



HAL
open science

Implication du microenvironnement sur la survenue de la maladie métastatique et l'apparition d'une maladie résiduelle dans les adénocarcinomes ovariens séreux

Raphaël Lis

► **To cite this version:**

Raphaël Lis. Implication du microenvironnement sur la survenue de la maladie métastatique et l'apparition d'une maladie résiduelle dans les adénocarcinomes ovariens séreux. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: 2011PA11T079 . tel-00753251

HAL Id: tel-00753251

<https://theses.hal.science/tel-00753251>

Submitted on 19 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champs disciplinaires : Biologie cellulaire et Moléculaire
Ecole Doctorale de rattachement : Cancérologie

**Implication du microenvironnement sur la survenue de la maladie
métastatique et l'apparition d'une maladie résiduelle dans les
adénocarcinomes ovariens séreux**

Sous la direction du
Dr Massoud MIRSHAHI

Présentée et soutenue publiquement
par
Raphael LIS
Le 18 novembre 2011

JURY

Président de Jury : Professeur Christian AUCLAIR
Rapporteur : Professeur Bettina COUDERC
Rapporteur : Professeur Jean Paul THIERY
Examineur : Docteur Arash RAFII TABRIZI
Directeur de thèse : Docteur Massoud MIRSHAHI

“I’ve found you’ve got to look back at the old things and see them in a new light.”

John Coltrane

A Lucien.

Remerciements:

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Jean-Pierre Marie pour son accueil au sein de l'équipe « résistance et survie des cellules tumorales » de l'unité INSERM-UMRS872. Merci pour vos remarques constructives et vos conseils avisés.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Docteur Massoud Mirshahi pour avoir encadré ce travail. Vos compétences scientifiques multiples et variées ainsi que votre constante disponibilité m'ont permis de mener « bel et bien » ce travail. Travailler à vos côtés m'a été extrêmement enrichissant, tant sur le plan scientifique qu'humain.

J'exprime mon profond respect et mon amitié la plus sincère au Docteur Arash Rafii Tabrizi. Un jour tu as écrit que pour réussir ma thèse il me faudrait renoncer à mon port de pantalon si particulier, que tout le monde m'envie, sur ce point précis je te concède un demi échec. Tu avais poursuivi par cette phrase prémonitoire : « [...] on le trouvera le labo de rêve avec DES RESULTATS, DES RESULTATS ! Tous les jours. ». A cette époque on ne savait pas encore que le labo de rêve se trouvait à quelques 6000 kilomètres d'ici, que ce n'était encore qu'une coquille vide (« fully fonctionnal » quelle blague !!), et finalement, trois années plus tard que de chemin parcouru ! Jérémie, merci de m'avoir fait partager cette expérience qatarienne, ce fut dur, souvent long, mais quel bel apprentissage. Ce travail est le tien.

Je suis sincèrement reconnaissant au Professeur Jean Paul Thiery d'être rapporteur de ce travail. C'est un grand honneur que de vous compter parmi ce jury.

Je remercie vivement le Professeur Bettina Couderc. Vous avez été un de mes maitres à l'université Paul Sabatier à Toulouse. Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie également respectueusement le Professeur Christian Auclair de présider le jury de soutenance.

Merci à toute l'équipe 18, présente aux Cordeliers et à l'Hôtel Dieu, pour son aide et sa gentillesse.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Amu Therwath pour son aide et pour les discussions que nous avons pu avoir autour d'un « p'tit café ».

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mon amitié la plus sincère au Dr Cyril Touboul. Tu m'as appris tout ce que je sais sur les aspects cliniques de la gynécologie-oncologie ainsi que sur l'éthique praticien hospitalier-patient. Tu m'auras accompagné tout au long de cette thèse, que de bons moments partagés (Hiromi, les cours de karaté, le taboulé !!!, Tableman et John Singer, Skype...). J'espère que ce travail constitue le début d'une longue collaboration, et la suite d'une grande complicité.

Merci à tout le laboratoire de recherche sur les cellules souches et leur microenvironnement du Weill Cornell Medical College-Qatar. Merci plus particulièrement

au Docteur Christophe Raynaud, j'ai (ré) appris beaucoup d'expressions désuètes à tes côtés (quel plaisir), et j'ai enfin pu partager mon expérience particulière avec la boulangère du Tignet avec quelqu'un...ne changes rien.

Merci à Mahtab Maleki pour sa bonne humeur, son soutien, et parfois ses coups de gueule sur ma sale habitude de laisser traîner ma tasse de café un peu partout !

Merci à Salma Abdallah, Pegah Ghiabi, aux petites nouvelles, Bella Guerrouahen et Jennifer Pasquier. Avoir travaillé à vos côtés fût un grand plaisir.

Je n'oublie pas les étudiants en médecine du Weill Cornell Medical College-Qatar, Joshi, Rim, Mahmoud, Sam, Maya, Fadwa, Danial, Sharon, Tasnim... Avoir pu vous encadrer lors des innombrables projets UREP fût une grande chance pour moi.

Un ENORME merci à Hussein Jaber, le seul qui soit arrivé à me faire sourire lorsqu'il m'annonçait que mes réactifs ne seraient pas au laboratoire avant 3 mois ! You're unique, you're Superman.

A Ali Hamam Abdullah al Abdullah pour sa gentillesse, sa générosité et sa grande culture.

Aux enseignants-chercheurs et professeurs qui m'ont tout appris, Estelle Espinos, Herve Prats, Joost van Meerwijk, Christophe Cazaux, Laurence Lamant, Mary Poupot, Jean Jacques Fournie et tant d'autres.

Au ministère de la recherche et de la technologie pour avoir financé ce travail.

A la Qatar Foundation pour avoir financé une partie de ce travail.

A ma famille, mes parents, mes frères.

Aux ADVistes (Jeanne, Hugo, « Le Gosier », « l'Ancêtre », Dorothee...) pour m'avoir fait passer une dernière année de thèse délicieuse sur Paris et sa banlieue, et ce malgré les maux de têtes et les samedis perdus ...

A mes amies, Carole, Magali, pour leur soutien inconditionnel.

A Guillaume pour avoir pu et su supporter le fameux : « j'finis une manip, j'arrive dans 10 minutes ».

Sommaire

1 Introduction.....	12
1.1 Adénocarcinomes ovariens : aspects cliniques et prises en charge.....	12
1.1.1 Généralités.....	12
1.1.2 Diagnostic.....	12
1.1.3 Prise en charge thérapeutique des cancers épithéliaux de l'ovaire.....	16
1.1.4 De la physiopathologie à la stratégie de recherche.....	17
1.2 Impact du microenvironnement tumoral sur la survenue des métastases ovariennes.....	18
1.2.1 « Seed and Soil » : perspectives historiques.....	18
1.2.2 Pathogénèse de la métastase.....	21
1.2.3 Déterminants génétiques de la métastase ovarienne.....	23
1.2.4 Particularités des métastases péritonéales ovariennes.....	27
1.2.5 Niche pré-métastatique et microenvironnement péritonéal.....	29
1.3 Les résistances aux thérapies : des résistances intrinsèques au microenvironnement.....	32
1.3.1 Résistances aux sels de platines.....	32
1.3.1.1 Généralités.....	32
1.3.1.2 Réparation des adduits de l'ADN.....	34
1.3.1.3 Détoxification des complexes de platines.....	34
1.3.1.4 Système d'efflux et résistances aux platines.....	35
1.3.1.5 La signalisation pro-apoptotique induite par le cis-platine.....	35
1.3.2 Résistances aux taxanes.....	37
1.3.2.1 Généralités.....	37
1.3.2.2 Système d'efflux et résistances aux taxanes.....	37
1.3.2.3 Mutations de la tubuline.....	38
1.3.2.4 Résistances aux taxanes : conclusions.....	39
1.3.3 Les résistances liées au microenvironnement.....	40
1.4 Les cellules souches mésenchymateuses, rôle dans la progression métastatique et la chimiorésistance.....	42
1.4.1 Généralités.....	42
1.4.2 Origines des cellules souches mésenchymateuses, phénotype et différenciation.....	44
1.4.3 MSC, processus inflammatoires et cicatrisants.....	47
1.4.4 Recrutement des MSC au niveau du stroma tumoral ovarien.....	48
1.4.5 Influence des MSC sur la progression tumorale ovarienne.....	50
1.4.6 Rôle des MSC sur l'émergence de résistance aux chimiothérapies.....	53
1.4.7 Démarche de recherche sur les MSC.....	54
1.5 Participation des cellules endothéliales aux résistances des adénocarcinomes ovariens : rôle de la voie Jagged1/Notch3.....	55
1.5.1 Généralités.....	55
1.5.2 Les facteurs angiocrines.....	56
1.5.3 Cellules endothéliales associées aux tumeurs : activation chronique d'AKT.....	58
1.5.4 Un modèle de niche vasculaire tumorale : rôle du gène l'adénovirus E4ORF1.....	61
1.5.4.1 Généralités.....	61
1.5.4.2 Le gène E4ORF1 de l'adénovirus.....	62

1.5.5	Role de la voie Notch dans les cancers de l’ovaire.....	65
1.5.5.1	Généralités sur la voie Notch.....	65
1.5.5.2	Notch3 est amplifié dans les cancers de l’ovaire.....	66
1.5.5.3	Fonction de la signalisation Notch3 dans les cancers de l’ovaire.....	67
1.5.5.4	Implication du gène Notch3 dans les résistances aux thérapies.....	67
1.5.6	Démarche de recherche sur les cellules endothéliales.....	69
1.6	Organisation de l’ouvrage.....	70
2	<u>Matériels et méthodes.....</u>	71
2.1	Culture cellulaire.....	71
2.2	Co-cultures.....	72
2.3	Test d’adhérence.....	72
2.4	Test de migration/invasion.....	72
2.5	Cytométrie en flux.....	72
2.6	Traitement hyperthermique.....	73
2.7	Test de viabilité par cytométrie en flux : Calcein-AM / Live Dead.....	73
2.8	Analyse du secretome.....	73
2.9	Analyse du transcriptome.....	74
2.10	Analyse des voies de transcription, Ingenuity Pathway Analysis.....	74
2.11	Isolation de cellules tumorales ovariennes primaires.....	75
2.12	Analyse de la variation du nombre de copie des gènes.....	75
2.13	Génération et maintenance des cellules endothéliales E4ORF1.....	75
2.14	Analyse de la phosphorylation de protéines.....	76
2.15	Cytométrie en flux et apoptose array.....	76
3	<u>Résultats.....</u>	78
3.1	Article 1: Modifications transcriptomiques des cellules tumorales ovariennes par les cellules souches mésenchymateuses: génération d’un profil pro-métastatique.....	78
3.1.1	Résumé long.....	78
3.2	Article 2: Les cellules souches mésenchymateuses protègent les cellules tumorales ovariennes de la mort induite par l’hyperthermie grâce à la sécrétion de la cytokine CXCL12.....	96
3.2.1	Résumé long.....	96
3.3	Article 3 : Les cellules endothéliales activant la protéine AKT, protègent les cellules tumorales des traitement conventionnels de chimiothérapies, par l’activation de la voie Notch.....	109
3.3.1	Résumé long.....	109
4	<u>Discussion.....</u>	126
4.1	Discussion sur l’impact des cellules souches mésenchymateuses sur la biologie des tumeurs ovariennes.....	126
4.2	Discussion sur le rôle des cellules endothéliales sur l’émergence de résistance aux chimiothérapies.....	132
5	<u>Références bibliographiques.....</u>	138
6	<u>Annexes.....</u>	164

Liste des abréviations:

AND	Acide Desoxyribo-Nucleique
ARN	Acide Ribo-Nucleique
ALDH	ALdehyde DesHydrogenase
ABC	ATP Binding Cassette
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide 7
BMDC	Bone Marrow Derived Cells
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BMP6	Bone Morphogenetic Protein 6
BDNF1	Brain-Derived Neurotrophic Factor 1
BRCA	BReast CAncer
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
CA125	Cancer Antigen 125
CA-MSC	Carcinoma Associated Mesenchymal Stem Cells
CSL	<u>C</u> BF1/ <u>R</u> BP- <u>J</u> k/ <u>S</u> uppressor of Hairless/ <u>L</u> AG-1
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CHIP	Chimiothérapie Hyperthermique IntraPeritoneale
CSPG4	Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	Colony-Formating Unit - Fibroblastic
DLL4	Delta-like 4
DLL1	Delta-like-1
DLL3	Delta-like-3
dUTPase	deoxyUridine TriphosPhatase
Dlg1	Drosophila disc large tumor suppressor 1
E4ORF1	Early gene 4 Open Reading Frame 1
E4ORF1-PEC	Early gene 4 Open Reading Frame 1- Primary Endothelial Cell
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementation group 1
FIGO	Fédération Internationale des Gynécologues Obstétriciens
FOXO	forkhead box O
FPRL1	Formyl peptide receptor-like 1
GGR	Global Genomic Repair
GST	Gluthation-S-Transferase

G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HAS	Haute Autorite de Sante
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2
ICAM1	InterCellular Adhesion Molecule 1
IL10	Interleukin 10
ISSCR	International Society for Stem Cell Research
LPA	LysoPhosphatidic Acid
LPAR	LysoPhosphatidic Acid Receptor
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MT	MetalloThionein
miARN	micro Acide Ribo-Nucleique
MCM2	mini-chromosome maintenance protein 2
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
MUC16	Mucin 16, cell surface associated
MDR	Multi Drug Resistance
MRP	Multi Resistance Protein
NO	Nitric Oxyde
NICD	Notch Intracellular Cytoplasmic Domain
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NER	Nucleotide Excision Repair
OMS	Organisation Mondiale de la Sante
OCP	Ovarian Cancer Prognostic Profile
PBM	PDZ Binding Motif
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinases
PEDF	pigment-epithelium derived factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PSD95	Post synaptic density protein Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor
PDZ	1,Zonula Occludens-1
PEC	Primary Endothelial Cell
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RhoA	Ras Homolog Family Gene, member A
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
SMAD3	S-mothers against decapentaplegic homolog 3

SOX11	SRY-related HMG-box 11
SLP1	Synaptotagmin-like protein 1
CNS	Systeme Nerveux Central
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGFbeta1	Transforming Growth Factor beta 1
TGFbetaR1	Transforming Growth Factor beta Receptor 1
TNM	Tumor Node Metastase
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF-C	Vascular Endothelial Growth Factor C
VPF	Vascular Permeability Factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XPA	Xeroderma Pigmentosum, complémentation group A
ZO-1	Zonula Occludens-1

Table des figures :

Figure 1: Pathogénèse de la métastase et théorie du « seed and soil »	21
Figure 2: Mise en évidence d'une signature transcriptomique pronostique dans les cancers de l'ovaire : « Ovarian Cancer Prognostic Profile »	25
Figure 3: Mise en évidence de l'existence de sous type distincts d'adénocarcinomes ovariens séreux, et création d'une nouvelle signature pronostique.....	27
Figure 4: Expérience de pose de drain péritonéo-veineux sur la dissémination métastatique des adénocarcinomes séreux ovariens.....	29
Figure 5: Mobilisation des cellules hématopoïétiques pro-génitrices (HPC) vers la niche pré-métastatique.....	32
Figure 6: Mécanismes de résistances aux sels de platines mises en œuvre par les cellules tumorales ovariennes.	34
Figure 7: Composition du microenvironnement tumoral et résistances liées au stroma tumoral.....	42
Figure 8: Phénotype et caractère multipotent des cellules souches mésenchymateuses ou cellules stromales mésenchymateuses.	46
Figure 9: Recrutement des MSC au stroma tumoral ovarien, rôle sur la progression des adénocarcinomes.	53
Figure 10: Participation des cellules endothéliales au stroma tumoral	56
Figure 11: Les cellules endothéliales associées aux tumeurs phosphoryle la protéine AKT.	60
Figure 12: Présentation du modèle PEC-E4ORF1.	64
Figure 13: Généralités sur la voie Notch.....	66
Figure 14: Amplification du gène Notch3 dans les adénocarcinomes séreux ovariens.....	67
Figure 15: L'expression de Notch3 est de mauvais pronostic dans les adénocarcinomes ovariens séreux.....	69
Figure 16: Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur l'effet des MSC sur la biologie des cellules tumorales ovariennes.....	130
Figure 17: Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur l'effet des E4ORF1-PEC sur l'émergence de résistances aux thérapies.	134

Table des tableaux :

Tableau 1: Classification OMS 2003 des tumeurs de l'ovaire.	15
Tableau 2: Classification FIGO et correspondance avec la classification TNM.....	16
Tableau 3: Etapes nécessaires à la pathogénèse de la métastase.....	23
Tableau 4: Les facteurs angiocrines produits par la niche vasculaire.	58

Résumé:

Trop souvent diagnostiqués à des stades tardifs du fait de leur quasi asymptotomie, les adénocarcinomes séreux ovariens posent un véritable problème de santé publique.

Malgré les progrès récents de prise en charge chirurgicale, l'émergence d'une maladie résiduelle microscopique chimiorésistante impacte grandement le pronostic des patientes.

Le microenvironnement tumoral est un acteur clé de la progression tumorale et de l'émergence de résistances aux traitements anticancéreux. Durant ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à deux composants majeurs du stroma tumoral, d'une part les cellules souches mésenchymateuses, d'autre part les cellules endothéliales.

Nous avons pu démontrer que les cellules souches mésenchymateuses participent à la progression tumorale et l'émergence de résistances. Enfin nous avons démontré que les cellules endothéliales, via la production de facteurs angiocrines, participent à la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes.

Dans ce travail, nous avons pu définir de nouvelles cibles thérapeutiques mettant en jeu la relation entre les cellules tumorales ovariennes et l'hôte.

Mots clés : cancer de l'ovaire, chimiorésistance, microenvironnement tumoral, cellules souches mésenchymateuses, cellules endothéliales.

Abstract :

Ovarian cancers constitute a poor prognosis disease. Due to their absence of symptoms, ovarian cancers are generally diagnosed at late stages. Despite major breakthrough regarding ovarian cancer surgery, minimal residual disease-induced relapse is still a hurdle for clinicians.

Tumor microenvironment is a key actor on disease progression and resistance to therapy. In this study, we have focused on two major components of the tumor stroma, on one hand, the mesenchymal stem cells, and the endothelial cells on the other hand.

We were able to demonstrate that mesenchymal stem cells are critically involved in ovarian cancer progression and resistance to therapy, while the endothelium, through production of angiocrine factors, is deeply involved in resistance of ovarian cancer cells to platinum and taxane based therapy.

Here, we set forth the idea that disrupting the relationship between ovarian cancer cells and their host stroma constitute a new therapeutic window.

Key words: ovarian cancer, chemoresistance, tumor microenvironment, mesenchymal stem cells, and endothelial cells.

1 Introduction.

1.1 Adénocarcinomes ovariens : aspects cliniques et prises en charge.

1.1.1 Généralités.

L'incidence des cancers en France en 2008 est estimée à 333 000 nouveaux cas par an, dont 144 000 cas chez des femmes. Le cancer de l'ovaire est la septième cause de cancer chez la femme en incidence avec 4 430 nouveaux cas estimés en 2008 (derrière le cancer du sein, du côlon, du poumon, de la thyroïde, de l'endomètre et les lymphomes non hodgkiniens) ¹. L'âge médian lors du diagnostic est de 65 ans ¹.

Le facteur de risque le plus important du cancer de l'ovaire est d'origine génétique. Environ 10% des cancers de l'ovaire surviennent dans un contexte de prédisposition génétique. Ils sont alors souvent liés à une mutation des gènes BRCA (BReast CAncer) 1 ou 2 et surviennent avant 60 ans¹. Ils seraient de meilleur pronostic, car plus chimio-sensibles que les cancers sporadiques². La nulliparité, les règles précoces, la ménopause tardive et l'âge sont également associés à une augmentation du risque. La contraception orale, la grossesse, l'allaitement et la ligature des trompes sont en revanche associés à une diminution du risque de cancer de l'ovaire³.

La vitesse d'évolution des cancers de l'ovaire est mal connue. Certains possèdent une longue période de latence clinique propice à un diagnostic précoce. D'autres évoluent rapidement vers une dissémination péritonéale.

Le cancer de l'ovaire est la quatrième cause de décès par cancer chez la femme derrière le cancer du sein, du côlon et du poumon avec plus de 3 000 décès estimés en 2008. La survie à 5 ans, tous stades confondus, est d'environ 45 % ^{1,4}.

Plus de 90 % des cancers de l'ovaire chez l'adulte sont des cancers épithéliaux (adénocarcinomes) ¹.

1.1.2 Diagnostic.

Le diagnostic peut être évoqué à un stade précoce en l'absence de symptôme devant une masse annexielle découverte dans le cadre d'un suivi gynécologique ou d'une échographie.

Le plus souvent néanmoins, le diagnostic est évoqué alors que le cancer est à un stade avancé. En effet, du fait de la situation anatomique des ovaires, une tumeur ovarienne peut atteindre un volume important avant de provoquer des symptômes qui peuvent être très variés et ne sont jamais spécifiques⁵.

Ils doivent alerter lorsqu'ils sont d'installation récente, perdurent quelques semaines et qu'ils ne sont notamment pas expliqués par une pathologie digestive.

Les signes cliniques de découverte d'un cancer de l'ovaire peuvent inclure notamment : un simple inconfort abdominal ; des douleurs pelviennes ou abdominales ; une augmentation progressive du volume abdominal due à une masse ou à une ascite ; des saignements ; des pertes vaginales anormales ; des symptômes de compression abdominopelvienne : troubles du transit, sub-occlusion, faux besoins, symptômes urinaires (impériosités, pollakiurie) ; plus rarement, un œdème d'un membre inférieur, une phlébite ou une sciatalgie par compression veineuse ou radiculaire ; une dyspnée qui peut être en rapport avec un épanchement pleural ; une douleur thoracique ou enfin une altération de l'état général.

Le diagnostic de certitude de cancer est anatomopathologique et nécessite un prélèvement histologique. L'examen cytologique seul est insuffisant pour établir le grade et le type histologique du cancer.

Devant une masse pelvienne suspecte isolée, le prélèvement sera la pièce chirurgicale. En cas de carcinose péritonéale, une biopsie sera réalisée sous coelioscopie ou sous contrôle d'imagerie si la coelioscopie est impossible.

Avant toute biopsie, il est nécessaire d'anticiper si besoin l'arrêt d'un traitement par anticoagulants oraux ou par antiagrégants plaquettaires et de réaliser un bilan d'hémostase.

L'examen anatomopathologique précise le type histologique de la tumeur selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Table 1). Les cancers épithéliaux représentent plus de 90 % des cancers de l'ovaire de l'adulte¹. Les sous-types sont : séreux, mucineux, endométrioïdes, à cellules claires, à cellules transitionnelles, mixtes, et indifférenciés. Le degré de différenciation histologique (grade 1, 2, 3) apparaît comme un facteur pronostique important (cf. Table 2 Classification FIGO [Fédération Internationale des Gynécologues Obstétriciens] et correspondance avec la classification TNM [Tumor Node Metastase])¹.

Tumeurs épithéliales	Tumeurs du stroma gonadique et des cordons sexuels et tumeurs stéroïdes
Séreuses Mucineuses Endométrioïdes A cellules claires A cellules transitionnelles Épithéliales mixtes Indifférenciées	Fibrome Thecome Fibrosarcome Stromale avec composante mineure des cordons sexuels Stromale sclérosante Stromale à cellules en bague à chaton Cordons sexuels A cellules de la granulosa Type adulte Type Juvenile A cellules de Sertoli-Leydig A cellules de Sertoli Du stroma gonadique et des cordons sexuels de type mixte et formes indifférenciées Gynandroblastome A cellules de Sertoli avec tubes annelés Des cordons sexuels indifférenciées A cellules stéroïdes Lutéome stromal
Tumeurs Germinales	Tumeurs mixtes des cordons sexuels et germinales
Teratomes Pluritissulaires - matures - immatures Monotissulaires Struma ovarii (goitres ovariens) Carcinoïdes Neuroectodermiques Germinales primitives Dysgerminomes Vitellines Carcinomes embryonnaires Choriocarcinomes non gestationnels Polyembryomes Tumeurs germinales mixtes	Gonadoblastomes Tumeurs mixtes des cordons sexuels et des cellules germinales
Tumeurs du rete ovarii	Autres
Adénomes Adénocarcinomes	Carcinomes à petites cellules Carcinomes neuroendocrines à grandes cellules Carcinomes hépatoïdes Carcinomes adénoïdes kystiques FATWO (tumeur Wolffienne) Parangliomes Myxomes Lymphomes Tumeurs conjonctives

Tableau 1 : Classification OMS 2003 des tumeurs de l’ovaire.

On peut ici soulever un premier problème, même si les cancers de l’ovaire de bas stade (I-II) sont de pronostic assez favorable avec une survie à 5 ans, respectivement, de 89% et 59% des patientes diagnostiquées, l’absence de symptômes spécifiques et distincts pour

la patiente et le praticien hospitalier, conduit à un diagnostic des cancers de l’ovaire aux stades avancés, III et VI pour les deux tiers des cas. Ces stades avancés engagent très sérieusement le pronostic, avec une survie à 5 ans de 35% pour les stades III et 22% pour les stades VI⁴. Ainsi, et ce malgré une incidence assez faible (3% des cancers diagnostiqués seulement), il est responsable de 6% des décès liés aux cancers soit la quatrième cause de mortalité parmi les cancers de la femme. Pour ces raisons plusieurs tentatives d’études de préventions secondaires basées sur la sonographie transvaginale et/ou dosage de marqueur sérique comme le CA125 (Cancer Antigen 125) ont été développées. Elles ont pourtant échoué à montrer un bénéfice en terme de survie globale en essais randomisés.

Stade FIGO	TNM	Bilan d’extension	Survie à 5 ans
I	T1	Tumeur limitée aux ovaires	84%
IA	T1a	Tumeur limitée à un seul ovaire avec capsule intacte.	
IB	T1b	Tumeurs des deux ovaires, capsules intactes	
IC	T1c	Rupture capsulaire ou tumeur à la surface ovarienne ou cellules malignes dans le liquide d’ascite ou de lavage péritonéal	
II	T2	Tumeur ovarienne étendue au pelvis	59%
IIA	T2a	Extension à l’utérus et/ou aux trompes	
IIB	T2b	Extension aux autres organes pelviens	
IIC	T2c	Extension pelvienne avec cellules malignes dans le liquide d’ascite ou de lavage péritonéal	
III	T3 et/ou N1	Métastases péritonéales au-delà du pelvis et/ou adénopathies métastatiques régionales	35%
IIIA	T3a	Métastases péritonéales microscopiques	
IIIB	T3b	Métastases péritonéales macroscopiques < 2 cm	
IIIC	T3c et/ou N1	Métastases péritonéales > 2 cm et/ou adénopathies métastatiques régionales	
IV	M1	Métastases à distance (autres que les métastases péritonéales)	22%

Tableau 2 : Classification FIGO et correspondance avec la classification TNM

1.1.3 Prise en charge thérapeutique des cancers épithéliaux de l'ovaire.

Nous traiterons dans cette section exclusivement de la prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes ovariens séreux de stades avancés (III ou VI).

De façon très générale, on peut estimer que la prise en charge thérapeutique des patientes atteintes de cancer de l'ovaire épithélial de stade avancé comprend une chirurgie et une chimiothérapie.

L'intervention standard minimale (tous stades confondus) comprend une annexectomie bilatérale avec hystérectomie totale (femme ménopausée ou femme ne désirant plus d'enfant). La stadification complète sous réserve des conditions d'opérabilité comprend au minimum une omentectomie totale, une appendicectomie (surtout pour les formes mucineuses), un curage ganglionnaire pelvien et aortique infrarénal bilatéral, des biopsies péritonéales, une cytologie péritonéale. L'objectif de la chirurgie des cancers de l'ovaire de stade avancé est la résection complète ou debulking optimal (absence de résidu macroscopique) ⁶. Ce « debulking » est ensuite suivi d'une chimiothérapie de six cycles minimum à base de Carboplatine et de Paclitaxel ^{4,7}.

Si la résection complète ne peut être obtenue d'emblée, une chimiothérapie néo-adjuvante peut être réalisée : une chirurgie d'intervalle (entre deux cures de chimiothérapie, au plus tard après la 3^{ème} cure) est ensuite envisagée, avec pour objectif de réaliser un « debulking » optimal ⁶.

La chirurgie de première intention bien que considérée pendant très longtemps comme le traitement standard dans les cancers de l'ovaire de stades avancés face au couple chimiothérapie néo-adjuvante puis « debulking » est aujourd'hui soumise à « controverse » et surtout à l'appréciation du praticien hospitalier. Les récents travaux d'Ignace Vergote ⁸ tendent à montrer que la chirurgie de première intention suivie d'une chimiothérapie comparée à une chimiothérapie néo-adjuvante suivie d'une chirurgie d'intervalle présente le même taux de survie globale dans le cadre d'un essai randomisé. Ainsi le seul facteur pronostique indépendant entre ces deux approches demeure la qualité de la résection qu'elle soit de première ou seconde intention ⁸.

1.1.4 De la physiopathologie à la stratégie de recherche.

Les adénocarcinomes ovariens sont donc des cancers diagnostiqués relativement tardivement. La prise en charge thérapeutique consiste à un geste de chirurgie associé à une chimiothérapie. Bien que 70 à 80% des patientes répondent au traitement standard de première intention, le taux de rechute des stades évolués est élevé. En effet, environ 75% des patientes présentent une rechute après une première ligne de traitement contenant habituellement du Carboplatine et du Paclitaxel. Cela peut s'expliquer, entre autres, par un taux de réponse histologique incomplet après la première ligne de chimiothérapie⁷. Ainsi, le délai médian de rechute est relativement court et intervient 15,5 à 22 mois après la prise en charge thérapeutique.

Le péritoine est le site préférentiel des rechutes. Ces rechutes se produisent à partir d'éléments cellulaires peu nombreux, souvent isolés : la maladie minimale résiduelle. La physiopathologie de la rechute implique, d'une part, des mécanismes primaires de chimiorésistance permettant la survie d'une population tumorale, d'autre part un environnement permissif au développement d'un foyer de rechute.

Un des challenges de la prise en charge des cancers de l'ovaire est donc la persistance, et ce malgré le traitement médical et chirurgical optimal, d'une maladie résiduelle microscopique. Les mécanismes, à l'origine de la chimiorésistance primaire, puis de la maladie résiduelle microscopique ne sont pas clairement compris. Le péritoine représentant le site de la maladie résiduelle, nous avons voulu à travers ce travail, identifier le rôle possible des cellules du microenvironnement péritonéal dans les mécanismes à l'initiative des rechutes.

1.2 Impact du microenvironnement tumoral sur la survenue des métastases ovariennes.

1.2.1 « Seed and Soil » : perspectives historiques.

Les tumeurs malignes se caractérisent par leur prolifération rapide, leur état de différenciation aberrant au regard du tissu d'origine et leur capacité à donner naissance à des foyers métastatiques. Le terme de « métastases » a été introduit par Jean Claude Recamier en 1829⁹ et est aujourd'hui défini par « le transfert, la dissémination de la maladie à un organe distant ».

La genèse d'une métastase est un processus complexe et séquentiel. Elle met en jeu une série d'étapes limitées qui dépendent à la fois des propriétés intrinsèques des cellules mais aussi de la réponse de l'hôte¹⁰. En 1889, Stephen Paget, chirurgien anglais, identifie les rôles de l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules de l'hôte sur l'apparition des métastases¹¹ en posant la question suivante : « Quels sont les déterminants à la base du tropisme métastatique pour certains organes ? ». Son étude, basée sur l'autopsie de 735 patientes atteintes de cancer du sein, montre une absence de corrélation entre le degré de perfusion des organes et leur susceptibilité aux métastases. Il constate une haute incidence des métastases au niveau du foie, des ovaires, des os, et au contraire peu, voire pas, de métastases au niveau de la rate¹¹. Cette observation vient contredire la théorie qui prévaut alors. En effet, selon Rudolf Virchow les métastases s'expliquent par l'embolie des cellules tumorales au niveau des arbres vasculaires capillaires¹². Il formule alors l'hypothèse du « seed and soil » (la graine et le sol), selon laquelle une cellule tumorale maligne (la graine) bien que disséminée doit trouver un organe permissif (le sol) au développement de la métastase¹¹.

En 1928, les travaux d'Ewing viennent contester les conclusions de Paget. Il explique que seul l'aspect mécanique secondaire entre la tumeur et les différents organes perfusés permettent d'expliquer la spécificité de la dissémination métastatique¹³. Les travaux séminaux de Fidler et al. ainsi que de Hart et al., durant les années 1970-1980 démontrent finalement que bien que les cellules tumorales circulent au travers de l'ensemble du réseau vasculaire, le développement métastatique reste contraint à certains organes spécifiques^{14,15}.

Les travaux des années 1970-1980, ont encouragé la recherche sur la pathogénèse de la métastase, résultant sur une description extensive du microenvironnement tumoral, la niche, de la tumeur primaire ou du foyer métastatique. Ils fournissent aussi une

démonstration princeps de l'hétérogénéité tumorale quant à son pouvoir métastatique : sélection de variant métastatique durant ou par le processus métastatique. Ainsi, les travaux de Stephen Paget constituent toujours une base pour la recherche sur la biologie de la métastase, et ce, cent vingt ans après leur publication. L'hypothèse du « seed and soil » est aujourd'hui communément acceptée, le « seed » étant référencé sous le nom, de cellules souches tumorales, cellule progénitrice, cellule initiatrice de tumeur ou encore variant métastatique, le « soil » sous les dénominatifs de stroma, niche, ou microenvironnement de l'organe cible ¹⁰.

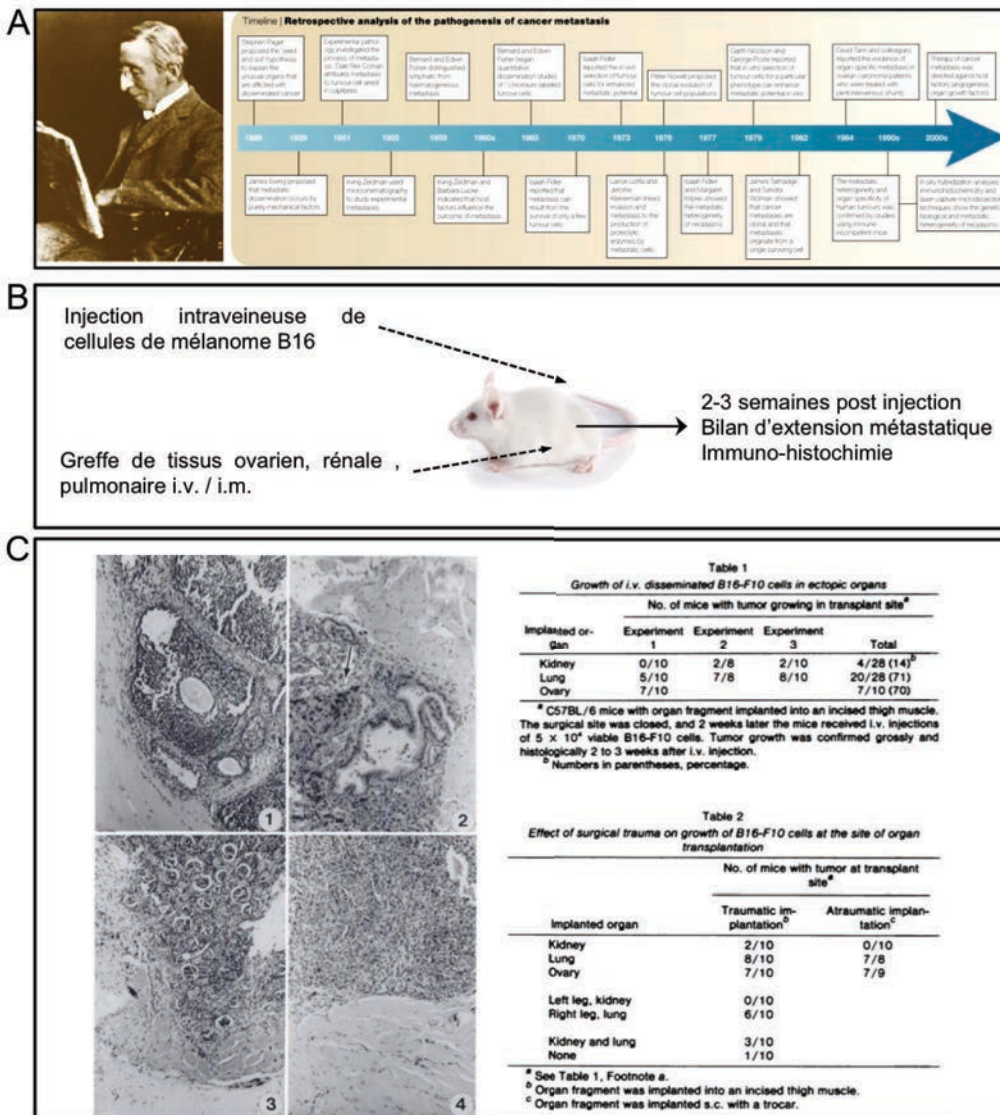


Figure 1: Pathogénèse de la métastase et théorie du « seed and soil »

A. Stephen Paget, et frise rétrospective sur la découverte de la pathogénèse de la métastase. **B.** Expérience princeps du groupe d'Isaiah J. Fidler validant la théorie du « seed and soil » énoncée en 1829. **C.** Expérience princeps de démontrant que les cellules tumorales circulent au travers de l'ensemble du réseau vasculaire, le développement métastatique reste contraint à certains organes spécifiques.

1.2.2 Pathogénèse de la métastase.

La genèse d'une métastase met en jeu une succession d'étapes interconnectées. Chacune de ces étapes peut être limitante dans la genèse de la métastase et interrompre la dissémination de la maladie ¹⁶. La réussite du processus métastatique dépend non seulement des capacités propres à la cellule maligne mais aussi de la réponse de l'organe cible, de l'hôte. Ainsi la dissémination métastatique est un équilibre entre l'hôte et la tumeur qui varie en fonction du terrain du patient ¹⁷.

En principe, les étapes nécessaires au développement d'une métastase sont généralisables à toutes les tumeurs dites « solides » (Table 3 et Figure 1). Ainsi, le développement d'un foyer métastatique nécessite qu'il développe un nouvel arbre vasculaire ¹⁸, échappe à la réponse immunitaire de l'hôte ^{19,20} et enfin réponde et s'adapte aux facteurs de croissance sécrétés par l'organe cible ²¹.

Il s'en suit que, seule une faible population cellulaire présente au sein de la tumeur primaire est capable de donner naissance à une métastase ¹⁵. Cette population peut être considérée comme le résultat de l'élimination des cellules circulantes n'ayant pu compléter les étapes listées en Table 3. La complexité de la progression métastatique peut expliquer, en partie, pourquoi la dissémination métastatique est considérée comme un phénomène peu efficace ¹⁶. Par exemple, la présence de cellules tumorales circulantes n'est pas prédictive de l'émergence d'une métastase, en effet la majorité des cellules tumorales qui pénètre la circulation sanguine est rapidement éliminée. Elle est, cependant, dans certaines études prédictive de la rechute à distance ²². L'injection intraveineuse de cellules radio-marquées de la lignée melanomateuse B16 chez la souris nous révèle que 24 heures après l'injection, seulement 0.1% des cellules restent viables, puis seulement 0.01% des cellules sont capables de survivre dans la circulation sanguine/lymphatique pour donner naissance à une métastase expérimentale ²³. Ces observations, questionnent un aspect important de la biologie de la métastase : le développement métastatique est-il le fait d'une survie et d'une prolifération fortuite des cellules tumorales malignes ? Ou est-ce la résultante d'une infime population capable de l'initier dans un organe donné ^{14,16}.

Etape	Description
1	Après les évènements de transformation, la croissance des cellules néoplasiques est généralement progressive et lente.
2	La masse tumorale excède 1 à 2 mm de diamètre, la masse tumorale est vascularisée via le phénomène de néo-angiogenèse. La synthèse et la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, bFGF) ont un rôle critique dans l'établissement d'un nouveau réseau vasculaire.
3	Invasion locale du stroma par les cellules malignes, cette invasion s'effectue par plusieurs mécanismes (dégradation de la matrice, transition épithélio-mésenchymateux...). Cette invasion cible notamment, mais pas uniquement, les vaisseaux sanguins et lymphatiques, structures qui n'offrent que peu de résistance à l'envahissement tumoral.
4	Détachement et embolisation d'agrégats de cellules tumorales.
5	Circulation des emboles tumorales au sein du réseau vasculaire et lymphatique.
6	Survie des cellules tumorales (résistance à l'anoikis) circulantes, et arrêt dans les lits capillaires.
7	Extravasation des cellules tumorales, mettant en jeu des mécanismes similaires à l'envahissement du stroma de l'organe primaire.
8	Prolifération des cellules tumorales au sein du parenchyme de l'organe cible. Il s'agit du développement de la micro-métastase.
9	Néo-angiogenèse métastatique, et développement de mécanismes immunosuppresseurs.
10	Ré-initiation du processus métastatique : métastase de métastase.

Tableau 3: Etapes nécessaires à la pathogénèse de la métastase.

1.2.3 Déterminants génétiques de la métastase ovarienne.

Les récentes avancées technologiques dérivées du séquençage du génome humain ont rendu possible l'analyse à haut débit du génome, et du transcriptome des tumeurs, permettant ainsi de questionner le processus complexe de la progression métastatique. Une des avancées majeures fut l'application de l'étude du transcriptome comme outil de stadification et d'indicateur pronostique, tout d'abord dans les hémopathies malignes ^{24,25} puis dans les tumeurs solides ²⁶⁻²⁸. Les analyses bioinformatiques des larges banques de tumeurs ont établi des motifs d'expression génique capables de prédire les récurrences métastatiques.

Différentes signatures biologiques ont ainsi été obtenues. Leur impact dépend de la manière dont l'étude est construite (nature du prélèvement, stadification de la cohorte, contrôle qualité des transcrits isolés) ²⁹. Parmi l'ensemble des tumeurs solides, le cancer de l'ovaire constitue un modèle de choix. En effet, L'hétérogénéité de cette maladie, variabilité concernant le taux de survie, les différents sous-types histologiques, la période pendant laquelle la rechute est possible bien qu'incertaine, l'existence de modalités thérapeutiques extrêmement différentes et l'accès à des prélèvements de large cohortes de patients contribuent à faire du cancer de l'ovaire un excellent modèle quant à l'établissement d'une signature transcriptomique à visée pronostique ²⁹⁻³³.

Hartman et al., ont analysé par puce à ARN les tumeurs épithéliales ovariennes de 79 patientes afin de développer une signature moléculaire, capable de discriminer les patientes à risque de rechute précoce après une première ligne classique de chimiothérapies (sels de platines et paclitaxel) ³². Sur un cohorte d'entraînement de 51 patientes, Hartman et al. définissent une signature de 14 gènes permettant de discriminer un groupe de patientes sujettes à une rechute précoce (moins de 21 mois) et un second groupe à rechute plus tardive (plus de 21 mois) ³². Cette signature a été confirmée dans une cohorte indépendante de 21 patientes dite de validation ³². Dans cette étude, la survie globale a été analysée comme une variable dichotomique. Il est, cependant, peu clair que la limite choisie des 21 mois possède une justification clinique et/ou biologique même si elle reste dans la fourchette du délai médian de rechute de 15,6 à 22 mois ^{1,4}.

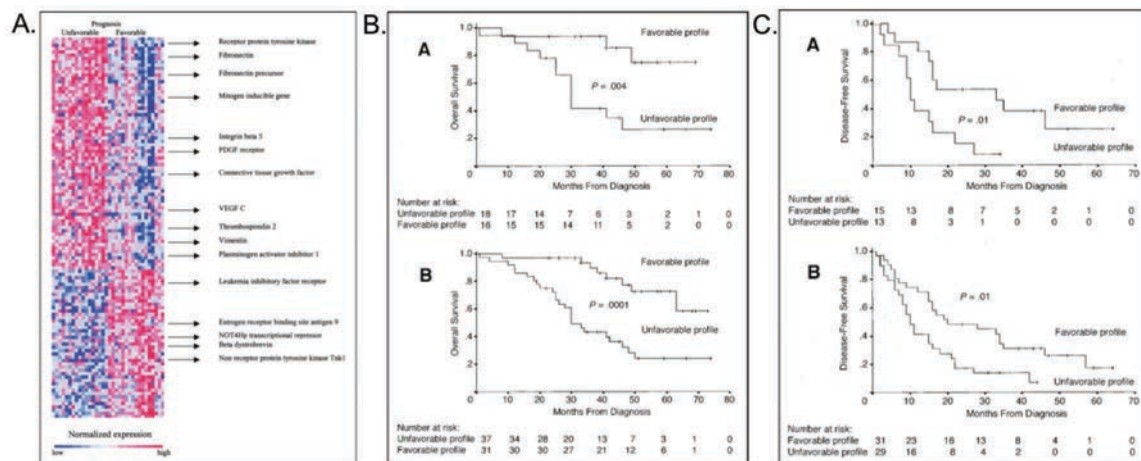


Figure 2: Mise en évidence d'une signature transcriptomique pronostique dans les cancers de l'ovaire : « Ovarian Cancer Prognostic Profile ».

A. Graphique d'expression des 115 gènes définissant la signature pronostique OCPP, les lignes représentent le niveau d'expression des gènes (rouge : surexprimé, bleu : sous-exprimé), les colonnes représentent les patientes recrutées dans le set d'entraînement. **B.** Association entre l'OCPP et la survie globale. Le set de validation est présente en B.A., on remarque que la médiane de survie du groupe de pronostic défavorable est de 30 mois et ne rejoint pas la médiane de survie du groupe de bon pronostic de 47.5 mois. Ces données sont validées en B.B. lorsque l'OCPP est appliqué à la fois au set d'entraînement et au set de validation. **C.** L'OCPP n'est pas seulement associé à la survie globale, elle est aussi capable de définir un groupe de bon pronostic en terme de survie sans récidence.

Figures adaptées de Spentzos, D. et al. Gene Expression Signature With Independent Prognostic Significance in Epithelial Ovarian Cancer. Journal of Clinical Oncology 22, 4700-4710 (2004).

Spentzos et al., en profilant une série de 68 patientes atteintes d'adénocarcinomes épithéliaux, ont défini une signature de 115 gènes appelée « Ovarian Cancer Prognostic Profile, OCPP » (Figure 2)³³. L'OCPP a une valeur pronostique sur la survie globale ainsi que sur la survie sans progression. Elle garde une valeur pronostique en analyse multivariée comparée aux facteurs de risque connus tels que l'âge, le stade de la tumeur, le grade de différenciation de la tumeur ainsi que la qualité de la résection³³. Les gènes de la famille du récepteur aux œstrogènes (comme l'antigène associé au site de liaison du récepteur aux œstrogènes) sont surexprimés dans le groupe de bon pronostic. Tandis que les gènes comme les cytokines et récepteur tyrosine kinase liées à la néo-angiogenèse tumorale (VEGF-C, Vascular Endothelial Growth Factor C, PDGFR), les marqueurs

mésenchymateux (fibronectine, fibromodulin, et vimentin), ainsi que des enzymes participant aux phénomènes d'invasion (plasminogen activator inhibitor type 1) sont eux surexprimés dans le groupe de mauvais pronostic³³.

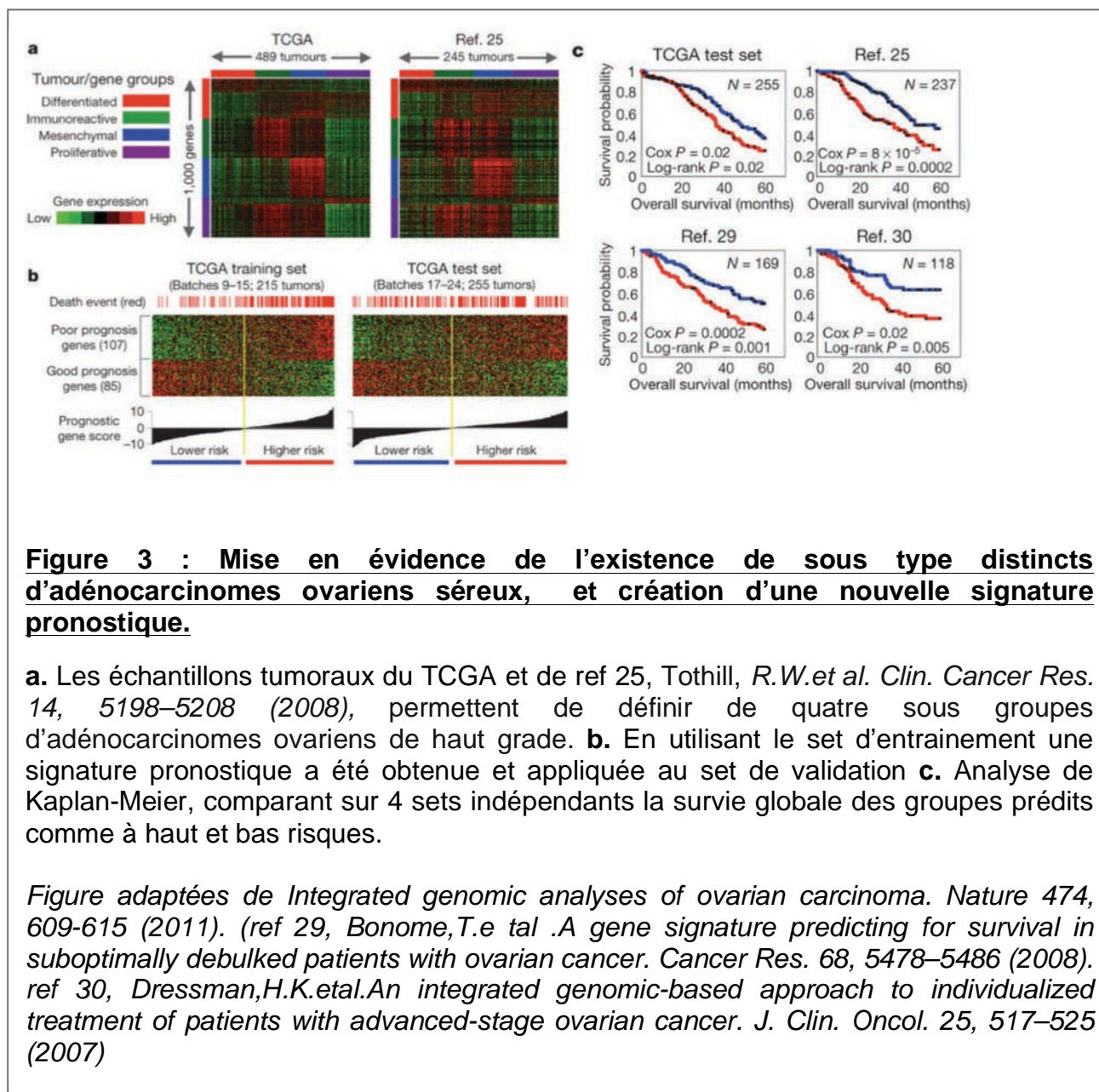
Réciproquement, les patientes atteintes de cancer de l'ovaire avancé présentent une signature transcriptomique distincte des patientes de stade précoce. Ces observations soutiennent l'hypothèse que les adénocarcinomes séreux ovariens sont une maladie extrêmement hétérogène et qu'ils représentent un sous type transcriptionnellement distinct des adénocarcinomes de stade précoces²⁹⁻³³. De façon surprenante, les différentes signatures transcriptomiques pronostiques identifiées par ces différents investigateurs ne partagent qu'un nombre restreint de gènes. De telles différences entre les études peuvent s'expliquer, entre autres, par l'utilisation de plateformes d'études différentes (Affymetrix^{30,31,33}, Agilent, modèles de puces), ainsi que l'algorithme de normalisation appliqué, ou encore le pourcentage de cellules tumorales au sein de l'échantillon étudié. Bien que les signatures diffèrent d'une étude à l'autre, ceci n'invalide pas leur pouvoir prédictif sur la rechute, cependant ces différentes signatures devraient être validées sur des cohortes de patientes indépendantes et plus importantes³⁴⁻³⁶.

Plus récemment le Cancer Genome Atlas (The Cancer Genome Atlas, TCGA) a entrepris d'étudier profondément la génétique des tumeurs de l'ovaire afin d'identifier de nouvelles cibles potentielles³⁷. Le TCGA met en œuvre une analyse de la variation du nombre de copies des gènes, du transcriptome, du statut de méthylation des promoteurs ainsi que de l'expression des micro-ARN (miRNA) sur 489 adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade, et obtient la séquence des exons sur 316 tumeurs du même type.

De façon assez surprenante, le spectre de mutations rencontré dans les adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade est assez simple. Les mutations sur le gène TP53 sont prédominantes et sont présentes dans 96% des échantillons testés, des mutations sur les gènes BRCA1 et BRCA2 sont retrouvées dans 22% des tumeurs³⁷. Cependant sur le profil d'expression des ARN messagers le TCGA est capable de définir quatre sous-types d'adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade respectivement : différencié (caractérisé par l'expression de MUC1, MUC16 et SLP1), immunoréactif (caractérisé entre autre par l'expression de CXCL10, CXCL11 et CXCR3), mésenchymateux (expression élevée des gènes de la famille HOX, ANGTL1 et 2) ou encore prolifératif (haute expression d'HMGA2, SOX11, MCM2, PCNA). Ces sous-types établis sur la base d'étude transcriptomique ne parviennent pas à résumer des groupes de patientes de bon ou mauvais pronostique³⁷.

Le TCGA sur la base des études transcriptomiques définit néanmoins une signature de 193 gènes capable de discriminer des groupes de patientes de bon et de mauvais pronostic (Figure 3)³⁷.

La détection de ces signatures, au sein même de la tumeur primaire pourrait être en accord avec l'hypothèse de l'évolution clonale ; selon laquelle la malignité d'une tumeur est due à l'émergence de nouveaux clones issus d'une pression de sélection (modèle darwinien de l'évolution tumorale)^{16,38,39}. Cependant, ces résultats peuvent aussi être interprétés selon un modèle prédéterminé, ou le caractère métastatique serait un reflet de la malignité de la tumeur primaire⁴⁰. Selon ce modèle, la malignité serait principalement conditionnée par l'action combinée des mutations qui participent à l'agressivité locale des tumeurs. Ainsi, selon le modèle prédéterminé, l'acquisition additionnelle de mutations n'aurait qu'un rôle complémentaire^{16,40,41}.



1.2.4 Particularités des métastases péritonéales ovariennes.

Comme souligné précédemment, la capacité à métastaser semble être prédéterminée au sein de la tumeur primaire, et restreinte à une faible population ^{16,33,41}. Cependant leur capacité à donner naissance à un foyer métastatique viable, semble être contenue dans le microenvironnement péritonéal. Les considérations éthiques excluent de fait, l'étude expérimentale de l'initiation d'une métastase chez l'Homme. Or, l'utilisation de drains péritonéaux veineux chez les patientes atteintes de cancers de l'ovaire avancés afin de palier l'inconfort clinique, nous a offert l'opportunité de décrire certains facteurs qui affectent la dissémination métastatique péritonéale ⁴².

Les cellules tumorales malignes ovariennes peuvent proliférer à la fois en suspension dans l'ascite (accumulation de liquide dans la cavité intra-péritonéale) mais aussi en adhérant au mésothélium péritonéal. En effet, lorsque leur capsule est rompue, les adénocarcinomes épithéliaux ovariens séreux disséminent principalement de la tumeur primaire, par exfoliation ainsi que par voie lymphatique. La dissémination peut être considérée comme loco-régionale, les ovaires étant anatomiquement localisés au sein de la cavité intra-péritonéale. C'est pourquoi il est extrêmement commun de retrouver un grand nombre de cellules malignes circulant au sein de l'épanchement intra-péritoneale ⁴³. Si la dissémination par voie hématogène est plutôt rare, la dissémination aux ganglions pelviens et lombo-aortique est présente chez 40% des patientes atteintes d'adénocarcinomes épithéliaux ovariens séreux de stade III ou IV ⁴³. Le péritoine constitue le site métastatique préférentiel, il est, en effet, atteint dans 70% des cas d'adénocarcinomes épithéliaux ovariens de stade III ou IV ⁴³. Des métastases hépatiques superficielles sont détectables dans 1 cas sur 2 pour les stades IV ⁴⁴, des métastases isolées sur l'omentum dans environ 46% des stades III ⁴⁴ et enfin sont détectées dans 43% des cas de stade IV des métastases intra-hépatique ⁴⁴. Il est considéré que le temps médian de développement d'une métastase à distance après diagnostic d'un stade I, II, ou III est de 15 mois (amplitude de 2 à 139 mois), A noter enfin, qu'au moment du diagnostic il est extrêmement rare d'observer des métastases osseuses ou cérébrales, et que la distribution des ces métastases n'est généralement pas liée à l'histologie ou le grade de la tumeur.

Une des explications au peu de sites métastatiques rencontrés pourrait donc être cette absence ou rareté de dissémination hématogène. Cependant, les travaux de David Tarin abordent clairement cette question ^{42,45}. En effet, en drainant l'ascite directement dans la circulation veineuse, il entraîne aussi le drainage de millions de cellules tumorales malignes dans la veine jugulaire. Les résultats d'autopsie de 15 patientes montrent que l'introduction de cellules tumorales viables, et malignes dans la circulation sanguine, n'augmente pas, d'une part, le développement de micro-métastases et de métastases en dehors de la cavité péritonéale, plus particulièrement au niveau du poumon, et ce même chez les patientes ayant survécu plus de 25 mois après la pose du drain (on note qu'il existe cependant des emboles de 5-6 cellules tumorales ovariennes dans le lit vasculaire

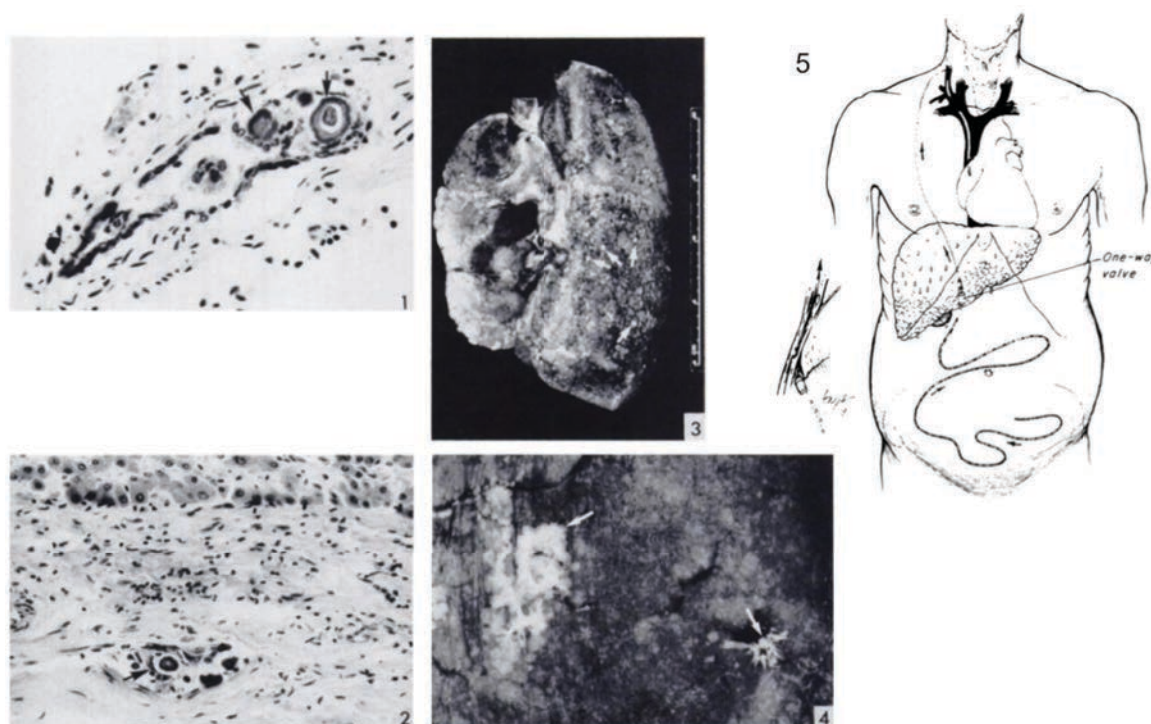


Figure 4: Expérience de pose de drain péritonéo-veineux sur la dissémination métastatique des adénocarcinomes séreux ovariens.

1. Section histologique présentant un groupe de cellules tumorales ovariennes viables formant des psammomateux dans les capillaires pulmonaires (flèches noires) 2. Section histologique présentant un groupe de cellules tumorales ovariennes viables formant des psammomateux dans la région hépatique porte (flèches noires) 3. Suivi du poumon droit présentant de multiples dépôts tumoraux de taille approximativement semblable (flèches blanches) 4. Détails de dépôts tumoraux présentés en 3. Confirmant leurs morphologies néoplasiques note (flèches blanches) 5. Schéma représentant la pose d'un drain peritoneo-veineux.

Figure adaptées de Tarin, D. et al. Mechanisms of Human Tumor Metastasis Studied in Patients with Peritoneovenous Shunts. Cancer Research 44, 3584-3592 (1984).

pulmonaire) ; et d'autre part que le pronostic des patientes n'est pas détérioré par la pause du drain. ^{42,45}

Il est donc clair, que dans la pathologie des adénocarcinomes ovariens épithéliaux séreux, malgré l'existence de population cellulaire prédisposée à la malignité ^{30,33}, l'initiation d'une métastase péritonéale est extraordinairement dépendante du microenvironnement de l'organe cible ^{42,45}.

1.2.5 Niche pré-métastatique et microenvironnement péritonéal.

Il ressort de la théorie énoncée par Stephen Paget ¹¹, que la colonisation et la prolifération d'un type tumoral particulier sont assujetties à la permissivité du microenvironnement de l'organe cible. Cette idée est critique dans la physiopathologie des cancers. En effet, elle aborde une question des plus intrigantes de la pathologie, à savoir la spécificité des organes ciblés par une métastase. L'interaction entre les cellules tumorales malignes disséminées et leur microenvironnement constitue un événement clé de leur survie et la genèse éventuelle d'une macro-métastase. Cependant, une question demeure : est ce que les organes ciblés par une métastase sont intrinsèquement enclins au développement d'une maladie à distance, ou est ce que « l'adressage » à ces sites demeure sous l'influence de la tumeur primaire ?

Les signaux sécrétés par la tumeur, comme les cytokines et protéases sont connues pour modifier profondément le microenvironnement « local », toutefois il est maintenant reconnu que des changements systémiques prennent place en réponse à la présence de la tumeur primaire ⁴⁶⁻⁴⁸.

Les travaux de R.N. Kaplan et al., suggèrent un rôle essentiel des cellules progénitrices dérivées de la moelle (Bone Marrow Derived Cells, BMDC) sur l'amorce du développement métastatique. En effet, en réponse à un pool de cytokines sécrétées par la tumeur primaire certaines cellules de la moelle osseuse sont mobilisées en périphérie ⁴⁸. Les BMDC s'organisent conjointement au niveau de l'organe cible en précédant le recrutement de cellules tumorales malignes. La mobilisation des BMDC au niveau de l'organe cible est associée à un dépôt local de fibronectine ; les BMDC sont donc capables de conditionner l'organe cible pour fournir aux cellules tumorales malignes disséminées un environnement permissif à leur croissance. L'inhibition du recrutement des BMDC au niveau de ces niches pré-métastatique est suffisante pour inhiber la progression métastatique. Il est important de noter que le recrutement des BMDC au

niveau des niches pré-métastatiques, semble être dépendant du type de tumeur considéré, et de la nature des facteurs sécrétés par celle-ci. Ainsi, l'administration de milieu conditionné de mélanome murin B16 chez une souris C57bl/6 conduit au recrutement des BMDC au niveau des poumons, de la rate, du foie, des testicules et du rein. Le traitement par un milieu conditionné de leucémie lymphoïde chronique murine conduit quant à lui à un recrutement des BMDC exclusivement localisé au niveau des poumons⁴⁸. La mobilisation des BMDC en périphérie est donc dépendante du type de tumeurs considérées, celles-ci sont capables d'orchestrer cette mobilisation par un jeu de facteurs sécrétés constituant une véritable empreinte tropique des sites métastatiques^{48,49}. La genèse d'une métastase est donc le fruit d'un dialogue savamment orchestré entre la cellule tumorale et son microenvironnement. On s'aperçoit qu'il existe une sous-population présentant des traits de malignité, néanmoins le développement métastatique reste dépendant du stroma de l'organe cible ; stroma lui-même sous l'influence de la cellule tumorale.

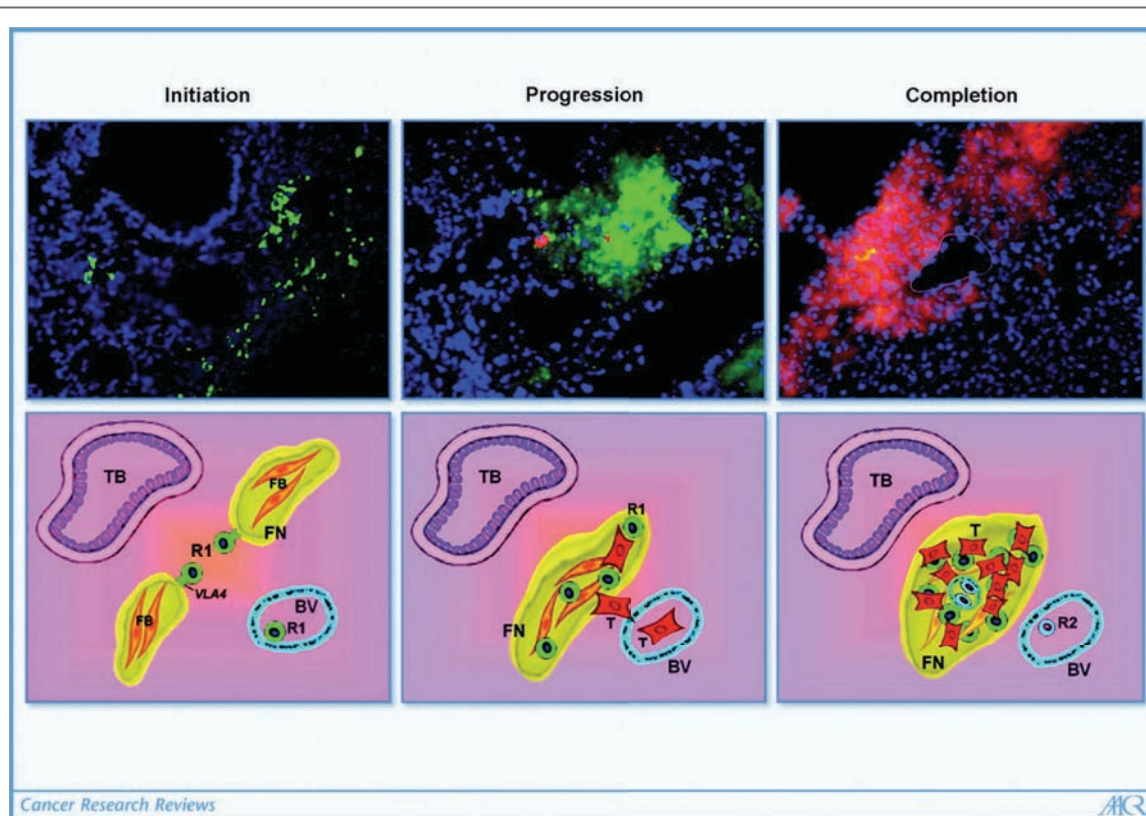


Figure 5: Mobilisation des cellules hématopoïétiques pro-génitrices (HPC) vers la niche pré-métastatique.

« *Initiation* ». Les HPC sont recrutées sous forme de groupes au niveau du poumon avant l'arrivée des cellules tumorales. « *Progression* », les cellules tumorales circulant adhèrent et prolifèrent spécifiquement sur ces sites. « *Completion* », des éléments pro-angiogéniques tels que les cellules endothéliales progénitrices sont recrutés au niveau de la lésion métastatique naissante. GFP : VEGFR1+HPC, mCherry : Cellules tumorales, DAPI : noyaux.

Ligne inférieure R1, VEGFR1⁺ HPCs (vert); R2, VEGFR2⁺ CEPs (bleu); T, tumeur (rouge); jaune, fibronectin (FN); orange, fibroblastes (FB); TB, bronchiole terminale; BV, veine de la bronchiole.

Figures adaptées de Kaplan, R.N., Rafii, S. & Lyden, D. Preparing the 'Soil': The Premetastatic Niche. *Cancer Research* 66, 11089-11093 (2006).

1.3 Les résistances aux thérapies : des résistances intrinsèques au microenvironnement.

La résistance aux traitements anticancéreux peut être divisée en deux catégories : la chimiorésistance acquise ou *de novo*. La résistance acquise ou intrinsèque est le résultat de mutations génétiques entraînant la formation d'un phénotype résistant. Classiquement les résistances intrinsèques des cellules tumorales aux traitements de chimiothérapie sont expliquées par :

- l'augmentation des mécanismes de réparation de l'ADN.
- La détoxification du cytoplasme par des mécanismes dépendant de la métallothionein et du glutathion
- Les pompes d'efflux
- La mutation de la cible
- Des mutations dans les signalisations pro- apoptotiques.

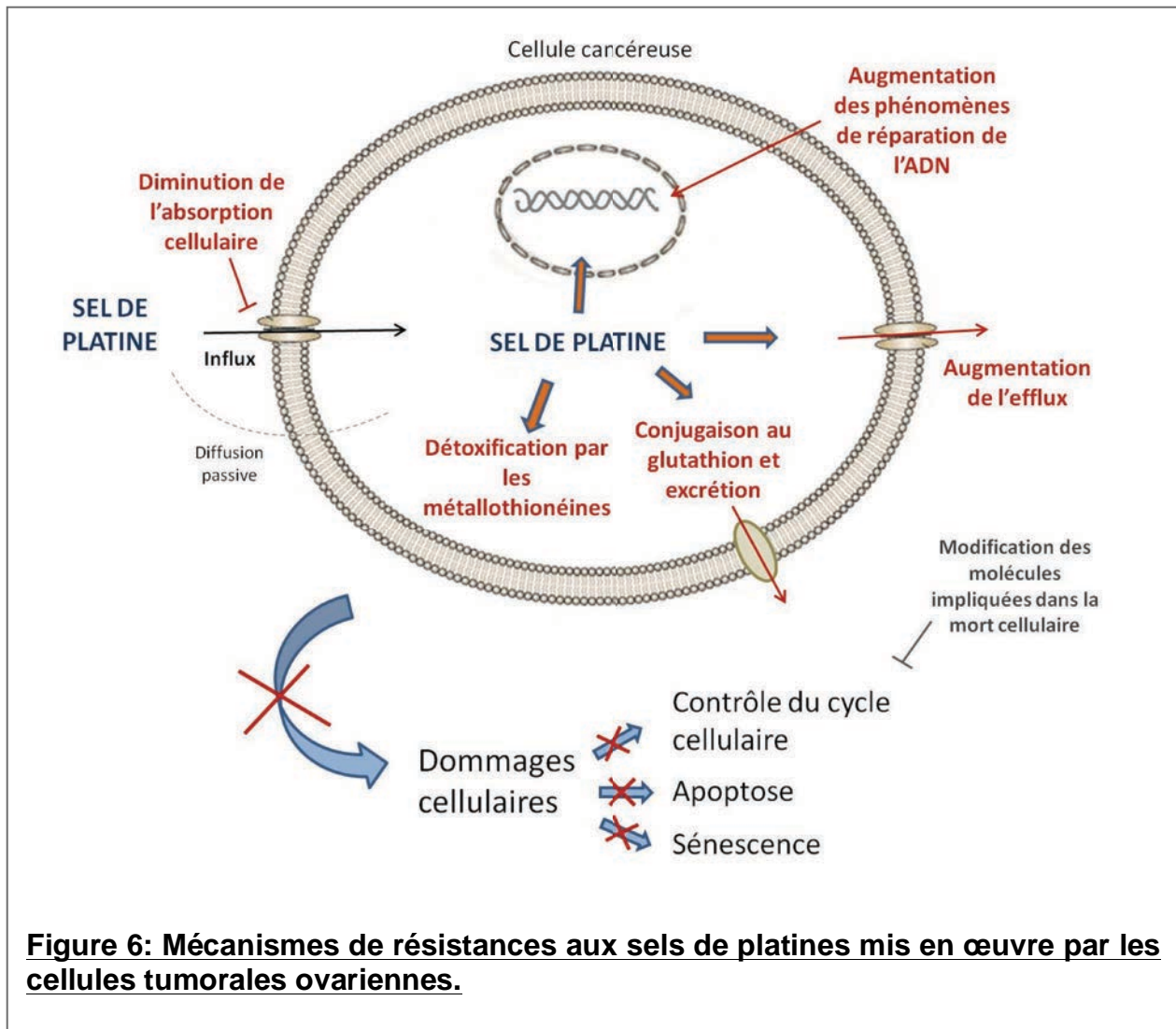
La prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes ovariens séreux, comprend un geste chirurgical suivi d'une chimiothérapie de six cycles minimum à base de Carboplatine et de Paclitaxel ^{1,4,7}. Dans cette partie, nous développerons les causes des résistances intrinsèques des adénocarcinomes ovariens séreux aux sels de platines et aux taxanes.

1.3.1 Résistances aux sels de platines.

1.3.1.1 *Généralités.*

Le cis-platine fut découvert de façon fortuite au milieu des années 60 par Barnett Rosenberg. En effet en étudiant l'effet des champs des électriques sur la division bactérienne, il s'aperçût que celle-ci était inhibée lorsqu'il introduisait une électrode de platine dans son système expérimental ⁵⁰. Le cis-platine obtint l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des cancers de l'ovaire en 1978 aux Etats Unis.

La cytotoxicité du cis-platine est basée sur sa capacité à former des adduits au niveau des bases puriques de l'ADN (adénine ou guanine). Ces adduits modifient la conformation spatiale locale du double brin, inhibant (i) la réplication de l'ADN lors de la phase S⁵¹, (ii) la transcription de l'ADN en ARN⁵¹. Dans les cancers de l'ovaire, le cis-platine induit une première réponse assez franche en terme de réduction de taille tumorale, cependant les rechutes manifestent par la suite une résistance prononcée à ce sel. La résistance au cis-platine et aux différents sels dérivés est multifactorielle, nous discuterons ici les causes principales.



1.3.1.2 Réparation des adduits de l'ADN.

Lorsque des clones résistants sont sélectionnés en culture en présence de cis-platine, une des propriétés partagées par les cellules tumorales ovariennes survivantes est l'augmentation des phénomènes de réparation de l'ADN. Les échantillons résistants de tumeurs présentent une plus forte activité de la protéine d'ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation group 1), actrice principale du mécanisme de réparation par excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair, NER)⁵². Le rôle clé du NER dans la résistance au platine est illustré par la corrélation, chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire, entre l'activité NER (expression de ERCC et XPA, Xeroderma Pigmentosum, complémentation group A) et de la résistance au cis-platine⁵²⁻⁵⁵.

1.3.1.3 Détoxification des complexes de platines.

Les complexes de platines, en particulier dans leur état ionique Pt^{2+} , sont des espèces réactives rapidement inactivées par la formation d'adduits sur des macromolécules d'ADN⁵⁶.

La métallothioneine (MT) est une protéine de bas poids moléculaire, présentant de multiples résidus cystéine et qui permettent la chélation d'un ensemble d'ions métalliques. La fonction de la métallothioneine est d'une part de contrôler la concentration intracytoplasmique et intra-nucléoplasmique de certains éléments essentiels, comme le zinc ou le cuivre, d'autre part de séquestrer les espèces métalliques toxiques comme le cadmium, le mercure ou encore le platine⁵⁷. Sous sa forme monomérique, la MT peut chélater jusqu'à cinq molécules de cis-platine⁵⁸. La relation entre l'expression de la MT et la sensibilité aux sels de platines a été démontrée sur des cellules en culture⁵⁹.

Le résultat des études cliniques menées sur la réponse au cis-platine dans les cancers de l'ovaire et l'expression de la MT sont quant à eux plus nuancés. S'il n'existe pas de corrélation entre le niveau d'expression de la MT et l'efficacité du traitement au cis-platine, on note que la localisation subcellulaire de la MT et plus particulièrement sa nucléarisation, est capable de définir chez les patientes un groupe de mauvais pronostic⁶⁰. La Gluthation-S-Transferase (GST) est une enzyme cytosolique capable de médier la désactivation d'espèces électrophiles hautement réactives, comme les drogues ou les produits de peroxydation des lipides, par conjugaison de celles-ci au Gluthation (GSH)⁶¹. La GST, et plus particulièrement son iso-forme "π", est responsable d'une pléthore de mécanismes de détoxification cellulaire, et il a été proposé que la π-GST puisse intervenir dans l'émergence d'une résistance au platine⁶². L'iso-forme π de la GST est surexprimé dans les cancers de l'ovaire de stade II à VI⁶³. Sur une série de 137 patientes testées T.

Satoh et al., démontrent une association entre cette surexpression de la π -GST et une baisse de la survie globale, cependant l'impact réel de cet essai, ainsi que sa pertinence pronostique restent aujourd'hui sujets à controverses^{62,64}.

1.3.1.4 Système d'efflux et résistances aux platines.

Trois transporteurs sont classiquement associés à la résistance aux chimiothérapies : ABC^{B1} (MDR1), ABC^{C1} (MRP1) et ABC^{G2} (BCRP). Cependant il n'est pas encore certain, dans la littérature, que ces transporteurs soient capables d'extruder le cis-platine des cellules tumorales ovariennes⁶⁵. De plus il n'existe peu de corrélations équivoques entre l'expression des ces transporteurs et la survie sans progression ou la survie globale de patientes sous une thérapie à base de platine^{62,66}.

Il a été suggéré que le transporteur MRP2 pourrait avoir un rôle sur les mécanismes de résistance aux sels de platines⁶⁷. Cependant son expression n'a été observée que dans un nombre de tumeurs primaires assez restreint et ne constitue ni une variable prédictive de la réponse au traitement, ni un indicateur pronostique⁶⁷.

Il apparaît cependant dans les cancers de l'ovaire que certains systèmes de transport peuvent avoir un rôle dans la résistance aux sels de platines. La protéine mise en jeu, ATP7B, n'est pas une protéine ABC spécialisée dans l'export de métabolites toxiques du cytoplasme, mais un transporteur de cuivre endogène⁶⁸. La relation entre l'expression de ce transporteur et la résistance au cis-platine a tout d'abord été mise en évidence sur des lignées tumorales de prostate, préalablement sélectionnées pour leur résistance au platine⁶⁸. L'augmentation de l'expression d'ATP7B réduit le potentiel cytotoxique du cis-platine, alors que la transfection du gène ATP7B chez des cellules de carcinome ovarien ne l'exprimant pas, leur confère une résistance aux dérivés du platine⁶⁹. ATP7B médie la résistance au platine par des mécanismes d'efflux. Des études cliniques prouvent qu'on rencontre un taux élevé de transcrit codant pour ATP7B dans les cancers de l'ovaire, les cancers gastriques ou encore les cancers du sein⁷⁰⁻⁷². Dans la pathologie ovarienne l'expression de la protéine ATP7B constitue un facteur de mauvais pronostic⁷⁰.

1.3.1.5 La signalisation pro-apoptotique induite par le cis-platine.

A la suite de la production et la détection de complexes ADN-platine, les mécanismes de réparation de l'ADN prennent place. Si cette réparation est inadéquate ou défectueuse, la cellule déclenche des voies pro-apoptotiques. Le facteur de transcription p53 est un effecteur clé dans la surveillance de l'intégrité du génome, coordonnant les mécanismes de réparation et dirigeant l'apoptose liée au stress comme les dommages à l'ADN,

l'activation aberrante de certains oncogènes ou encore la perte de contact cellule-cellule⁷³⁻⁷⁵. La protéine p53 est mutée dans plus de 50% des cancers de l'ovaire de stades avancés⁷⁶, ceux-ci, comme discuté précédemment, sont pris en charge par une thérapie à base de sels de platines en association avec des taxanes⁴. Malgré de nombreuses études, la relation entre le statut p53 des cancers de l'ovaire et l'efficacité d'une thérapie à base de platine reste peu claire⁷⁶.

Il est donc difficile d'établir un lien net entre le statut p53 d'une tumeur et sa réponse aux thérapies à base de sels de platines. En effet les tumeurs de l'ovaire sont extrêmement hétérogènes concernant cette mutation. Les résistances aux thérapies à base de sels de platines étant multifactorielle, le seul statut p53 d'une tumeur ovarienne reste un facteur prédictif de la réponse au cis-platine peu efficace.

L'altération de l'expression ou de l'activité de protéines médiatrices de l'apoptose (Bcl-2, AKT, Fas-L) constitue un facteur critique à la réponse au cisplatine⁷⁷⁻⁸⁰. De plus, on peut envisager que la modulation de l'expression de ces protéines impliquées dans l'apoptose pourrait constituer une thérapie chimio-sensibilisante. Par exemple, l'inhibition chimique de l'expression des inhibiteurs de l'apoptose liée au chromosome X (X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP) permet de circonvenir la résistance au cis-platine dans de nombreux types cellulaires⁸¹. Le rôle précis des différentes protéines intervenant dans les mécanismes d'apoptose sur la résistance au cis-platine requiert des études supplémentaires, et plus particulièrement dans un contexte clinique. Une plus grande compréhension des mécanismes participant à l'émergence des résistances aux sels de platines pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies anti-tumorales.

1.3.2 Résistances aux taxanes

1.3.2.1 *Généralités.*

Les taxanes sont des agents chimio-thérapeutiques dérivés de l'if européen. Les deux composés les plus utilisés en clinique aujourd'hui sont le paclitaxel et un taxane de deuxième génération ; le docetaxel. Ces deux taxanes appartiennent à la catégorie des agents anti-mitotiques conformément à leur capacité à inhiber la division cellulaire en perturbant la formation du fuseau mitotique de tubuline^{82,83}. Le fuseau mitotique est formé par la polymérisation d'hétéro-dimères d'alpha et beta tubuline. Le paclitaxel et le docetaxel se lient à la sous-unité beta de la tubuline et inhibent ses mécanismes de dépolymérisation. En effet, cette liaison entraîne une stabilisation et une extension de polymère de microtubule^{84,85}. Ce mécanisme de stabilisation du fuseau mitotique entraîne un arrêt dans le cycle cellulaire en phase M, et le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose. Depuis leur introduction sur le marché, les taxanes ont été utilisés dans le traitement de nombreuses tumeurs solides, comme les tumeurs de prostate, de la tête et du cou, des poumons, des mélanomes, et des ovaires^{86,87}. Malgré les bénéfices cliniques forts associés aux thérapies à base de taxanes plus de 75% des patientes atteintes de cancer de l'ovaire rechutent après leurs chimiothérapies. Les mécanismes de résistances intrinsèques des cellules tumorales ont été abondamment étudiés in vitro ; les deux modes de résistance les plus décrits étant la diminution de l'accumulation des taxanes au niveau du cytoplasme, ainsi que l'altération de la tubuline.

1.3.2.2 *Système d'efflux et résistances aux taxanes.*

Un des phénomènes proposés pour expliquer les résistances au taxanes est la réduction de la concentration cytoplasmique et nucléaire de la drogue. Cette réduction a été observée à la fois pour le paclitaxel et le docetaxel au sein de cellules tumorales in vitro. Il est clair aujourd'hui, que cette réduction est dépendante de l'expression et de l'activité de plusieurs protéines de la famille ABC, comme ABC^{B1}, ABC^{B11} et ABC^{C1}⁸⁷⁻⁸⁹. L'inhibition de ces pompes, et plus particulièrement d'ABCB1 par la verapamil ou la cyclosporine A restaure la sensibilité des cellules tumorales cultivées en présence de paclitaxel et docetaxel^{90,91}. Ainsi il existe une relation très nette entre l'efficacité des taxanes et leur capacité à s'accumuler dans le cytoplasme des cellules tumorales. Suite à ces observations de nombreuses études cliniques se sont attachées à démontrer que l'utilisation des bloqueurs de pompes de première et deuxième génération sont capables de rétablir une sensibilité des cellules tumorales au docetaxel. L'utilisation de ces

premières générations en clinique a montré que l'inhibition de pompes ABC permettait l'augmentation de la cytotoxicité ainsi qu'une interaction pharmacocinétique aboutissant à une réduction de dose de l'agent de chimiothérapies. Cependant, les inhibiteurs de pompes les plus prometteurs en précliniques, les inhibiteurs de troisième génération, n'ont pas obtenu de résultats significatifs en essai clinique. Par exemple la combinaison tariquidar-docetaxel n'a pas montré de bénéfice clinique en terme de survie globale. L'eraclidar, un inhibiteur d'ABCB1, a été développé de façon à augmenter la pénétration de docetaxel dans le système nerveux central (CNS) et ainsi de traiter les tumeurs du CNS. Malheureusement, l'administration de ce composé entraîne l'augmentation de la concentration du docetaxel au niveau systémique ainsi qu'une élimination réduite de la drogue ⁹².

Ces résultats décevants ont souligné le manque de compréhension concernant le rôle précis des pompes ABC, et plus particulièrement ABCB1 dans les résistances cliniques aux taxanes. Ces échecs relatifs mettent aussi en exergue un doute concernant la validité théorique à cibler les pompes ABC dans les cancers résistants.

1.3.2.3 Mutations de la tubuline.

L'altération de l'expression ou de l'activité de la cible des taxanes est un facteur majeur contribuant à l'émergence de résistance aux chimiothérapies. Dans le cas de la résistance aux taxanes, ces modifications incluent tout d'abord une mutation ou une altération de l'expression de nombreux iso-types de la bêta-tubuline ⁹³⁻⁹⁵. La cristallographie par rayon X nous révèle que les mutations de la bêta-tubuline, sont situées au site de liaison entre le taxane et la sous-unité de la tubuline, diminuant ainsi l'efficacité de liaison de la drogue, et la stabilité des polymères de tubuline ^{95,96}. L'impact prédictif et pronostique des mutations, ou altération de l'expression de la tubuline, reste sujet à controverse. En effet, le gène de la bêta-tubuline est conservé tout au long de l'évolution, et il est extrêmement rare de retrouver un polymorphisme de ce gène chez les patients ⁹⁷. De plus, il a été démontré que des patients atteints de cancer du poumon, du sein ou encore de l'ovaire, bien que réfractaires aux thérapies à base de taxanes, ne présentaient pas de polymorphisme et/ou mutation au niveau du gène de la bêta-tubuline. A la vue des données de la littérature, il est donc très difficile aujourd'hui de mettre en lumière une corrélation nette entre la réponse aux traitements à base de taxanes et le polymorphisme du gène de la bêta-tubuline.

1.3.2.4 Résistances aux taxanes : conclusions.

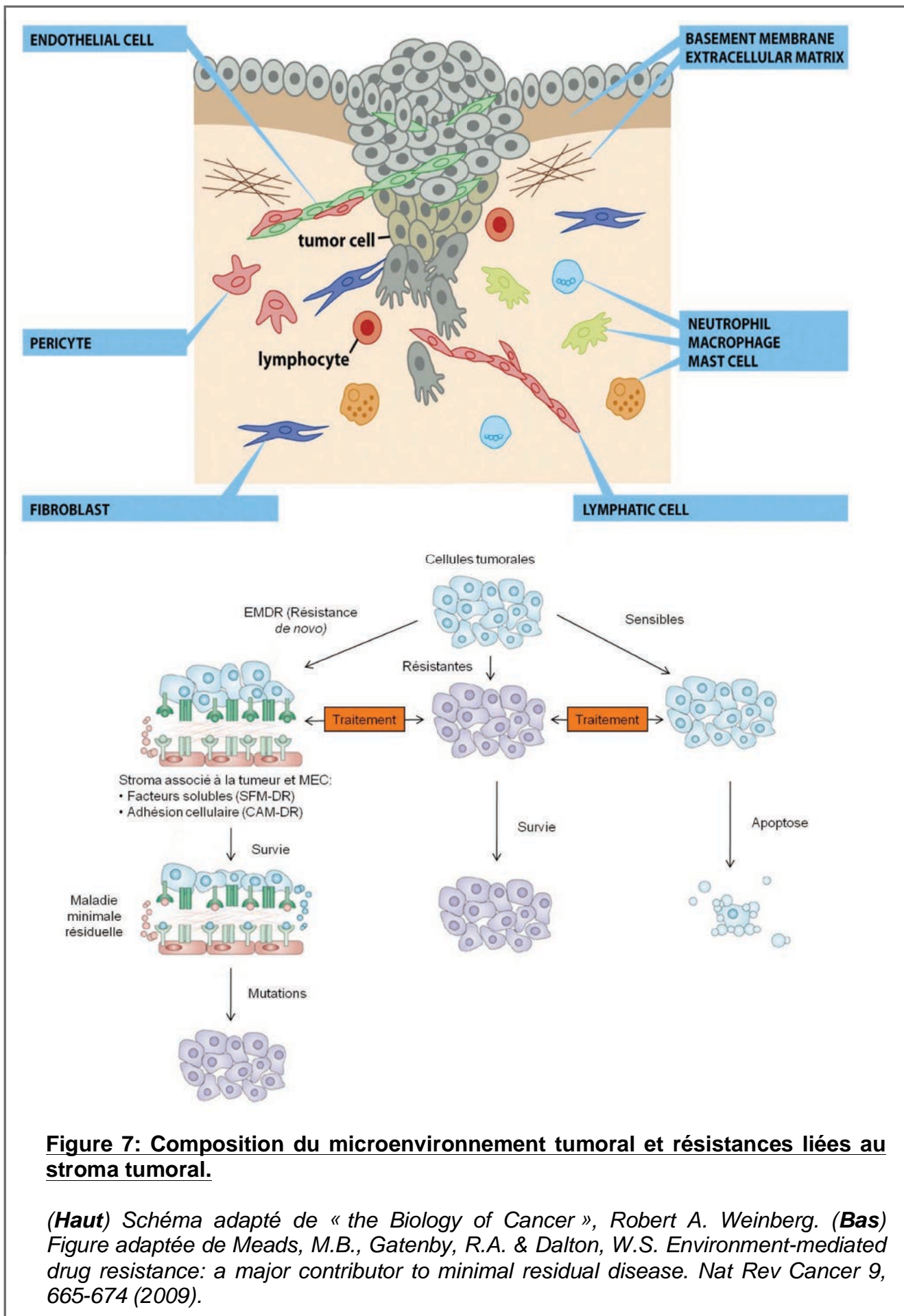
La question des facteurs causant chez les patients une résistance aux taxanes reste, encore aujourd'hui, non résolue. Les mutations et altérations du gène de la tubuline sont généralement absentes chez les patientes et ce, même dans les groupes résistants aux taxanes. La pompe ABCB1 semble être un bon candidat. Cependant l'inhibition de son action soulève des problèmes de toxicité sévère. Le développement de dérivé de taxane n'étant pas substrat d'ABCB1 a donc été accueilli avec un grand optimisme. Le DJ-927 (tesetaxel) est une molécule de la famille des taxanes, qui présente une toxicité sévère sur les cellules tumorales exprimant ABCB1 ⁹⁸. Considérant que le développement du tesetaxel a cessé suite à un échec dans le traitement des cancers colorectaux et gastriques ⁹⁹. Il n'en reste pas moins que le principe de développement de drogues n'étant pas substrats de pompes de la famille ABC, reste une alternative plausible à l'inhibition de celles-ci par des composés chimiques.

1.3.3 Les résistances liées au microenvironnement.

L'acquisition de ces modifications cellulaires entraînant une chimiorésistance résulte de plusieurs mutations géniques et nécessite plusieurs années¹⁰⁰. Or le délai de rechute dans le cancer de l'ovaire étant de l'ordre de 1 à 2 ans¹, des mécanismes autres que la résistance acquise doivent pouvoir participer à la chimiorésistance des cellules tumorales formant la maladie résiduelle, comme par exemple leur environnement (figure 6).

C'est en 1990, que Teicher met en évidence le rôle de l'environnement tumoral dans la résistance au cisplatine¹⁰¹. Il greffe des cellules de carcinome mammaire chez des souris, traitées ensuite par divers agents cytotoxiques pour créer une chimiorésistance. Les cellules tumorales chimiorésistantes sont prélevées sur des animaux et cultivées in vitro. Elles retrouvent alors un phénotype chimiosensible. Ces mêmes cellules ré-implantées chez des souris présentent de nouveau une chimio-résistance in vivo¹⁰¹. Ces travaux démontrent que le micro-environnement de la tumeur serait donc un facteur clé de résistance aux chimiothérapies et bouleversent l'idée longtemps établie que le cancer était uniquement un processus cellulaire autonome où l'acquisition successive de mutations au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur entraînait progressivement une prolifération et une résistance à la mort cellulaire¹⁰¹.

Parmi l'entité complexe et hétérogène (matrice extracellulaire, cellules immunitaires, fibroblastes associés aux tumeurs) (figure 6) que constitue le microenvironnement tumoral, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à deux éléments : les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ainsi que les cellules endothéliales, et plus précisément leur rôle dans l'émergence de la maladie métastatique et des résistances aux traitements conventionnels de chimiothérapie.



1.4 Les cellules souches mésenchymateuses, rôle dans la progression métastatique et la chimiorésistance.

1.4.1 Généralités.

On doit l'identification de cellules adultes non hématopoïétiques, d'origine médullaire, aux travaux de Von Recklinghausen and Cohnheim (revu dans ¹⁰²). Dès 1860, ils observent qu'une sous-population présente dans la moelle osseuse peut servir de source de cellules mésenchymateuses lors des processus de cicatrisation ou d'inflammation. Ce n'est qu'en 1874 que cette sous-population, ces pro-géniteurs médullaires ont été isolés et caractérisés. Friedenstein et al, ont pu cultiver ceux-ci à partir d'extraits médullaires totaux. Ces progéniteurs médullaires se présentent sous la forme de cellules adhérentes au plastique, de morphologie mésenchymateuse ou « spindle-like shape ». Ces cellules mésenchymateuses d'origine médullaire croissent sous forme de colonies fibroblastiques aussi appelées unité formatrice de colonie fibroblastique «colony-formating unit-fibroblastic, CFU-F » ¹⁰³. Ces cultures clonogéniques, appelées plus tardivement cellules souches mésenchymateuses, ou MSC, « Mesenchymal Stem Cells », possèdent des capacités de différenciation uniques. Cellules pluripotentes, elles sont capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, ou encore myoblastes ¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Les MSC sont des cellules qui se conservent aisément en culture. Leur profil de différenciation est connu et relativement constant. Les MSC possèdent aussi une capacité à s'autorenouveler en culture assez robuste, et présentent des propriétés immunosuppressives. L'ensemble de ces propriétés ont amené les chercheurs à utiliser les cellules souches mésenchymateuses dans de nombreux essais translationnels.

Les MSC ont ainsi été utilisées dans la réparation de tissus conjonctifs comme les os ou les muscles ^{108,109}, dans le traitement de foyers inflammatoires ¹⁰⁹ ou encore dans la prévention ou le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte ^{110,111}. Le tropisme particulier des MSC ainsi que leur pouvoir pro-angiogénique a aussi permis d'utiliser ces cellules dans le traitement d'organes compromis suite à un choc ischémique, notamment dans les cas d'infarctus du myocarde ou d'attaque cérébrale ¹¹²⁻¹¹⁶.

Ces propriétés et fonctions uniques des MSC, ont amené la communauté scientifique à considérer celles-ci comme une source majeure de cellules souches adultes en médecine régénérative, pouvant constituer dans certains cas une alternative crédible aux cellules souches embryonnaires humaines ¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Les MSC présentent une avidité pour les sites de cicatrisation lorsqu'elles sont injectées dans la circulation périphérique ¹²⁰. Les signaux endocrines provenant de l'organe ou du

tissu endommagés induisent la mobilisation depuis la moelle osseuse de MSC vers la circulation sanguine ¹²¹. D'autres signaux endocrines sont ensuite mis en jeu pour recruter les MSC aux sites inflammatoires, au niveau desquels les MSC exercent leur pouvoir immunomodulateur et régénératif. Même si ce modèle de mobilisation/recrutement de MSC à partir de la moelle osseuse reste encore aujourd'hui sujet à controverse, celui-ci a fait l'objet de nombreuses études. Les molécules impliquées dans les processus de mobilisation, et recrutement (extravasation et intravasation) des MSC commencent à être relativement bien décrites dans la littérature (revu dans ¹²⁰). Néanmoins, ce tropisme des MSC pour les sites inflammatoires a fourni aux scientifiques un moyen efficace pour délivrer des agents thérapeutiques, permettant d'envisager que l'injection de MSC exogènes modifiées puisse contribuer au développement de thérapies géniques utilisant des vecteurs cellulaires ¹²¹.

Puisque les MSC sont recrutées au niveau de site inflammatoire, il est finalement peu surprenant que des MSC exogènes injectées chez le petit animal présentent une prédilection pour les sites tumorigéniques. Les premiers travaux démontrant le recrutement de MSC au niveau de sites tumoraux sont le fruit de Matus Studeny et al. ¹²², qui utilisent de façon assez ingénieux le tropisme des MSC pour les sites tumoraux pour délivrer de localement de l'interféron beta. Cette élévation locale du taux d'interféron beta résulte dans une diminution de la masse tumorale ¹²². Ces observations furent validées par la suite dans d'autres modèles tumoraux expérimentaux ^{123,124}, et ont fourni la preuve du concept de thérapie cellulaire anticancéreuse à base de MSC exogènes modifiées génétiquement ^{125,126}.

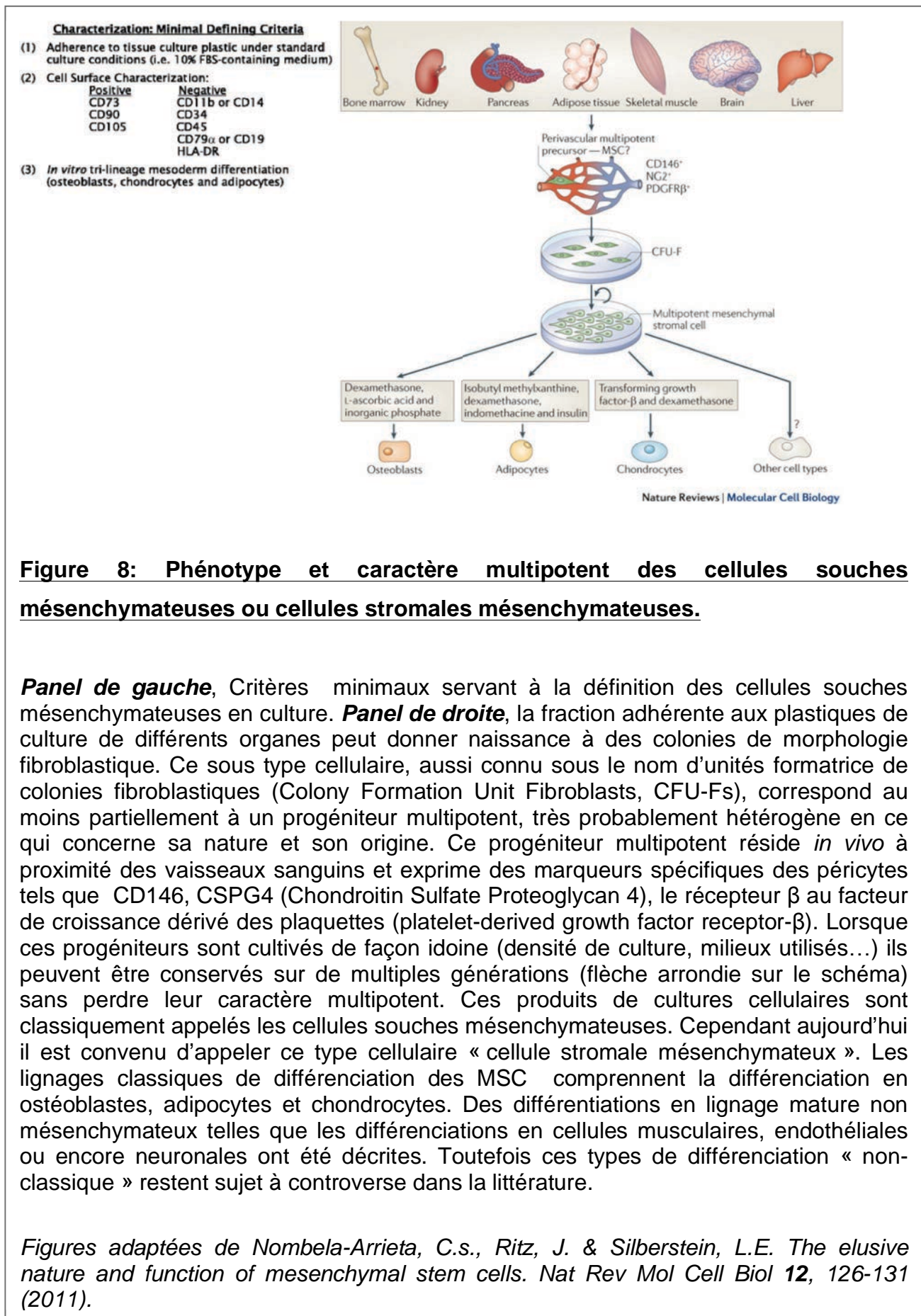
Des travaux récents ont montré que les MSC endogènes sont recrutées au niveau du stroma tumoral. Ces MSC exercent une influence aussi bien sur la desmoplasie fibro-vasculaire, la tumorigenèse que sur la capacité du cancer à disséminer dans l'organisme ^{127,128}.

Ces efforts soulignent que les MSC possèdent des propriétés particulières dans le cadre tumoral, et ont suscité un intérêt nouveau dans l'étude des MSC comme des cellules à part entière du stroma tumoral. Quels sont les réservoirs de MSC in vivo? Comment ces cellules sont recrutées au niveau de la tumeur? Quel est leur devenir au contact du tissu cancéreux? Quelle est la nature du dialogue engagé entre les MSC et les cellules tumorales? Toutes ces questions font l'objet d'intenses études. Dans cette section, nous essayerons de détailler le rôle des MSC associées aux tumeurs sur le développement tumoral et l'apparition de résistances aux thérapies anticancéreuses, et plus particulièrement dans les adénocarcinomes séreux ovariens.

1.4.2 Origines des cellules souches mésenchymateuses, phénotype et différenciation.

Les cellules souches mésenchymateuses, MSC, sont des cellules non hématopoïétiques issues de la moelle osseuse, pouvant être isolées à partir d'autres tissus, comme le muscle, le tissu adipeux, le foie, le cordon ombilical, les membranes fœtales, le cartilage et la peau ¹²⁹. On identifie les MSC, en culture, sur la base de la co-expression d'un certains nombres de « cluster of differentiation », CD. La société internationale de recherche sur les cellules souches (International Society for Stem Cell Research, ISSCR) admet une définition minimale des cellules souches mésenchymateuses sur l'expression de CD90, CD73 et CD105. Cependant, des définitions phénotypiques plus larges existent dans la littérature. On considère que les MSC expriment : CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 et Stro1, et n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques tels que CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, et HLA-DR ¹³⁰. De plus, les MSC expriment le complexe majeur d'histocompatibilité, CMH, de classe 1, mais n'expriment pas le CMH de classe 2 ainsi que les molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD40 ¹³¹. Ce profil d'expression de molécules impliquées dans la discrimination du soi/non-soi facilite la transplantation non allogénique des MSC.

Toutefois, malgré le fait que l'on ait pu isoler des MSC des différents tissus ou organes. Que celles-ci partagent l'expression de certains marqueurs membranaires, il n'en reste pas moins que ces MSC restent une population hétérogène, comprenant de nombreux variants ayant des caractéristiques propres ¹³². En effet, un certain nombre de laboratoires a pu obtenir, à partir de préparations de MSCs les lignages dits classiques. Comme les ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes, mais sont parvenus à générer dans le même temps des lignages non classiques. Par exemple, les MSC seraient capables de se différencier en myocytes, en cellules neuro-ectodermales ou encore, et de façon plus surprenante, en cellules épithéliales ^{133,134}. La régulation moléculaire mise en jeu lors de ces processus de différenciation non-classique reste encore aujourd'hui à éclairer.



Le mode de culture et de propagation des cellules souches mésenchymateuses n'est pas uniforme au sein de la communauté scientifique. Il en résulte une variation sur le

phénotype des MSC. Cette variation peut s'expliquer en partie par la formulation du milieu de base, la concentration en glucose, la densité d'ensemencement, l'utilisation ou non de sérum de bœuf ou de veau, le type de plastiques utilisés ou autres ^{135,136}. Le protocole pour isoler les MSC le plus communément admis reste l'isolation de la fraction adhérente de la moelle osseuse. De nombreuses modifications ont malgré tout été apportées à ce protocole afin d'augmenter la pureté et l'efficacité d'isolation : sélection sur billes ou l'utilisation de gradients de densité ¹³⁷⁻¹⁴⁰. La variété de méthodes utilisées sur une population cellulaire déjà hétérogène peut expliquer la disparité des résultats observés dans la littérature concernant les MSC, et notamment leur implication fonctionnelle dans le stroma tumoral. Elle peut aussi expliquer la difficulté à reproduire les résultats d'un laboratoire à un autre.

Les MSC partagent un certain nombre de gènes associés à la pluripotence avec les cellules souches embryonnaires humaines, notamment les facteurs de transcription NANOG, OCT-4 et SOX2 ¹⁴¹ ; suggérant que ces trois facteurs puissent être impliqués dans les phénomènes d'auto-renouvellement des MSC ¹⁴². En effet, la perte d'expression d'OCT-4 ou de SOX2 corrèle avec la perte d'autorenouvellement, l'induction de la sénescence, la perte de capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses en culture, confirmant ainsi l'importance de l'expression de ces facteurs de transcription dans les phénomènes d'auto-renouvellement. De la même façon, les MSC maintiennent un phénotype constant et une activité télomérase forte pendant 10-12 générations ou passages, ainsi qu'une forte capacité mitotique pendant 20 à 30 générations ou passages ^{131,143,144}. Cependant, au-delà de ces 20-30 passages, le maintien de cette activité mitotique cesse suite à l'augmentation de l'expression et de la sécrétion du Transforming Growth Factor beta 1 (TGFbeta1) et de la mise en place d'une boucle autocrine impliquant le récepteur 1 au TGFbeta (Transforming Growth Factor beta Receptor 1, TGFbetaR1) et une l'une de ses protéines adaptatrices SMAD3 (S-mothers against decapentaplegic homolog 3). Cette mise en route d'une boucle autocrine est concomitante d'un rapide changement morphologique des MSC, d'un raccourcissement des télomères, traduisant des phénomènes de sénescence. Cette induction intrinsèque de sénescence pourrait constituer un obstacle majeur à l'utilisation des MSC en thérapeutique et médecine régénérative ¹⁴⁵.

1.4.3 MSC, processus inflammatoires et cicatrisants.

La mobilisation des MSC depuis la moelle osseuse (et certainement depuis d'autres niches périphériques telles que le tissu adipeux) vers la circulation sanguine est un processus qui prend place à la suite de phénomènes inflammatoires mis en jeu lors des processus de cicatrisation ¹²¹.

Une fois recrutées au niveau du site inflammatoires, les MSC produisent et secrètent des facteurs trophogènes capables de stimuler l'expansion et la prolifération de cellules souches locales ¹⁴⁶, d'interrompre l'inflammation et de contribuer à la cicatrisation ¹⁴⁷.

Les cellules souches mésenchymateuses possèdent des propriétés anti-inflammatoires assez étendues, elles inhibent aussi bien l'activation et la prolifération des cellules T en réponse à une stimulation antigénique allo-génique ¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, que la différenciation des cellules B en plasmocytes et la sécrétion d'anticorps ^{151,152}. De plus, la maturation des cellules dendritiques ainsi que leur fonction sont au moins partiellement inhibées par les cellules souches mésenchymateuses ^{153,154}. De façon assez similaire, les cellules souches mésenchymateuses recrutent et participent à la prolifération des lymphocytes T régulateurs ¹⁵⁵. Les lymphocytes T régulateurs sont définis par la co-expression des marqueurs CD4, CD25 et du facteur de transcription Foxp3. Les lymphocytes Treg inhibent l'activation, la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T environnants. Les Treg sont donc de puissants immunorégulateurs, à la fois capable de diminuer la réponse immunitaire dirigée contre les pathogènes, les greffes allogéniques ou encore le cancer. Le recrutement des lymphocytes Treg par les MSC ne dépend pas de leurs tissus d'origine, les MSC de tissus adipeux sont capables, non seulement, de recruter les lymphocytes Treg *in vivo* comme les MSC issues du stroma médullaire. mais également de différencier ceux ci *in vitro* à partir de cellules mononucléaires de circulation sanguine ¹⁵⁶.

Les MSC présentent donc une multitude de propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. De nombreux groupes de recherche ont cherché à exploiter ces propriétés afin de traiter des troubles associés à l'inflammation chronique et/ou les dommages tissulaires comme les infarctus du myocarde ^{146,157}, les ruptures de moelle épinière ^{158,159}, le diabète ¹⁶⁰, les fractures osseuses ou cartilagineuses ¹⁶¹ et enfin la maladie du greffon contre l'hôte ¹⁶². Encore une fois, ces propriétés immunomodulatrices ne sont pas exclusives aux MSC de moelle osseuse. En effet les MSC de tissus adipeux ont été utilisé dans des essais thérapeutiques ou xéno greffes pour le traitement de la maladie

inflammatoire des intestins, l'arthrite ou encore dans des modèles expérimentaux d'encéphalites auto-immunes ¹⁶³⁻¹⁶⁶.

L'absence du CMH de classe II à la surface des MSC leur confère un privilège immunologique permettant leur greffe, qu'elle soit allo-génique ou xeno-génique. Cet immuno-privilège combiné à leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives définissent les MSC comme un candidat sérieux pour les thérapies cellulaires anti-inflammatoires ¹⁶⁷.

1.4.4 Recrutement des MSC au niveau du stroma tumoral ovarien.

La composition cellulaire et moléculaire du stroma tumoral ovaire, ressemble de façon assez surprenante à un tissu chroniquement inflammé. L'augmentation de la sécrétion de métallo-protéinases (MMPs), de facteurs de croissance, et de cytokines pro inflammatoire façonne le stroma tumoral ovarien en blessure qui ne cicatrise jamais, « wound that never heals » ¹⁶⁸. Ce contexte pro-inflammatoire, de façon similaire au processus de cicatrisation, provoque le recrutement de nombreux types cellulaires tels que cellules du système immunitaire, tissu conjonctif, et enfin des cellules souches mésenchymateuses.

Le recrutement des cellules souches mésenchymateuses vers des tumeurs greffées chez le petit animal a été établi dans plusieurs modèles tels que le glioblastome, mélanome, sarcome de Kaposi, sarcome d'Ewing, ou encore les carcinomes coliques, du sein et enfin de l'ovaire ^{123,124,127,169-173}.

Les mécanismes moléculaires sous-jacents au recrutement des cellules souches mésenchymateuses au sein du stroma tumoral ovarien sont encore peu compris ou du moins peu décrits. Cependant, une des premières molécules récemment impliquée est l'acide lysophosphatidique ou LPA (LysoPhosphatidic Acid). L'acide lysophosphatidique (LPA) est un lipide biologiquement actif, présentant une activité de type facteur de croissance *in vitro* (stimulation de la prolifération, migration et invasion cellulaire) ¹⁷⁴. L'implication du LPA dans le processus cancéreux émerge à l'heure actuelle de certaines études. Toutefois, son rôle est très mal défini.

Le niveau de LPA est élevé dans les ascites de patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens de haut grade ¹⁷⁵. Les cellules tumorales ovariennes de patientes de stade III ou VI produisent de façon élevée du LPA. Le LPA est capable d'induire la migration des cellules souches mésenchymateuses par un mécanisme dépendant de son récepteur, le LPAR, couple à une protéine G sensible à la toxine pertussique, en déclenchant une voie MAP kinase MEK/ERK conduisant à l'activation de Ras Homolog Family Gene, member A

(RhoA) et la formation de fibre de stress ¹⁷⁵. Cette migration, recrutement des cellules souches mésenchymateuses au sein de tumeurs ovariennes semble être dépendante d'une isoforme du LPA : le LPA1 ¹⁷⁵ (Figure 9).

Le peptide LL-37, aussi appelé cathelicidine, est une protéine antimicrobienne, principalement contenue dans les granules tertiaires des neutrophiles. Stocké sous forme inactive, il est libéré et activé par l'élastase et agit contre les bactéries Gram positives et négatives ¹⁷⁶. Il peut opérer en synergie avec une autre protéine des granules spécifiques, la lactoferrine, qui possède également sa propre activité anti-microbienne ¹⁷⁷. Le peptide LL37 est surexprimé dans nombre de cancers parmi lesquels on retrouve les cancers du sein, du poumon et enfin de l'ovaire ¹⁷³. Il est un puissant chemo-attractant de cellules tumorales ¹⁷³. De façon étonnante, la neutralisation du peptide LL37 lors d'une xénogreffe de cellules tumorales ovariennes chez la souris immunodéprimée réduit de façon très significative le recrutement des cellules souches mésenchymateuses au sein du stroma tumoral. Ce recrutement de MSC serait dépendant du récepteur FPRL1, Formyl peptide receptor-like 1 (Figure 9). Ce défaut de recrutement a pour effet une inhibition de la croissance tumorale ainsi qu'une diminution de la formation du réseau fibro-vasculaire ¹⁷³.

Il est donc évident que les cellules souches mésenchymateuses sont recrutées au niveau des tumeurs ovariennes au sein desquelles elles seraient capables de soutenir la progression tumorale.

1.4.5 Influence des MSC sur la progression tumorale ovarienne.

La participation des cellules souches mésenchymateuses à la progression tumorale est une notion assez récente dans la littérature. Ce n'est qu'en 2007 qu'Antoine Karnoub du groupe de Robert Weinberg démontre que les MSC de moelle osseuse sont capables d'augmenter de façon significative le potentiel métastatique de lignées tumorales mammaires humaines, lorsque cette co-culture est injectée chez une souris immunodéprimée¹²⁷. Cette augmentation du potentiel métastatique des lignées tumorales mammaires humaines par les MSC de moelle osseuse s'explique par la sécrétion de novo par celles-ci d'une chimiokine pro-inflammatoire : CCL5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5, aussi appelée RANTES, Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted). Le CCL5 agit de façon paracrine en augmentant la mobilité des cellules tumorales mammaires, et leur capacité à dégrader et envahir la matrice extracellulaire^{127,178}. Cependant, cette capacité accrue à métastaser reste un phénomène réversible, entièrement dépendant du CCL5 sécrété par les MSC. Ces résultats suggèrent que le microenvironnement tumoral est capable, d'une certaine manière, de faciliter la dissémination métastatique en élicitant des changements réversibles sur le phénotype des cellules tumorales mammaires^{127,178}.

Les changements induits par les cellules souches mésenchymateuses sur la biologie des tumeurs ovariennes sont encore peu décrits dans la littérature. On distinguera parmi les effets liés au MSC sur les tumeurs ovariennes les effets des cellules mésenchymateuses des effets du produit de leur différenciation.

Les travaux de McLean et al¹⁷⁹, identifient et confirment la présence de cellules souches mésenchymateuses au sein du stroma tumoral ovarien. Ces MSC isolées à partir d'ascites présentent un phénotype conforme à la définition canonique des MSC : CD44+CD73+CD90+¹⁷⁹. Ces MSC associées aux tumeurs de l'ovaire présentent des capacités de différenciation semblables au MSC isolées à partir de moelle osseuse ou de tissus adipeux, leur habilité à la différenciation chondrogénique, ostéoblastique, ou adipocytaire n'a pas été altérée par le contexte pro-inflammatoire du stroma tumoral ovarien¹⁷⁹. Ces MSC associées aux tumeurs ovariennes (CA-MSC, Carcinoma Associated Mesenchymal Stem Cells) sont capables de stimuler in vitro et in vivo la croissance tumorale. Même si les CA-MSC expriment les marqueurs typiques des MSC, McLean et al. révèlent que le profil d'expression transcriptomique est distinct des cellules souches mésenchymateuses d'individus sains. Les CA-MSC surexpriment les membres de la famille de Bone Morphogenetic Protein, et plus particulièrement les BMP2, BMP4 et BMP6. Cette surexpression de BMP, et notamment de BMP2, par les CA-MSC leur permet entre autre d'augmenter le nombre de cellules souches tumorales ovariennes

définies par le triple marquage CD133+CD73-ALDH+ (ALdehyde DesHydrogenase) ¹⁷⁹. L'inhibition de la signalisation induite par BMP2 suffit à enrayer l'effet des CA-MSCs sur la croissance tumorale et l'augmentation du pool des cellules souches tumorales ovariennes ¹⁷⁹ (Figure 9).

Les MSC sous l'effet du peptide LL37 sécrété par les cellules tumorales augmentent leur production de cytokines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques ¹⁷³. Ainsi, l'IL10 (Interleukin 10) et le CCL5 contribuent à augmenter la prolifération et la dissémination des cellules tumorales ovariennes in vivo, alors que l'IL6 et le VEGF, stimulent la prolifération et le recrutement des cellules endothéliales ¹⁷³ (Figure 9). Ces deux phénomènes conjoints expliquent l'effet pro-tumoral des cellules souches mésenchymateuses associées aux tumeurs ovariennes.

On distingue parmi les effets liés au MSC sur les tumeurs ovariennes, les effets des cellules mésenchymateuses des effets du produit de leur différenciation. En effet, lors de leur recrutement au niveau du microenvironnement tumoral ovarien, les MSC (principalement les MSC de tissus adipeux) se différencient en myo-fibroblastes. Cette différenciation myo-fibroblastique semble être dirigée par le LPA ¹⁸⁰ (Figure 9). La différenciation des MSC en myo-fibroblaste déclenche une boucle paracrine de TGFbeta1 ayant pour conséquence une augmentation de la sécrétion de CXCL12 ¹⁸⁰, chimiokine pro-inflammatoire impliquée dans la migration, l'invasion et la prolifération des cellules tumorales ovariennes ¹⁸¹⁻¹⁸⁴ (Figure 9).

Ces myo-fibroblastes contribuent aussi à la progression tumorale (migration, invasion, prolifération) via la sécrétion de facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) ; et la neo-angiogenèse tumorale par la sécrétion d'IL6 et de VEGF ¹⁸⁵.

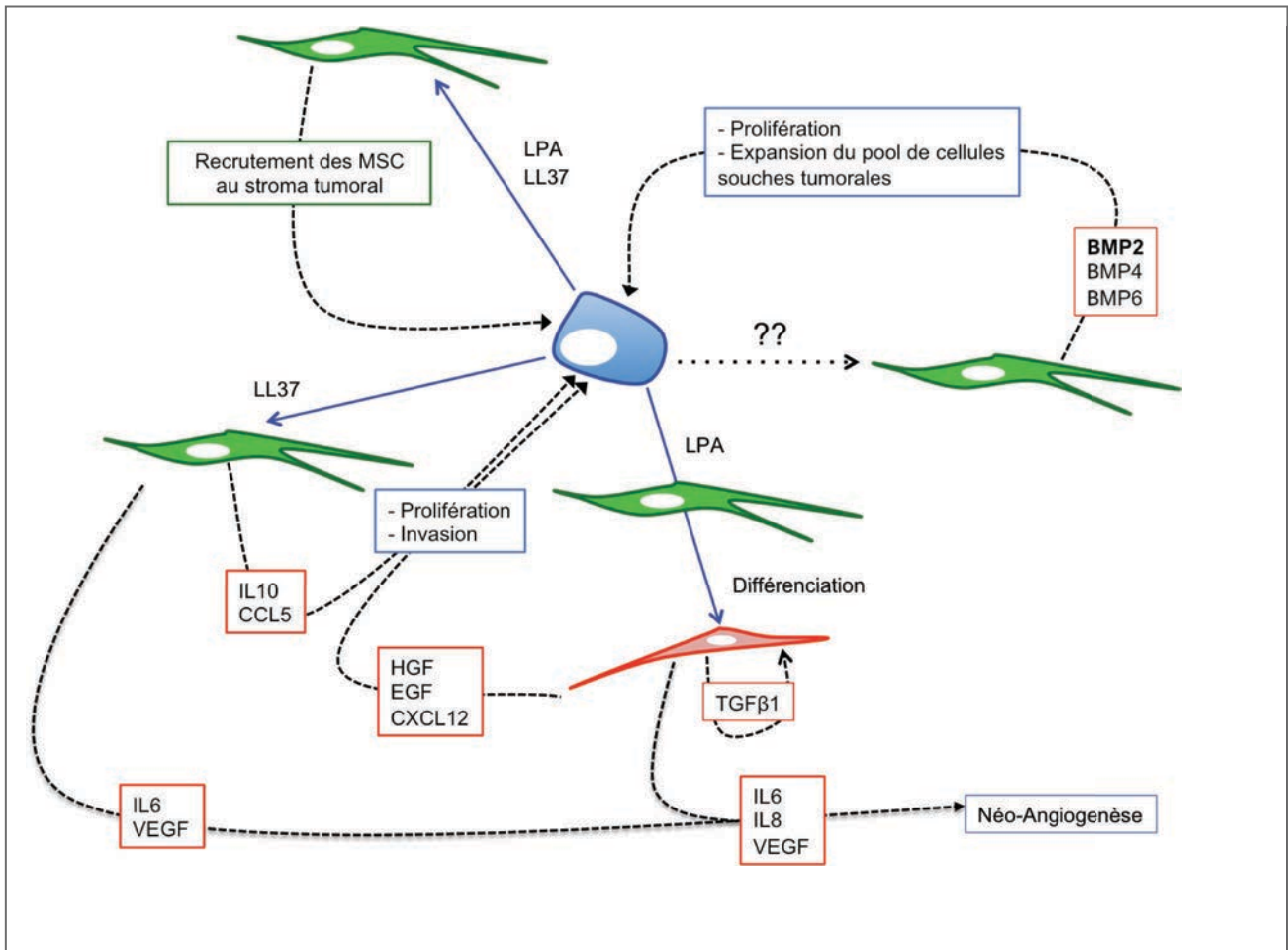


Figure 9: Recrutement des MSC au stroma tumoral ovarien, rôle sur la progression des adénocarcinomes.

Les cellules en **bleu** représentent les **cellules tumorales ovariennes**. Les cellules en **vert** représentent les **cellules souches mésenchymateuses**, et enfin les cellules **rouges** représentent les **fibroblastes** issus de la différenciation des MSC.

Les MSC, qu'elles proviennent du tissu adipeux, de la moelle osseuse ou d'une autre niche, parviennent à soutenir le développement des adénocarcinomes ovariens, que ce soit à travers des effets directs sur la tumeur, tels que l'augmentation du pool de cellules souches tumorales, l'induction de prolifération, ou encore l'augmentation du potentiel invasif des cellules tumorales ^{180,185}. Nous avons voulu à travers ce travail, identifier le possible rôle des cellules du microenvironnement péritonéales dans les mécanismes à l'initiative des rechutes. La rechute clinique est la résultante d'au moins deux phénomènes conjoints : la capacité de la niche (ici les MSC) de soutenir une croissance tumorale, et celle de pourvoir un microenvironnement, un abri aux chimiothérapies anticancéreuses.

1.4.6 Rôle des MSC sur l'émergence de résistances aux chimiothérapies.

La prise en charge thérapeutique des adénocarcinomes ovariens séreux comprend un geste chirurgical suivi d'une chimiothérapie de six cycles minimum à base de Carboplatine et de Paclitaxel ¹ ou dans certains cas, en accord avec le comité de décision pluridisciplinaire, d'une chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP) ¹. Dans cette partie, nous développerons les causes de résistances des adénocarcinomes ovariens séreux aux sels de platines, aux taxanes ainsi qu'à l'hyperthermie, liées à la présence des MSC au sein du microenvironnement tumoral.

La chimiorésistance induite par le microenvironnement tumoral ovarien est une notion assez nouvelle et peu décrite.

Il existe à ce jour peu de références traitant de l'implication des MSC associés aux cancers de l'ovaire dans les phénomènes de résistances aux sels de platines ou aux taxanes. Récemment, le groupe de Emile E. Voest, a démontré que les MSC lorsqu'elles sont exposées à une thérapie à base de sels de platines, sont capables de relarguer des acides gras poly-insaturés tels que l'acide 12-oxo-5,8,10-heptadecatrienoic (KHT) ou l'acide hexadeca-4,7,10,13-tetraenoic ¹⁸⁶. Ces acides gras relargués de façon dépendante de la protéine COX1 ou TSAX, sont capables d'exercer une protection pour les cellules tumorales, dans un contexte de xénogreffe, contre de nombreux agents chimiothérapeutiques ¹⁸⁶.

Cependant, concernant l'hyperthermie, les travaux de Cho et al. et de Park et al. démontrent que le milieu conditionné de cellules souches mésenchymateuses préalablement exposées à un choc hyperthermique exerce un effet cytotoxique sur les cellules tumorales ovariennes ^{187,188}.

Les mécanismes à l'origine d'une éventuelle chimiorésistance liée au microenvironnement et plus particulièrement à la présence de cellules souches mésenchymateuses feront donc l'objet de ce travail de thèse.

1.4.7 Démarche de recherche sur les MSC.

Les MSC constituent un élément clé du microenvironnement tumoral. Capables de détourner les éléments du système immunitaire, de déclencher des signalisations pro-inflammatoires et de soutenir la progression tumorale, les voies de signalisation induites par celles-ci au contact des cellules tumorales ovariennes sont encore peu comprises. Le premier objectif de ce travail thèse sera de décrire de façon exhaustive, par étude transcriptomique, les voies de signalisation déclenchées au niveau des cellules tumorales ovariennes par les cellules souches mésenchymateuses. Ces voies de signalisation feront l'objet de validation fonctionnelle *in vitro*.

Le second objectif de ce travail de thèse sera d'élucider un mécanisme de résistance à l'hyperthermie. Nous étudierons plus particulièrement le rôle de la chimiokine CXCL12 sécrétée par les cellules souches mésenchymateuses sur la survie des cellules tumorales ovariennes exposées à un choc hyperthermique.

1.5 Participation des cellules endothéliales aux résistances des adénocarcinomes ovariens : rôle de la voie Jagged1/Notch3.

1.5.1 Généralités.

L'angiogenèse, processus par lequel des vaisseaux sanguins sont créés *de novo* à partir de cellules endothéliales préexistantes, joue un rôle crucial au niveau de l'initiation tumorale, la dormance, la progression et la dissémination métastatique. Il a été suggéré dans la littérature que l'utilisation des molécules anti-angiogénique pourrait enrayer la capacité des cellules tumorales à accéder aux nutriments et oxygène nécessaires à leur survie et prolifération, en inhibant l'émergence et l'assemblage d'une vasculature tumorale anormale ^{18,189-193} (Figure 9). Ceci pouvant entraîner une régression ou un arrêt de la croissance tumorale de façon dépendante de la molécule anti-angiogénique utilisée. En corroboration avec l'hypothèse énoncée, de nombreuses molécules anti-angiogéniques ont donné d'excellents résultats en bloquant l'invasion et la progression tumorale chez la souris ^{18,189-193}.

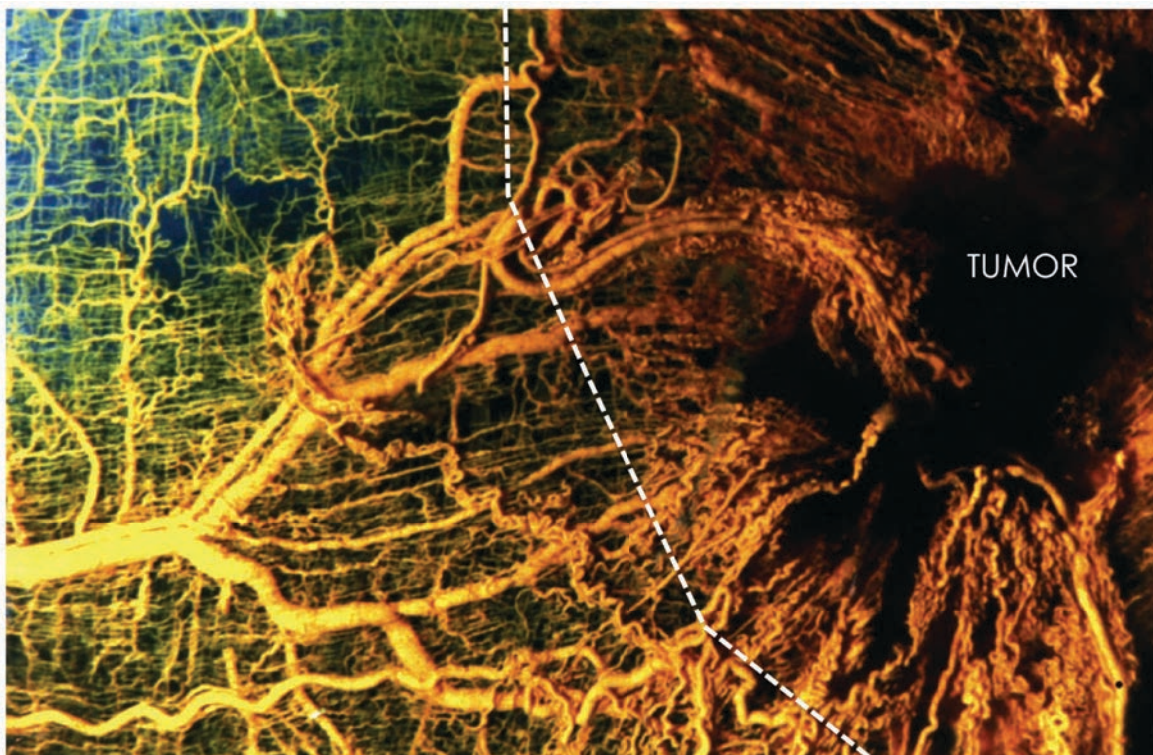


Figure 13-34a The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

Figure 10: Participation des cellules endothéliales au stroma tumoral

Les cellules endothéliales sont recrutées au stroma tumoral via la néo-angiogenèse tumorale. Ce phénomène aboutit à la génération de vaisseaux plutôt immatures, perméables et dilatés.

Malgré l'efficacité réelle de certains agents anti-angiogéniques pour améliorer le pronostic de souris réceptrices d'une xénogreffe, les résultats des essais cliniques testant ces mêmes molécules n'ont pu à ce jour démontrer un vrai gain de survie chez les patients traités par thérapie anti-angiogénique. En effet, lorsque celles-ci sont administrées chez les patients atteints de tumeurs solides de hauts stades en combinaison avec une chimiothérapie classique, le bénéfice sur la survie globale n'est que de quelques mois ¹⁸.

Paradoxalement, dans certains modèles murins, l'inhibition de la néo-angiogenèse tumorale aboutit, via la création d'un environnement hypoxique ou l'activation de signalisations pro-angiogéniques alternatives, à l'augmentation de l'agressivité des cellules tumorales^{194,195}. Ces données suggèrent que les cellules endothéliales supportent la croissance tumorale en dehors de leur fonction vasculogénique¹⁹⁶. C'est à dire que leur rôle n'est pas restreint à la formation d'un conduit capable de délivrer nutriments, et oxygène au tissu tumoral.

Il serait donc concevable que les cellules endothéliales soient capables d'exprimer et de sécréter un set de facteurs, permettant de réguler directement la croissance et la progression tumorale, de façon indépendante du contexte de perfusion. Il a été démontré que lors du développement embryonnaire les cellules endothéliales sont capables de diriger les phénomènes d'organogenèse et plus particulièrement l'organogenèse hépatique, et ce même en l'absence de vasculogénèse et de perfusion sanguine ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Ces données démontrent que les cellules endothéliales peuvent exprimer et produire des facteurs de croissance capables de diriger l'organogenèse, facteurs pouvant potentiellement promouvoir la croissance et la progression tumorale ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.

Ainsi, un des mécanismes alternatifs grâce auquel les cellules endothéliales régulent la croissance et la progression tumorale serait la production de facteurs paracrines que nous appellerons les facteurs angiocrines ²⁰⁰.

1.5.2 Les facteurs angiocrines.

Les facteurs angiocrines comprennent les facteurs de croissance ou cytokines sécrétés par les cellules endothéliales ainsi que les protéines d'adhésion exprimées à leur membrane (Table 4). Parmi les molécules d'adhésion pouvant réguler la croissance tumorale on peut trouver ICAM1 (InterCellular Adhesion Molecule 1), VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), E-selectin, P-selectin et l'acide hyaluronique. Les cytokines comprises parmi les facteurs angiocrines sont l'IL8, le MCP1 (monocyte chemotactic protein 1) aussi connue sous le nom de CCL2 (Chemokine ligand 2) et le CXCL12 entre

autres. Les facteurs angiocrines pourraient accélérer la réparation tissulaire après un traitement à base de molécule anti-angiogénique ou une chimiothérapie. En effet, un nombre croissant de données précliniques suggèrent que les cellules endothéliales ne sont pas seulement des conduits passifs non trombogéniques pour la circulation sanguine mais ont le potentiel de produire des facteurs angiocrines capables d'accroître l'agressivité des tumeurs ²⁰¹⁻²⁰³.

Les cellules endothéliales établissent donc une niche vasculaire à partir de laquelle elles secrètent ou expriment des facteurs membranaires ou secrétés, déposent des composants de la matrice extracellulaire afin de générer un microenvironnement unique capable de moduler la progression tumorale, l'invasion tumorale ou encore la capacité à métastaser.

Angiocrine factors	Function	Organ specificity
BMP2 and BMP4	Organogenesis and tumorigenesis	Nonspecific
FGF2	Organogenesis and tumorigenesis	Nonspecific
BDNF	Neurogenesis	Brain and heart
PEDF	Neurogenesis	Brain and bone marrow
PGF	Angiogenesis and tumorigenesis	Nonspecific
PDGFβ	Angiogenesis and tumorigenesis	Smooth muscle
VEGFA	Angiogenesis and autocrine loop	Vasculature
ANGPT2	Angiogenesis remodelling	Vasculature
Jagged 1 and jagged 2	Haematopoiesis, angiogenesis and tumorigenesis	Bone marrow
LAMA4	Organogenesis and tumorigenesis	Stem cell niches
NO	Tumorigenesis and leukaemogenesis	Nonspecific
IL-8, IL-6, CD40, G-CSF, GM-CSF, IGF1, SDF1, EDN1, MCP1 and TGFβ	Tumorigenesis and tissue repair	Nonspecific

Tableau 4 : Les facteurs angiocrines produits par la niche vasculaire.

Tableau adapté de Butler, J.M., Kobayashi, H. & Rafii, S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. Nat Rev Cancer 10, 138-146 (2010).

Comme les facteurs angiocrines modulent la prolifération et l'auto-renouvellement de cellules souches et progénitrice (au niveau hépatique et hématopoïétique) ²⁰⁴⁻²⁰⁶; il est concevable que ces mêmes facteurs angiocrines soient capables de moduler la prolifération des cellules souches tumorales ou initiateur de tumeurs ²⁰⁷. Même si la signification physiologique ainsi que l'existence des cellules souches tumorales n'ont pas encore été

clairement démontrées ²⁰⁷ et que leur proportion peut varier grandement d'une tumeur à une autre ^{208,209}, il reste concevable que ces mêmes facteurs angiocrines soient impliqués dans l'homéostasie des cellules souches tumorales.

Ici, nous voulons mettre en avant l'idée que les cellules endothéliales qui composent la surface des petites artères et veinules, sont capables d'entretenir la croissance tumorale de façon indépendante de la perfusion sanguine grâce à la production de facteurs angiocrines. Cependant quels sont les facteurs angiocrines sur-exprimés par les cellules endothéliales au contact des tumeurs ?

1.5.3 Cellules endothéliales associée aux tumeurs : activation chronique d'AKT.

Le développement et la maturation des vaisseaux sanguins résultent d'une coopération, d'une balance complexe entre les signaux pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Le déséquilibre dans cette balance de signaux pro et anti pourrait être à la base de la formation de vaisseaux sanguins « pathologiques », comme ceux retrouvés au sein des tumeurs²¹⁰. Les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs sont à la fois perturbés au niveau de leur structure et de leur fonction. Bien qu'hétérogènes, on note que les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs possèdent un plus gros diamètre et sont plus tortueux que les vaisseaux sanguins du tissu sain. De plus, pour un vaisseau de même taille, le vaisseau associé à la tumeur sera beaucoup moins investi par les péricytes, et présentera un déficit dans la composition de sa membrane basale comparé aux vaisseaux du tissu sain^{191,196,211,212}. Les vaisseaux sanguins tumoraux sont aussi hyperperméables aux macromolécules circulantes, cette hyperperméabilité est en partie due à la surproduction du facteur de perméabilité vasculaire, VPF (Vascular Permeability Factor) et du VEGF-A. En résulte l'extravasation de fluide plasmatique et de protéines^{213,214} (Figure 11). Il existe plusieurs signalisations par lesquelles les macromolécules ou autres fluides plasmatiques traversent l'endothélium vasculaire, parmi lesquelles on distinguera les jonctions intercellulaires, les fenêtres, les pores trans-endotheliaux ou encore les organelles vésiculo-vacuolaires²¹⁵⁻²¹⁸. Le VEGF-A est un des facteurs de croissance majeur dans les processus de néo-angiogenèse tumorale, son expression n'est pas seulement régulée par l'état hypoxique du stroma tumoral, mais aussi par certains oncogènes et suppresseurs de tumeurs²¹⁹⁻²²³. La surproduction de VEGF-A par les cellules tumorales entraîne la formation de vaisseaux sanguins de tailles exagérées, tortueux, perméable, dont la survie est sous la dépendance de ce VEGF-A²²⁴ (Figure 11). Dans certaines tumeurs, les vaisseaux sanguins peuvent présenter une certaine résistance au sevrage de VEGF-A lorsqu'ils sont associés à des péricytes ou des muscles mous²²⁵. Enfin la sur-expression de VEGF-A est capable à elle seule de produire des

vaisseaux de tailles exagérées, tortueux et perméables, semblables aux vaisseaux associés aux tumeurs, et ce dans le tissu sain en l'absence de tumeurs^{217,226,227}.

La signalisation PI3K/Akt est une des cibles en aval du VEGF-A, elle promeut, entre autres, la survie des cellules endothéliales²²⁸⁻²³¹. Il est démontré dans la littérature que la phosphorylation de l'isoforme 1 de la protéine AKT est requise pour induire une angiogenèse pathologique dans un modèle murin d'ischémie du membre postérieur et ce en réponse à une perméabilité accrue dépendante du VEGF-A²³².

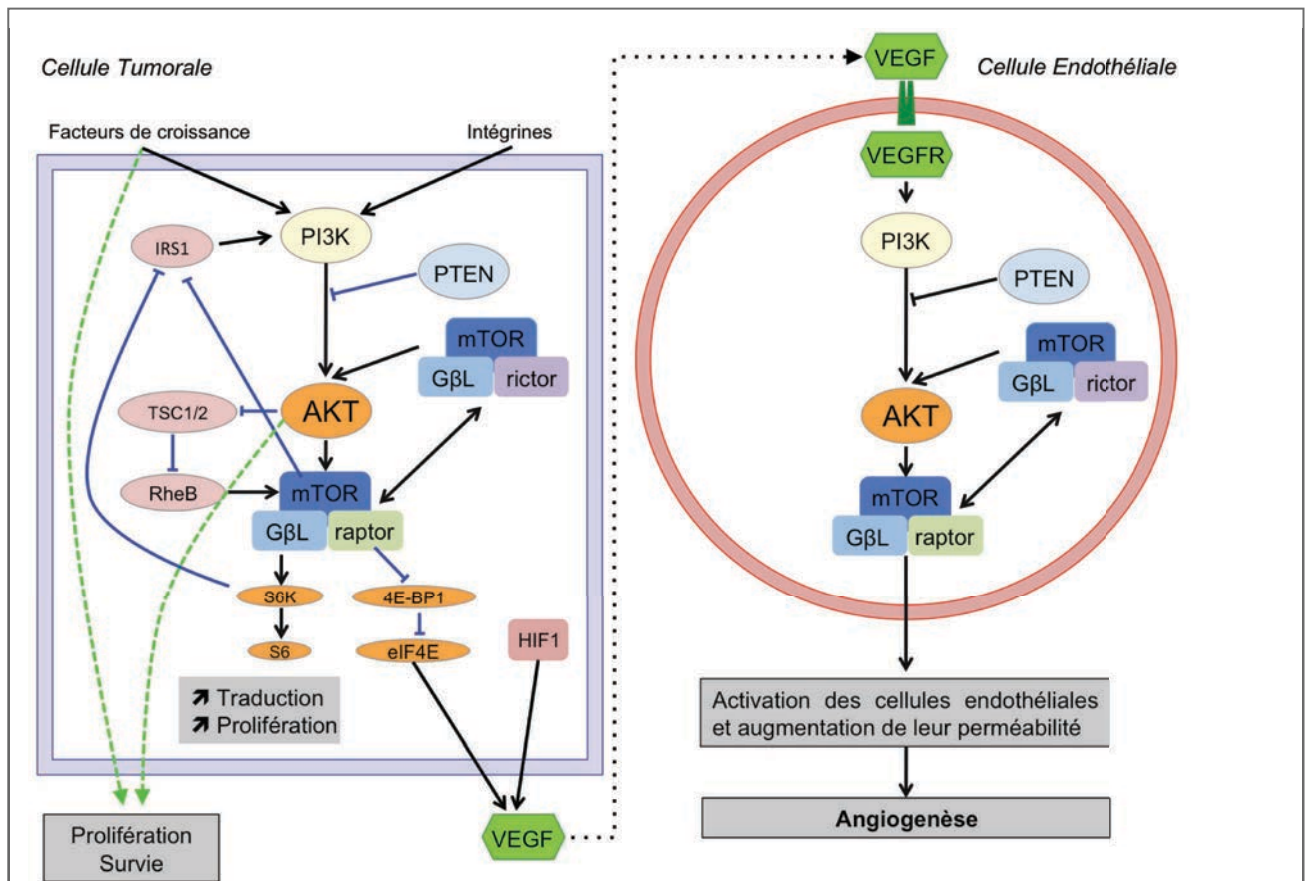


Figure 11: Les cellules endothéliales associées aux tumeurs phosphoryle la protéine AKT.

L'activation de la signalisation PI3K, à la suite d'une stimulation par des facteurs de croissance, ou de la perception de la matrice extracellulaire via les intégrines, aboutit à la phosphorylation de la protéine AKT. L'activation de la protéine AKT conduit à l'assemblage du complexe mTORC1, composée de la protéine GβL et rictor. L'assemblage et l'activation de mTORC1 induisent une augmentation globale de la traduction des ARN messagers, et notamment une augmentation de la traduction du transcrit du VEGF.

Le VEGF ainsi sécrété par les cellules tumorales va se lier à son récepteur le VEGFR présent à la surface des cellules endothéliales. La signalisation en aval du récepteur au VEGF comprend la voie de transduction PI3K/AKT. L'activation de la protéine AKT fait donc suite à une stimulation du VEGFR par son ligand. Cette activation d'AKT, puis de mTORC1, conduit à une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales, leur activation et enfin à la néo-angiogenèse tumorale.

Thuy L. Phung et al observent que les vaisseaux associés aux tumeurs présentent une phosphorylation chronique et tonique de la protéine AKT1. Afin d'étudier les conséquences fonctionnelles de cette phosphorylation, ils créent un modèle transgénique murin dans lequel la forme myristoylée et constitutivement active d'AKT1 est inductible spécifiquement dans les vaisseaux sanguins (myrAkt1 est placée sous le contrôle d'un promoteur vasculaire spécifique : VE-Cadherin) ²³³. La phosphorylation d'AKT1 au niveau vasculaire réussit à résumer à elle seule les propriétés d'un endothélium associé aux tumeurs. En effet, lorsque myrAkt1, est induite les vaisseaux sanguins s'élargissent et deviennent hyperperméables ^{233,234}. Les vaisseaux présentant la forme activée de la protéine AKT1 récapitulent donc l'intégralité des anomalies fonctionnelles et structurales des vaisseaux induits lors d'un processus de néo-angiogénèse tumorale associé au VEGF-A (Figure 11).

Puisque nous voulons mettre en avant l'idée que les cellules endothéliales sont capables d'entretenir la croissance tumorale de façon indépendante de la perfusion sanguine grâce à la production de facteurs angiocrines, il est impératif d'étudier l'expression de ces facteurs angiocrines dans un modèle qui imite les vaisseaux associés aux tumeurs ; c'est à dire utiliser des cellules endothéliales présentant une phosphorylation chronique et tonique de la protéine AKT1.

1.5.4 Un modèle de niche vasculaire tumorale : rôle du gène l'adénovirus E4ORF1.

1.5.4.1 *Généralités.*

Les cellules endothéliales n'ont pas pour seul but de former des vaisseaux pour délivrer oxygène et nutriments, elles peuvent aussi servir de niche permissive à la progression tumorale ²³⁵. Par exemple, les cellules endothéliales promeuvent la croissance des cellules leucémiques ²³⁶ ou glioblastomateuses ²³⁷. Cependant, la difficulté à cultiver des cellules endothéliales primaires (primary Endothelial Cell, PEC) de bonne qualité à long terme a longtemps ralenti les progrès de la recherche sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'interaction entre les PEC et les cellules tumorales. La maintenance de PEC en culture nécessite un milieu dédié enrichi en nombreux facteurs de croissance, comme du sérum ²³⁸, des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF-A, le FGF2, l'EGF, l'IGF etc ²³⁹⁻²⁴¹. De façon assez remarquable, un sevrage de quelques heures des PEC de ces facteurs de croissance suffit à provoquer une mort cellulaire programmée très rapide²⁰¹. Ainsi, l'utilisation de PEC comme cellules « feeder », nourricières, doit être entreprise en présence de ces milieux de culture dédiés aux cellules endothéliales. Ces milieux enrichis en facteurs de croissance vont influencer de façon dramatique la physiologie des cellules tumorales co-cultivées avec les PEC. Cette utilisation de facteurs de croissance supplémentaires induit donc un biais dans les études de l'effet la niche vasculaire sur les cellules tumorales.

Afin de contourner les obstacles propres à la culture des PEC, certains groupes ont immortalisé les PEC en utilisant la transcriptase inverse de la télomérase (human Telomerase Reverse Transcriptase, hTERT), l'antigène grand T du virus simien 40 ou encore l'antigène moyen T des polyomavirus ^{242,243}. Cependant, l'activation des signaux de prolifération liée à l'immortalisation (phosphorylation de MAPK) entraîne la génération de cellules endothéliales atypiques : dépendantes de la présence de sérum ou encore présentant des caractéristiques de cellules transformées ^{242,243}. De plus, du fait de leur métabolisme important (lié à l'activation tonique des signaux de prolifération) ²⁴⁴ les PEC immortalisées consomment la majorité des nutriments et facteurs de croissance présents dans le milieu de culture, rendant leur co-culture avec des cellules tumorales primaires assez délicate.

Ainsi pour modéliser la niche vasculaire tumorale, on se doit de contourner deux obstacles : (i) la dépendance des PEC aux divers facteurs pro-angiogéniques, (ii) obtenir l'activation de la protéine Akt1 sans pour autant activer les voies de prolifération dont l'activation se fait au détriment de la fonction des cellules endothéliales.

1.5.4.2 Le gène E4ORF1 de l'adénovirus.

Le laboratoire de Shahin Rafii a réussi à identifier un gène capable de supporter la croissance à long terme des PEC. Le gène de l'adénovirus 36 E4ORF1 (Early gene 4 Open Reading Frame), lorsqu'il est introduit dans les cellules endothéliales (E4ORF1-PEC), permet de maintenir à long terme les capacités angiogéniques des cellules endothéliales, sans pour autant induire les modifications délétères liées au processus de transformation cellulaire. Le répertoire angiogénique des E4ORF1-PEC est similaire à celui des PEC fraîchement isolées²⁰¹. Ainsi les E4ORF1-PEC pourraient nous fournir une plateforme intéressante pour étudier le rôle de la niche vasculaire.

Les adénovirus possèdent un set de gènes précoces qui codent pour des protéines associées à l'évasion au système immunitaire, la réplication virale et le détournement de la machine cellulaire de la cellule hôte ; ils possèdent aussi un set de gènes dits tardifs codant pour des protéines structurales. Le gène E4ORF1 est transcrit sur le premier cadre ouvert de lecture du gène précoce 4 l'adénovirus 36, le produit de ce transcrit est une protéine de 125 acides aminés (15 kDA). Cette protéine est assez homologue à la deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) ancestrale humaine, elle possède un motif de liaison au domaine PDZ (Post synaptic density protein (PSD95), *Drosophila* disc large tumor suppressor 1 (Dlg1), and *Zonula Occludens-1* protein (ZO-1)) appelée PBM (PDZ binding motif) qui lui permet d'interagir avec des protéines présentant un domaine PDZ. La protéine E4ORF1 se lie via son domaine PBM à la protéine Dlg1²⁴⁵, ce complexe est alors transloqué à la membrane plasmique où il active la protéine PI3K de façon dépendante de Ras dans le cas de la protéine E4ORF1 de l'adénovirus 4, mais de façon indépendante de Ras dans les cas de l'adénovirus 36²⁴⁵⁻²⁴⁷. La protéine E4ORF1, et ce, de façon assez surprenante, lorsqu'elle est introduite dans des cellules humaines affecte plutôt la survie cellulaire plutôt que leur prolifération^{248,249}.

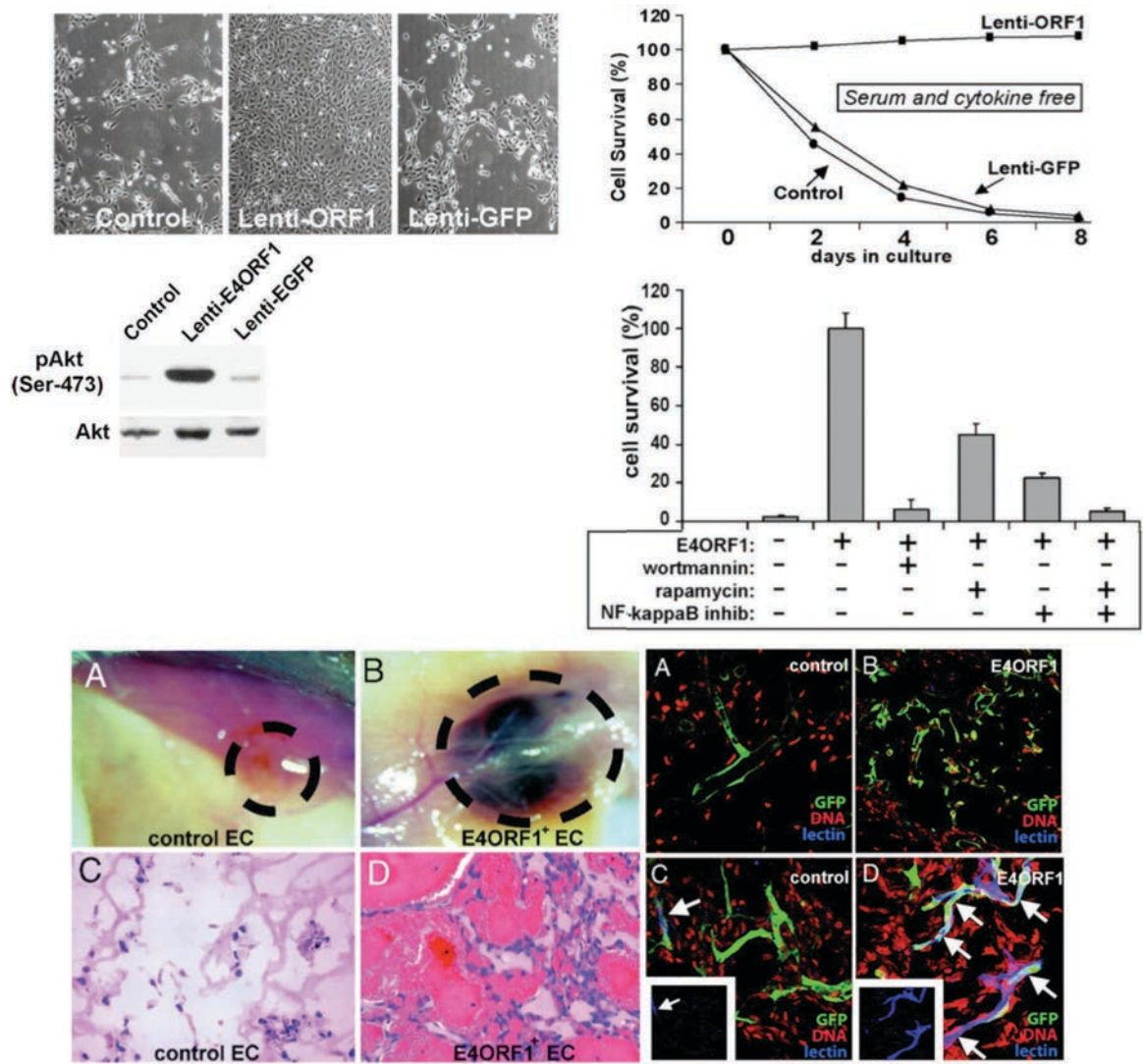


Figure 12: Présentation du modèle PEC-E4ORF1.

La transduction de PEC par le transgène E4ORF1, rend possible la culture de PEC dans un milieu de culture sans sérum, sans facteurs de croissance ou de cytokines (photos en haut à gauche, graphique). La culture sans sérum sans cytokines est permise par la phosphorylation d'AKT (western blot central). Ainsi l'effet du transgène E4ORF1 peut être inhibé par des inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR-NFκB (graphique panel central). Les PEC-E4OF1 maintiennent un potentiel angiogénique, comme le démontre la génération de lésions hémogénique suite à leur greffe chez le petit animal (Photo A,B, immunohistochimie C,D [gauche]) et génèrent une niche vasculaire mature (immunofluorescence + marquage lectine A-D [droite])

Figures adaptées de Seandel, M. et al. Generation of a functional and durable vascular niche by the adenoviral E4ORF1 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 19288-19293 (2008).

L'insertion du gène E4ORF1 dans les PEC, accroît leur survie permettant leur culture dans un milieu sans cytokines ou facteur croissance et sans ajout de sérum. L'expression de cette protéine adénovirale ne provoque pas une prolifération aberrante des cellules endothéliales primaires²⁰¹. De plus, l'insertion de ce complexe adénovirale ne modifie pas les propriétés angiogéniques des cellules endothéliales, en modulant leur capacité migratoire et leur survie *in vitro* ni leur *in vivo*²⁵⁰ (Figure 12).

L'effet pro-survie d'E4ORF1 sur les cellules endothéliales s'explique par l'activation de la voie PI3K-Akt1-mTOR et la nucléarisation de facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor Kappa B), par une diminution de l'activité caspase 3 lorsque les E4ORF1-PEC sont cultivées sans sérum sans cytokine, sans pour autant activer la signalisation MAPK, conservant ainsi la cellule endothéliale quiescente^{201,205,251}. Ainsi la génération E4ORF1-PEC nous permet de contourner les deux obstacles majeurs à l'étude de la niche vasculaire tumorale. Elle nous permet de pouvoir co-cultiver l'endothélium et les cellules tumorales en l'absence de sérum ou autre cytokine, nous autorisant ainsi à questionner l'effet de la niche vasculaire. Enfin, l'utilisation de cellules endothéliales présentant une phosphorylation chronique et tonique de la protéine Akt1 sans pour autant activer des voies pro-prolifératives nous permet d'utiliser un modèle plus proche de la physiologie des cellules endothéliales associées aux tumeurs (Figure 12).

Le modèle E4ORF1-PEC nous offre un accès aux facteurs angiocrines régulés par la protéine AKT1 activée, mimant un endothélium associé aux tumeurs. Les récents travaux d'Hideki Kobayashi et al. démontrent qu'il existe un set spécifique de gènes surexprimés ou inhibés par la phosphorylation d'Akt1 dans les cellules endothéliales²⁰⁴. Parmi les gènes surexprimés sous l'effet de la forme phosphorylée d'Akt1, on note la présence de la quasi intégralité de la famille des ligands de Notch (Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL4).

Une des questions qui s'est posée lors de ce travail de thèse a été de comprendre le rôle de ligands de Notch exprimés par les cellules endothéliales associées aux tumeurs (représentées par le modèle E4ORF1-PEC) sur la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies à base de sels de platines et de taxanes.

1.5.5 Role de la voie Notch dans les cancers de l'ovaire.

1.5.5.1 Généralités sur la voie Notch.

La signalisation Notch est une signalisation conservée au cours de l'évolution. Elle est composée par deux grandes familles de ligands, Delta et Jagged, de récepteurs Notch, un de facteurs de transcription tels que CSL (CBF1/RBP-Jk/Suppressor of Hairless/LAG-1)²⁵². La famille des récepteurs Notch chez les mammifères est composée de quatre récepteurs Notch 1, 2, 3 et 4 et de cinq ligands, Jagged-1, Jagged-2, Delta-like-1 (DLL1), Delta-like-3 (DLL3) et Delta-like 4 (DLL4)²⁵².

La signalisation Notch est initiée par une interaction entre un récepteur et son ligand. Celle-ci déclenche une série de clivages protéolytiques qui aboutit à la libération du domaine intracellulaire de Notch (NICD, Notch Intracellular Cytoplasmic Domain) dans le cytoplasme. Le NICD est nucléarisé pour s'associer à la protéine CSL et convertit celle-ci en activateur de la transcription des gènes cibles de Notch (figure 13)²⁵².

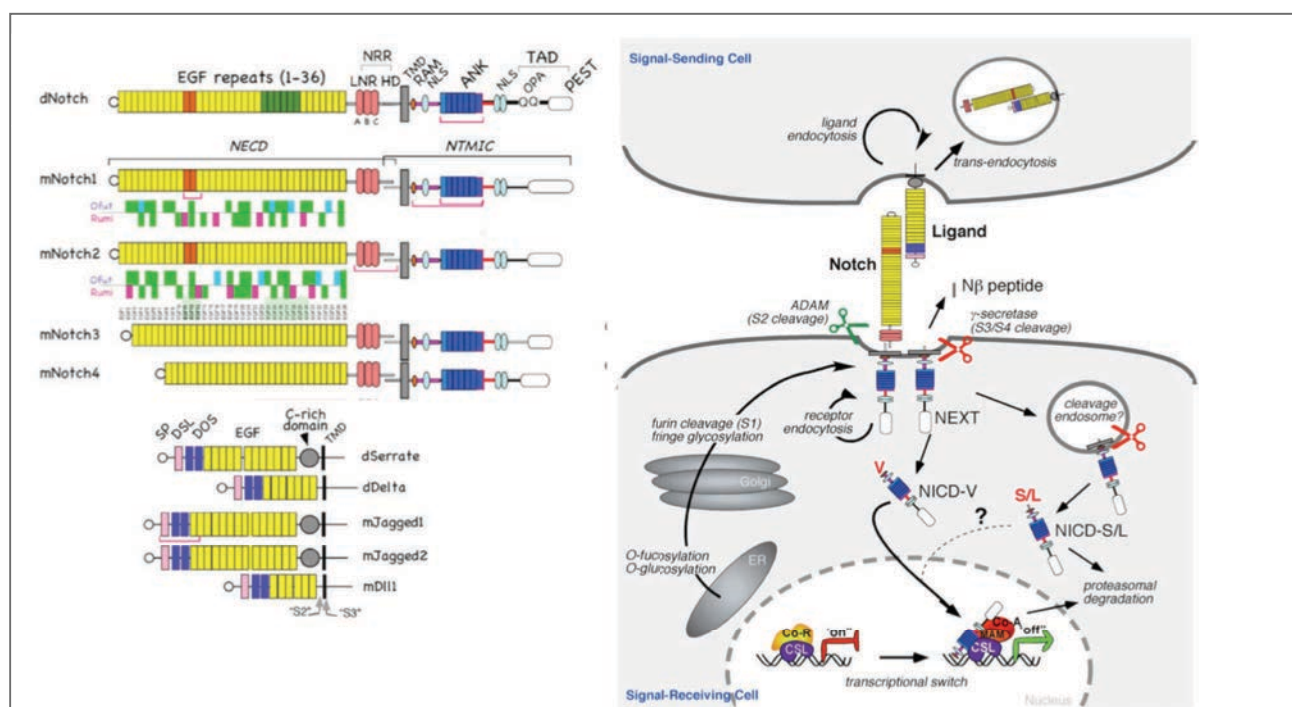


Figure 13: Généralités sur la voie Notch.

(gauche), Les différents récepteurs et ligands de la famille Notch. Ce schéma représente linéairement la structure des protéines, ainsi que les différents domaines rencontrés. (droite) Signalisation canonique de la voie Notch, lorsqu'un des récepteurs est engagé par son ligand.

Figures adaptées de Kopan, R. & Ilagan, M.X. *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism.* Cell 137, 216-33 (2009).

1.5.5.2 Le gène *Notch3* est amplifié dans les cancers de l'ovaire.

L'amplification de gènes est un processus commun au cours de la tumorigénèse. Les travaux de Joon T Park et al. et Kentaro Nakayama et al. démontrent qu'il existe, chez 20% des patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade, un amplicon sur le chromosome 19 en 19p13.12²⁵³⁻²⁵⁵. Cet amplicon comprend 34 gènes codant pour des protéines, parmi lesquels Joon T Park et al. et Kentaro Nakayama et al. identifient le gène *Notch3*^{254,255} (Figure 14). L'amplification du gène *Notch3*, chez ces patientes, correspond à une surexpression de la protéine à la membrane des cellules tumorales ovariennes. Cette amplification de la signalisation *Notch3* a été récemment validée par le TCGA, leur étude démontre que dans 22% des cas, cette signalisation est altérée et le gène *Notch3* est amplifié dans 11 % des cas³⁷.

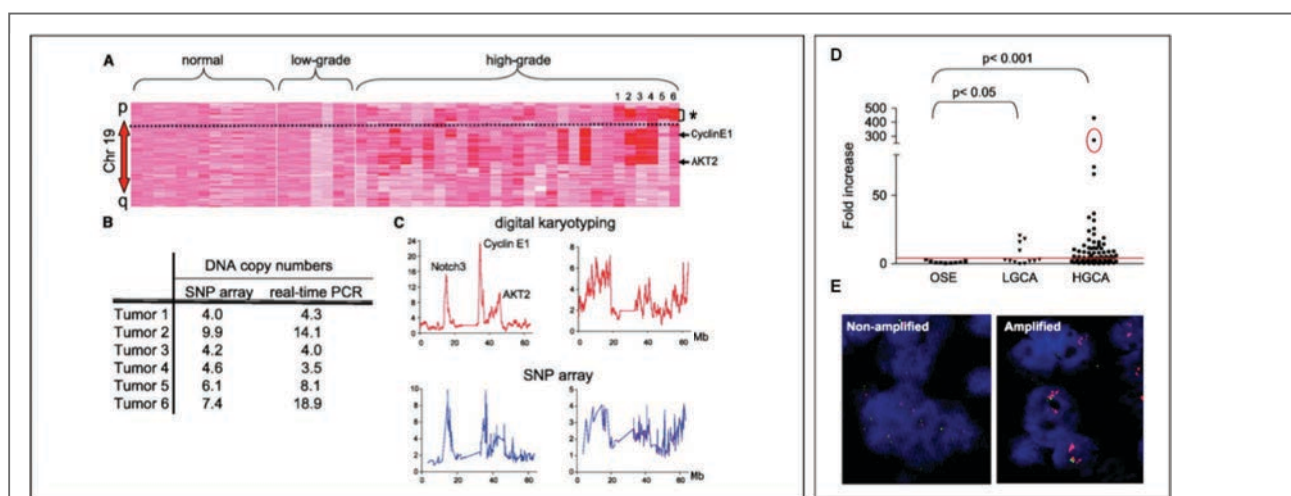


Figure 14: Amplification du gène *Notch3* dans les adénocarcinomes séreux ovariens.

A. Analyse des SNP sur SNP array. On peut distinguer plusieurs amplicons sur le chromosome 19, incluant notamment des amplicons au niveau des gènes de la cyclines E1 et de AKT2, et un amplicon non décrit à ce jour en position chr19p13.12. L'augmentation du nombre de copie est représentée par un gradient de blanc (pas de copie) à rouge (plus de 5 copies). Chaque colonne représente un échantillon tumoral ou de tissu sain différent. **B.** qRT-PCR validant sur 6 tumeurs l'amplicon observé en chr19p13.12 sur le SNP array. **C.** Comparaison du nombre de copies sur le chromosome 19 par étude des SNP et karyotype digital. Sur la gauche, un échantillon tumoral présentant un amplicon sur chr19p13.12 ; sur la droite un échantillon tumoral contrôle. L'étude des SNP corrèle avec les altérations présentes sur le karyotype digital. **D.** Analyse par qRT-PCR de l'expression du transcrit *Notch3*, on note que son expression est augmentée dans les adénocarcinomes de haut grade par rapport au tissu sain qui ne l'exprime pas. **E.** Analyse par FISH montrant que des régions géniques amplifiées corrélant avec l'accumulation du transcrit décrit en D., la tumeur de gauche est une tumeur contrôle ne présentant pas d'amplicon en chr19p13.12.

Figures adaptées de Park, J.T. et al. *Notch3 Gene Amplification in Ovarian Cancer. Cancer Research* **66**, 6312-6318 (2006).

Ces données suggèrent que le gène Notch3 est sélectionné lors du processus de tumorigenèse ovarienne, et doit présenter une fonction essentielle pour sa progression.

L'inactivation du gène Notch3, par des ARN interférant, dans les lignées ovariennes qui présentent l'amplification conduit à un arrêt de la prolifération puis à une induction de la mort cellulaire programmée ²⁵⁵.

1.5.5.3 Fonction de la signalisation Notch3 dans les cancers de l'ovaire.

Le récepteur Notch3 est donc un gène amplifié dans les adénocarcinomes séreux de haut grade. Notch3 régule l'adhésion des cellules tumorales ovariennes aux cellules mésothéliales exprimant un de ses ligands Jagged1 ²⁵⁶. L'adhérence des cellules tumorales ovariennes sur un tapis de « feeder » mésothéliaux augmente leur prolifération ²⁵⁶. L'inhibition de l'expression de Jagged1 sur les cellules mésothéliales ou des cellules tumorales ovariennes est nécessaire et suffisante pour inhiber à la fois les mécanismes d'adhérence cellules-cellules et l'induction de la prolifération tumorale ²⁵⁶. Les travaux de Choi et al. démontrent que Jagged 1 est le ligand de Notch le plus exprimé par les cellules mésothéliales ainsi que par les cellules tumorales ovariennes ²⁵⁶. L'expression de Jagged 1 à la surface des cellules tumorales ovariennes est positivement régulée par Notch 3 ²⁵⁷. Ainsi il existe dans les adénocarcinomes ovariens une boucle juxtacrine Jagged1/Notch3 régulant l'adhésion des cellules tumorales ovariennes aux cellules mésothéliales. Le but de ce travail de thèse étant d'étudier le rôle du microenvironnement dans l'émergence des résistances aux chimiothérapies, le couple Jagged1/Notch3 semble constituer un candidat sérieux dans le cadre de ce travail.

1.5.5.4 Implication du gène Notch3 dans les résistances aux thérapies.

Les travaux de Sang Jung et al. et de Joon Tae Park et al. démontrent que l'expression de Notch3 par les adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade constitue un facteur prédictif de la réponse à la chimiothérapie à base de sels de platines, ainsi qu'un facteur pronostique de la rechute ^{258,259}. Sang Jung et al. sur une série de 175 tumeurs étudient l'expression du transcrite de Notch3 par qPCR ainsi que celle de la protéine par immunohistochimie (IHC) ²⁵⁸. Ils confirment tout d'abord que Notch3 est un gène sélectionné par la tumorigenèse ovarienne. Ainsi, son expression est en moyenne dix-sept fois plus importante que dans le tissu sain ou la tumeur bénigne ²⁵⁸. Que ce soit dans la série de Sang Jung et al. ou de Joon Tae Park et al. l'expression de Notch3 corrèle positivement

avec les stades avancés des adénocarcinomes ovariens, l'envahissement des ganglions lombo-aortiques, et aussi avec l'envahissement péritonéal^{258,259}.

De façon intéressante l'expression de Notch3 chez les patientes permet de définir un groupe de patientes de mauvais pronostic, aussi bien au niveau de la survie sans récurrence que de la survie globale, suggérant que le récepteur Notch3 est impliqué dans les mécanismes de chimiorésistance^{258,259} (Figure15). Ces données cliniques viennent conforter certaines données obtenues in vitro où l'expression ectopique de Notch3 dans des lignées tumorales ovariennes permet d'augmenter de façon significative la concentration inhibitrice 50 (CI50)²⁵⁹. De la même façon, l'inhibition de l'expression par ARN interférant de Notch3 est suffisante pour restaurer une sensibilité accrue au carboplatine^{258,259}.

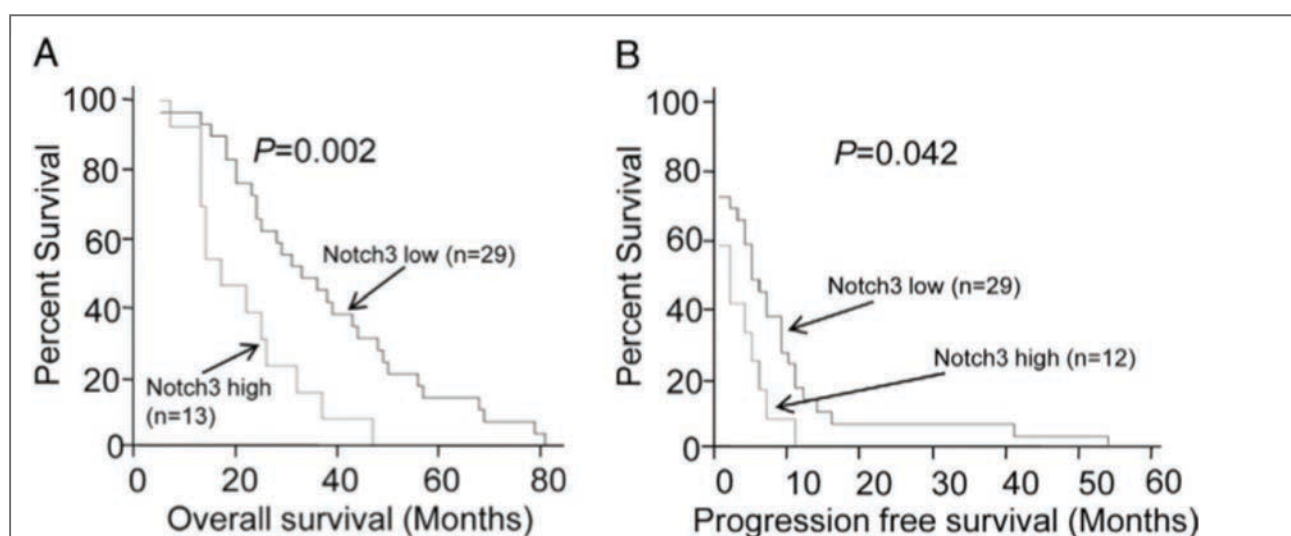


Figure 15 : L'expression de Notch3 est de mauvais pronostic dans les adénocarcinomes ovariens séreux.

A. Courbe de Kaplan-Meier montrant une association entre l'expression de l'ARNm Notch3 et la survie globale sur 42 patientes en rechute après leurs chimiothérapies. Les patientes ayant un fort taux de transcrite Notch3 présentent une médiane de survie globale de 22 mois comparée au 37 chez les patientes ayant une faible expression de Notch3 ($p = 0.002$) **B.** Courbe de Kaplan-Meier montrant une association entre l'expression de l'ARNm Notch3 et la survie sans progression sur 42 patientes en rechutes post-chimiothérapies. Les patientes ayant un fort taux de transcrite Notch3 présentent une médiane de survie sans progression de 3 mois comparée aux 8 mois chez les patientes ayant une faible expression de Notch3 ($p = 0.002$)

Figures adaptées de Park, J.T. et al. Notch3 overexpression is related to the recurrence of ovarian cancer and confers resistance to carboplatin. Am J Pathol 177, 1087-94 (2010).

1.5.6 Démarche de recherche sur les cellules endothéliales.

Puisque nous voulons mettre en avant l'idée que les cellules endothéliales sont capables d'entretenir la croissance tumorale de façon indépendante de la perfusion sanguine grâce à la production de facteurs angiocrines, il est impératif d'étudier l'expression de ces facteurs angiocrines dans un modèle qui imite les vaisseaux associés aux tumeurs, c'est à dire d'utiliser des cellules endothéliales présentant une phosphorylation chronique et tonique de la protéine AKT1.

Nous avons modélisé la niche tumorale vasculaire en utilisant le modèle E4ORF1-PEC qui nous permet de contourner deux obstacles techniques : (i) la dépendance des PEC aux divers facteurs pro-angiogéniques, (ii) obtenir l'activation de la protéine AKT1 sans pour autant activer les voies de prolifération dont l'activation se fait au détriment de la fonction des cellules endothéliales.

La phosphorylation d'AKT1 dans les E4ORF1-PEC aboutit à la surexpression de facteur angiocrines, parmi lesquels on note la présence des ligands de Notch, et plus particulièrement Jagged1.

Le couple Notch3/Jagged1 constitue chez les patientes une variable indépendante concernant la survie globale et la réponse à la chimiothérapie à base de sels de platines. Une des questions qui s'est posée lors de ce travail de thèse a été de comprendre le rôle de ligands de Notch exprimés par les cellules endothéliales associées aux tumeurs (représentées par le modèle E4ORF1-PEC) sur la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies à base de sels de platines et de taxanes.

1.6 Organisation de l'ouvrage.

Le présent ouvrage sera divisé en plusieurs volets :

- I. Modifications transcriptomiques des cellules tumorales ovariennes par les cellules souches mésenchymateuses : génération d'un profil pro-métastatique.
« Mesenchymal cells interaction with ovarian cancer cells triggers wide transcriptomic pro-metastatic profile. »

- II. Les cellules souches mésenchymateuses protègent les cellules tumorales ovariennes de la mort induite par l'hyperthermie grâce à la sécrétion de la cytokine CXCL12.
« Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12 »

- III. Les cellules endothéliales activant la protéine AKT, protègent les cellules tumorales des traitements conventionnels de chimiothérapies, par l'activation de la voie Notch.
« Akt-activated endothelial promote chemoresistance of ovarian cancer cells. »

En annexe, sont présentés un article et une revue :

- IV. Expression *de novo* de la protéine N-Cadhérine par les cellules tumorales mammaires. Implication éventuelle de la trogocytose oncologique.
« Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells. ».

- V. L'utilisation des cellules souches en médecine régénérative.
« Stem cells in therapeutic medicine »

2 Matériels et méthodes.

La majorité des méthodes employées est détaillée dans les sections « Materials and methods » des articles insérés ci-après. Une liste exhaustive de ces techniques, avec une brève explication est présentée ci-dessous.

2.1 Culture cellulaire.

Les lignées tumorales ovariennes SKOV3 (HTB-77), CaOV3 (HTB-75), et NIH : OVCAR3 (HTB-161) ont été obtenues par l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules tumorales ovariennes SKOV3 (HTB-77) ont été maintenues en culture en suivant les recommandations de l'ATCC (DMEM high glucose [Hyclone, Thermo Scientific], 10% FBS [Hyclone, Thermo Scientific], 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericyn B solution [Sigma], 1 Non Essential Amino-Acid [Hyclone, Thermo Scientific]). Les CaOV3 et les NIH : OVCAR3 ont elles aussi été maintenues en culture en suivant les recommandations de l'ATCC (DMEM high glucose [Hyclone, Thermo Scientific], 20% FBS [Hyclone, Thermo Scientific], 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericyn B solution [Sigma], 1 Non Essential Amino-Acid [Hyclone, Thermo Scientific], 2mM L-Glutamine).

Les cellules souches mésenchymateuses dérivées de moelle osseuse ont été obtenues chez la compagnie Stem Cell (Vancouver, CA). Ces MSC ont été cultivées dans le milieu : MSC Basal Medium (Stem Cell [Vancouver, CA]) auquel on a ajouté les Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Stem Cell [Vancouver, CA]), et ce conformément aux instructions du fournisseur.

Les cellules souches mésenchymateuses dérivées de cellules souches embryonnaires humaines exprimant constitutivement la protéine fluorescente mOrange ont été cultivées dans un milieu ayant pour formulation : DMEM low glucose (Hyclone, Thermo Scientific), 20% FBS (Hyclone, Thermo Scientific), 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericyn B solution (Sigma), 2mM L-Glutamine.

Les cellules endothéliales de cordon ombilical (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ont été obtenues chez BD Biosciences. Elles sont maintenues en culture sur une couche mince de gélatine à 0.1 gramme par litre, dans un milieu ayant pour formulation : M199, 20%FBS, 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericyn B solution (Sigma), 2mM L-Glutamine, 25 ng.ml Endothelial Cell Growth Factor (ECGF, Sigma), 20 unités par millilitres d'héparine.

Les cellules endothéliales transduites par le gène de l'adénovirus E4ORF1, sont maintenues dans les mêmes conditions que les HUVEC. Cependant la culture de ces cellules ne nécessite pas le dépôt d'une couche mince de gélatine à 0.1%.

2.2 Co-cultures.

Les co-cultures de cellules tumorales ovariennes et cellules du stroma (MSC ou cellules endothéliales) sont réalisées 24h avant l'expérience. Brièvement, une suspension de cellules tumorales ovariennes est déposée sur un tapis de cellules stromales dans les puits d'une plaque de 24 puits ou 6 puits. Les deux types cellulaires sont ensuite cultivées dans un milieu DMEM, sans sérum bovin fœtal, avec 10 000 UI/mL de Pénicilline, 10mg/mL de Streptomycine, et de 2 mM de glutamine pendant 24h, à 37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide.

2.3 Test d'adhérence.

Pour étudier l'adhésion à la MEC, des plaques sont coatées avec du Matrigel (BD Biosciences) selon les recommandations du fabricant. 2×10^4 cellules OVCAR-3 eGFP provenant de mono ou de co-culture avec des MSC séparées par FACS (Fluorescent activated cell sorting) sont déposées dans chaque puits et incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 15, 30 minutes et 1 heure. Les plaques sont lues avec un spectrophotomètre aux longueurs d'onde 488 nm pour l'excitation et 510 nm pour l'émission.

2.4 Test de migration/invasion.

Pour mettre en évidence l'invasion de la MEC, des supports perméables Transwell 8 µm de 24 puits sont coatés avec du Matrigel (BD Biosciences) à 4°C. Les cellules OVCAR-3 sont cultivées sans sérum la veille de l'expérience. 5×10^4 cellules OVCAR-3 sont déposées par puit et incubées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 12 et 24 heures. La chambre supérieure contient un milieu sans sérum tandis que la chambre inférieure du dispositif contient un milieu avec sérum.

2.5 Cytométrie en flux.

Les cellules tumorales ovariennes, endothéliales, ou souches mésenchymateuses sont trypsinées, puis bloquées à l'aide d'une solution de PBS-5%FBS-1%BSA-10%FcR Blocking Reagent (Myltenyi Biotec) à 4 degrés celsius. La suspension cellulaire est ensuite marquée avec les anticorps nécessaires à l'expérience pour 15 minutes à température ambiante, puis filtrée à 40 µm. La suspension unicellulaire est ensuite analysée par cytométrie en flux à l'aide d'un SORP FACSAria2 (BD Biosciences). Les données sont acquises et analysées sur FACSDiva 6.3 software (BD Biosciences). Brièvement, les doublets sont exclus par une double gate morphologique FSC-W × FSC-H and SSC-W × SSC-H, les canaux simple marquage sont utilisés pour régler les compensation, et les FMO (Fluorescence Minus One) sont utilisés pour définir les populations cellulaires positives pour un marqueur d'intérêt. Généralement 100 000

événements sont acquis pour l'analyse, durant le tri cellulaire on appliqué un masque de pureté pour minimiser les contaminations entre les populations triées.

2.6 Traitement hyperthermique.

Les différents types cellulaires ont été placés dans une étuve à 42°C pendant 1 à 2 heures (5%CO₂, atmosphère humide). Les cellules sont ensuite placées à 37°C pendant 2 heures avant de pratiquer une expérience.

2.7 Test de viabilité par cytométrie en flux : Calcein-AM / Live Dead.

Les cellules tumorales ovariennes en mono- ou en coculture sur un lit de MSC ou de cellules endothéliales depuis 24h sont traitées par différentes doses de cisplatine et paclitaxel. 48h après, un quadruple marquage des cellules tumorales ovariennes, MSC ou cellules endothéliales est réalisé avec des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes : EpCam (Molécule d'adhésion des cellules épithéliales, CD326) Alexia Fluor 647 nm pour sélectionner les cellules épithéliales tumorales, l'IgG Pacific Blue pour exclure la fluorescence aspécifique FcR dépendante, et le LiveDead Near IR (Invitrogen, Molecular probes) pour quantifier les cellules mortes. La suspension cellulaire est analysée par un cytomètre en flux LSR II (BD Biosciences). Les doublets sont exclus par les analyses FSC-W × FSC-H et SSC-W × SSC-H. La eGFP est excitée par un laser bleu à 488 nm et l'émission est lue à 510/50 nm. En monoculture, les cellules OVCAR-3 sont définies comme eGFP+LiveDead-, en co-culture, les cellules vivantes sont définies comme SSC-A+LiveDead- et les OVCAR-3 comme eGFP+EpCam+. 50 000 cellules par échantillon sont analysées. La préparation et l'acquisition des données des monocultures de cellules OVCAR-3 sont réalisées de manière identique pour éviter tout changement d'expression génique, d'invasion cellulaire ou de migration du à la procédure expérimentale.

2.8 Analyse du secretome.

Les cellules mésenchymales associées aux tumeurs ou cellules souches mésenchymateuses ont été cultivées dans un milieu sans sérum pendant 24 heures. Les cellules mésenchymales associées aux tumeurs ou cellules souches mésenchymateuses ont ensuite été traitées par hyperthermie comme décrit ci-dessus. Le milieu conditionné est ensuite collecté, et les protéines qu'il contient quantifiées en mesurant l'absorbance du milieu à 280 nm sur un Nanodrop (Thermo Scientific, Dubai, Emirates). 200 µg de protéines sont déposés sur RayBioVR Human Cytokine Antibody Array G Series 1000 conformément aux instructions du fournisseur. Le milieu non conditionné a été utilisé comme contrôle négatif. Les membranes ont ensuite été révélées par une réaction

chemiluminescence entre l'HRP (Horse Radish Peroxydase) et le SuperSignal West Pico Luminescent Substrates (Thermo Scientific, Dubai, Emirates). Les données sont acquises par caméra CCD (Geliance CCD camera, Perkin Elmer) puis traitées sur le logiciel ImageJ. Brièvement, les signaux acquis sur les membranes ont tout d'abord été inversés et l'intensité du bruit de fond soustraite. Nous avons ensuite défini des disques de 110-120 μm de diamètre pour capturer l'intensité d'une cytokine donnée. Afin de comparer les membranes entre elles, toutes les valeurs sont normalisées sur la base du contrôle positif interne à la membrane.

2.9 Analyse du transcriptome.

Les ARN messagers sont isolés en utilisant le kit Qiagen RNEasy en suivant les instructions du fournisseur. Deux contrôles qualités sont ensuite mis en œuvre afin de produire des données d'analyse transcriptomique satisfaisantes. (1) une analyse spectrophotométrique, (2) une analyse de la fragmentation de l'ARN sur puce Agilent. Un total de 200 ng d'ARN messenger est ensuite analysé sur Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Les données sont ensuite normalisées via le logiciel Partek: (1) par puce, en divisant les données brutes par le 50^{ème} percentile de toutes les mesures, (2) par gène, en divisant les données brutes par la médiane d'expression de tous les gènes contenu sur la puce. Les données sont ensuite traitées sur le logiciel Partek. Une comparaison de classe entre les différentes conditions (3 répliquats biologiques par condition) a été menée afin d'identifier les changements sur l'expression des transcrits avec une différence significative en suivant le « associated two-tailed Students t-test ($p < 0.05$) » et une diminution ou une augmentation d'un facteur 2 au minimum. Les images des puces scannées sont ensuite analysées par Microarray Suite version 5.0 (MAS 5.0) algorithm (Affymetrix) comme décrit dans ²⁶⁰⁻²⁶². Brièvement, les données sont corrigées par une correction de Benjamini-Hochberg pour limiter le taux de faux-positifs. Les comparaisons statistiques de données catégoriques sont menées en utilisant le test de χ^2 . Les corrélations sont effectuées en utilisant la corrélation de Pearson. Toutes autres comparaisons statistiques est calculée par le two-tailed (Welsh) t-test.

2.10 Analyse des voies de transcription, Ingenuity Pathway Analysis.

Afin d'identifier les voies de transcription modifiées sur la base de nos études transcriptomiques, nous avons utilisé le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Les réseaux de transduction ont été construits en superposant les gènes obtenus dans les listes de gènes significativement surexprimés ou sous-exprimés et les réseaux moléculaires contenus dans la base de données d'Ingenuity

Pathways Knowledge. Les voies de transduction affectées par la co-culture avec les MSC ont été générées algorithmiquement sur la base de leur relevance statistique. Un réseau est la représentation graphique du lien entre les gènes. Les gènes sont représentés par des nœuds ; la relation, stimulatrice ou inhibitrice, entre les différents gènes est représentée par une ligne. La significativité statistique des réseaux générés est basée sur leur distribution hypergéométrique et est calculée par le right-tailed Fisher's exact *t*-test.

2.11 Isolation de cellules tumorales ovariennes primaires.

Les échantillons tumoraux sont dilacérés puis digérés pendant 45-60 minutes dans un cocktail enzymatique de collagenase A, Dispase II, et DNase II à 37°C sous agitation. Le produit de digestion est ensuite filtré à 30 µm. La suspension cellulaire est ensuite mise en culture dans un milieu M199/MCDB105 (Sigma), 20%FCS, 10 ng.ml EGF (Peprotech), 34 µg.ml d'extrait pituitaire bovin (Sigma), 5 µg.ml insuline, 0.5 µg.ml d'hyrdocortisone, à 37°C, 5%CO₂, atmosphère humide.

Les cellules tumorales primaires isolées à partir d'échantillons tumoraux, sont quantifiées par immunofluorescence dirigée contre CD45 et EpCAM. Le nombre de cellules tumorales primaires ovariennes est défini par cytométrie en flux, par le nombre d'évènements CD45-CD326+. L'intensité de marquages a été déterminée par la médiane d'intensité de fluorescence calculée sur le logiciel FACSDiva 6.3 (BD Bioscience)

2.12 Analyse de la variation du nombre de copie des gènes.

25 échantillons tumoraux ont été collectés sur 14 patientes à l'institut Claudius Regaud (Toulouse, France). Ces échantillons ont été prélevés sur la tumeur primaire ou sur une métastase péritonéale. L'analyse du nombre de copies est effectuée sur une puce Affymetrix, Affymetrix Genome-Wide SNP Array 6.0. 250 ng d'ADN génomique sont utilisés pour l'analyse. Les contrôles sains sont obtenus à partir de 270 échantillons du HapMap fournis par Affymetrix. Les données obtenues sur les puces Affymetrix Genome-Wide SNP Array 6.0 ont été analysées sur le logiciel PARTEK Genomics Suite en appliquant les normalisations recommandées par Affymetrix. Chaque échantillon a été comparé à la distribution de base du HapMap afin d'identifier les régions amplifiées ou perdues.

2.13 Génération et maintenance des cellules endothéliales E4ORF1.

Le gène E4ORF1 de l'adénovirus du serotype 5 est cloné dans un vecteur lentiviral^{201,250,251}. La préparation lentivirale est générée par une contransfection de 15mg de vecteur lentiviral, 3 mg de pENV/VSV-G, 5 mg de pRRE et 2,5 mg de pRSVREV dans des cellules 293T (passage 8-10, subconfluentes). Le milieu est changé 24h après la

transfection, et les surnageants sont collectées 40h à 60h après transfection. Les surnageants sont ensuite filtrés sur une membrane de cellulose acetate ne contenant pas de surfactant, aliquotés et stockés à -80°C.

Une fois que les cellules endothéliales sont transduites par E4ORFF1, elles sont cultivées soit dans un milieu X-Vivo (Hyclone) sans sérum ni cytokines, soit amplifiées dans un milieu pour cellules endothéliales (cf. culture cellulaire.)

2.14 Analyse de la phosphorylation de protéines.

Les cellules NIH:OVCAR3 sont utilisées pour cette expérience afin d'obtenir une réponse plus nette à la stimulation par le ligand recombinant de Notch Jagged1. Les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits (Corning, NY, USA) et cultivées dans un milieu DMEM high glucose (Hyclones) 20% BS (Hyclones) jusque 75%-80% de confluence.

Les cellules NIH:OVCAR3 sont ensuite maintenues pendant 24h dans un milieu sans sérum, puis stimulées par 4 µg.ml de ligand recombinant de Notch Jagged1 (RandD) pour 2 heures, ou par une solution contrôle (PBS). Les cellules tumorales sont ensuite rincées, trypsinées, et centrifuger pour 5 minutes à 1200 rpm. Les protéines sont isolées par lyse cellulaire, après quantification 500 µg de protéines sont déposés sur un proteine array (RandD). Ces membranes contiennent des anticorps dirigés contre un set de protéines phosphorylées, cette approche nous permet de détecter le niveau de phosphorylation d'un set de protéines définies. Après incubation du lysat sur la membrane, de l'ECL (Thermo Scientific Biotechnology, CA, USA) est ajoutée et les résultats sont capturés sur une caméra CCD. Le contrôle positif interne à la membrane est utilisé pour normaliser les résultats. Le niveau de phosphorylation de chaque kinase est calculé comme le ratio du niveau de phosphorylation de la kinase des cellules stimulées par Jagged 1 sur le niveau de phosphorylation de cette même kinase des cellules contrôles.

2.15 Cytometrie en flux et apoptose array.

Les cellules NIH:OVCAR3 sont utilisées pour cette expérience afin d'obtenir une réponse plus nette à la stimulation par le ligand recombinant de Notch Jagged1. Les cellules sontensemencées dans une plaque 6 puits (Corning, NY, USA) et cultivées dans un milieu DMEM high glucose (Hyclones) 20% BS (Hyclones) jusque 75%-80% de confluence.

Les cellules NIH:OVCAR3 sont ensuite maintenues pendant 24h dans un milieu sans sérum, puis stimulées par 4 µg.ml de ligand recombinant de Notch Jagged1 (RandD) pour 2 heures, ou par une solution contrôle (PBS). Après stimulation, les cellules tumorales sont traitées pendant 48h avec 90µM Cisplatine et 6nM of Paclitaxel. Les cellules tumorales sont ensuite rincées, trypsinées, et centrifugées pour 5 minutes à 1200 rpm et marquées comme décrit dans la section test de viabilité. Les cellules vivantes sont ensuite

triées sur un SORP-FACS-ARIA2 (BD Biosciences, Dubai), et les protéines sont extraites par lyse. Après quantification 500 µg de protéines sont déposés sur un protéine array (RandD). Ces membranes contiennent des anticorps dirigés contre un set de protéines phosphorylées, cette approche nous permet de détecter le niveaux d'expression d'un set de protéines impliquées dans l'apoptose. Après incubation du lysat sur la membrane, de l'ECL (Thermo Scientific Biotechnology, CA, USA) est ajoutée, et les résultats sont capturés sur une caméra CCD. Le contrôle positif interne à la membrane est utilisé pour normaliser les résultats.

3 Résultats.

3.1 Article 1: Modifications transcriptomiques des cellules tumorales ovariennes par les cellules souches mésenchymateuses: génération d'un profil pro-métastatique.

Ce travail fait actuellement l'objet d'une soumission dans « Gynecology Oncology ».

3.1.1 Résumé long.

La plupart des patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade sont diagnostiquées avec une extension péritonéale de leur maladie ²⁶³. Bien que beaucoup d'études s'intéressent à la dissémination métastatique à travers le flux sanguin, la biologie de l'atteinte péritonéale est encore peu connue. On pense, cependant, que l'initiation d'une métastase péritonéale pourrait répondre à une succession d'étapes critiques, telles que l'exfoliation du foyer primaire de la maladie, en l'occurrence l'ovaire, l'interaction et l'adhérence aux cellules mésothéliales péritonéales, ainsi que la colonisation des feuillets sub-mésothéliaux et la prolifération au sein de ceux-ci ²⁶⁴.

Il est maintenant admis qu'il doit exister un niche pré-métastatique, capable de procurer aux cellules tumorales un environnement permissif au développement d'un foyer métastatique ⁴⁷⁻⁴⁹. Dans cette étude, notre but est de démontrer que les cellules souches mésenchymateuses constituent un déterminant cellulaire critique pour l'établissement d'une métastase, en décrivant les profondes modifications transcriptomiques pro-métastatique induites chez les cellules tumorales ovariennes au contact des cellules souches mésenchymateuses.

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules pluripotentes, capables de générer une variété de tissus conjonctifs tels que les os, le tissu adipeux ou encore le cartilage et les muscles ¹⁰⁵. Des travaux récents ont pu montrer que les MSC sont recrutées en nombre important au niveau du stroma tumoral ovarien où elles participent aux phénomènes d'invasion, d'initiation de la métastase, de résistances aux chimiothérapies ou au traitement par hyperthermie ^{173,265-267}. Bien que de nombreuses études s'attachent à décrire l'acquisition du caractère métastatique de façon unifactorielle, peu d'études tentent d'identifier les changements globaux subis par les cellules tumorales lors de leur interaction avec le stroma adjacent ²⁶⁸.

Les travaux de Shuming Zhang et al. démontrent que les cellules tumorales prostatiques subissent de profondes modifications d'ordre transcriptomique lors de leur interaction avec les cellules souches mésenchymateuses. Ils définissent ainsi un nouveau profil métastatique basé sur approche globale d'étude du transcriptome ²⁶⁸.

Plus récemment, le groupe de Ronald J. Buckanovich a révélé que les cellules souches mésenchymateuses contribuaient à la tumorigenicité des adénocarcinomes ovariens grâce à la production des facteurs appartenant à la famille des Bone Morphogenetic Protein, et en particulier le BMP2. Ces travaux suggèrent que les MSC stimulent la croissance tumorale en augmentant le pool de cellules souches tumorales ovariennes ¹⁷⁹.

Décrire les modifications liées au microenvironnement et définir les voies de transduction modifiées par l'interaction entre une cellule tumorale et son microenvironnement nous permettrait d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans cette étude, nous démontrons que la co-culture de cellules de lignées tumorales ovariennes (OVCAR3 et SKOV3) avec des cellules souches mésenchymateuses augmente les propriétés métastatiques des cellules tumorales considérées.

En utilisant une approche transcriptomique corrélée à des tests fonctionnels, nous avons pu mettre en évidence que les MSC augmentent les propriétés métastatiques des lignées tumorales ovariennes en augmentant certains groupes de gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire, l'invasion et la motilité, ou encore la chimiorésistance.

Ces résultats suggèrent que la niche créée par les cellules souches mésenchymateuses pourrait augmenter l'initiation d'un foyer métastatique. Cibler l'interaction entre les cellules tumorales ovariennes et les MSC de l'hôte pourrait constituer une cible de choix dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mesenchymal cells interaction with ovarian cancer cells triggers wide transcriptomic pro-metastatic profile

Raphael Lis ^{1,2,*}, Cyril Touboul ^{1,2,*}, Christophe M. Raynaud ¹, Denis Querleu ³, Joel A. Malek⁵, Jean-Pierre Marie ², Massoud Mirshahi ², Arash Rafii ^{1,5,**}

¹Stem cell and microenvironment laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar (WCMC-Q), Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar. ²UMRS 872 INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 and Université Paris Descartes, Equipe 18, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Medecine, 75270, Paris Cedex 06, France. ³Institut Claudius Regaud, Toulouse, F-31052 France. ⁴Genomic Core, Weill Cornell Medical College in Qatar (WCMC-Q), Education city, Qatar Foundation, Doha, Qatar. ⁵Department of Genetic Medicine, Weill Cornell Medical College, NY, USA.

* These authors contributed equally to this work.

**All correspondence should be addressed to: Dr Arash Rafii. Department of Genetic Medicine and Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, Stem cell and microenvironment laboratory Weill Cornell Medical College in Qatar, Qatar-Foundation PO: 24144, Doha, Qatar. Phone : +974 3313 5828. Fax : +974 4492 8422. Mail : jat2021@qatar-med.cornell.edu

Keywords: Mesenchymal stem cell, ovarian cancer, microenvironment

Introduction:

Most patients with ovarian cancer will develop peritoneal disease at presentation ²⁶³. While many studies in the literature address the issue of distant metastasis through blood circulation, the biology of peritoneal tumor spread in advanced ovarian cancer is not well known. Development of peritoneal carcinomatosis involves well-defined critical steps, including cells shedding and transport, interaction and adhesion to the mesothelial layer, as well as colonization of and proliferation into the sub-mesothelial microenvironment ²⁶⁴. It is now appreciated that there must be an initiation of a viable, permissive pre-metastatic niche within the target organ, one that facilitates the initial survival tumor cells in a non-receptive organ ⁴⁷⁻⁴⁹. Here, we aim to determine that Mesenchymal Cells (MC) constitute a cellular determinant of ovarian cancer cells metastatic tropism by demonstrating that MC interaction with ovarian cancer cell lines modifies their transcriptome toward a pro-metastatic profile.

MCs are pluripotent cells that give rise to a variety of connective tissue cell types including those that form bone, adipose, cartilage, and muscle ¹⁰⁵. Recent studies have shown that BM-derived MSCs are recruited in significant number to tumor sites and contribute to invasion, metastasis and resistance to chemotherapy and hyperthermia of several tumor cell lines ^{173,265-267}. While many studies focus on specific factors in the acquisition of metastatic profile there is very few study assessing the global transcriptomic changes occurring in cancer cells upon their interaction with the Mesenchymal cells ²⁶⁸.

Zhang S et al. have demonstrated profound modification of the prostate cancer cell transcriptome over the interaction with the MC defining a new pro-metastatic transcriptomic state. Understanding these global modifications and the pathways implicated might result in the design of new therapeutic strategies ²⁶⁸.

More recently, Mesenchymal Stem Cells have been shown to contribute to ovarian cancer tumorigenicity through altered production of the Bone Morphogenetic Protein family, and particularly BMP2. This altered production of BMP2 leads to an increase of ovarian cancer cells proliferation, both *in vitro* and *in vivo*. This study suggest that the mesenchymal stem cells promote tumor growth by increasing the number of ovarian cancer stem cells ¹⁷⁹.

Herein, we demonstrate that coculture of ovarian cancer cells (OVCAR3 and SKOV3 cell line) in direct cellular contact with MCs enhances metastatic abilities of ovarian cancer cells.

Using transcriptomic analysis and functional assays, we demonstrate that MCs enhance metastatic properties of different ovarian cancer cells through different transcriptomic modifications. Specific cell-type specific clusters of genes related to, cellular adhesion, invasion, migration, proliferation and chemo-resistance are modified upon OCC/MC contact. These results suggest that the MC niche could increase metastatic initiation and expansion through specific modification of the cancer cells transcriptome. Specific pathways could then be targeted to disrupt the acquired pro-metastatic profile.

Material and methods:

Cell Culture: Ovarian cancer cells lines SKOV3 (HTB-77) and OVCAR3 (HTB-161) were purchased from ATCC and maintained in culture following ATCC recommendations (DMEM high glucose [Hyclone, Thermo Scientific], 10% FBS [Hyclone, Thermo Scientific], 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B solution [Sigma], 1X Non Essential Amino-Acid [Hyclone, Thermo Scientific]). Mesenchymal cells were purchased from Stem Cells, Inc (Vancouver, CA) and maintained and expanded in culture using MesenCult[®] MSC Basal Medium completed with Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Stem cell Inc, Vancouver, CA) according to manufacturer's recommendations.

Co-Cultures: To demonstrate the pro-metastatic phenotypes induced by the BM-MCs we established co-cultures of eGFP-OCC with BM-MC at a ratio of 1:2. Co-cultures were established for 24 hours. OCC were differentiated from BM-MC based on their eGFP and Ep-Cam. The different cell populations were sorted using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) and different metastatic abilities were evaluated.

Fluorescent activated cell sorting: Briefly, all cells were harvested and then blocked in PBS-5%FBS-1%BSA-10%FcR Blocking Reagent (Myltenyi Biotec) for 30 minutes on ice. Single-cell suspension was analyzed and sorted on SORP FACS Aria2 (BD Biosciences). Data were processed with FACSDiva 6.3 (BD Biosciences). Doublets were excluded by FSC-W × FSC-H and SSC-W × SSC-H analysis, single stained channels were used for compensation, and fluorophore minus one (FMO) controls were used for gating. eGFP fluorescence was acquired with a 488 nm blue laser and a 510/50 nm emission, for analysis 50 000 events were acquired per sample. Charts display the median of fluorescence intensity (mfi) relative to control. During cell-sorting purity-phase mask was applied. OCC monocultures were processed and sorted in an identical manner as controls.

Gene expression analysis: Upon cell sorting mRNA was isolated using Trizol reagent followed by additional purification using RNAeasy extraction kit from Qiagen. 200 ng of total RNA were analyzed on Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Data were analyzed using Partek software (St Louis, MO). Class comparison between different conditions (three biological replicates) was performed to identify gene expression changes with significant expression differences (FDR $p < 0.05$) and 2 fold increase or decrease expression²⁶⁰⁻²⁶². Statistical comparisons for microarray data were calculated using two-tailed Students t-test. Benjamini-Hochberg correction was applied to limit the false discovery rate. Statistical comparisons for categorical data were achieved using Chi-squared test. Correlations were performed using Pearson correlation. All other statistical comparisons were calculated using two-tailed (Welsh) t-test.

Ingenuity Pathway analysis: We used Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Networks were constructed by overlaying the up and down regulated genes upon co-culture onto a global molecular network developed from information contained in the Ingenuity Pathways Knowledge database using keywords such as cell adherence, migration and invasion, proliferation, chemoresistance, and apoptosis. Networks of genes up- or down-regulated by the co-culture were then algorithmically generated based on their connectivity. Genes are represented as nodes, and the biological relationship between two nodes is represented as a line. All edges are supported by at least one reference from the literature, from a textbook, or from canonical information stored in the Ingenuity Pathways knowledge database. *P* values for the enrichment of canonical pathways were then generated based on the hypergeometric distribution and calculated with the right-tailed Fisher's exact *t*-test for 2×2 contingency tables.

Adherence assay: To assess adhesion to ECM, coated 96 well-plates were coated with Matrigel (BD-Biosciences). 20 000 OCC-eGFP (NIH:OVCAR3, SKOV3, sorted from co- and monoculture) were seeded per well and incubated in 5%CO₂ incubator at 37°C for 15, 30 minutes and 1 hour. Non-adherent cells were washed away. Adherent cells were quantified using fluorescence plate reader (Wallac, Perkin Elmer) (488nm excitation, 510 emission). All experiments were performed in biological triplicates; we acquired 5 wells per condition (mono and co-culture). Matrigel coated unseeded wells were used as blank.

Migration / Invasion assays: 8 μm pores transwell permeable supports Matrigel (BD Biosciences) were coated with Matrigel. 50 000 viable OCC (sorted from co- and monoculture) were seeded per well and incubated in 5%CO₂ at 37 oC for 12 and 24 hours. OCC migration and invasion was then assessed using a fluorescence plate reader (Wallac, Perkin Elmer) All experiments were performed in triplicates; we acquired 5 wells per condition (mono and co-culture).

Proliferation assay: 5000 OCC were seeded in monoculture or on MSC-mOrange monolayer in a serum free / cytokine free media. OCC were counted every two days during 14 days under a microscope using GFP fluorescence as a tag. Each day ten fields were quantified. All experiments were performed in triplicates.

Chemoresistance: 100000 OCC were seeded in monoculture or with BM-MSK in a 1:2 ratio. Mono- and co-culture were treated with 90 μM Cisplatinum and 6 μM Paclitaxel (Sigma) for 24h. Cells were then stained with Calcein Red-Orange, LIVE/DEAD Aqua blue (Invitrogen, Molecular Probes), CD73-APC (Biolegend, clone: AD2) according to manufacturer's instructions and analyzed by FACS as described earlier. OCC were defined as cells GFP+CD73-, living OCC were defined as calcein Red-Orange+ LIVE/DEAD aqua-. 50 000 events were acquired per sample, each condition was run in triplicate.

Results:

Modification of the transcriptome of OCC upon interaction with MC.

Upon co-culture with MC, OVCAR3 upregulated 420 genes and downregulated 99 genes (>2 fold or <-2 folds, FDR 0.05), SKOV3 upregulated 90 genes and downregulated 155 genes (>2 fold or <-2 folds, FDR 0.05).

Interestingly as demonstrated by PCA analysis while the global change is clearly reflected for each cell line there is no unique MC signature indicating that the transcriptomic modifications are cell type dependent (data not shown).

Using the gene lists obtained for each cell line IPA retrieved several networks and pathways. Interestingly for OVCAR3 and SKOV3, among Diseases and disorders the category Cancer was the first hit (see Supplementary table 1 for the most relevant networks). Using the genes in the Cancer category we built the network presented in supplementary figure 2. While global analysis allows understanding of the overall relationship between genes it is difficult to interpret when looking at particular functions therefore we undertook a systematic approach. We performed functional assays to characterize the role of MC in ovarian cancer metastasis. Then we build smaller focused

networks on particular functions.

MCs increase OCC metastatic abilities.

Peritoneal outgrowth initiation is a tightly regulated and well-defined process. It includes adhesion to the peritoneum as well as migration and invasion into the sub-mesothelial layers (reviewed in ²⁶⁴). As our hypothesis was that MC could initiate a permissive niche to metastatic outgrowth, we checked the ability of MC interaction to regulate adhesion, migration and invasion of OCC and determined through gene expression analysis pathways implicated for the different cell lines.

OCC were co-cultured with BM-MSc for 24h in a 1OCC : 2MSc ratio. Cultures were then starved for 12 hours and then stained for Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) expression and analyzed and sorted by FACS. OCC were defined as double positive for EpCAM and eGFP, whereas MSc were defined as the double negative populations (Figure 1.A). After sorting, we tested OCC ability to adhere to the Extra Cellular Matrix (ECM). Co-cultured OVCAR3-eGFP and SKOV3-eGFP displayed a substantial 2 fold increase in cellular adherence compared to OCC alone (Figure 1.B). Similarly migration was increased by a 3 fold factors for both OVCAR3 and SKOV3 cell lines while invasion was increased by a factor 2 fold and 1.8 fold for OVCAR3 and SKOV3 cell lines respectively (Figure 1.C). A selection for genes implicated in cellular movement, cell adherence, cell migration and invasion was made using IPA and used to determine key pathways for the two cell lines. Interestingly genes involved in increased adhesion to ECM were not similar between the two ovarian cancer cell lines. For OVCAR3 among the genes involved several key genes in Epithelial to Mesenchymal transition were upregulated TWIST (2.85 fold), and ZEB (2 fold), other key factors implicated in tumor cell adhesion, migration and invasion such as CDH1 (2.8 fold), Hyaluronan synthase 3 (-2.7 fold), Fibronectin1 (-5.67 fold) were differentially regulated. The corresponding network is presented in Figure 2A. The SKOV3 cells modulated different genes implicated in increased adherence, migration and invasion such as the up-regulation of CXCR4 (2.9 fold), Fibronectin1 (2 fold), MMP3 (5.8 fold), Serpine1 (3.2 fold), PAPP-A (7.2 fold), SPARC (4.6 fold) and downregulation of CDH1 (-4.4 fold), CD24 (-2.1 fold), VAV3 (-2.9 fold) (Figure 2B).

Therefore, through different cell type specific modifications BM-MSc were able to increase all critical steps for peritoneal outgrowth initiation.

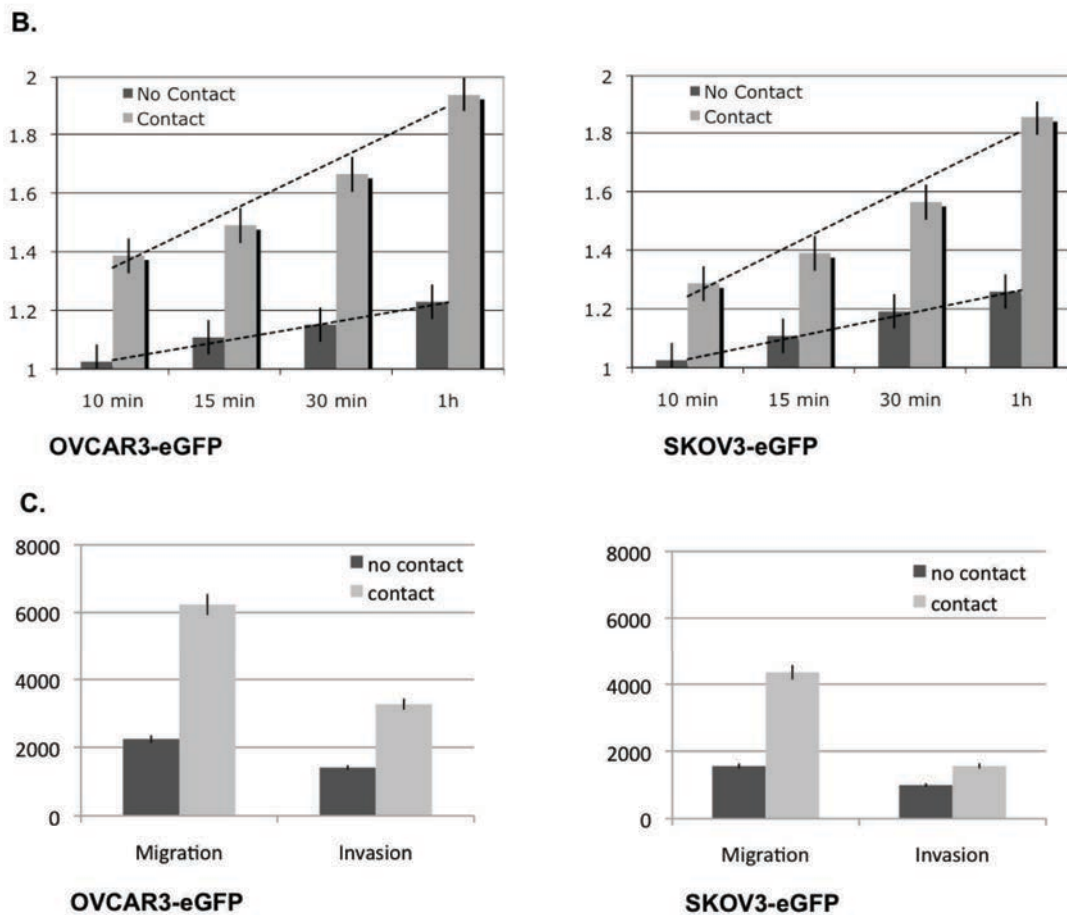
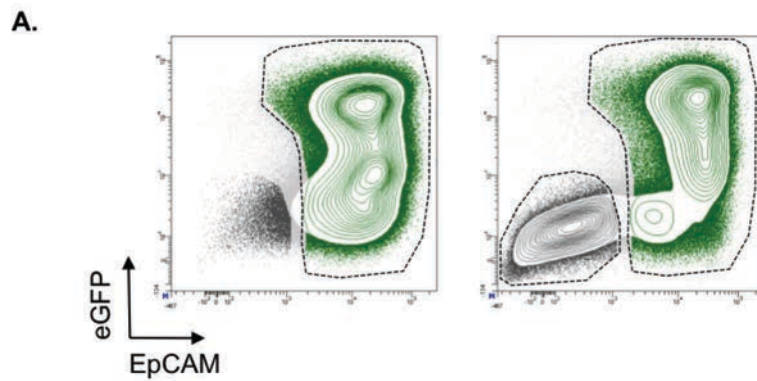


Figure 1 : MCs increase OCC metastatic abilities.

A. Dot plot showing an typical gating of OCC FACS sorting **B.** Graphical chart representing cell adherence to the extracellular matrix. OCC cancer cells, both OVCAR3 et SKOV3 show increase adherence to the ECM after being in contact with MSC. **C.** Graphical chart representing cell invasion through the ECM and migration. OCC cancer cells, both OVCAR3 et SKOV3 show increase adherence to the ECM after being in contact with MSC. All experiments were run in triplicates.

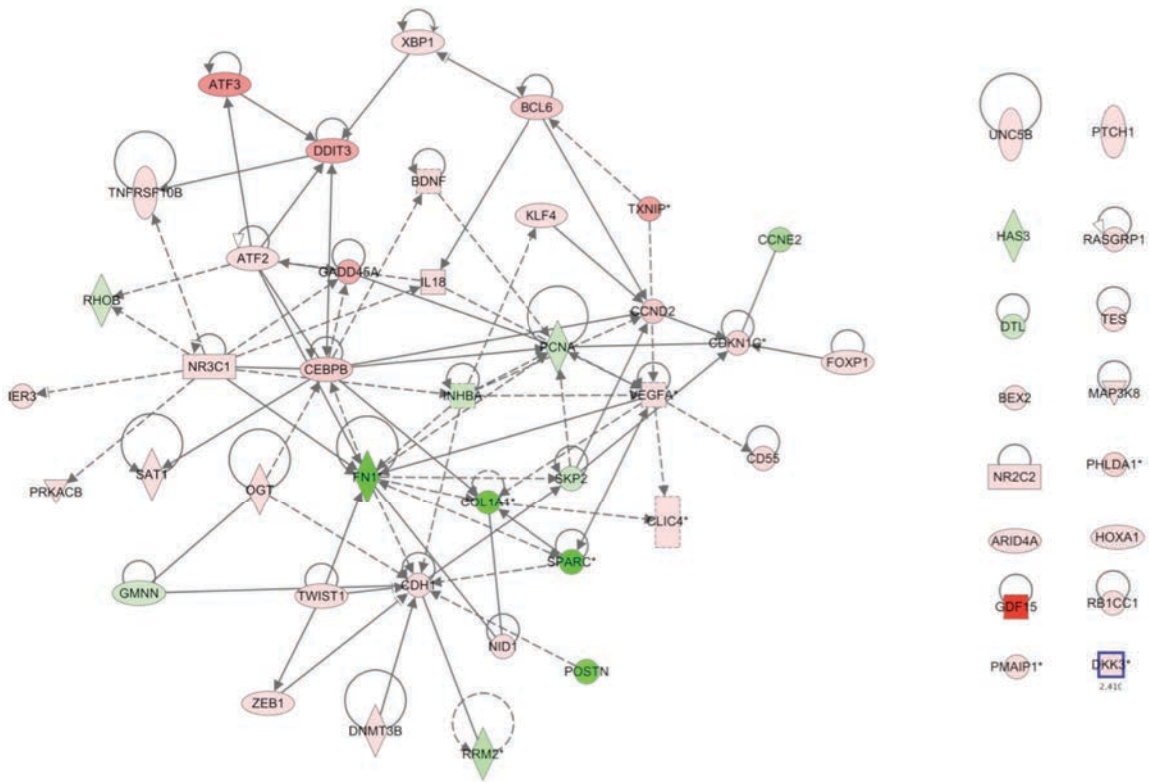
Mesenchymal cells sustain ovarian cancer cells proliferation.

We showed MC mOrange and OVCAR3-eGFP remain alive after 15 days in a serum-free and cytokine-free media (Figure 3.a, 3.b). Notably MSCs support the long-term expansion

of OVCAR3-eGFP cells in serum- and cytokine-free conditions (Figure 3.c). Same data were obtained with SKOV3-eGFP (data not shown). Using our gene list provided from our co-culture experience and pathway analysis we built the pathways responsible for the increased proliferation in the two different ovarian cancer cell lines. The proliferation of OVCAR3 cell line relies on concomitant up-regulation of pro-proliferation factors such as the following transcription factors CEBPB (5.3 fold), CCDN2 (5.4 fold) CDKN1C (4.2 fold), BCL6 (5.5 fold), RASGRP1 (2.17), down regulation of anti-proliferation genes such as CLNE2 (-3.9), GMNN (-2), SKP2 (-2.2), SPARC (-3.8). The overall network was associated with functions such as survival of tumor cells (P=8.10-47).

The SKOV3 cell lines modulated different genes and network with the major actors being Activin A (INHBA) activating Akt (3.5 fold), the mesenchymal gene FN1 (2 fold), IGFBP5 insulin binding protein playing a role in proliferation (4.3 fold). Interestingly some genes such as SPARC (4.6 fold) and COL1A1 (9.8) were regulated inversely to OVCAR3 demonstrating the specificity of the pathways regarding the cell type. The overall network was associated to survival of tumor cells.

A. OVCAR3-eGFP



B. SKOV3-eGFP

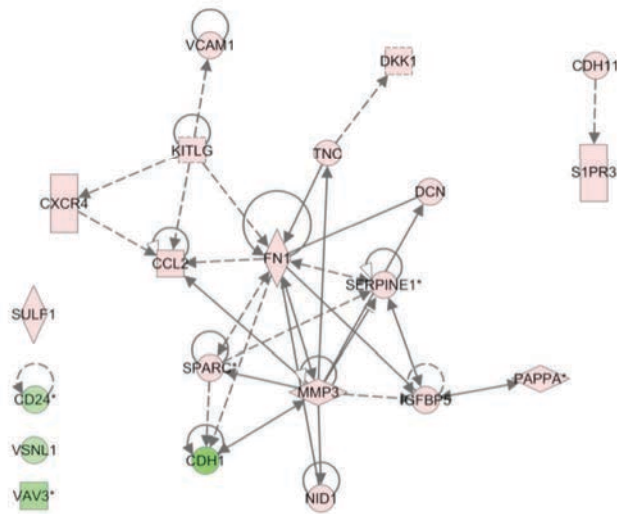
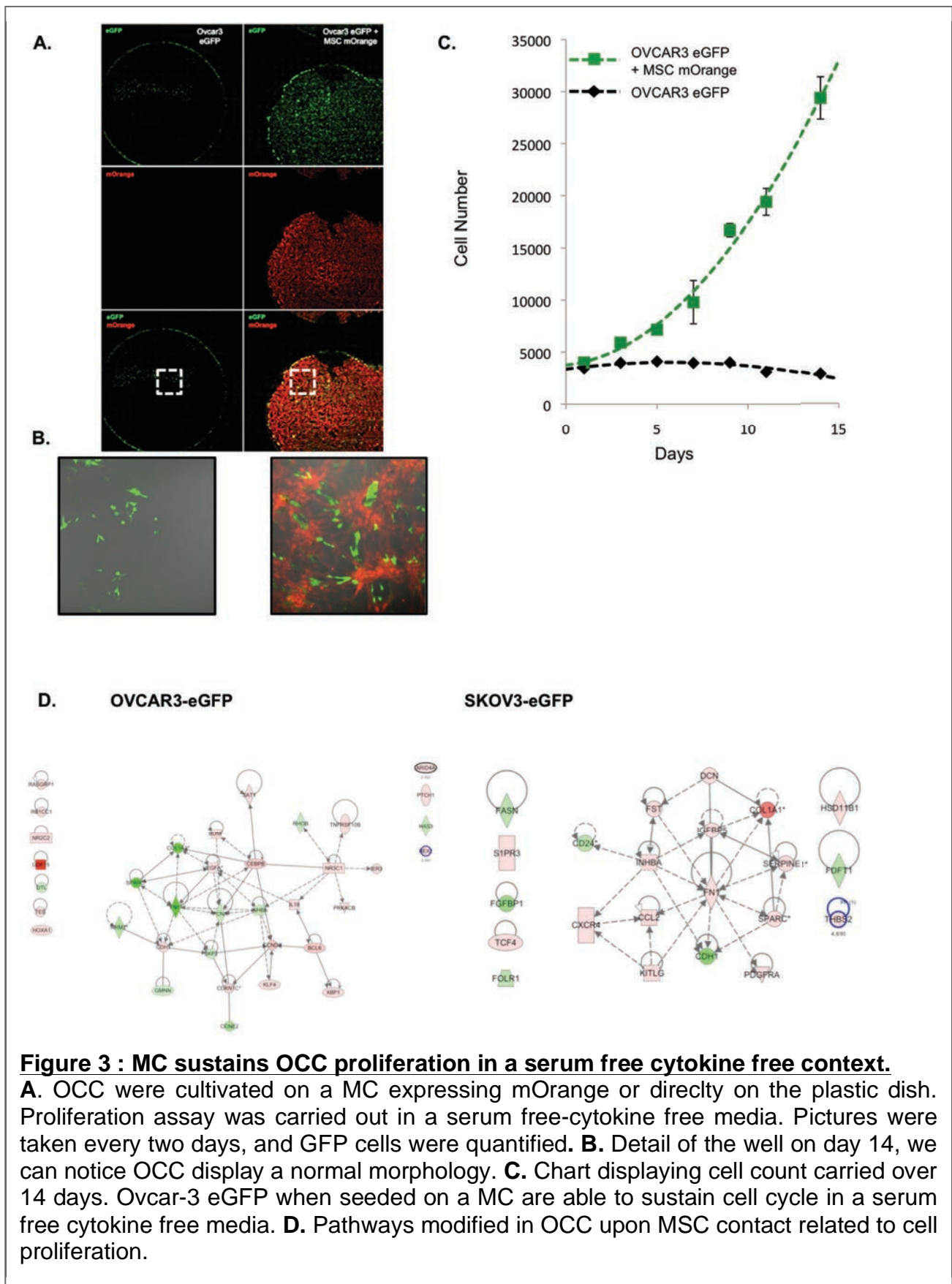


Figure 2 : pathways modified in OCC upon MSC contact related to adherence, migration, and invasion.

A. Ingenuity Pathway Analysis obtained from OVCAR3-eGFP following MC contact. **B.** Ingenuity Pathway Analysis obtained from SKOV3-eGFP following MC contact.



Chemoresistance.

Herein, we investigated the ability of MSC to protect OCC from poly-chemotherapy: Cisplatinum in admixture with Paclitaxel. We assessed cell viability by FACS using a combination of calcein and LIVE/DEAD (as described in ²⁶⁵). Briefly we discriminated OCC

from MSC using our eGFP-tagged OCC line and CD73 as a MSC marker. OCC were defined as eGFP+CD73- (figure 4.A), and living OCC were defined as Calcein high LIVE/DEAD low (teal population, figure 4.A).

Co-culture of OCC with MSC in absence of chemotherapeutic stress did not show any significant differences in cell viability/mortality (Figure 4.B). However, while treatment with 90µM Cisplatin admixed with 6µM Paclitaxel of OCC mono-culture induced 65% of calcein low LIVE/DEAD high in average, co-culture with MSC tend to rescue OCC from chemotherapy-induced cell death. Indeed, in average we were able to detect only 40% of

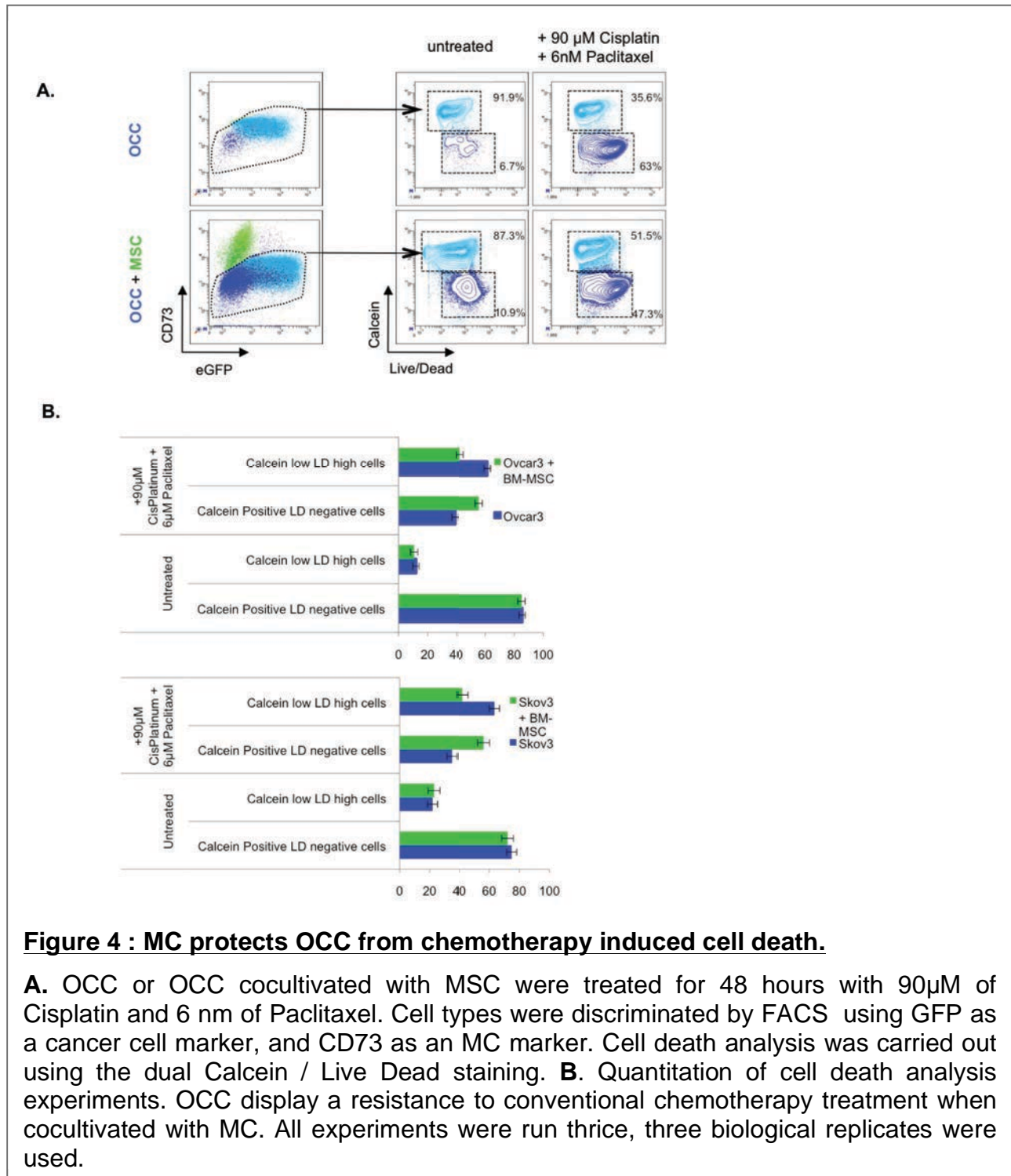
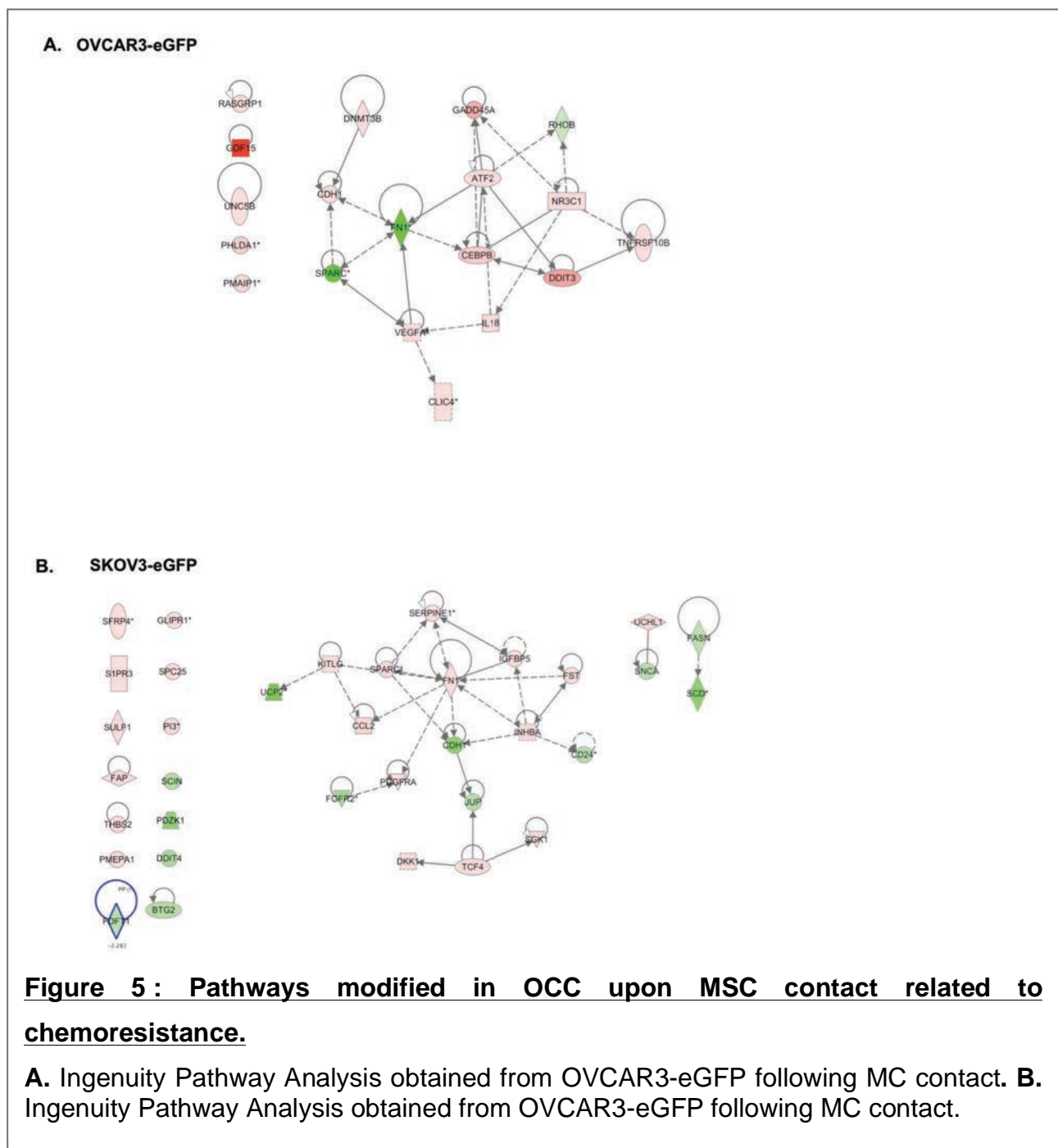


Figure 4 : MC protects OCC from chemotherapy induced cell death.

A. OCC or OCC cocultivated with MSC were treated for 48 hours with 90µM of Cisplatin and 6 nm of Paclitaxel. Cell types were discriminated by FACS using GFP as a cancer cell marker, and CD73 as an MC marker. Cell death analysis was carried out using the dual Calcein / Live Dead staining. **B.** Quantitation of cell death analysis experiments. OCC display a resistance to conventional chemotherapy treatment when cocultivated with MC. All experiments were run thrice, three biological replicates were used.

calcein low LIVE/DEAD high in average (Figure 4.B). Conversely the rate of calcein high LIVE/DEAD low is higher in OCC/MSC co-culture after treatment with cis-platinum and taxol than mono-cultured OCC (55% versus 37.5% respectively) (Figure 4.B). Then, we build networks related to OCC chemo-resistance.

As demonstrated in Figure 5 A and B there were no real nodes that could be identified for the cell types studied. SKOV3 cell line down-regulated the following genes implicated in apoptosis BTG2, SCD, FASN, DDIT4 and up-regulation of survival genes such as: SPARC, PDGFRA, S1PR3, KITLG, IGFBP. Overall the gene networks described in Figure 5B was associated with functions such as survival of tumor cells ($p=5.74 \cdot 10^{-7}$).



OVCAR3 chemo-resistance seems to be mediated through up-regulation of genes such as GADD45A, DDIT3, NR3C1, ATF2, RASGRP1. Overall the genes network described in Figure 5B was associated with functions such as cell death of tumor cells ($p= 1.38 \cdot 10^{-34}$) or survival of eukaryote cells ($p=1.52 \cdot 10^{-12}$). And survival of tumor cells ($p=1.25 \cdot 10^{-5}$).

Discussion :

To date, there have been very few amounts of studies describing the effects of human ovarian cancer-associated MCs on cancer cells pro-metastatic abilities. Our study demonstrates that MCs are able to change drastically ovarian cancer cells physiology towards a metastatic phenotype, which includes adhesion to the ECM, invasion of the ECM, proliferation, and resistance to chemotherapy ²⁶⁴. This is consistent with some reports of MCs modifying ovarian cancer cells behavior ^{173,180,185,265}. This also is in concordance with what have been described in other cancer model such as breast cancer. Indeed breast cancer cell lines harbor increased metastatic properties when they are co-injected with bone marrow derived mesenchymal stem cells in an immuno-compromised mice ¹²⁷.

Our aim in this study was to describe a relationship between changes that occur in ovarian cancer cell line at the transcriptomic level and differences in cell behavior we observed with the coculture assay we developed. One limitation of our study is that our compared transcriptomic analysis of both NIH:OVCAR3 and SKOV3 in contact with MC failed to define a shared global change at the gene expression level. Recently the cancer genome atlas published their work on ovarian serous adenocarcinomas ³⁷. They were able to define four new subsets (differentiated, immunoreactive, mesenchymal and proliferative) of ovarian high-grade serous adenocarcinomas based on a gene expression study of 489 patients ³⁷. One explanation for the lack of overlap in gene expression changes between NIH:OVCAR3 and SKOV3 is that each cell line belongs to different subset of ovarian high-grade serous adenocarcinomas. Indeed OVCAR3 and SKOV3 are quite different cells as demonstrated by the PCA plot. It is not surprising that different genes get activated in different transcriptomic background. Therefore, on order to define a MCs signature, we should probably refine our experimental setting.

Despite the lack of gene overlap between NIH:OVCAR3 and SKOV3, we were able to demonstrate that when these cell lines were in contact with MC they display an increase of adherence to ECM and invasion through ECM. Increase of adherence and invasion constitute one of the key steps to initiation a peritoneal metastasis ²⁶⁴. Both cell lines up- or down-regulates genes involved in these phenomenons but surprisingly some of the

genes encountered an opposite regulation. While FN1 was upregulated by 2-fold in SKOV3, it was downregulated by 5.63-fold in NIH:OVCAR3. However, this opposite regulation enlightens the fact that we are facing two different subtypes of ovarian serous adenocarcinomas. Indeed, Ahmed et al. described that Fibronectin 1 does not enhance NIH:OVCAR3 adherence to the ECM, neither it does increase its invasion through it ²⁶⁹. Whereas, regarding SKOV3 cell line, Fibronectin 1 enhances its adhesion to ECM, as well as its migration and invasion ability ²⁷⁰.

Building the networks allowed us to understand the role of some genes that have already been associated with increased migration and invasion. For OVCAR3 cell line up-regulation of Twist and Zeb indicates some epithelial to mesenchymal transition state. The expression of E-cadherin in ovarian cancers plays a role in the adhesion to the peritoneal surfaces. Noteworthy while the OSE does not express E-cadherin, its expression appears in the inclusion cyst in the ovary and is reinforced during tumoral progression ²⁷¹.

Interestingly one might argue against the simultaneous up-regulation of EMT markers such as Twist and Zeb and up-regulation of E-cadherin and downregulation of FN1. Strauss R et al have recently described a subpopulation of cells in a transitory Epithelial/Mesenchymal hybrid stage presenting increased tumorigenicity ²⁷². Moreover the cell plasticity was dependent on external factors such as co-culture with mesenchymal cells.

SKOV3 cells presented different networks, indeed there was an increase of MMP3 and degradation of the ECM has clearly been demonstrated playing a role in the occurrence of metastasis ²⁷³. Several cytokines also implicated in the occurrence of metastasis were up-regulated such as CXCR4, or CCL2. The role of CXCR4 has clearly been described in invasion of ovarian cancer ^{274,275}. It is noteworthy to underline that the IPA analysis demonstrate how these molecules interact together and illustrate some redundancies making it hard to target a single gene.

Regarding cell proliferation we were not able to define clear nodes and/or genes typically involved in regulation of cell cycle, despite accumulating evidences in the literature ^{179,256,267}, and our in vitro data (Figure 3). We believed that our experimental setting, 24 hours of coculture, might not allows us to identify early-genes involved in cell proliferation. However, we strongly believe that studying the modifications that's occurs in OCC on kinases-phosphorylation state upon MC interaction will allow us to determine how MC are able to sustain OCC proliferation in a serum-free context.

Recently, Jeanine M.L. Roodhart et al. described how MCs are able to induce resistance to chemotherapy. In their study they demonstrated that endogenous mesenchymal stem

cells (MSCs) become activated during treatment with platinum analogs and produce factors that protect tumor cells against a range of chemotherapeutics¹⁸⁶. They identified two distinct platinum-induced polyunsaturated fatty acids (PIFAs), 12-oxo-5,8,10-heptadecatrienoic acid (KHT) and hexadeca-4,7,10,13-tetraenoic acid (16:4(n-3)). In our study, we obtain results in corroboration with this concept. Despite we were not able to identify a clear gene network implicated in resistance to chemotherapy, we believe that our transcriptomic based- experimental setting will allow us to unravel the signaling pathways activated by these PIFAs.

While other genes have been described in the literature they have not been uncovered through our approach as they might not play a role in the co-culture context^{179,256,267}. We believe that our experimental setting, 24 hours of co-culture, might not allows us to identify all the genes involved in cell proliferation and chemoresistance. However, we strongly believe that studying the modifications that's occurs in OCC on kinases-phosphorylation state upon MC interaction will allow us to determine how MC are able to sustain OCC proliferation in a serum-free context.

While the gene expressions were performed after cell sorting using a purity mask ensuring non-significant contamination. It is hard to interpret all the genes described in the networks in a cancer cell autonomous context. While some genes might not have the expected regulation, one might think that they actually are responsible for a cross talk between the cancer cells and MCs. In a future study we aim to characterize the transcriptome of the MCs post co-culture and build more comprehensive network including the molecules that might be responsible for a cross talk between the two cell type.

In this study, we were able to demonstrate that MCs strongly change OCC behavior towards a pro-metastatic phenotype, increasing cell adherence, invasion, proliferation and chemoresistance. However, our transcriptomic analysis of OCC upon MC interaction did not allow us to identify a signature shared by the two cell lines we treated. These results suggested that tumor microenvironment is supporting the progression of different subtypes of ovarian adenocarcinomas by activating different pathway. Therefore, understanding the differences between ovarian serous adenocarcinomas is mandatory to define new therapeutical windows.

In this study, we were able to demonstrate that MCs strongly change OCC behavior towards a pro-metastatic phenotype, increasing cell adherence, invasion, proliferation and chemoresistance. However, our transcriptomic analysis of OCC upon MC interaction did not allow us to identify a signature shared by the two cell lines we treated. These results suggest that tumor microenvironment is supporting the progression of different subtypes

of ovarian adenocarcinomas by activating different pathway. Therefore, understanding the differences between ovarian serous adenocarcinomas is mandatory to define new therapeutical windows.

References :

Les références sont incluses dans la bibliographie du manuscrit de thèse.

Supplementary Data :

Cell line and category	Pathways and functions	p	Number of genes
OVCAR3			
Disease and Disorders	Cancer	$3.77 \cdot 10^{-21}$	167
	Reproductive system Disease	$5.58 \cdot 10^{-9}$	105
Physiological system development and Function	Connective tissue development and function	$2.85 \cdot 10^{-5}$	
	Tumor morphology	$1.03 \cdot 10^{-4}$	
SKOV3			
Disease and Disorders	Cancer	$1.9 \cdot 10^{-12}$	88
	Reproductive system Disease	$1.8 \cdot 10^{-10}$	67
Molecular and Cellular function	Cellular Movement	$1.9 \cdot 10^{-7}$	45
	Tissue development	$3.3 \cdot 10^{-7}$	55

Supplementary table 1 : IPA networks and pathways analysis.

3.2 Article 2: Les cellules souches mésenchymateuses protègent les cellules tumorales ovariennes de la mort induite par l'hyperthermie grâce à la sécrétion de la cytokine CXCL12.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « the International Journal of Cancer » et est référencé sous :

Lis, R. et al. Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *International Journal of Cancer* **128**, 715-725 (2011).²⁶⁵

3.2.1 Résumé long.

De nombreux essais cliniques étudiant la synergie entre les chimiothérapies et l'hyperthermie sur la prise en charge des carcinomes péritonéaux, qu'ils soient d'origine gastrique, mésothéliale, colorectale ou encore ovariennes, ont été entrepris ces dernières années^{276,277}. Un essai randomisé de phase III comparant le traitement standard délivré en intra-veineux à ce même traitement standard délivré directement dans la cavité péritonéale, a montré un bénéfice clinique significatif en terme de survie globale dans le bras expérimental²⁷⁸. Cependant, malgré les différents protocoles testés, la chimiothérapie intra-péritonéale combinée à l'hyperthermie n'a pas obtenu, du moins sur les adénocarcinomes ovariens séreux, de bons résultats²⁷⁹. Dans le cas des adénocarcinomes ovariens, la médiane de survie du bras expérimental traité par chimiothérapie intra-péritonéale hyperthermique varie de 22 à 64 mois, avec une médiane de survie sans progression variant de 10 à 57 mois^{279,280}. Chez les patientes ayant reçu un debulking optimal, le taux de survie à 5 ans peut varier de 12% à 66%^{279,280}. Cependant, le taux de morbidité lié à l'acte chirurgico-oncologique est bien plus important que chez les patientes ayant reçu le traitement standard ; variant respectivement de 0% à 40%, et de 0% à 10%^{279,280}.

L'hyperthermie seule ne constitue pas une modalité thérapeutique dans les cancers de l'ovaire. Cependant, un nombre croissant de publications suggèrent que celle-ci pourrait, lorsqu'elle est associée à la chimiothérapie, constituer une alternative intéressante au traitement conventionnel. Malgré la variété des protocoles testés l'association entre l'hyperthermie et la chimiothérapie n'a pas apporté de bénéfices en terme de survie globale et reste liée à un fort taux de morbidité²⁸⁰. Certains auteurs suggèrent que l'association entre l'hyperthermie et la chimiothérapie pourrait, chez les patientes atteintes

de cancers épithéliaux de l'ovaire mais ne présentant pas de maladie résiduelle, constituer un traitement de consolidation ²⁸¹.

Un nombre croissant de publications suggère que le microenvironnement péritonéal pourrait jouer un rôle important sur le développement des adénocarcinomes ovariens séreux ²⁸²⁻²⁸⁴. Récemment, notre groupe a pu démontrer qu'un sous-type cellulaire de cellules mésothéliales, isolées de la cavité péritonéale de patiente atteintes de cancer de l'ovaire, était capable de protéger les cellules tumorales ovariennes des traitements de chimiothérapies ²⁸⁵. Nous avons pu démontrer que ces mêmes cellules mésothéliales sont capables d'entretenir la croissance tumorale in vivo, et de procurer aux cellules tumorales ovariennes un environnement immunotolérant ^{266,267}.

De nombreuses données de la littérature suggèrent qu'ils existent un dialogue entre les cellules tumorales ovariennes et les cellules stromales péritonéales, celui-ci pourrait diminuer l'efficacité des traitements anticancéreux. Les travaux de H. Cho et al. et H. Park et al. démontrent que le surnageant de MSC préalablement exposées à l'hyperthermie possèdent des propriétés anti-tumorale ^{187,188}. Dans cette partie du travail, nous avons étudié la viabilité des cellules tumorales ovariennes suite à un traitement hyperthermique dans un contexte de co-culture avec les MSC. Nous avons pu démontrer que les MSC sont capables d'induire chez les cellules tumorales ovariennes un phénotype thermo tolérant ²⁶⁵. Cette thermotolérance est la résultante de la sécrétion d'une cytokine par les MSC : le CXCL12 ²⁶⁵.

Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12

Raphael Lis^{1,2}, Cyril Touboul^{1,2}, Pejman Mirshahi², Fadoua Ali¹, Sharon Mathew¹, Daniel J. Nolan³, Mahtab Maleki¹, Salma A. Abdalla¹, Christophe M. Raynaud¹, Denis Querleu^{4,5}, Eman Al-Azwani⁶, Joel Malek⁶, Massoud Mirshahi² and Arash Rafii^{1,7}

¹Stem Cell and Microenvironment Laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar (WCMC-Q, Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar)

²UMRS 872 INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 and Université Paris Descartes, Equipe 18, Centre de Recherche des Cordeliers, 75270, Paris Cedex 06, France

³Howard Hughes Medical Institute, Department of Genetic Medicine and Ansary Stem Cell Institute, Weill Cornell Medical College, New York, NY

⁴Institut Claudius Regaud, Department of Oncologic Surgery, Toulouse 31052, France

⁵McGill University, Department of Gynecologic Oncology, Montreal, Canada

⁶Genomic Core, Weill Cornell Medical College in Qatar (WCMC-Q, Education city, Qatar Foundation, Doha, Qatar)

⁷Department of Genetic Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY

Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) has shown promise in treatment of ovarian carcinosis. Despite its efficiency for the treatment of peritoneal carcinosis from digestive tract neoplasia, it has failed to demonstrate significant benefit in ovarian cancers. It is therefore essential to understand the mechanism underlying resistance to HIPEC in ovarian cancers. Mesenchymal stem cells (MSC) play an important role in the development of ovarian cancer metastasis and resistance to treatments. A recent study suggests that MSCs may be cytotoxic for cancer cells upon heat shock. In contrast, we describe the protective role of MSC against hyperthermia. Using cytokine arrays we determined that the tumor associated MSC (TAMC) secrete pro-tumoral cytokines. We studied the effect of hyperthermia in co-culture setting of TAMC or BM-MSC associated with ovarian cancer cell lines (SKOV3 and CaOV3) with polyvariate flow cytometry. We demonstrate that hyperthermia does not challenge survival of TAMC or bone marrow derived MSC (BM-MSC). Both TAMC and BM-MSC displayed strong protective effect inducing thermotolerance in ovarian cancer cells (OCC). Transwell experiments demonstrated the role of secreted factors. We showed that CXCL12 was inducing thermotolerance and that inhibition of CXCL12/CXCR4 interaction restored cytotoxicity of hyperthermia in co-culture experiments. Contrary to the previous published study we demonstrated that TAMC and BM-MSC co-cultured with OCC induced thermotolerance in a CXCL12 dependant manner. Targeting the interaction between stromal and cancer cells through CXCL12 inhibition might restore hyperthermia sensitivity in ovarian cancers, and thus improve HIPEC efficiency.

Epithelial ovarian carcinoma (EOC) is the sixth most common malignancy in women and the leading cause of death from gynecological cancer worldwide.¹ EOC has a predisposi-

tion to metastatic involvement of the peritoneal cavity.^{2,3} Late stage EOC is characterized by widespread peritoneal dissemination, ascitis and a high rate of mortality with an overall survival ranging from 20 to 30% at 5 years.⁴

Key words: mesenchymal stem cells, hyperthermia, ovarian cancer resistance, CXCL12

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Qatar-Foundation NPRP; **Grant number:** 08-663-3-140; **Grant sponsor:** Qatar foundation UREP; **Grant number:** 07-170-3-031; **Grant sponsor:** Qatar Foundation, Qatar Technology Transfer

DOI: 10.1002/ijc.25619

History: Received 29 Mar 2010; Accepted 16 Jul 2010; Online 19 Aug 2010

Correspondence to: Dr Arash Rafii, Department of Genetic Medicine and Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, Stem cell and Microenvironment laboratory Weill Cornell Medical College in Qatar, Qatar-Foundation, Doha, Qatar, Tel.: 974-313-5828, Fax: 974-492-8422, E-mail: jat2021@qatar-med.cornell.edu

Platinum associated to taxanes chemotherapy, is the standard treatment for ovarian cancers, and has achieved high response rate. The development of drug-resistant cancer cells exhibiting multidrug resistance phenotype is one of the major limitations of the efficacy illustrated in the literature for platinum or taxanes chemotherapy.^{4,5} Therefore, new therapeutic modalities are critical to improve overall survival in ovarian cancer. Intra-peritoneal (IP) chemotherapy emerged as one therapeutic option from the natural history of ovarian cancers (e.g., local extension to the peritoneum, chemosensitivity). Indeed it has been demonstrated that IP delivery of certain chemotherapeutic agents leads to increased peritoneal cavity drug exposure.⁶ Randomized control trials demonstrated superiority of IP chemotherapy over classical intravenous therapy in patients with optimally debulked Stage III ovarian cancer.^{6,7} More recently, hyperthermic intraperitoneal

chemotherapy (HIPEC) has emerged as a new option to increase the efficacy of chemotherapy. Its efficacy has already been demonstrated in carcinosis from colon cancer.⁸

Hyperthermia is tumoricidal and increases the cytotoxicity of many chemotherapeutic agents in cell cultures as well as in animal models.^{9,10} Synergistic effects of hyperthermia in conjunction with cisplatin treatment include increased DNA cross-linking, increased DNA adducts formation and deeper penetration into peritoneal tumor implants.^{11,12} Furthermore, cancer cells operate under increased acidity due to their inability to expel waste created by the anaerobic metabolism and are thus sensitive to hyperthermia. Hyperthermia also disrupts the stability of cellular proteins, cell membranes and the cytoskeleton. Finally hyperthermia inhibits DNA replication forks, which leads to cancer cells displaying greater sensitivity to chemotherapy than normal cells.¹³

Many clinical trials in peritoneal carcinosis studying different tumor types (gastric, mesothelioma, endometrial, colorectal) have been launched based on the described synergy between hyperthermia and chemotherapy, and possibility of concomitant IP delivery of these two modalities.^{6,14,15} A Phase III randomized study of HIPEC following cyto-reductive surgery compared to traditional intravenous chemotherapy and palliative care, in patients with peritoneal spread of colorectal carcinoma showed a statistically significant prolongation of life in the experimental arm.⁶ However despite different protocols, HIPEC could not demonstrate a real benefit compared to the standard treatment in ovarian cancer carcinosis.¹⁶ In the case of ovarian cancers most of the studies are Phase I or II feasibility trials. The overall median survival following HIPEC ranged from 22 to 64 months with a median disease-free survival ranging from 10 to 57 months. In patients with optimal cytoreduction, a 5-year survival rate ranging from 12 to 66% could be achieved. The overall rate of severe perioperative morbidity and mortality is higher than standard treatment ranging from 0 to 40% and from 0 to 10%, respectively.^{16,17}

Hyperthermia by itself is not a treatment in ovarian cancers. However the growing amount of publication in the literature demonstrate that it might be of interest in the treatment of peritoneal carcinosis when associated to chemotherapy. Despite various modifications of the protocols, the optimal results have not been achieved and there are no demonstrated benefits for survival with associated high morbidity.¹⁷ Several randomized trial are trying to address these issues. Some authors suggest that in patients with epithelial ovarian cancer with no residual disease, HIPEC should be considered as a consolidation treatment option.¹⁸

Indeed surgical optimal cytoreduction immediately followed by HIPEC ensures intraperitoneal delivery of the drug to all peritoneal surfaces and the advantages of combined hyperthermia to be exploited to target microscopic residual disease.¹⁹

A growing amount of evidence is underlying the role of microenvironment in EOC development.²⁰⁻²² Recently, our group was able to demonstrate that a subset of the mesothe-

lial cells isolated from the peritoneal cavity of patients with ovarian cancer was able to induce chemoresistance through oncologic trophoblastosis.²³ We went further in demonstrating that these cells were also able to sustain tumor growth *in-vivo* through the production of IL8 and their role in angiogenesis.²⁴ Finally we demonstrated that these cells could provide an immunotolerant microenvironment to cancer cells.²⁵

Evidences in the literature are suggesting a “cross-talk” between cancer cells and peritoneal stromal cells that might impact different therapeutic modalities. Thus far, there has been only one study on the role of hyperthermia on mesenchymal stem cells (MSCs) and their effect on ovarian cancer cells (OCC). Our study demonstrated that conditioned medium of hyperthermia treated MSCs exerted suppressive effects on the tumor progression and malignancy, suggesting that hyperthermia enables MSC to provide a sensitizing environment for tumor cells to undergo cell death. We choose a different approach and used a co-culture setting. We were able to display a significant protective effect of MSCs on OCC subjected to hyperthermia. We demonstrated that MSC-mediated thermotolerance upon cross-talk with the OCC was dependant on CXCL12.

Material and Methods

Isolation of tumor associated mesenchymal cells (TAMC)

Mesothelial cells are known to exfoliate at the beginning of the metastatic process. This suggests that the ovarian cancer-specific mesothelial cells could interact with the epithelial ovarian cancer cell aggregates. TAMC were isolated from the ascites of 3 untreated patients with Stage IIIc ovarian serous adenocarcinomas, who were undergoing ascites evacuation for clinical discomfort, as previously described.²³⁻²⁵ Lymphocytes and erythrocytes were separated from cancer cell-TAMC aggregates using a Ficoll procedure. These ascites-derived TAMC displayed a fibroblast-like morphology and could be cryopreserved and expanded *in vitro*. We determined the expression profile of surface marker proteins by fluorescence-activated cell sorting. Cells expressed MSC related markers CD9, CD10, CD29, CD146, CD166 and HLA1. TAMC do not express any hematopoietic markers like CD45, CD31, CD34, CD3, CD4, CD8 and epithelial markers such as CD324 (E-Cadherin) and CD326 (EpCAM).²³ Polyvariate flow cytometry analysis was only able to define a unique population of TAMC, thus demonstrating that TAMC constitutes a pure population.²³⁻²⁵

Ovarian cancer and mesenchymal stem cells

OCC lines SKOV3 (HTB-77) and CaOV3 (HTB-75) were purchased from the ATCC and maintained in culture following ATCC recommendations (DMEM high glucose [Hyclone, Thermo Scientific], 10% FBS [Hyclone, Thermo Scientific], 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericyn B solution [Sigma], 1× Non Essential Amino-Acid [Hyclone, Thermo Scientific]). Bone Marrow derived MSC (BM-MSC) were purchased from Stem Cells, Inc (Vancouver, CA) and maintained and expanded in

culture using MesenCult[®] MSC Basal Medium completed with Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Stem Cell, Vancouver, CA) according to manufacturer's recommendations.

Heat treatments

Different cell populations were heat-shocked at 42°C for 1 to 2 hr (5% CO₂, humid atmosphere). Cells were allowed to recover for a period of 2 hr before assessing cell viability.

Immunostaining and fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis

OCC were stained for the expression of CXCR4 using a rat anti-human CXCR4 antibody (BD Biosciences, clone 12G5) conjugated to APC and/or for EpCAM (CD326) using a mouse anti-human EpCAM antibody conjugated to PE (Miltenyi Biotec, clone HES125). Briefly, 2.10⁵ cells were harvested and then blocked in PBS-5%FBS-1%BSA-10%FcR Blocking Reagent (Myltenyi Biotec) for 30 min on ice. Cell suspension was stained for the CXCR4-APC and/or the EpCAM-PE or with 0.01 mg of antibody per 1.10⁶ cells for 45 min on ice. Filtered, single-cell suspension was analyzed by FACS on a SORP FACS Aria2 (BD Biosciences). Data were processed with FACSDiva 6.3 software (BD Biosciences). Doubts were excluded by FSC-W × FSC-H and SSC-W × SSC-H analysis, single stained channels were used for compensation, and fluorophore minus one (FMO) controls were used for gating. Calcein-violet-AM fluorescence was acquired with 405 nm violet laser excitation and a 450/50 nm filter emission, eGFP fluorescence was acquired with 488 nm blue laser excitation and a 488/40 nm filter emission, EpCAM (CD326) conjugated to PhycoErythrin (EpCAM-PE) fluorescence was acquired with a 532 nm yellow-green laser and a 582/15 nm emission, CXCR4 (CD184) conjugated to AlloPhycoCyanin (CXCR4-APC) was acquired with 633 nm red laser excitation and a 670/14 nm emission. 45,000 events were acquired per sample. Charts display the mean of fluorescence intensity (MFI) relative to the control.

Cell viability, calcein staining

Calcein-AM indicates intracellular esterase activity. OCC were exposed to hyperthermia as described. The cells were then washed twice with Phosphate buffer saline (PBS). Cells were next stained with the 2 μM of calcein-violet-AM (Molecular Probes, Invitrogen, Leiden NL) for 45 min at 37° 5% CO₂ according to manufacturers instructions. They were then immediately analyzed by FACS on a SORP FACS Aria2 (BD Bioscience, San Jose, CA) as described.

Cytokines array

TAMC were cultivated in serum free media for 24 hr. TAMC were then heat-shocked as described earlier. Heat-shock conditioned media was collected and protein quantified based on sample absorbance at 280 nm using nanodrop device (Thermo-Scientific, Dubai, Emirates). 200 μg of protein was loaded on RayBio[®] Human Cytokine Antibody Array G Se-

ries 1000 (Raybiotec, Norcross, GA) according to manufacturer's instructions. Unconditioned media was used as a negative control sample. Arrays were revealed using Horse-Radish Peroxidase (HRP) and SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo-Scientific, Dubai, Emirates). Data were collected using Geliance CCD camera (Perkin Elmer, MA), and extracted using ImageJ software (NIH). Briefly, the pictures of the arrays were inverted and background subtracted. We then defined the area for signal capture for all spots as 110–120 micron diameter, using the same area for every spot. We defined our signal as the median pixel density value. For the comparison, the independent arrays values were normalized on their positive control intensity value.

Co-cultures

To demonstrate the protective effect of TAMC-eGFP or BM-MS-C-eGFP on OCC during hyperthermia, we established co-cultures of OCC with TAMC-eGFP or BM-MS-C-eGFP at a ratio of 1:1. Co-cultures were established 24 hr prior to the beginning of the hyperthermia assay. OCC were differentiated from the TAMC or BM-MS-C based on their eGFP and EpCAM expression (CD326) (restricted to OCC in our model). OCC were defined as the eGFP⁻EpCAM⁺ cells. Hyperthermia assays was driven as previously described and cell viability was assessed using calcein assay (see above). The same experiments were performed using a 0.2 μm trans-well system (BD Bioscience, San Jose, CA) to study the effect of intercellular contact on survival of OCC. To avoid donor-to-donor variability, all experiments with BM-MS-C involved two different lots of BM-MS-C.

Statistical analysis

Student-t, Fisher exact or chi-square tests were performed as appropriate. All *p*-values are two-sided with statistical significance evaluated at the 0.05 alpha level. Ninety-five percent confidence intervals (95% CI) were calculated to assess the precision of the obtained estimates. All statistical analysis was done using the data analysis plug-in shipped into the Excel 2008 for the Mac (Microsoft). We first calculated the variance of two paired. Mean ± SEM are shown on the graphs. All results are representative of the indicated number of independent experiments.

Results

Characterization of heat-shocked TAMC and MSC

The TAMC or BM-MS-C were either untreated or heat-shocked as described in "Material and Methods." Phase contrast microscopy analysis of TAMC submitted to heat shock for 2 hr did not display any morphological changes (Fig. 1a). We were able to demonstrate no cytotoxic effect of hyperthermia on BM-MS-C or TAMC (Figs. 1b–1c). We went further and performed transcriptomic analysis of TAMC after heat-shock. As expected, genes involved in thermotolerance were upregulated (HSP-70, Id2). Accordingly to functional

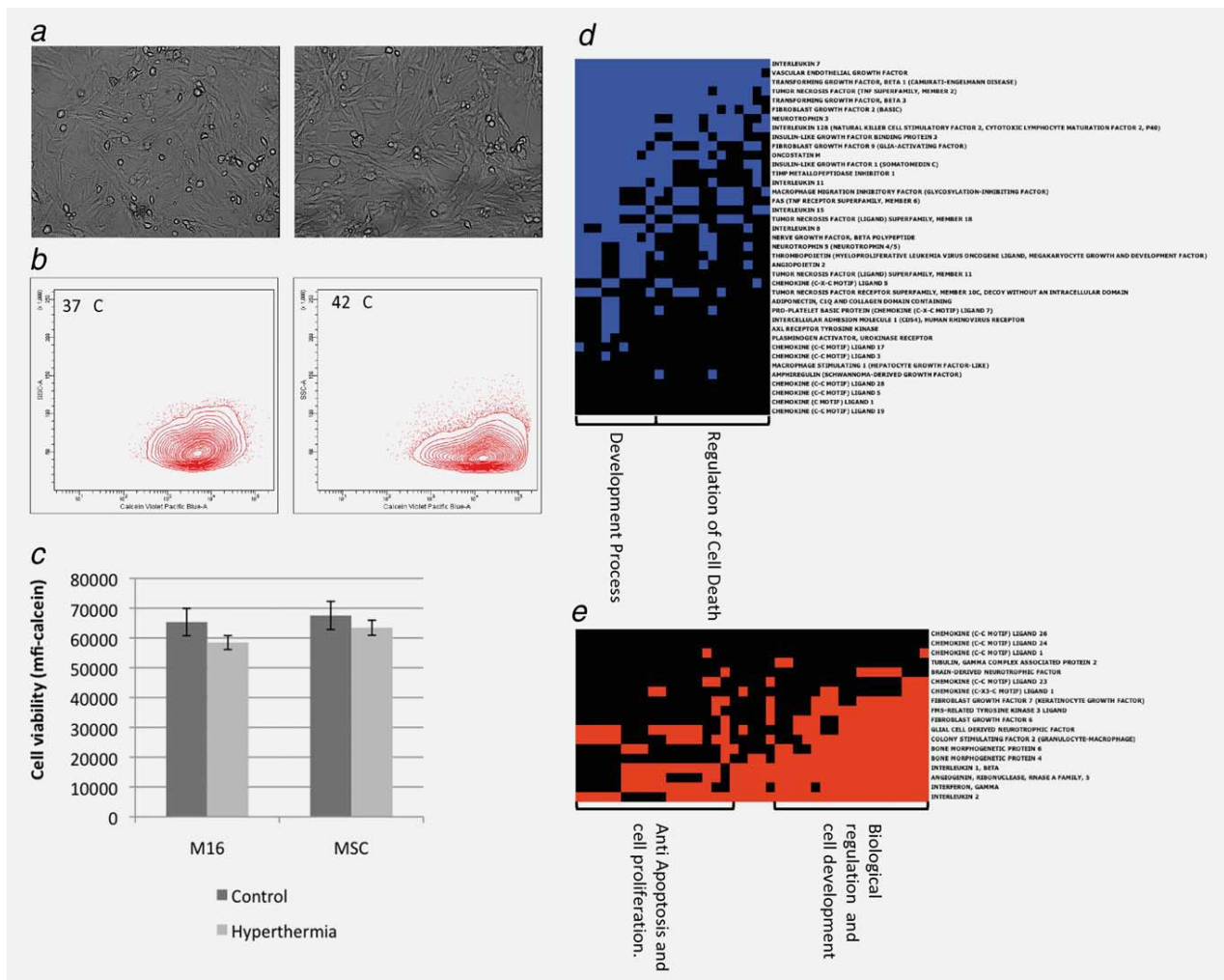


Figure 1. Effect of hyperthermia on TAMC and MSC. (a) Phase contrast analysis of the TAMC exposed to the hyperthermia for 2 hr and allowed to recover for 2 hr. (b) Scatter plot analyzing calcein Violet staining of TAMC at 37°C (control) and at 42°C (hyperthermia) as described in “Material and methods.” Briefly, the different cell populations were stained by calcein Violet AM and submitted to heat-shock for 2 hr and allowed to recover for 2 hr, cell viability was then assessed by calcein staining using polyvariate flow cytometry. (c) Quantification of the fluorescence intensity representing the living cells for the same experiments. (d and e) DAVID Functional annotation clustering charts displaying function enriched in down-regulated cytokines (d) or up-regulated cytokines (e). Representative of three independent experiences.

analysis, no genes involved in apoptosis or cell death were upregulated (Supporting Information Table 1). We then performed cytokine arrays of heat-shocked TAMC. Several cytokines involved in the inflammatory response (IL2, CCL1, CCL24 and CCL 26) as well as cytokines involved in negative regulation of cell death and cell proliferation (IFN—gamma, Angiogenin, BMP6, GM-CSF and GDNFm and CCL23) were upregulated. Cytokines involved in cell death signaling such as Fas, TNFSF18, TNFSF10C) were down-regulated (Supporting Information Figure 2). Comprehensive functional annotation chart was obtained by clustering more than 2-fold up or down regulated cytokines using DAVID Bioinformatic Resources (as described in Refs. 26,27). A number of functional groups or biological themes are identified as enriched in treated TAMC compared to the untreated control (Sup-

porting Information Table 2). As shown in Figures 1d and 1e among all cytokines tested, cytokines involved in developmental process, regulation of cell death, anti-apoptosis and cell proliferation were specifically enriched. Having demonstrated a survival of TAMC and BM-MSc upon heat-shock treatment, we investigated the effect of co-culture of TAMC or BM-MSc with OCC.

TAMC and BM-MSc induced thermotolerance of OCC

The viability of OCC (SKOV3 and CaOV3) were challenged after 30 min of hyperthermia treatment and reached a plateau after 1 hr of treatment (Supporting Information Figure 3A and B). Timelapse study confirmed the kinetic observed in the cytotoxicity assay (Supporting Information Figure 3C).

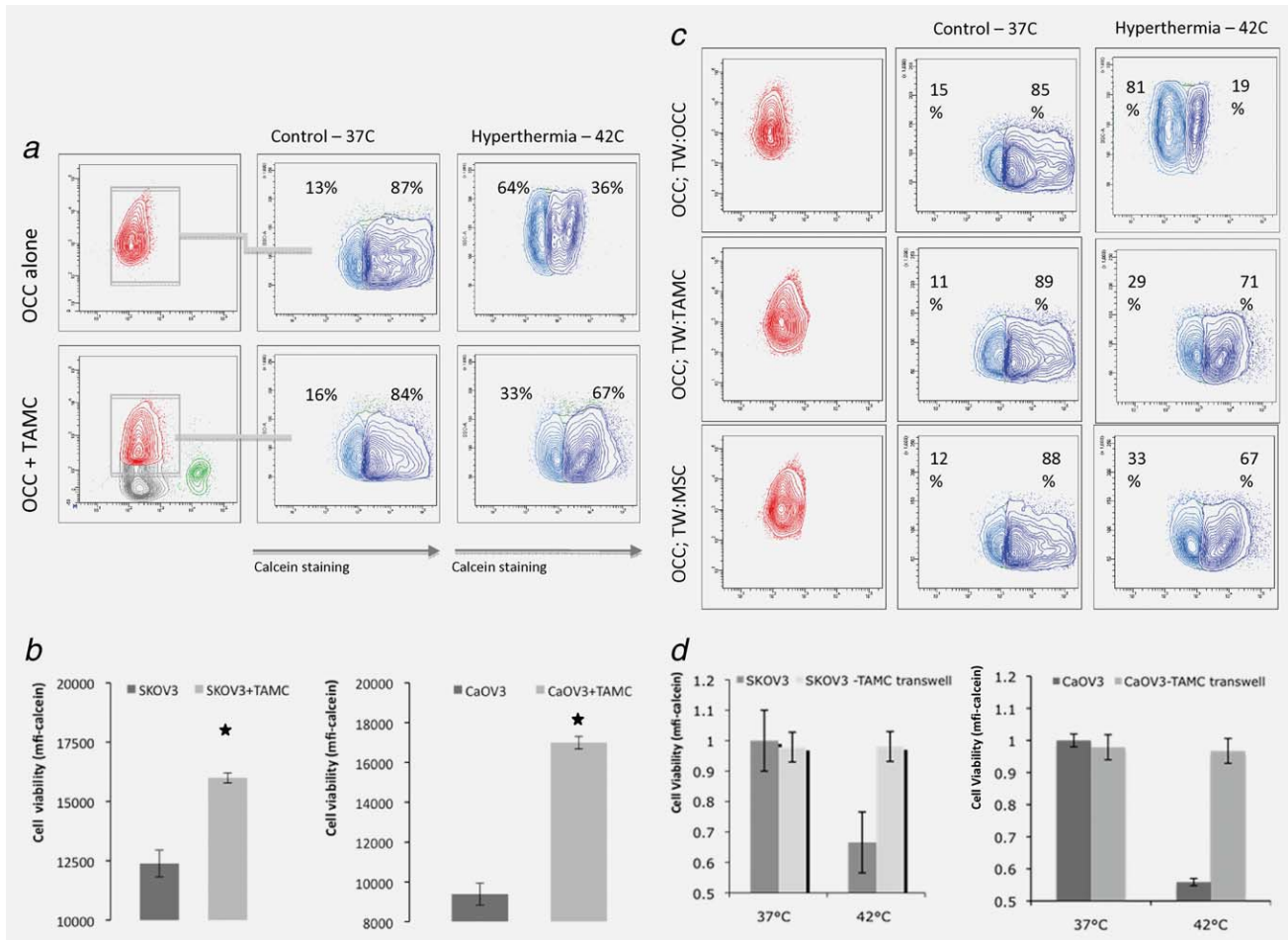


Figure 2. TAMC and MSC protects tumor cells against hyperthermia. (a) Scatter plot analyzing the effect of hyperthermia on co-culture of SKOV3 and TAMC. Ovarian cancer cells were stained with calcein violet to assess for cell viability. eGFP-TAMC were differentiated by eGFP staining (b) Graphic representation for different hyperthermia experiments performed. The cancer cell lines were either cultured alone or with the TAMC (or BM-MSC) before heat-treatment. Cell viability was assessed by calcein staining in the cancer cell population using polyvariate flow cytometry as depicted in 2A. (c) Scatter plot analyzing the effect of hyperthermia on co-culture of SKOV3 and TAMC in a transwell context. (d) Graphic representation of the same experiments. All results are representative of five different sets of experiments. ($\star p < 0.05$).

For all following experiments, heat shock duration of 2 hr with recovery period of 2 hr at 37°C was applied.

We used polyvariate flow cytometry to characterize the effect of hyperthermia in co-culture of mesenchymal cells with OCC. Figure 2a represents a typical scatter plot with selection of different sub-populations and the strategy used for analyzing OCC viability upon hyperthermia treatment. In the co-culture context, no significant increase in cell viability was observed prior to the heat-shock (Figs. 2a and 2b). When treated at 42°C for 2 hr OCC's viability was decreased by up to 40% (Figs. 2a and 2b). Twenty-four hours co-culture either with BM-MSC or TAMC was able to rescue OCC from hyperthermia-induced cell death ($p < 0.05$, $n = 5$). To differentiate the role of intercellular contact from secreted factors, we reproduced the same set of experiments in the 0.2 μ m transwell setting. The positive effect on cell viability persisted in the absence of a direct hetero-cellu-

lar contact, highlighting the role of secreted factors in MSC mediated thermotolerance (Figs. 2c and 2d).

CXCR4 is a determinant of MSC induced thermotolerance

In human ovarian tumor microenvironment, chemokine CXCL12 (also known as Stromal Derived Factor 1, SDF1) stimulates proliferation and invasion of OCC by establishing a permissive network.²⁸ We first investigated the expression of one of CXCL12 receptors: CXCR4. As shown in Figure 3a, both CaOV3 and SKOV3 cell lines exhibit a high expression level of CXCR4. We were previously able to demonstrate that MSC rescued OCC from hyperthermia induced cell death (Fig. 2) here we checked whether rescued cells were expressing higher level of CXCR4. We first demonstrated that the OCC were expressing CXCR4 (Fig. 3a). Using polyvariate flow cytometry we discriminated BM-MSC-eGFP or TAMC-

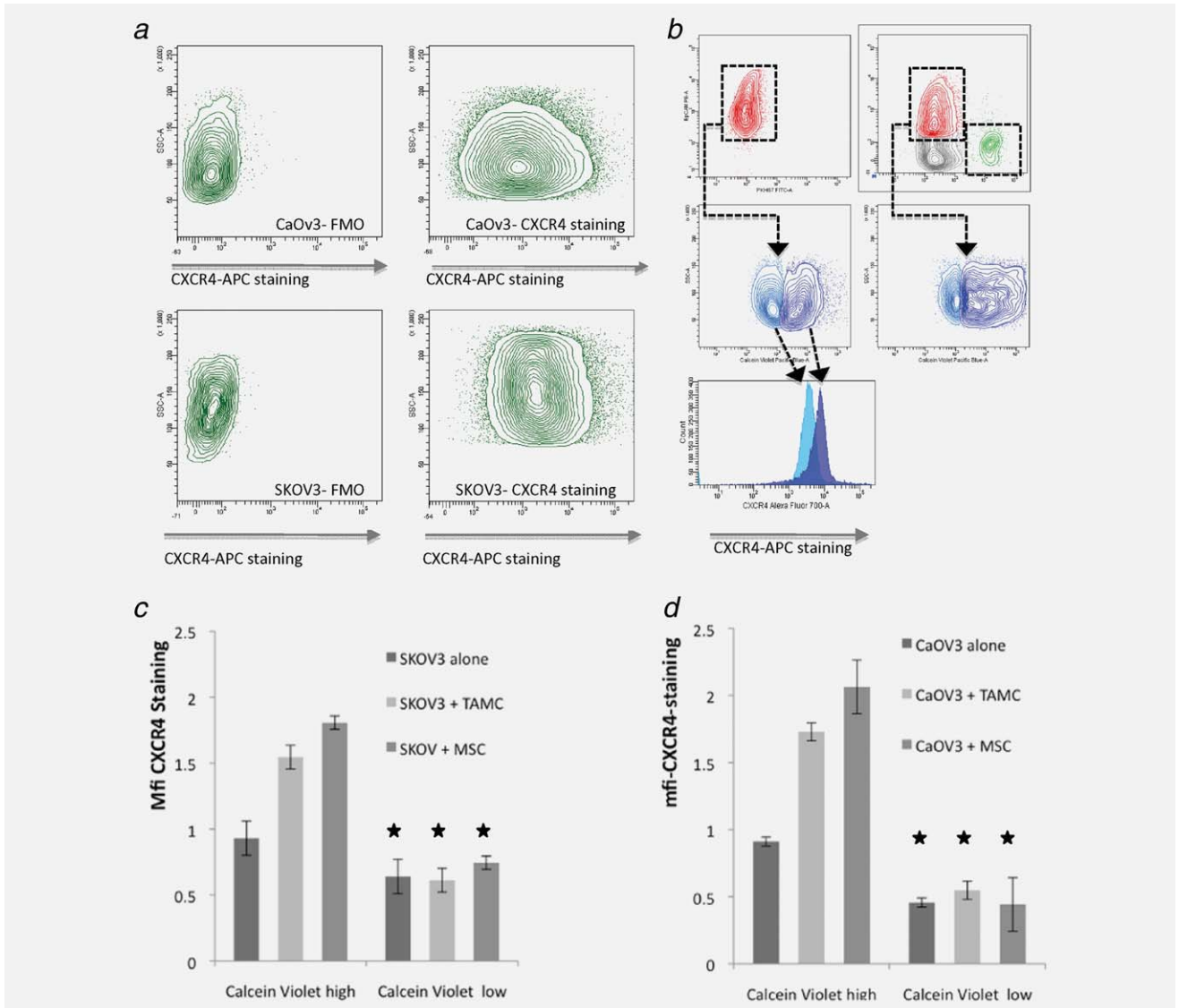


Figure 3. CXCR4 expression and cell viability. (a) Cytometry analysis of the SKOV3 and CAOV3 demonstrating expression of CXCR4 on both cell lines when compared to the controls. (b) Analysis of CXCR4 expression in the hyperthermia experience. Polyvariate flow analysis was able to demonstrate lower expression of CXCR4 on calcein-low (low viability) ovarian cancer cells. (c and d) Quantification of CXCR4 on calcein-high and low population during hyperthermia assays in the context of single or co-culture. (* $p < 0.05$).

eGFP from OCC (CaOV3 or SKOV3) based on their eGFP fluorescence. Within the OCC population, we investigated the calcein violet fluorescence intensity and defined two populations: calcein low (nonviable) and calcein high (viable) (Fig. 3b). Then we determined the CXCR4 expression level in these two populations (Fig. 3b–3d). When co-cultivated with TAMC or BM-MSC, both CaOV3 and SKOV3 resistant to heat-shock exhibited a higher level of CXCR4 expression. According to these data, CXCR4 seems to play a role in the BM-MSC and TAMC induced thermotolerance.

CXCL12 mediates OCC thermotolerance

To further investigate the role of CXCL12 in thermotolerance induction, we stimulated the OCC (CaOV3 and SKOV3)

with 100 ng/ml of CXCL12 24 hr prior to heat-shock. As shown in the Figure 4a, CXCL12 stimulation does not increase the percentage of viable cells when at 37°C. When heat shocked, untreated OCC underwent a major hyperthermia induced cell death (87% of calcein high cell against 29% after heat-shock). However, when treated with CXCL12, no significant hyperthermia induced cell death was observed (Figs. 4b and 4c). Hence, the CXCL12 stimulation is sufficient to induce thermotolerance of OCC.

CXCR4 inhibition reverses MSC induced thermotolerance

As CXCL12 is sufficient to protect OCC from hyperthermia induced cell death, we developed a strategy in which we inhibited CXCL12 signaling. OCC/TAMC or BM-MSC co-

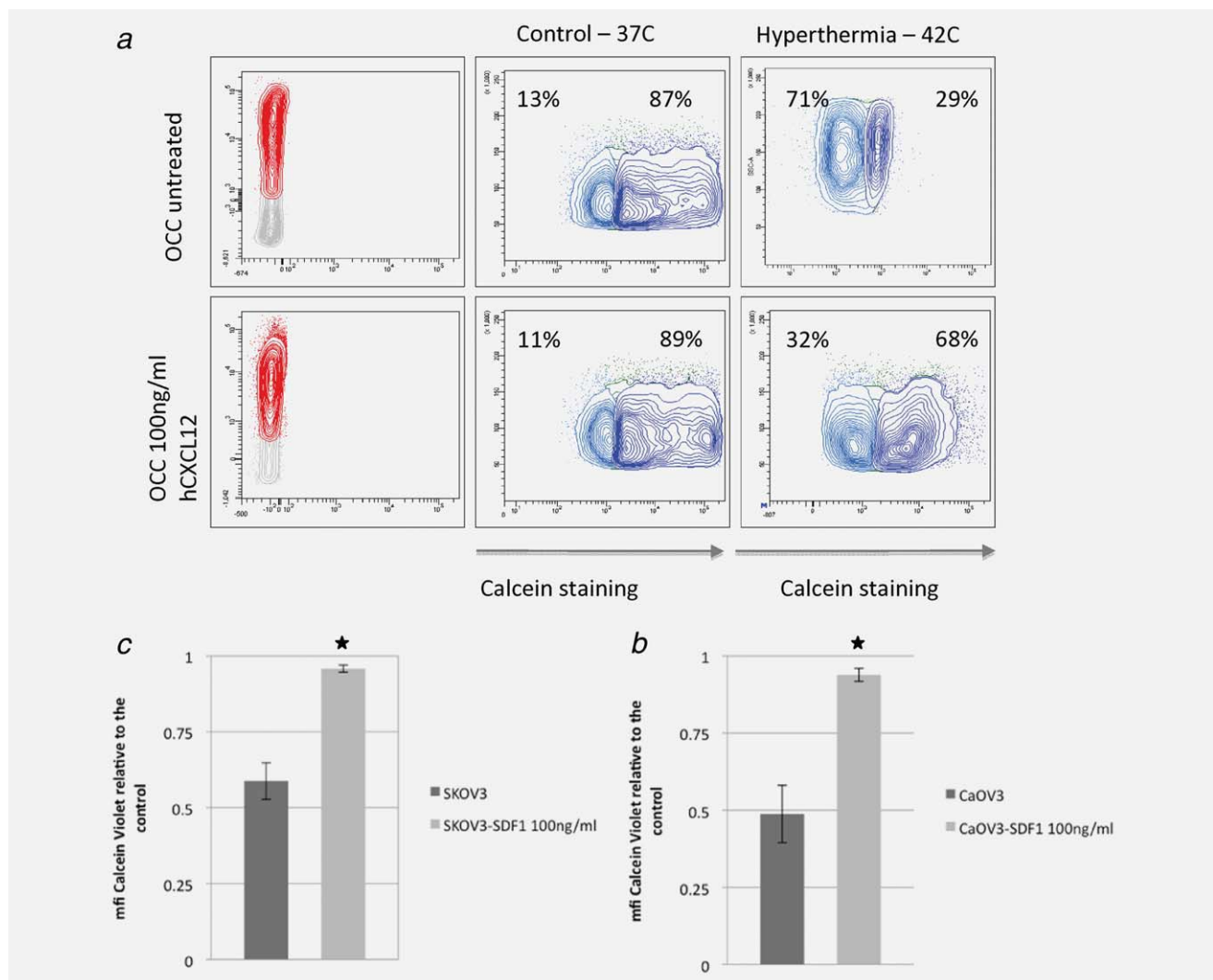


Figure 4. Role of CXCL12/CXCR4 on thermotolerance. (a) Cell viability was assessed as previously by calcein staining. Blocking monoclonal antibodies were used at (10 μ g/ml). We were able to demonstrate that treating the Ovarian cancer cells by hCXCL12 (100 ng/ml) was able to recapitulate the thermotolerance induced by co-cultures of TAMC or BM-MSC and OCC. (b and c) Graphic representation for different hyperthermia experiments performed. The protective effect of hCXCL12 was equivalent for SKOV3 and CaOV3. Graphs are representative of three different experiments. ($\star p < 0.05$).

cultures were treated with blocking CXCR4 antibody 24 hr before heat-shock. Treatment with CXCR4 blocking antibody did not induce any cell death prior to heat-shock on the OCC, TAMC or BM-MSC (Figs. 5a and 5b and data not shown). When exposed to hyperthermia OCC/TAMC or BM-MSC co-cultures did not display major OCC death, as shown previously. However, treatment with a CXCR4 blocking antibody critically sensitized the OCC in the co-culture context (Figs. 5c and 5d). Here, we were able to demonstrate that the MSC-induced thermotolerance relies on CXCR4/CXCL12 signaling axis.

Discussion

In our study, we were able to demonstrate that TAMC and BM-MSC are able to induce OCC thermotolerance.

Patients with peritoneal carcinosis have very poor survival. Indeed the rate of recurrence is quite high even in patients who underwent optimal debulking surgery and chemotherapy. HIPEC efficacy has been demonstrated in carcinosis from colon and gastric cancer.⁸ However, most protocols used in the treatment of ovarian cancers failed to demonstrate significant benefit regarding the overall survival. Ovarian cancer is a different entity from digestive tract cancers. Some investigators even consider ovarian cancer to be a peritoneal disease.²⁹ Most of the patients (75%) display peritoneal metastasis at the time of diagnosis, compared to the digestive tract cancers (25%). Peritoneal metastasis seems to be an early event in the natural history of the disease. Identifying peritoneal components that play a role in therapeutic resistance is therefore of essence. The role of microenvironment in

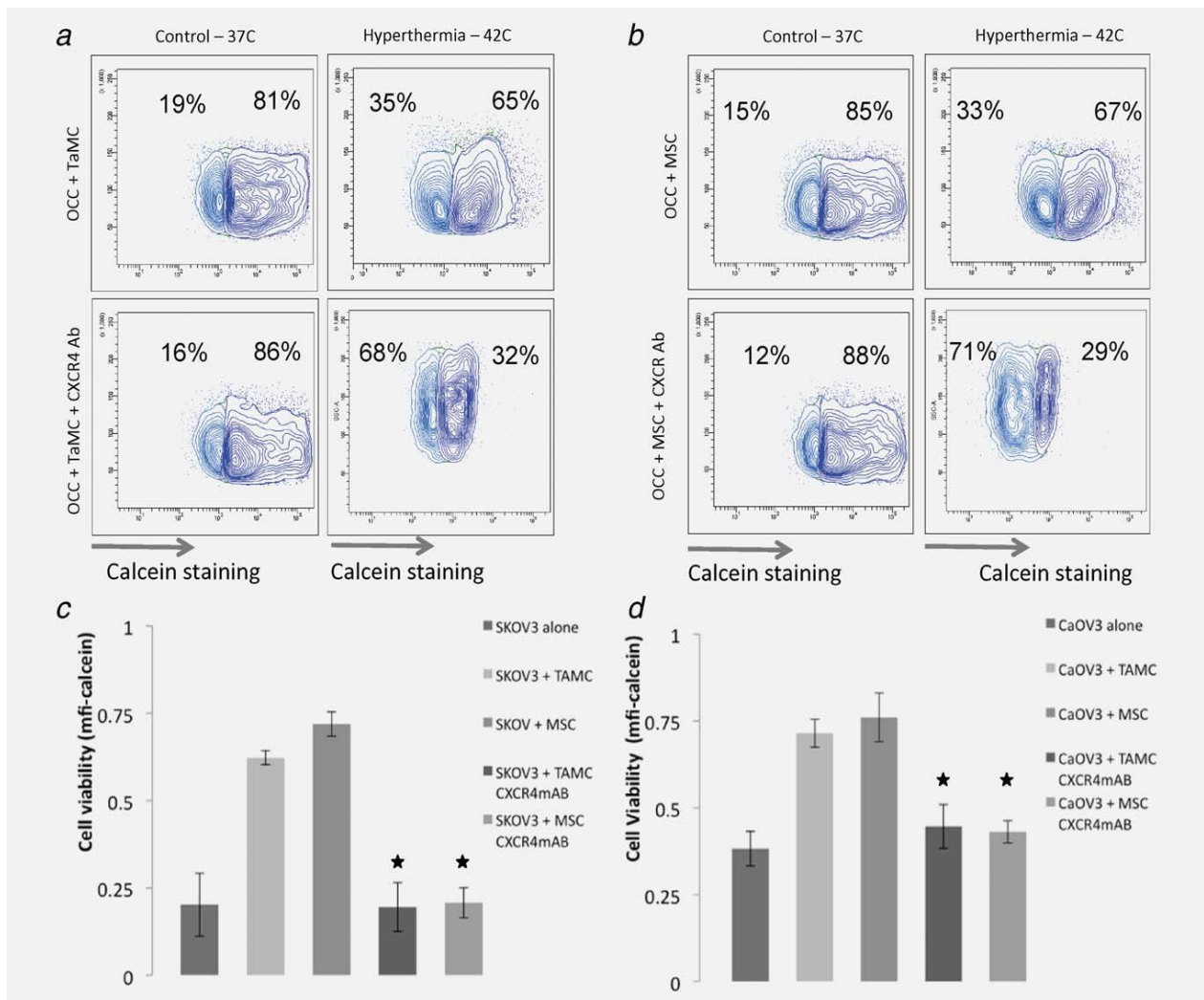


Figure 5. The protective effect of TAMC or BM-MSc is induced by CXCL12. (a and b) Scatter plot analyzing the effect of hyperthermia on co-culture of SKOV3 (OCC) with TAMC and BM-MSc respectively. OCC were stained with calcein violet to assess for cell viability. eGFP-TAMC were differentiated by eGFP staining. The co-culture experiments were performed in the presence of CXCR4 monoclonal blocking antibodies when indicated. (c and d) Graphic representation for the different hyperthermia experiments with CXCR4 monoclonal blocking antibodies involving CAOV3 and SKOV3 respectively. Representative of three different experiments, blocking CXCR4 would inhibit thermotolerance induced by TAMC or BM-MSc. ($\star p < 0.05$).

ovarian cancer has already been illustrated in the literature.^{20–22} Several studies demonstrated that mesothelial cells from peritoneum of patients with ovarian cancer undergo phenotypic modification. Their transcriptomic profile demonstrated that they provide a pro-tumoral environment.^{30,31} In these studies however, the tumor interacting cells were not specifically characterized.

MSC comprise a unique population of cells playing a central role in tissue maintenance and repair.³² These cells have regenerative ability and multipotent capacity, and can differentiate into osteocytes, adipocytes, chondrocytes or myocytes.³³ Their tropism toward injury sites prompted investigators to study their ability to migrate toward neoplastic lesions considered as nonhealing wounds. Recently, it has been dem-

onstrated that MSCs are able to relocate to ovarian neoplastic lesions, where they participate in the formation of the tumor stroma. Kidd *et al.* demonstrated that the MSCs injected in the peritoneal cavity co-localize to the ovarian tumor xenografts.³⁴ Furthermore Lee *et al.*³⁵ demonstrated that LPA is responsible for enhanced migration of human adipocyte derived stem cells in response to malignant ascites from ovarian cancer patients through activation of LPA-receptor. Finally Coffelt *et al.*³⁶ demonstrated that an inflammatory microenvironment promotes ovarian cancer progression through the recruitment of MSCs in an LL-27 dependant manner. We were recently able to demonstrate that TAMC induce increased proliferation and chemoresistance through IL8 and IL6 secretion and oncologic trogocytosis.²³ Therefore,

we find the study of Cho *et al.*³⁷ demonstrating a cytotoxic effect of heated MSC on ovarian cancer cell lines quite intriguing.

In our study, we used TAMC isolated from cancer cell aggregates or BM-MSC in a co-culture context. It has been demonstrated that MSC undergo profound modification within peri-tumoral stroma. Indeed, co-culture of MSC with ovarian cancer cell lines induced the expression of tumor associated fibroblast markers such as TnC, TSP-a, FSP and increased the expression of alpha-SMA, FAP and desmin.^{38,39} We therefore used the TAMC isolated from ovarian cancer aggregates. These cells have been modified by their contact with the OCC, and might therefore be more relevant. To avoid cell-type specific effects, we controlled their functional effect using BM-MSC from different donors in a co-culture setting.

We were able to demonstrate that neither TAMC nor BM-MSC underwent apoptosis when submitted to heat shock. Transcriptomic analysis of TAMC did not display up-regulation of pro-apoptotic factors when exposed to heat-shock. The cytokine arrays performed on TAMC after heat-shock defined a pro-tumoral cytokine environment, rather than a cytotoxic one. For example, pro-survival cytokines such as FGF6, CSF2, IL2 were up-regulated. The tumor stroma is indeed a complex environment and it is hard to speculate on the role of each cytokine on their own. Therefore, we analyzed our cytokine arrays by clustering up-regulated and down-regulated cytokines using DAVID software.^{26,27} We were able to demonstrate down regulation of cytokines involved in pro-apoptotic pathways as well as an up regulation of cytokines implicated in cell proliferation.

Our approach was very different from the approach of Cho *et al.*³⁷ To recapitulate a situation as close to the clinical setting as possible we used polyvariate flow cytometry, and were able to perform all hyperthermia experiments in a co-culture context. While *in vitro* research is far from the clinical scenario, this was the best way to mimic the complex interaction between OCC and TAMC or MSC. We acknowledge that the complexity of the tumor stroma is significantly higher than our simple co-culture experiments may suggest. Other cell types such as endothelial cells and fibroblasts have important roles in tumor maintenance and resistance to therapy. The diverse components of the extra-cellular matrix also play an important role in tumor physiology. Finally, tri-dimensional aspect of the tumor should be considered when performing resistance assays. Nevertheless, a complex and practical tri-dimensional cultures have not yet been developed to allow for the reproducible assessment of therapeutic modalities.

In our co-culture context, we were able to demonstrate the induction of heat-shock resistance. This was concordant with our previously published results on the protective role of TAMC inducing chemoresistance and immunoevasion as well as with the data of other studies demonstrating supportive role of the MSC in ovarian tumor growth.^{24,25}

The discrepancy of our results with the results of the Cho *et al.* might be due to the methodological differences. Cho

*et al.*³⁷ demonstrated that conditioned media from MSC submitted to heat shock presented toxicity. However it seems than when the thermo-resistance experiments were performed in the co-culture, the TAMC as well BM-MSC provided a protective environment.

Determining the role of TAMC and BM-MSC in inducing heat-shock resistance lead to us to identify the molecular basis of this effect. As the effect was not contact mediated, one or several cytokines qualified as strong candidates. Among these, CXCL12 has been widely implicated in cancer metastasis.⁴⁰ In particular, in the context of ovarian carcinoma it has been demonstrated that lysophosphatidic acid stimulates secretion of VEGF and CXCL12.^{38,41} Kajiyama *et al.*²⁸ demonstrated the role of CXCL12 in the occurrence of peritoneal metastasis. Indeed CXCL12 increased cell adhesion to peritoneal mesothelial cells, and inhibiting CXCL12/CXCR4 axis would result in a reduction of peritoneal disease in mice. As in other tumors, CXCL12 contributed to the increased invasiveness of OCC through the activation of matrix metalloproteinase-2 and 9.⁴² Human peritoneal mesothelial cells have been described to produce a significant quantity of CXCL12.⁴⁰ Next to the metastatic properties of the CXCL12, its role in the proliferation of OCC has also been described. Indeed, CXCL12 seems to work in collaboration with EGF receptor to enhance ovarian cancer cell proliferation.⁴³ We first demonstrated that CXCL12 was able to induce resistance to hyperthermia. In co-culture experiments, through the blocking of the CXCR4 axis, we were able to demonstrate the reversion of the thermotolerance. The effect was similar when using TAMC or BM-MSC ruling out a specific cell-type effect. The role of CXCL12 does not rule out synergistic interaction or the role of other cytokines, and this should be addressed using a screening strategy. However as chemical inhibitors of CXCL12 have been tried in Phase I clinical trial, we suggest that CXCL12 blockade might be used as adjuvant therapy during HIPEC.

In this report, we demonstrate that TAMC and BM-MCS exert their thermo-protective effect by the elaboration of the CXCL12. Its role in resistance to therapeutic regimens in ovarian cancer has not yet been documented. We had previously demonstrated the role of TAMC in resistance to chemotherapy. Therefore in our study we specifically focused on the mechanism implicated in thermotolerance.

The results of the clinical trials are not yet convincing to consider HIPEC as standard treatment in ovarian cancers. HIPEC was used in ovarian cancer carcinosis upon evidences accumulated in the treatment of colon cancer carcinosis or peritoneal mesotheliome. Indeed the high morbidity rate as well as the small benefits demonstrates the need for further pre-clinical studies. Moreover we also need to evaluate the role of hyperthermia associated to other modalities than chemotherapy, such as recent targeted therapies, or anti-angiogenic therapies. Combining therapeutic modalities is mandatory to decrease the treatment failure rate in advanced

ovarian carcinoma.⁴⁴ Several randomized trials have been launched to determine the role of HIPEC in advanced ovarian cancers. The differences in the trial outcomes between colon cancer and ovarian cancer prompt us to investigate treatment modalities in-vitro and in-vivo on animal models to set-up optimal clinical trials.

Whether CXCL12 induced resistance will play a role in the context of hyperthermia associated to chemotherapy should be further studied. However, from our data it seems that the inhibition of CXCL12 might provide sensitization of OCC to hyperthermia, which might therefore be of benefit in the context of HIPEC.

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225–49.
- Bhoola SMD, Hoskins WJMD. Diagnosis and Management of Epithelial Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol* 2006;107:1399–410.
- Eisenkop SM, Spirtos NM, Lin W-CM. “Optimal” cytoreduction for advanced epithelial ovarian cancer: a commentary. *Gynecol Oncol* 2006;103:329–35.
- Pfisterer J, Ledermann JA. Management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Semin Oncol* 2006;33:12–16.
- Di Nicolantonio F, Mercer S, Knight L, Gabriel F, Whitehouse P, Sharma S, Fernando A, Glaysher S, Di Palma S, Johnson P, Somers S, Toh S, et al. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer* 2005;5:78.
- Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA, the Gynecologic Oncology Group. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354:34–43.
- Markman M, Brady MP, Hutson AP, Berek JSMD. Survival after second-line intraperitoneal therapy for the treatment of epithelial ovarian cancer: the gynecologic oncology group experience. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:223–9.
- Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, Levine E, Yan T, Alexander R, Baratti D, Bartlett D, Barone R, Barrios P, Bieligk S, Bretcha-Boix P, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. *Ann Surg Oncol* 2007;14:128–33.
- Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:487–97.
- Jones EL, Samulski TV, Dewhirst MW, Alvarez-Secord A, Berchuck A, Clarke-Pearson D, Havrilesky LJ, Soper J, Prosnitz LR. A pilot phase II trial of concurrent radiotherapy, chemotherapy, and hyperthermia for locally advanced cervical carcinoma. *Cancer* 2003;98:277–82.
- Meyn RE, Corry PM, Fletcher SE, Demetriades M. Thermal enhancement of DNA damage in mammalian cells treated with cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 1980;40:1136–39.
- van de Vaart PJM, van der Vange N, Zoetmulder FAN, van Goethem AR, van Tellingen O, ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH, Bartelink H, Begg AC. Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1998;34:148–54.
- Roti Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia* 2009; 24:3–15.
- Fujimoto S, Takahashi M, Mutou T, Kobayashi K, Toyosawa T, Isawa E, Sumida M, Ohkubo H. Improved mortality rate of gastric carcinoma patients with peritoneal carcinomatosis treated with intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion combined with surgery. *Cancer* 1997;79:884–91.
- Helm CW, Toler CR, Martins RS, III, Gordinier ME, Parker LP, Metzinger DS, Edwards RP. Cytoreduction and intraperitoneal heated chemotherapy for the treatment of endometrial carcinoma recurrent within the peritoneal cavity. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:204–09.
- Chua T, Robertson G, Liauw W, Farrell R, Yan T, Morris D. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery in ovarian cancer peritoneal carcinomatosis: systematic review of current results. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1637–45.
- Pomel C, Ferron G, Lorimier G, Rey A, Lhomme C, Classe JM, Bereder JM, Quenet F, Meeus P, Marchal F, Morice P, Elias D. Hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy using oxaliplatin as consolidation therapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. Results of a phase II prospective multicentre trial. CHIPOVAC study. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36:589–93.
- Kim JH, Lee JM, Ryu KS, Lee YS, Park YG, Hur SY, Lee KH, Lee SH, Kim SJ. Consolidation hyperthermic intraperitoneal chemotherapy using paclitaxel in patients with epithelial ovarian cancer. *J Surg Oncol* 2010;101:149–55.
- Ceelen WPF, Michael F. Intraperitoneal therapy for peritoneal tumors: biophysics and clinical evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;7:108–15.
- Charles KA, Kulbe H, Soper R, Escorcio-Correia M, Lawrence T, Schultheis A, Chakravarty P, Thompson RG, Kollias G, Smyth JF, Balkwill FR, Hagemann T. The tumor-promoting actions of TNF-CE± involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest* 2009;119:3011–23.
- Katz E, Skorecki K, Tzukerman M. Niche-dependent tumorigenic capacity of malignant ovarian ascites-derived cancer cell subpopulations. *Clin Cancer Res* 2009; 15:70–80.
- Tsiatas ML, Gyftaki R, Liacos C, Politi E, Rodolakis A, Dimopoulos MA, Bamias A. Study of T lymphocytes infiltrating peritoneal metastases in advanced ovarian cancer: associations with vascular endothelial growth factor levels and prognosis in patients receiving platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19: 1329–34.
- Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, Faussat A-M, Simon A, Ducros E, Mery E, Couderc B, Lis R, Capdet J, Bergalet J, Querleu D, et al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS ONE* 2008;3:e3894.
- Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie J, Mirshahi M, Couderc B. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 2010;126: 2090–101.
- Martinet L, Poupot R, Mirshahi P, Rafii A, FourniÈ J-J, Mirshahi M, Poupot M. Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *Int J Cancer* 2010;126:2143–52.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protocols* 2008;4:44–57.
- Dennis G, Sherman B, Hosack D, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki R. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* 2003; 4:P3.
- Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122:91–99.

29. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol* 2008;9: 1191–97.
30. Burleson KM, Hansen LK, Skubitz APN. Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers. *Clin Exp Metastasis* 2005;21:685–97.
31. Wang E, Ngalame Y, Panelli MC, Nguyen-Jackson H, Deavers M, Mueller P, Hu W, Savary CA, Kobayashi R, Freedman RS, Marincola FM. Peritoneal and subperitoneal stroma may facilitate regional spread of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:113–22.
32. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 2005;11:1198–211.
33. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–47.
34. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 2009;27:2614–23.
35. Lee MJ, Jeon ES, Lee JS, Cho M, Suh D-S, Chang CL, Kim JH. Lysophosphatidic acid in malignant ascites stimulates migration of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2008;104:499–510.
36. Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zwezdaryk KJ, Dembinski JL, LaMarca HL, Tomchuck SL, zu Bentrup KH, Danka ES, Henkle SL, Scandurro AB. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106: 3806–11.
37. Cho JA, Park H, Kim HK, Lim EH, Seo SW, Choi JS, Lee KW. Hyperthermia-treated mesenchymal stem cells exert antitumor effects on human carcinoma cell line. *Cancer* 2009;115:311–23.
38. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh D-S, Yoon M-S, Chang CL, Jung JS, Kim JH. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 2008;26:789–97.
39. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE* 2009;4: e4992.
40. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2002;62:5930–38.
41. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrasa M, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 2005;65:465–72.
42. Yuecheng Y, Xiaoyan X. Stromal-cell derived factor-1 regulates epithelial ovarian cancer cell invasion by activating matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2. [Article]. *Eur J Cancer Prev* 2007;16:430–35.
43. Guo Z, Cai S, Fang R, Chen H, Du J, Tan Y, Ma W, Hu H, Cai S, Liu Y. The synergistic effects of CXCR4 and EGFR on promoting EGF-mediated metastasis in ovarian cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;60:1–6.
44. Susana M, Campos SG. A current review of targeted therapeutics for ovarian cancer. *J Oncol* 2009;2010:11.

3.3 Article 3: Les cellules endothéliales activant la protéine AKT, protègent les cellules tumorales des traitements conventionnels de chimiothérapies, par l'activation de la voie Notch.

3.3.1 Résumé long.

La néo-angiogenèse tumorale est un processus physiopathologique qui permet la formation de nouveaux vaisseaux, sous l'influence du tissu cancéreux, par le recrutement des cellules endothéliales présentes dans le stroma^{18,189}. La néo-angiogenèse tumorale est un processus clé dans l'initiation et la progression tumorale, ainsi que dans l'émergence de métastases. Malgré l'efficacité de certaines molécules anti-angiogéniques pour stopper la croissance tumorale dans le cadre d'une xenogreffe chez la souris immunodéprimée^{18,190}, les récents résultats des essais cliniques où les molécules anti-angiogéniques sont administrées aux patients simultanément à leur chimiothérapie, n'ont pour l'instant amené qu'une faible progression concernant la survie globale de patients (généralement quelques mois); la majorité des patients de la cohorte décédant finalement de la progression de leur maladie²⁸⁶.

De façon assez surprenante, l'inhibition de certaines voies de transduction pro-angiogéniques peut aboutir à l'augmentation de l'envahissement tumoral et de l'occurrence de métastases^{194,195}. Ces données suggèrent que les cellules endothéliales ne soutiennent pas seulement la croissance tumorale en établissant des conduits passifs prompts à délivrer de l'oxygène et des nutriments, mais sont aussi capables de produire et de sécréter un lot spécifique de facteurs propres à promouvoir la croissance tumorale.

Ainsi, nous proposons un mécanisme par lequel les cellules endothéliales régulent directement la croissance tumorale à travers la sécrétion de facteurs "angiocrines" et ce indépendamment de la perfusion sanguine^{200,204-206}. Parmi l'éventail des facteurs angiocrines produits, il a été démontré que l'expression des ligands de Notch est conservée de façon épigénétique quelque soit l'état d'activation de l'endothélium.²⁰⁴

La voie de signalisation Notch régule un grand nombre d'évènements concernant la destinée cellulaire que ce soit durant la vie embryonnaire ou post-natale²⁸⁷. Cette voie est activée lorsqu'une cellule exprimant un ligand de la voie Notch, tel que Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL2, DLL4, interagit physiquement avec une cellule exprimant un des récepteurs de la famille Notch (Notch 1-4). Suite à la liaison entre le ligand et son récepteur, le récepteur à simple domaine transmembranaire Notch est clivé séquentiellement, d'abord

par un métalloprotéinase extracellulaire, puis par un complexe protéique à activité γ -secrétase. Ce double clivage enzymatique aboutit au relargage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) dans le cytoplasme de la cellule cible²⁵². Le NICD est ensuite transloqué dans le noyau où il interagit avec la protéine comportant un domaine de liaison à l'ADN : CSL (Rbp-Jk chez la souris, CBF1 chez l'homme), convertissant ce répresseur de transcription en activateur en recrutant des protéines de la famille mastermind. Les cibles de Notch les mieux décrites dans la littérature sont des protéines de la famille basic-helix-loop-helix de la famille Hes et Hey²⁵².

Bien que classiquement étudiée pour son rôle dans le développement embryonnaire, la signalisation Notch est aujourd'hui décrite comme activée de façon aberrante dans les cancers. Parmi les quatre récepteurs de la famille Notch, l'isoforme Notch3 est connue pour être amplifiée dans les adénocarcinomes séreux ovariens de haut grade^{37,254,255}. L'activation des voies de transduction dépendantes du récepteur Notch3 régule directement l'adhérence des cellules tumorales ovariennes aux cellules mésodermiques péritonéales, ainsi que la prolifération des foyers métastatiques²⁵⁶. De plus, un proto oncogène, la protéine Pbx1, récemment impliqué dans la survie et la prolifération des cellules tumorales ovariennes, a été identifié comme cible transcriptionnelle du complexe Notch3/CSL²⁸⁸. Enfin, les patients en récurrence d'un adénocarcinome ovarien de haut grade possédant une amplification du gène Notch3 présentent un pronostic clinique plus défavorable, c'est à dire une baisse de la survie globale combinée à une baisse de la survie sans progression, par rapport aux patientes exprimant un taux de Notch3 basal^{258,259}.

Dans cette étude, nous démontrons que les cellules endothéliales transduites par le gène E4ORF1 sont capables de protéger les cellules tumorales ovariennes des traitements de chimiothérapie. Cette chimiorésistance est dépendante de la voie Notch, car bloquée par un traitement aux inhibiteurs de γ -secrétase. Nous avons pu déterminer un couple privilégié à l'interface cellule endothéliales cellules tumorales ovariennes représenté par le ligand Jagged1 et le récepteur Notch3. Nous avons pu constater que les cellules endothéliales E4ORF1 aussi bien que le ligand recombinant Jagged1 activaient la protéine Akt chez les cellules tumorales ovariennes. Enfin nous avons établi le lien entre la signalisation Jagged1/Notch3 et la surexpression de gène anti-apoptotique classiquement impliqué dans les résistances aux thérapies.

Akt-activated endothelial cells promote chemoresistance of ovarian cancer cells through Notch3 activation.

Raphael Lis^{1,2*}, Cyril Touboul^{1*}, Christophe M. Raynaud², Laurene Martin¹, Annie Cortez³, Eliane Mery⁴, Denis Querleu^{4,5}, Joel A. Malek⁷, Jean Pierre Marie^{1,6}, Massoud Mirshahi¹, Shahin Rafii⁷, Arash Rafii^{2,7**}.

¹ UMRS 872 INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Equipe 18, Centre de Recherche des Cordeliers, 75270, Paris Cedex 06, France

² Stem Cell and Microenvironment Laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar (WCMC-Q, Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar)

³ Department of Pathology, Hôpital Tenon, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, and CancerEst, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

⁴ Institut Claudius Regaud, Department of Oncologic Surgery, Toulouse 31052, France

⁵ McGill University, Department of Gynecologic Oncology, Montreal, Canada

⁶ Département d'Hématologie, Hôtel-Dieu, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris

⁷ Department of Genetic Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY

* These authors contributed equally to this work.

**All correspondence should be addressed to:

Dr Arash Rafii.

Stem Cell and Microenvironment Laboratory - Weill Cornell Medical College in Qatar (WCMC-Q, Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar)

Department of Genetic Medicine Weill Cornell Medical College, New York, NY.

Email: jat2021@qatar-med.cornell.edu

Phone: +974-4492-8410

Fax: +974-4492-8429

Introduction:

Angiogenesis is a physiological process, which establish new blood vessels from pre-existing steady state endothelial cells ^{18,189}. Angiogenesis is a key process in tumor initiation as well as progression and metastasis . In spite of efficacy shown by some anti-angiogenic agent to stop tumor growth in xenograft ^{18,190}, recent outcomes of clinical trial in which anti-angiogenic agents were delivered simultaneously with chemotherapy have been restricted to a slight increase in patient survival, with most of the cohort dying from tumor progression ²⁸⁶.

Surprisingly, inhibition of specific angiogenic pathways could lead to enhanced tumor invasiveness and metastasis occurrence ^{194,195}. These data suggest that endothelial cells not only support tumor progression only by establishing passive and permissive conducts for delivering O₂, nutrients and chemotherapy to the tumor, but also are able to secrete growth factors that can support organogenesis, many of which can promote cancer cell growth.

Therefore, an alternative mechanism by which endothelial cells directly regulate tumor growth might be through the paracrine release of endothelial-derived growth factors and trophogens, which we refer to as 'angiocrine factors' as recently described in ^{200,204-206} . It has been recently demonstrated that expression of Notch ligands on endothelial cells are epigenetically preserve to prevent exhaustion of HSPC ²⁰⁴.

The Notch-signaling pathway regulates a broad spectrum of cell- fate decisions during development and postnatal life ²⁸⁷. The pathway is activated when a cell expressing one of the Notch ligands (Jagged1, Jagged2, DLL1, DLL2, DLL4) physically interacts with a signal-receiving cell expressing one of the Notch receptors (Notch 1-4). Upon ligand binding, the transmembrane Notch receptor is cleaved sequentially, first by an extracellular matrix metalloprotease and then by the protease complex γ -secretase, releasing the Notch intracellular domain (NICD) ²⁵². NICD then translocates to the nucleus where it interacts with the DNA-binding protein CSL (Rbp-Jk in mice; CBF1 in humans), converting it from a transcriptional repressor to activator by recruiting cofactors such as Mastermind-like proteins. The most prominent targets of the Notch pathway include a set of basic-helix-loop-helix factors of the Hes and Hey families ²⁵².

Although classically known for its role in embryonic development, the Notch pathway is now being recognized for its aberrant activation in ovarian cancer. Within all four Notch receptors Notch3 has been shown to be amplified in ovarian cancer and associated to its progression ^{37,254,255}. Activation of Notch3 dependent pathway in ovarian cancer regulates

OCC adhesion to peritoneal cells and cancer cell metastatic outgrowth ²⁵⁶. Moreover a proto-oncogene Pbx1 has been recently involved in regulation of proliferation of ovarian cancer cell upon Notch3 activation ²⁸⁸. Patients with recurrent high grade serous ovarian adenocarcinomas showing high with high Notch3 expression had a significantly worse clinical outcome, including reduced overall survival and shortened progression-free survival than did patients with low Notch3 expressing high grade serous adenocarcinomas ^{258,259}.

Here we show that AKT-activated endothelial cells are able to drive chemoresistance through Notch3 signaling. Notch3 activation by Jagged1 leads to activation of AKT and up-regulation of key anti-apoptotic genes in ovarian cancer cells.

Material and Methods:

Patient samples, isolation of primary ovarian cancer cells, and flow cytometry: Fresh tumor samples were minced, and then digested for 45–60 min at 37°C with an enzyme cocktail under gentle agitation (Collagenase A, Dispase II and DNase I; Roche Applied Science), and filtered through a 30-µm strainer. Single cell suspension was placed in culture in M199/MCDB105 (Sigma) 20%FBS (Sigma), 10ng/ml EGF (Peprotech), 34ug/ml BPE (bovine pituitary extract) (Sigma), 5ug/ml insulin (Sigma), 0.5ug/ml hydrocortisone (Sigma), at 37 degrees, 5%CO₂, humid atmosphere.

Primary Ovarian Cancer Cell (POCC) from fresh tumor samples were quantified by costaining with conjugated antibodies to CD45 (2D1, BD Pharmingen) and CD326, EpCAM (1B7, Ebioscience). The number of functional POCCs was quantified by the number of CD326+ CD45- cells per sample. The intensity of both CD45 and CD326 expression was determined by calculating the mean fluorescent intensity (MFI) with the FACSDiva software 6.3 (BD Biosciences).

Patient samples, CNV analysis: Twenty five tumor samples were collected from 14 patients and represented either primary ovarian tumors and/or their peritoneal metastasis. We used the Affymetrix Genome-Wide SNP Array 6.0 for the genomic analysis for the detection of copy number changes in this study. The workflow of Affymetrix Genome-Wide SNP Array 6.0 strictly followed the cytogenetic protocol from the manufacturer. 250 ng of total genomic DNA was used in the analysis. The normal controls were obtained from the 270 HapMap samples provided by Affymetrix. Data from the SNP6.0 arrays were analyzed using the PARTEK Genomics Suite software with recommended normalization settings. Each sample was compared to a HapMap distributed baseline to identify amplified and

deleted regions using the circular binary segmentation algorithm within PARTEK.

Generation and Maintenance of E4ORF1+ ECs: The adenoviral E4ORF1 gene and/or Gfp derived from the serotype 5 adeno- viruses were cloned into the lentivirus vector^{201,250,251}. Lentiviruses were generated by cotransfecting 15 mg of lentiviral vector, 3 mg of pENV/VSV-G, 5 mg of pRRE, and 2.5 mg of pRSVREV in 293T cells (passage 8–10; subconfluent) by the calcium precipitation method. Medium was changed 24hr after transfection, and supernatants were collected 40hr and 64hr after transfection. Supernatants were immediately sterile filtered via surfactant-free cellulose acetate membranes, aliquoted, and stored at 80°C.

Once PECs were transduced with E4ORF1 gene they were then cultured in serum/cytokine-free X-Vivo 20 or EC medium for routine expansion. All experiments described herein were performed with HUVEC-derived E4ORF1-ECs, except as specifically noted.

Cell Cultures: POCC were maintained in M199/MCDB105 (Sigma) 20%FBS (Hyclone), 10ng/ml EGF (Peprotech), 34ug/ml BPE (bovine pituitary extract) (Sigma), 5ug/ml insulin (Sigma), 0.5ug/ml hydrocortisone (Sigma), 100 units penicillin-streptomycin-Amphotericin B (Hyclone), 2mM L-Glutamine at 37 degrees, 5%CO₂, humid atmosphere. Ovarian cancer cell lines NIH:OVCAR3 (HTB) and SKOV3 (HTB) were maintained in DMEM high glucose (Hyclone) 20%FBS (Hyclone) 100 units penicillin-streptomycin-Amphotericin B (Hyclone), 2mM L-Glutamine. Human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs) were cultured in endothelial cell growth medium Medium 199 (Hyclone), 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Hyclone), 20 µg ml⁻¹ endothelial cell growth supplement (Sigma), 1% (v/v) antibiotics (Hyclone), and 20 units.ml heparin (Sigma).

Proliferation assay: For in vitro proliferation assays NIH OVCAR3, SKOV3 or POCC from ATCC were cocultured in the presence or absence of E4ORF1 ECs in serum/cytokine-free conditions in direct cellular contact. Subsequently, the number of proliferating cancer cells was determined whether by trypan blue exclusion or GFP signal quantification.

Chemoresistance assay: The Calcein AM , Live/Dead (Invitrogen, Molecular probes) assay was used to assess cell survival. OCC line, POCC seeded on E4ORF1-ECs-GFP monolayer or not were plated at a density of 20.10⁴ cells per well on a 24-well plates and incubated in growth medium overnight. Cells were then starved form serum and growth factor for additional 24h. Monoculture of OCC or POCC, or coculture with E4-ORF1-ECs were then treated with a mentioned dose of cisplatinum (Sigma) and Paclitaxel (Sigma) for

48 hours in presence or absence of 20 nM of GSI. Cell viability was assessed using Calcein AM , Live/Dead assay monitored by FACS (SORP-FACSARIA2, BD Biosciences) as described in ²⁶⁵. Briefly living OCC lines or POCC were quantified as the number of EpCAM+CD45-Calcein AM+Live/Dead- cells per sample. The intensity of both Calcein AM and Live/Dead was determined by calculating the mean fluorescent intensity (MFI) with the FACSDiva software 6.3 (BD Biosciences).

Kinase array: NIH:OVCAR3 cells were used in this assay in order to produce a clearer response, as they over-express Notch3, and there is no a few other Notch receptors detected. Cells were plated in 6-well plate (Corning, NY, USA) and cultured in DMEM high glucose supplemented with 20% FBS until they reached 75%–80% confluence.

NIH:OVCAR3 cells were then incubated for 24h in serum-free DMEM prior to stimulation with 4 µg.ml of Recombinant human Jagged 1 Fc Chimera for 2h as described in , or with the vehicle as the control. After that, cells were rinsed, detached, and following centrifugation immediately disrupted using lysis buffer. After quantification of total protein content from the lysates, 500µg of protein from the lysates were incubated with a pre-blotted membrane array, as instructed by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, USA). These membranes contain capture antibodies against various kinases phosphorylation sites and by this approach we could detect the phosphorylation levels of a set of kinases. After the incubation with the lysates, ECL reagent (Thermo Scientific Biotechnology, CA, USA) was added to the phospho-kinase array membrane and the results acquired on a CCD Camera. An internal positive control present in the array was used to normalize the protein levels in this assay. The phosphorylation status of each kinase is expressed as a ratio from the phosphorylation level from the Jagged1 stimulated cells and the control cells.

Flow Cytometry and apoptosis array: NIH:OVCAR3 cells were used in this assay in order to produce a clearer response, as they over-express Notch3, and there is no a few other Notch receptors detected. Cells were plated in 6-well plate (Corning, NY, USA) and cultured in DMEM high glucose supplemented with 20% FBS until they reached 75%–80% confluence.

NIH:OVCAR3 cells were then incubated for 24h in serum-free DMEM prior to stimulation with 4 µg.ml of Recombinant human Jagged 1 Fc Chimera for 2h as described in , or with the vehicle as the control. After that, cells were treated with 90µM Cisplatinum and 6nM of paclitaxel for 48 hours. Afterward cells were rinsed, detached, and following centrifugation immediately stained as described in the chemoresistance assay section. Remaining living

cells were sorted on a SORP-FACS-ARIA2 (BD Biosciences, Dubai). After that, cells were rinsed, and following centrifugation immediately disrupted using lysis buffer. After quantification of total protein content from the lysates, 500µg of protein from the lysates were incubated with a pre-blotted membrane array, as instructed by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, USA). Data acquisition and results analysis are conducted according to the previous section.

Results:

Notch3 is amplified in ovarian cancer primary tumors and metastasis :

SNP arrays were used to search for genome-wide DNA copy number alterations in 25 high-grade ovarian serous carcinomas from both primary tumors and metastasis. We found several distinct amplifications on chromosome 19 specific to high-grade serous carcinomas. Among them, amplification of NOTCH3 was present in 55% of primary tumors sample tested (peak copy number changes: 13.43) (Figure 1.A). Surprisingly, NOTCH3 amplification was conserved in peritoneal metastasis (peak copy number changes: 7.78) (Figure 1.A). In order to study the role of the endothelial niche on promoting OCC chemoresistance through Notch signaling, we then checked the expression of Notch3 protein on two ovarian cancer cell line (OCC) (NIH:OVCAR3 and SKOV3) and on primary ovarian cancer cells (POCC). As described in ^{255,256} we demonstrated that NIH:OVCAR3 are expressing a high amount of Notch3 protein, five patients samples were tested and all were expressing a high amount of Notch3, whereas SKOV3 does not express a significant amount of this protein. For the rest of the study we chose to exclusively use the NIH:OVCAR3 cell line and our five-selected POCC (Figure 1.B).

In order to study the role of Notch signaling, we checked the expression of the Notch ligand on our E4ORF1-PEC. Upon AKT activation PEC are overexpressing the whole Notch ligand family²⁰⁴ at the mRNA level, we found by FACS analysis that among all the notch ligand, Jagged1 is expressed the most (Figure 1C). Taken together, these data indicates that the Notch3/Jagged1 axis seems to be a strong candidate to study the role of the vascular niche on promoting OCC chemoresistance through Notch signaling.

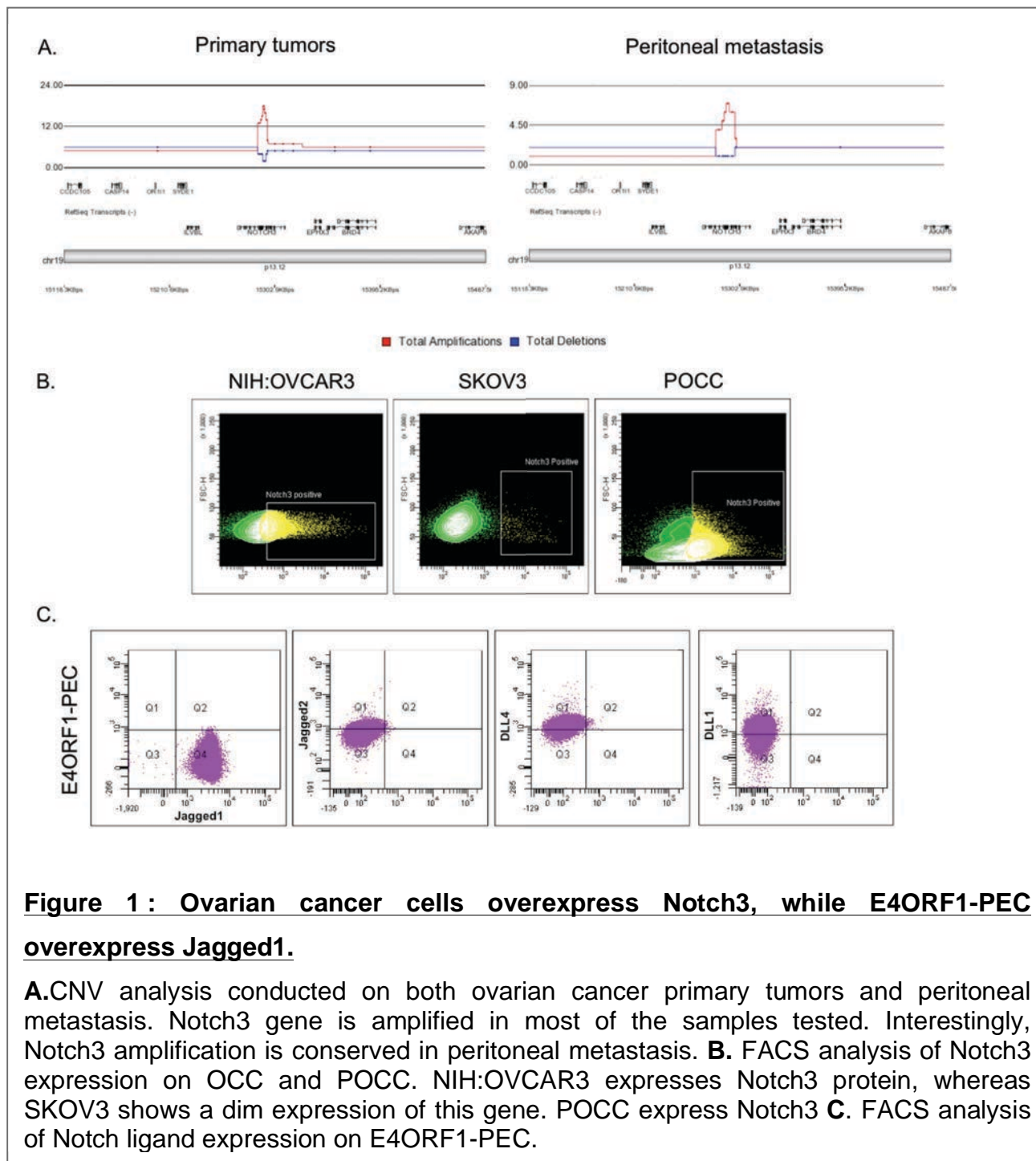


Figure 1: Ovarian cancer cells overexpress Notch3, while E4ORF1-PEC overexpress Jagged1.

A. CNV analysis conducted on both ovarian cancer primary tumors and peritoneal metastasis. Notch3 gene is amplified in most of the samples tested. Interestingly, Notch3 amplification is conserved in peritoneal metastasis. **B.** FACS analysis of Notch3 expression on OCC and POCC. NIH:OVCAR3 expresses Notch3 protein, whereas SKOV3 shows a dim expression of this gene. POCC express Notch3 **C.** FACS analysis of Notch ligand expression on E4ORF1-PEC.

E4ORF1-PEC promotes chemoresistance of OCC in a contact dependent manner.

We questioned the ability of E4ORF1-PEC to promote chemoresistance of OCC (eg NIH:OVCAR3). OCC were seeded directly onto the plastic dish or on a E4ORF1-PEC monolayer. OCC or OCC cocultivated with E4ORF1-PEC were then treated with 90 μ M of cisplatinum and 6nM of Paclitaxel. We were able to demonstrate using Calcein/Live Dead –based cell viability assay that when OCC, when cocultivated with E4ORF1-PEC, survived 3 times more than the control (32.4% of living OCC vs 8.87% in the control) (Figure 2.A and 2.B). To check if this ability was dependent on a secreted factor or on cell-cell interaction, we repeated the same experiment using conditioned media of E4ORF1-PEC and conditioned media of OCC as a control. As shown in Figure 2.C, neither conditioned media of E4ORF1-PEC nor conditioned media of OCC were able to protect OCC from

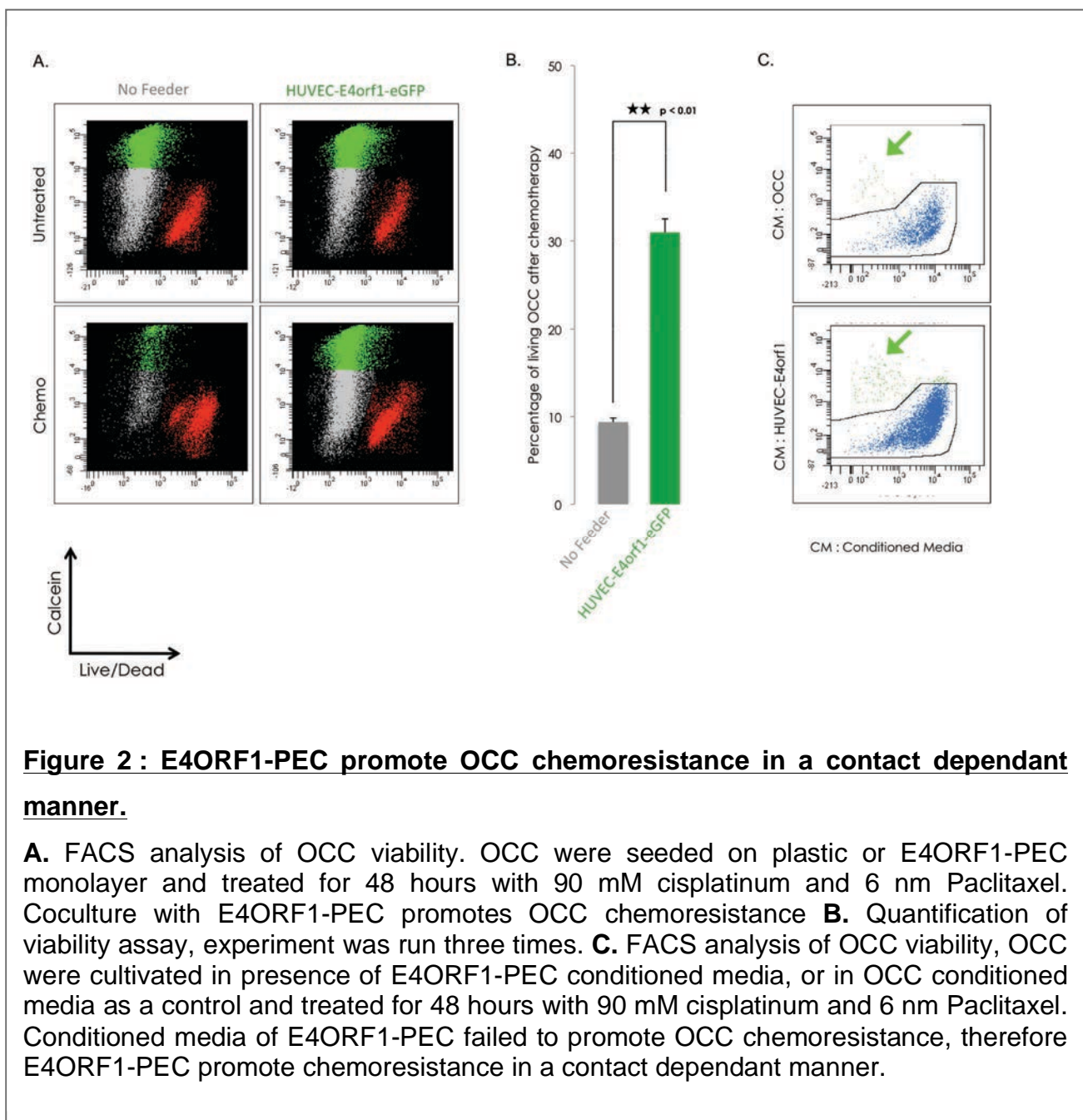


Figure 2 : E4ORF1-PEC promote OCC chemoresistance in a contact dependent manner.

A. FACS analysis of OCC viability. OCC were seeded on plastic or E4ORF1-PEC monolayer and treated for 48 hours with 90 mM cisplatinum and 6 nm Paclitaxel. Coculture with E4ORF1-PEC promotes OCC chemoresistance **B.** Quantification of viability assay, experiment was run three times. **C.** FACS analysis of OCC viability, OCC were cultivated in presence of E4ORF1-PEC conditioned media, or in OCC conditioned media as a control and treated for 48 hours with 90 mM cisplatinum and 6 nm Paclitaxel. Conditioned media of E4ORF1-PEC failed to promote OCC chemoresistance, therefore E4ORF1-PEC promote chemoresistance in a contact dependant manner.

chemotherapy-induced cell death. Therefore, E4ORF1-PECs are able to promote OCC resistance to conventional chemotherapy in a contact dependent manner.

E4ORF1-PEC promotes POCC chemoresistance through Notch signaling.

In order to check Notch signaling involvement in promoting OCC chemoresistance to conventional chemotherapy, we selected 5 patients expressing high level of Notch3 protein (data not shown). We repeated our cell viability assay after treatment with 90µM cisplatin and 6nm of Paclitaxel. We were able to show that E4ORF1-PECs are able to promote a 4-fold increase of cell viability of POCC (Figure 3.A and 3.B). This induction of chemoresistance was inhibited when the cancer cells were treated with 20µM of Gamma Secretase Inhibitor (GSI) prior chemotherapy (Figure 3.A and 3.B). GSI is a potent inhibitor

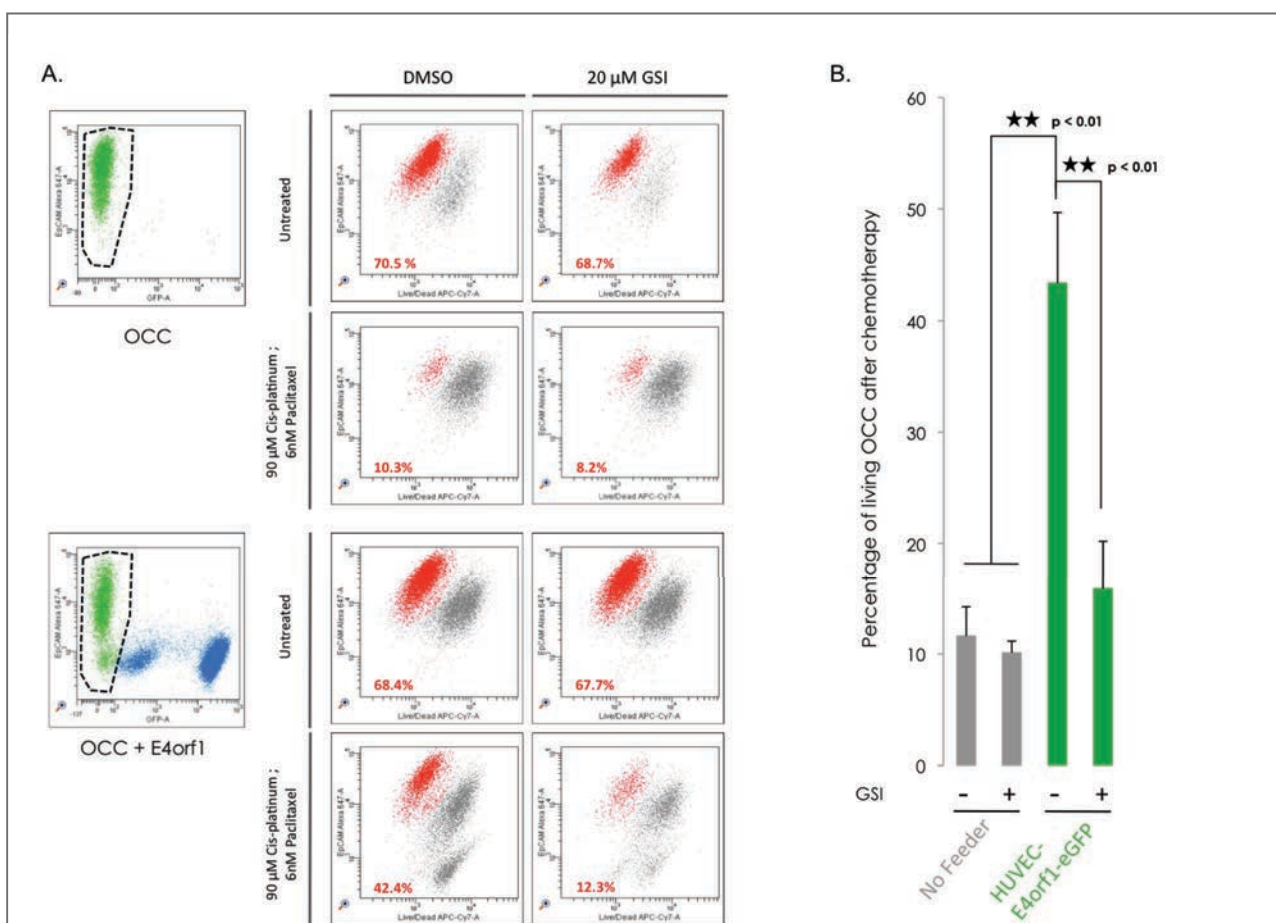


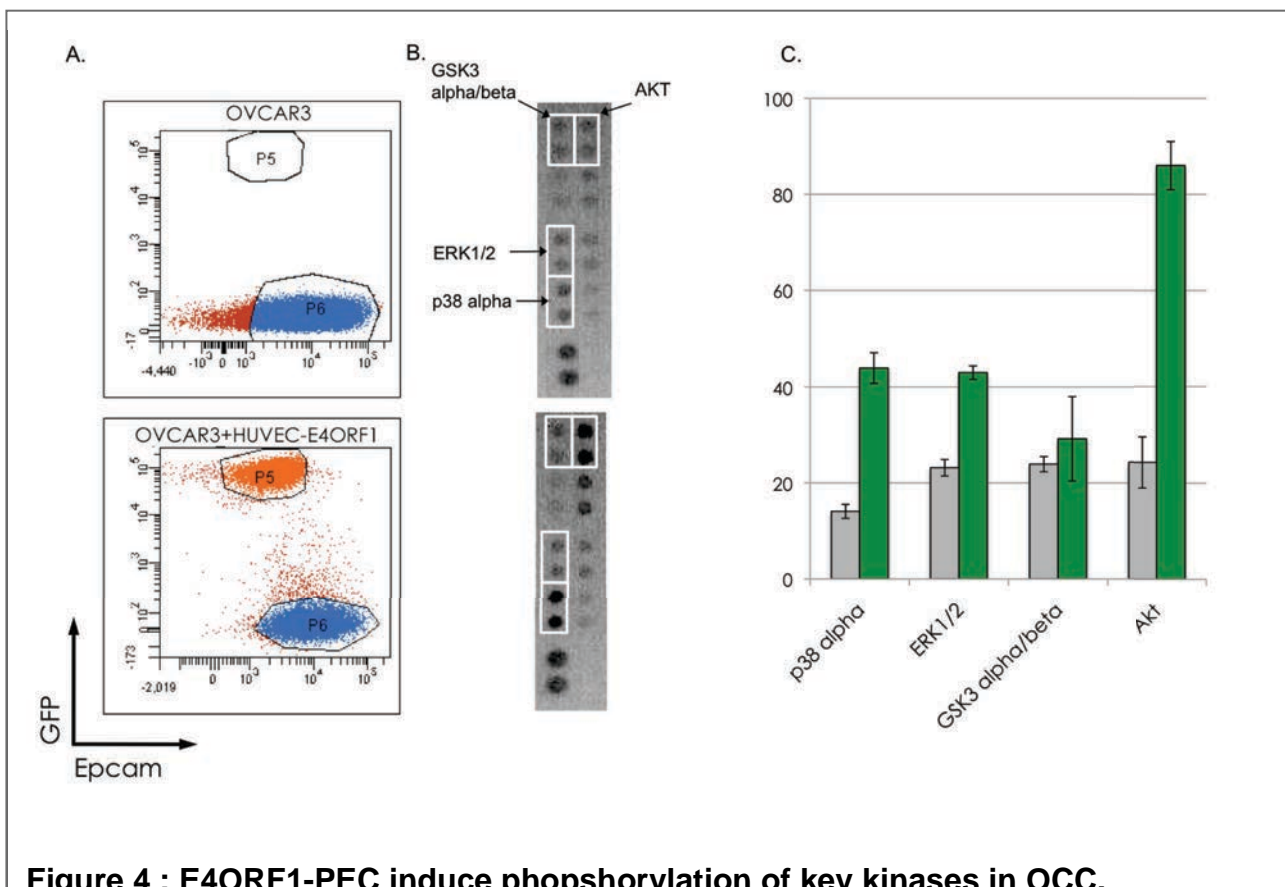
Figure 3 : E4ORF1-PEC promote POCC chemoresistance through Notch signaling.

A. FACS analysis of POCC viability. OCC were seeded on plastic or E4ORF1-PEC monolayer and treated for 48 hours with 90µM cisplatin and 6nm Paclitaxel. Coculture with E4ORF1-PEC promotes POCC chemoresistance. Treatment with 20 µM of Gamma-Secretase Inhibitor (GSI) restore POCC sensitivity to chemotherapy **B.** Quantification of Cell viability, n=5 patients.

of total Notch signaling, taken together, these data indicates that E4ORF1-PEC promote chemoresistance of primary OCC, in a contact dependent manner, through activation of Notch signaling.

E4ORF1-PEC activates AKT in OCC.

E4ORF1-PEC promotes chemoresistance of primary OCC, in a contact dependent manner, through activation of Notch signaling. In order to understand the molecular that take place upon E4ORF1-PEC interaction with OCC, we decided to study the phosphorylation status of kinases targeted by Notch signaling after coculture of NIH:OVCAR3 with E4ORF1-PEC.



We were able to notice upon E4ORF1-PEC interaction with NIH:OVCAR3, p38 alpha (T180/Y182), ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187) were phosphorylated twice more than in the OCC monoculture (Figure 4.B and 4.C). AKT, key kinase involved in cell survival, was phosphorylated on S473 four times more than in the control. Taken together, these results show that there was a set of kinases involved in cell survival phosphorylated upon

E4ORF1-PEC interaction with NOH:OVCAR3. Interestingly these kinases, especially AKT, are known to be the downstream effectors of Notch signaling.

As we suggested in figure 1, Jagged1 seems a strong candidate to explain the effect of E4ORF1-PEC on OCC. Therefore, we investigated the effect of Jagged 1 on OCC resistance to therapy.

Notch3 ligand Jagged1 promote OCC chemoresistance and phosphorylation of key kinases in OCC.

We decided to check if the activation of Notch signaling in OCC was sufficient to trigger chemoresistance of OCC. We chose to use NIH:OVCAR3, and stimulated them with 4µg.ml of recombinant human Jagged1 for 2 hours prior treatment with chemotherapy (with 90 µM cisplatinum and 6 nm Paclitaxel) for 48 hours. As shown in Figure 5.A, there is

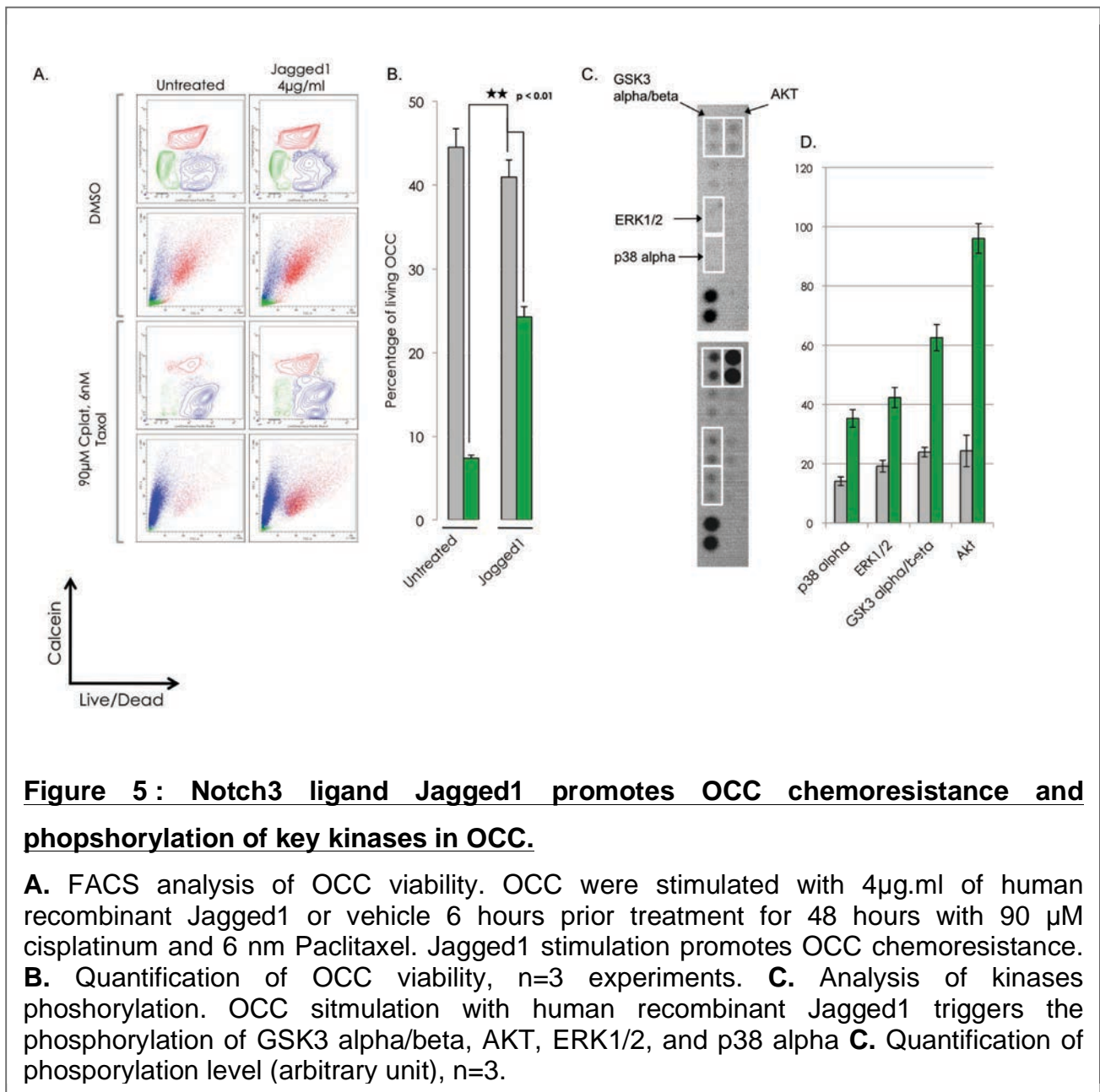


Figure 5: Notch3 ligand Jagged1 promotes OCC chemoresistance and phosphorylation of key kinases in OCC.

A. FACS analysis of OCC viability. OCC were stimulated with 4µg.ml of human recombinant Jagged1 or vehicle 6 hours prior treatment for 48 hours with 90 µM cisplatinum and 6 nm Paclitaxel. Jagged1 stimulation promotes OCC chemoresistance. **B.** Quantification of OCC viability, n=3 experiments. **C.** Analysis of kinases phosphorylation. OCC stimulation with human recombinant Jagged1 triggers the phosphorylation of GSK3 alpha/beta, AKT, ERK1/2, and p38 alpha **D.** Quantification of phosphorylation level (arbitrary unit), n=3.

no statistical difference regarding cell viability when NIH:OVCAR3 were treated by 4µg.ml of human recombinant Jagged1 in absence of chemotherapy (Figure 5.A and 5.B). However, when exposed to chemotherapy, Jagged1 stimulated OCC displays a 2.5 fold higher cell viability (Figure 5.A and 5.B). As described in ^{289,290}, notch signaling activation leads to p38 alpha phosphorylation on T180/Y182, ERK1/2 on T202/Y204 and T185/Y187, and Akt phosphorylation on S473. Therefore, recombinant human Jagged1 stimulation of OCC is able to mimic the effects induced by E4ORF1-PEC. Since Jagged1 stimulated OCC resist to chemotherapy more than their control counterpart, and activate pro-survival kinases, we investigated which pro- or anti-apoptotic genes are regulated by Jagged1 stimulation.

Notch3 ligand Jagged1 up-regulates a set of anti-apoptotic proteins in chemotherapy-treated OCC.

We demonstrated that both E4ORF1_PEC and Jagged1 stimulation of OCC lead to OCC résistance to chemotherapy.

We speculated Jagged1-induced chemoresistance is a consequence of AKT protein and upregulation of anti-apoptotic proteins. Therefore, we sorted the remaining living cells after treatment with 90µM Cisplatinum and 6nm Paclitaxel, and investigate the differential expression of proteins involved in apoptosis between OCC pre-treated with 4 µg.ml of human recombinant Jagged1 and the control (Figure 6.A). We were able to demonstrate that a set of anti-apoptotic was upregulated in alived OCC after chemotherapy when they were pre-treated with Jagged1. Among these anti-apoptotic proteins, we noticed an up-regulation of 5-fold of Clusterin, 2-3 fold upregulation of Bcl-X, Bcl-2, XIAP, cIAP1, and Survivin (Figure 6.B). We also noticed a severe down-regulation of several pro-apoptotic proteins, like Bax and Bad, and the cleaved form of Caspase 3 (Figure 6.B). Taken together, these data suggests that Jagged1 enhance OCC resistance to chemotherapy through inhibition of apoptosis.

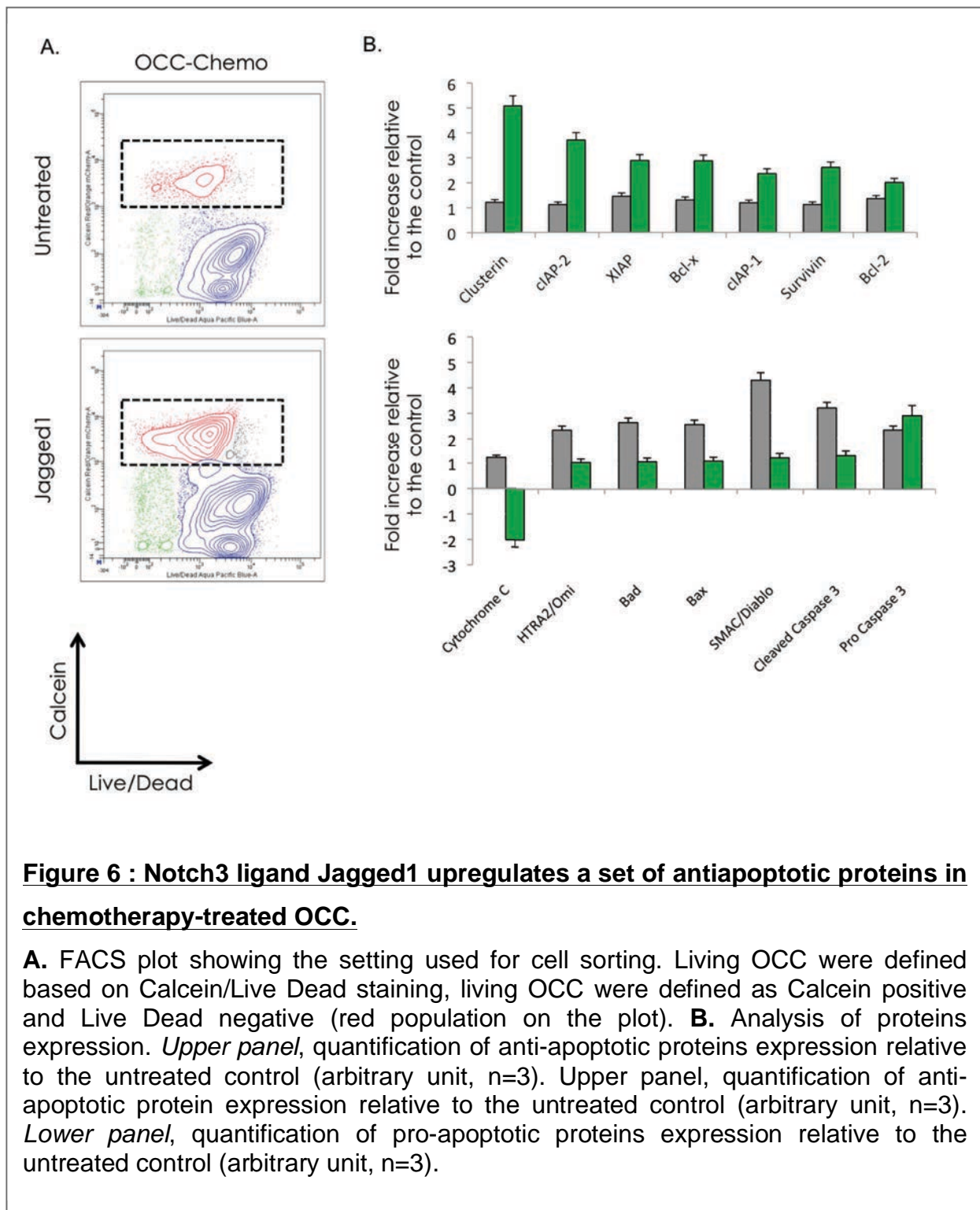


Figure 6 : Notch3 ligand Jagged1 upregulates a set of antiapoptotic proteins in chemotherapy-treated OCC.

A. FACS plot showing the setting used for cell sorting. Living OCC were defined based on Calcein/Live Dead staining, living OCC were defined as Calcein positive and Live Dead negative (red population on the plot). **B.** Analysis of proteins expression. *Upper panel*, quantification of anti-apoptotic proteins expression relative to the untreated control (arbitrary unit, n=3). *Upper panel*, quantification of anti-apoptotic protein expression relative to the untreated control (arbitrary unit, n=3). *Lower panel*, quantification of pro-apoptotic proteins expression relative to the untreated control (arbitrary unit, n=3).

Discussion :

In most patients, ovarian carcinoma is diagnosed at an advanced stage and is treated with platinum-based chemotherapy after cytoreduction surgery. Unfortunately, acquisition of a chemoresistant phenotype in tumors is almost inevitable and ultimately leads to clinically incurable disease. Understanding and targeting the molecular underpinnings of recurrent disease continues to be the principal challenge in cancer research ²⁹¹. In this study we provide evidence that AKT-activated endothelial cells through Jagged1/Notch3 signaling participates in the development of recurrent ovarian serous carcinoma probably through enhancing cisplatin and taxol resistance in tumor cells.

The present study indicates that ECs are not passive conduits that support the delivery of oxygen and nutrients but also through production of EC-derived angiocrine factors are able to participate to ovarian cancer resistance to therapy. AKT-activated EC upregulates notch ligands, among those we showed that Jagged1 expressed on EC through Notch3 signaling is able to drive resistance of OCC. Further, we show that Jagged1/Notch3 mediated chemoresistance occurs primarily by phosphorylation of AKT (Ser473), ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187). These two kinases have been critically involved in cell survival upon chemotherapy, and have been recently described as downstream target of Notch signaling ^{292,293}. Phosphorylation of these key kinase leads to upregulation of key anti-apoptotic genes (BCL-2, BCL-XI Survivin), classically involved in resistance to platinum based therapy and paclitaxel ^{294,295}.

The interaction between cancer cells and the surrounding stroma is increasingly becoming a focus of study in cancer research due to its role in tumor progression. This tumor-associated stroma is composed primarily of endothelial cells, which are necessary for tumor angiogenesis, and fibroblasts, which can secrete growth factors to the adjacent cancer cells. Recent reports suggest that Notch signaling can occur between tumor and stromal cells in some malignancies ^{296,297}, indicating that targeting the Notch-ligand interaction in endothelial cells can have therapeutic applications. In addition, studies have shown that Jagged1 expression is crucial for normal vascular development during embryogenesis and that mutations of the *JAGGED1* gene can cause Alagille syndrome, a disease characterized by, among other deformities, congenital heart defects ^{298,299}. In our study, we found that selectively targeting Jagged1-induced notch signaling impairs the ability of AKT-activated endothelial cell to promote chemoresistance of ovarian cancer cells.

Chemoresistance remains a persistent obstacle in the treatment of ovarian cancer.

Although the clinical behavior of ovarian cancer suggests that most cancer cells are initially sensitive to chemotherapy, they subsequently either develop resistance or contain a population of cells that are inherently resistant. The latter hypothesis is consistent with what has become known as cancer stem cells or cancer initiating cells (CIC). These CICs are commonly believed to have enhanced tumorigenicity, differentiation capacity, and resistance to chemotherapy in comparison with non-CICs. It is because of these features that CICs have been examined for molecular pathways and markers that could be targeted for therapeutic purposes. Recent studies have shown that the ancient developmental pathways Hedgehog, Wnt, and Notch play important roles in the maintenance of CICs and that inhibiting these pathways may provide enhanced chemosensitivity when combined with traditional chemotherapies³⁰⁰⁻³⁰³. In our study, we sought to determine the mechanism whereby Jagged1, a Notch ligand, might sensitize ovarian cancer cells to cisplatin and taxanes-based therapy.

Collectively, the data presented in this study show that the Notch ligand Jagged1 contributes to cisplatin–taxane resistance, and targeting Jagged1/Notch3 in ovarian cancer cells as well as in surrounding stroma could significantly reduce relapse rate through platinum taxane-sensitizing effects. With the ability to identify subsets of cancer patients with Notch3 overexpression, antagonism of this signaling molecule could ultimately provide a useful therapeutic strategy for ovarian cancer.

Reference :

Les références sont incluses dans la bibliographie du manuscrit de thèse.

4 Discussion.

Le microenvironnement tumoral ovarien influence grandement la croissance de la tumeur, sa progression et la dissémination métastatique. Il peut, par ailleurs, limiter l'accès aux thérapies, altérer le métabolisme des drogues et contribuer au développement d'une résistance aux chimiothérapies^{123,128,173,179,182,185,187,265-267,282,285}. Par son rôle actif dans le développement tumoral, les éléments composant le microenvironnement tumoral sont devenus des cibles thérapeutiques très attractives. Une modification des interactions tumeur-hôte pourrait être importante dans la prévention voire l'inhibition des résistances aux thérapies.

Durant ce travail de thèse nous nous sommes intéressés tout particulièrement à deux composants clés du stroma tumoral : les cellules souches mésenchymateuses et les cellules endothéliales.

4.1 Discussion sur l'impact des cellules souches mésenchymateuses sur la biologie des tumeurs ovariennes.

Concernant les cellules souches mésenchymateuses, nous avons pu tout d'abord montrer in vitro que lorsqu'elles étaient cultivées en présence de cellules tumorales ovariennes, celles-ci développaient leur pouvoir métastatique. Nous avons défini le pouvoir métastatique des cellules tumorales ovariennes comme la somme de propriétés différentes telles que la capacité à adhérer à la matrice extracellulaire, la capacité à envahir celle-ci, la prolifération des cellules malignes et enfin leur habilité à résister aux traitements de chimiothérapies. Cette somme de propriétés est nécessaire et suffisante à l'émergence chez la patiente d'une maladie métastatique résiduelle²⁶⁴.

Les cellules souches mésenchymateuses sont capables d'augmenter le pouvoir métastatique de deux lignées tumorales ovariennes distinctes (NIH:OVCAR3 et SKOV3), nous avons voulu corrélérer cette augmentation de pouvoir métastatique à des modifications transcriptomiques chez les cellules tumorales.

Contrairement aux résultats attendus, et ce malgré des tests fonctionnels concordants, les profils transcriptomiques induits par les cellules souches mésenchymateuses se sont révélés distincts dans les deux lignées tumorales ovariennes considérées. Ceci constitue une des limites de notre étude. Il est envisageable que l'utilisation de lignées aux caractéristiques différentes ne permette pas d'obtenir une signature transcriptomique

partagée, semblable, en réponse à un même stimulus. Récemment le TCGA a publié ses travaux de caractérisation avancée des adénocarcinomes ovariens séreux. Ils sont capables, sur la base de profilage transcriptomique, d'établir différentes entités présentes au sein des adénocarcinomes ovariens séreux. Ils décrivent quatre groupes, différencié (caractérisé par l'expression de MUC1, MUC16 et SLP1), immunoréactif (caractérisé entre autre par l'expression de CXCL10, CXCL11 et CXCR3), mésenchymateux (expression élevée des gènes de la famille HOX, ANGTL1 et 2) ou encore prolifératif (haute expression d'HMGA2, SOX11, MCM2, PCNA) ³⁷. Les différences obtenues entre NIH:OVCAR3 et SKOV3 pourraient donc s'expliquer par le fait que ces deux lignées représentent deux entités distinctes d'adénocarcinomes ovariens séreux. Il nous semble donc important pour la suite de l'étude, (i) d'identifier à quelle entité appartiennent les lignées tumorales que nous avons à notre disposition, (ii) homogénéiser nos résultats en choisissant des lignées tumorales ovariennes appartenant à la même entité.

Une fois les résultats homogénéisés une validation fonctionnelle, *in vitro* and *in vivo* des cibles identifiées sera requise. Cependant par notre démarche, et ce de façon assez intéressante, nous avons pu identifier certaines cibles déjà décrites dans la littérature. Ainsi nous avons démontré que les cellules tumorales NIH : OVCAR3, lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules souches mésenchymateuses, voient leur pouvoir invasif augmenter. Cette augmentation de la capacité à envahir la matrice extracellulaire est corrélée à la diminution de la protéine matricielle extracellulaire SPARC.

Les cellules souches mésenchymateuses lorsqu'elles sont recrutées au niveau du stroma tumoral sont capables d'augmenter l'agressivité des tumeurs ovariennes par la sécrétion de LPA ^{174,175,180}. La migration et l'invasion induite par le LPA secrété par les cellules souches mésenchymateuses peuvent être inhibées par la protéine SPARC ³⁰⁴. Ainsi la diminution de l'expression de SPARC par les cellules tumorales ovariennes NIH : OVCAR3 est un signe clair de l'induction par les cellules souches mésenchymateuses d'un pouvoir métastatique renforcé ^{305,306}.

Nous avons pu aussi identifier une autre cible de choix. En effet, en co-culture, l'expression du récepteur CXCR4 par les cellules tumorales ovariennes est augmentée. Le ligand du CXCR4 est le CXCL12 (aussi connu sous le nom de SDF1). Cette cytokine est impliquée de façon majeure dans les phénomènes de migration, d'invasion et d'initiation de la métastase ^{181,183,184}. Cette augmentation de l'expression du récepteur à cette cytokine pro-inflammatoire et pro-tumorale pourrait rendre la cellule tumorale ovarienne plus « sensible » au stimulus pro-tumoral délivré par les cellules souches mésenchymateuses.

Le CXCL12 est une molécule pivot dans la physiologie des tumeurs ovariennes, capable d'induire la survie des cellules malignes, leur prolifération ou encore renforcer leur interaction aux cellules mésothéliales péritonéales, elle constitue une molécule de choix dans l'étude la maladie ovarienne résiduelle et métastatique²⁷⁴.

Malgré son rôle prééminent sur la biologie des tumeurs d'origines ovariennes, il existe encore peu d'études s'intéressant au rôle du CXCL12 sur les résistances aux thérapies anticancéreuses.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés au rôle du CXCL12 sur l'émergence des résistances à une alternative thérapeutique dans les cancers de l'ovaire : la chimiothérapie intra-péritonéale hyperthermique³⁰⁷. La chimiothérapie intra-péritonéale hyperthermique présente deux avantages majeurs. Le premier est le mode de délivrance du médicament au sein même de la cavité péritonéale. Le second est le choc thermique induit sur les cellules tumorales. Ce choc thermique est d'une part toxique pour les cellules tumorales : l'augmentation de la température, conduit à l'agrégation des protéines dans le cytoplasme, l'acidification de celui-ci, le renforcement de l'interaction protéines-ADN par changement de conformation conduisant à l'occurrence d'évènements clastogènes. Ce choc thermique agit, d'autre part, en synergie avec les thérapies à base de sels de platines. En effet l'augmentation de la température intranucléaire renforce l'interaction des adduits de platine avec leur ADN cible, augmentant ainsi la cytotoxicité du sel³⁰⁸.

Cependant les résultats des différents essais cliniques utilisant la chimiothérapie intra-péritonéale hyperthermique, n'ont pas rencontré les résultats escomptés^{279,280}.

Bien que l'hyperthermie seule ne constitue pas une modalité thérapeutique, nous avons voulu dans le cadre de ce travail, démontrer qu'il existe dans le microenvironnement tumoral une source de résistance à cette alternative thérapeutique.

Nous avons tout d'abord pu démontrer que, contrairement aux cellules tumorales ovariennes, les cellules souches mésenchymateuses ne sont pas sensibles aux chocs hyperthermiques. Une des raisons pour lesquelles les cellules souches mésenchymateuses ne sont pas affectées par ce stress, pourrait être leur relatif état de quiescence. En effet, puisque le choc hyperthermique a pour conséquence la création de cassures simple- et double-brin de l'ADN, la quiescence des cellules souches mésenchymateuse leur permettrait d'échapper à la mort cellulaire programmée par défaut de réparation.

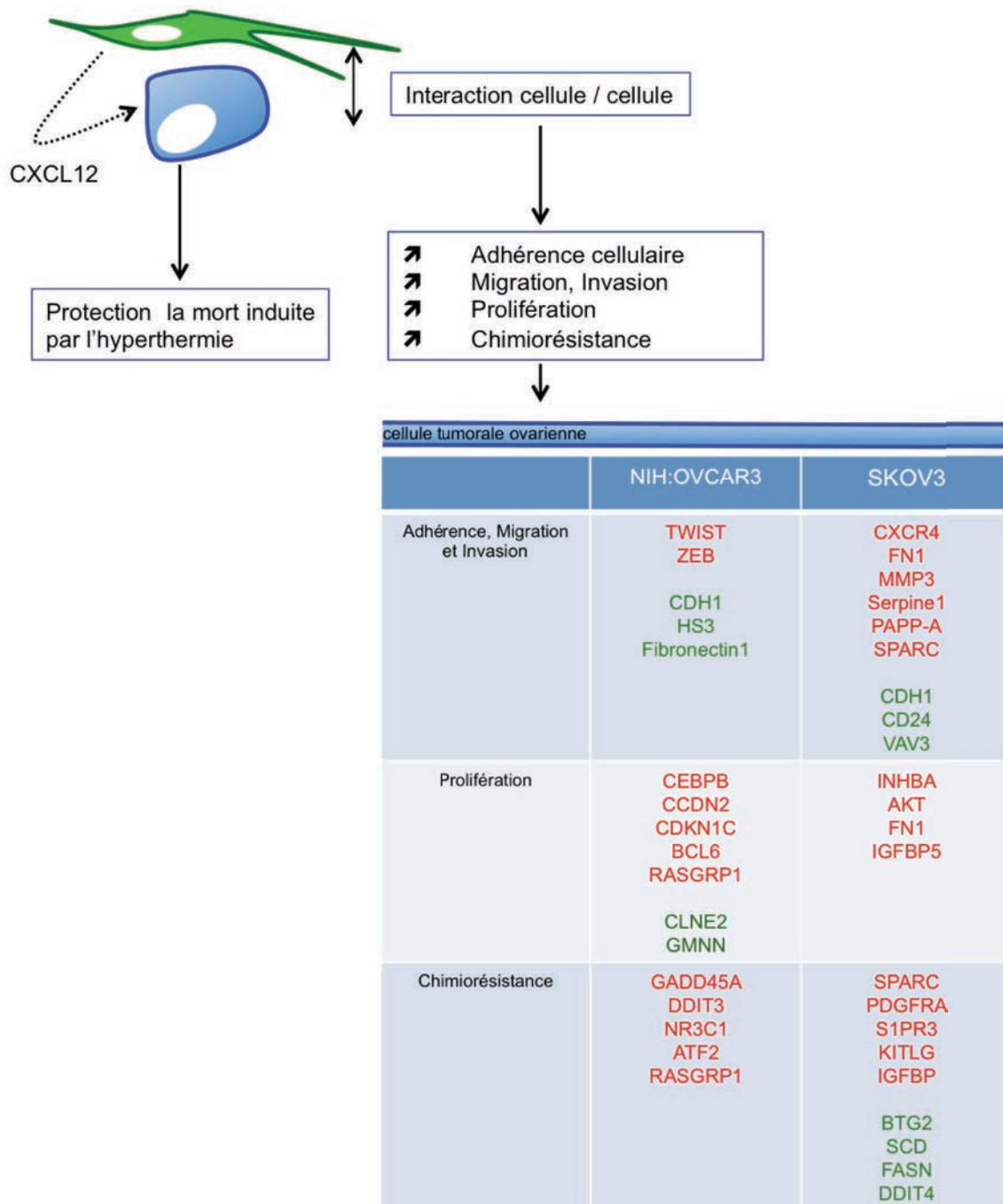


Figure 16: Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur l'effet des MSC sur la biologie des cellules tumorales ovariennes.

Les cellules en **bleu** représentent les **cellules tumorales ovariennes**. Les cellules en **vert** représentent les **cellules souches mésenchymateuses**. Les gènes surexprimés dans les cellules tumorales ovariennes sous l'effet des MSC sont représentés en **rouge**, tandis que les gènes sous-exprimés sont représentés en **vert**.

Nous avons pu ensuite montrer que, lorsque les cellules tumorales ovariennes sont cultivées en présence de cellules souches mésenchymateuses, les cellules malignes étaient moins sensibles à la mort cellulaire liée à l'hyperthermie. L'action protectrice des MSC serait en grande partie dirigée par la cytokine CXCL12, étant donné que l'ajout d'un

anticorps monoclonal bloquant le principal récepteur du CXCL12 est capable de reverser le phénomène de thermo-tolérance²⁶⁵.

On peut entrevoir au moins deux limites à ce travail. Tout d'abord nous avons, durant cette étude, utilisé exclusivement des lignées de cellules tumorales ovariennes, plus particulièrement SKOV3 et CaOV3. Ces deux lignées exhibent une résistance accrue aux thérapies standard. On notera que celles-ci résistent aux doses de sel de platine cliniquement administrées. Puisque l'un des mécanismes par lequel l'hyperthermie exerce son effet cytotoxique est partagé avec les mécanismes d'action des sels de platines, on peut envisager que les lignées tumorales que nous avons utilisées présentent aussi une résistance accrue au stress hyperthermique. Ainsi répéter ces expériences en utilisant des cellules tumorales ovariennes primaires nous permettrait de comprendre la régulation fine de la protection apportée par les cellules souches tumorales ovariennes.

La deuxième limite de cette étude, est sa restriction à l'étude d'un phénomène *in vitro*. En effet, la compréhension de toute forme de résistance pharmacologique nécessite la mise au point d'un modèle animal. La mise au point d'un modèle animal, nous permettrait, tout d'abord d'insérer une hétérogénéité de traitement sur les cellules tumorales. On peut envisager que le stress hyperthermique ne se propage pas de façon uniforme au sein d'un nodule tumoral, on peut aussi, de la même manière, estimer que le CXCL12 secrété par les cellules souches mésenchymateuses ne diffuse pas de manière homogène. Il est donc certain que la suite de ce travail s'attachera à créer un modèle de thérapie par hyperthermie chez le petit animal en carcinose péritonéale.

Nous avons donc pu démontrer que les cellules souches mésenchymateuses participent à la progression tumorale et à l'émergence de résistance aux traitements. Cependant, l'utilisation du type cellulaire souche mésenchymateux peut être sujet à controverse, du moins à discussion. Bien que le concept de cellules souches mésenchymateuses soit aujourd'hui communément accepté dans la communauté scientifique, leur phénotype, leurs origines ainsi que leurs fonctions restent très élusives. De nombreux groupes travaillant sur ce type cellulaire ont pu générer des résultats extrêmement différents ne serait-ce que sur la capacité des cellules souches mésenchymateuses à s'auto-renouveler, ou encore sur l'éventail de leur multi-potence (revu dans³⁰⁹).

Les divergences concernant les résultats obtenus sur les MSC peuvent s'expliquer, au moins partiellement, par la présence au sein des cultures cellulaires, d'un pool de précurseurs hétérogènes en terme de nature et d'origine bien qu'ils semblent similaires sur la base de l'expression de marqueurs membranaires *in vitro*. Toutefois, cette hétérogénéité des MSC peut être évidente à un certain degré, par exemple il n'est pas

rare d'observer en culture la présence de clones présentant des différences de morphologies³¹⁰⁻³¹², de prolifération³¹², de capacité à se différencier³¹¹ ou à générer des implants osseux en injection ectopique^{312,313}.

L'isolation de clones de cellules stromales mésenchymateuses à partir de cordons ombilicaux, ou de membrane fœtale, a pu nous montrer, d'une part que ces clones présentent une grande variabilité en terme de capacité à se différencier et à s'auto-renouveler ; et d'autre part ces différents génèrent des cellules filles qui au fil des générations vont perdre peu à peu leur caractère multipotent³¹⁴.

L'ensemble de ces données suggèrent que ce que nous appelons de façon conventionnelle les cellules souches mésenchymateuses proviennent, du moins contiennent, un pool de précurseurs mésenchymateux ou de cellules souches, qui pourraient être organisé hiérarchiquement, de façon analogue aux autres systèmes «souches» décrits dans la littérature.

Au delà des cellules souches mésenchymateuses, certains groupes de recherche suggèrent qu'il existe un groupe de cellules adultes multipotentes capables de générer in vitro l'intégralité des trois feuilletts embryonnaires. Ces cellules souches multipotentes adultes, résideraient à l'instar des cellules souches mésenchymateuses, au sein de nombreux tissus, et pourraient donc contaminer les protocoles d'isolation des MSC. Cependant, il est important de souligner que l'existence de ces cellules souches multipotentes adultes³¹⁵⁻³¹⁷ demeure à ce jour une théorie controversée, du fait de l'absence de description précise de leurs propriétés biologiques, et d'une caractérisation détaillée.

Une considération importante à prendre en compte est, qu'en plus d'exhiber des morphologies différentes en culture ou des capacités de différenciation assez variées³¹⁰⁻³¹², les cellules souches mésenchymateuses isolées de différents tissus embryonnaires, post-nataux ou encore adultes, présentent des profils transcriptomiques assez distincts³¹⁸⁻³²⁰. Ces résultats suggèrent que ce que nous appelons conventionnellement les cellules souches mésenchymateuses, lorsqu'elles sont isolées de tissus différents, puis sélectionnées sur leur capacités à adhérer, ou par d'autres méthodes de culture, ne constituent pas forcément un type cellulaire à part entière et pourraient exhiber des propriétés biologique assez différentes.

Collectivement, ces travaux démontrent que les cellules souches mésenchymateuses, ou plutôt les cellules stromales mésenchymateuses, pourraient provenir d'une panoplie de précurseurs multipotents tissus-spécifiques résidants au sein des tissus adultes, et présenteraient des degrés divers de plasticité et d'auto-renouvellement.

L'identité assez évasive du type cellulaire souche mésenchymateux, limite grandement l'étude de son rôle sur la biologie des tumeurs, solides ou d'origine hématopoïétique, et explique en partie la variété, voir les contradictions, des résultats publiés dans la littérature scientifique.

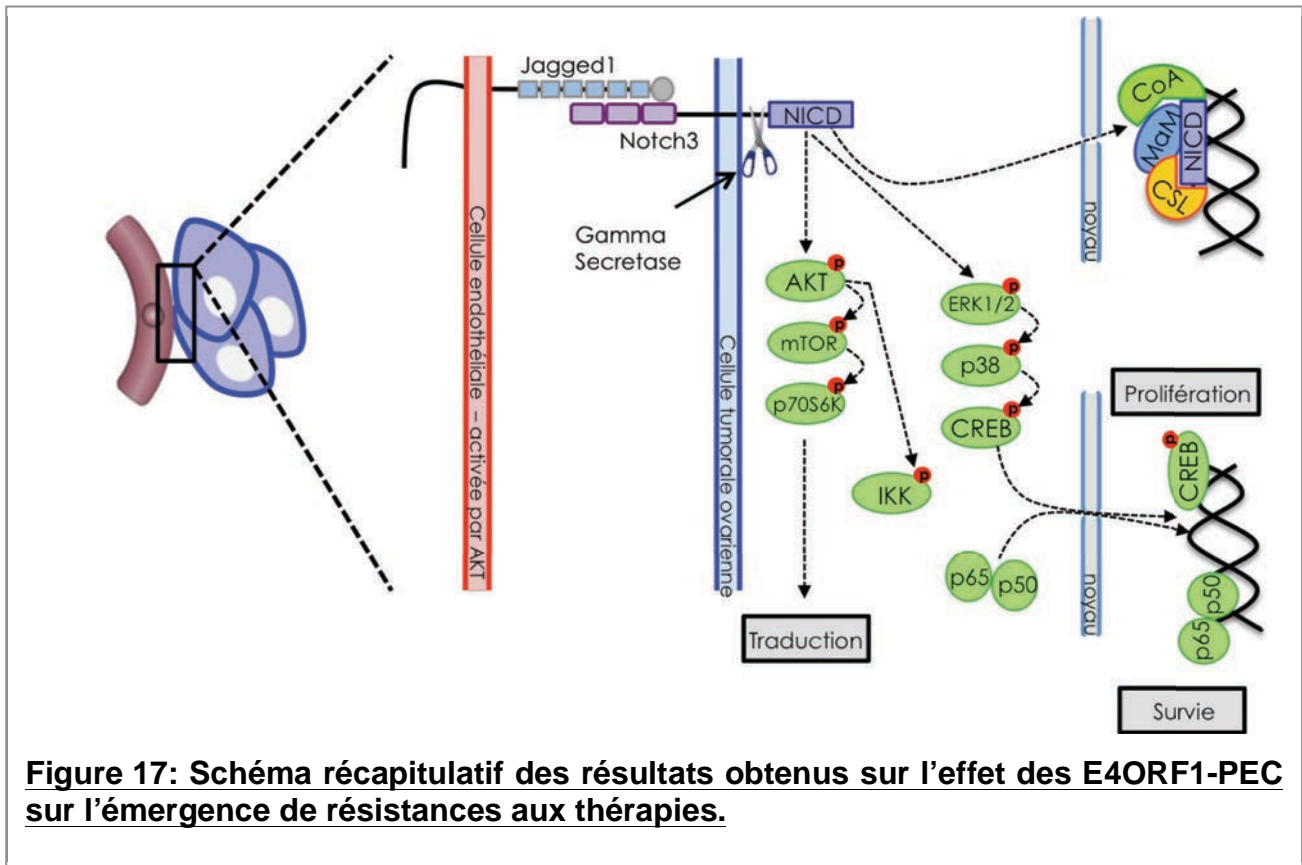
Un des défis à relever pour comprendre l'impact réel des cellules souches mésenchymateuses sur la biologie des tumeurs sera (i) de définir une équivalence biologique ainsi qu'une organisation hiérarchique entre les précurseurs mésenchymateux isolées à partir des différents organes, (ii) de comprendre leur origine développementale, et (iii) de caractériser leur propriétés de différenciation ainsi que leur contribution exacte à l'homéostasie tissulaire.

4.2 Discussion sur le rôle des cellules endothéliales sur l'émergence de résistance aux chimiothérapies.

Notre travail sur le rôle des cellules endothéliales sur l'émergence de résistance aux chimiothérapies, nous a permis de montrer que l'activation de la niche vasculaire par la protéine AKT conduit à l'expression de facteurs angiocrines, comme par exemple les ligands des récepteurs Notch, et en particulier Jagged1.

D'un autre côté nous avons identifié que les cellules tumorales ovariennes amplifient le gène Notch3, que ce soit au niveau de la tumeur primaire ou de la métastase péritonéale. Nous nous sommes donc posé la question du rôle de l'axe Jagged1/Notch3 sur l'émergence de résistance aux traitements.

La co-culture de cellules tumorales ovariennes primaires avec des cellules endothéliales E4ORF1, leur confère une résistance au traitement conventionnel de chimiothérapie, à savoir une association entre des sels de platines et des taxanes. Cette chimiorésistance est inhibée, du moins *in vitro*, par l'utilisation d'inhibiteur de γ -secrétase. Ce résultat démontre que les cellules endothéliales E4ORF1 protègent les cellules tumorales ovariennes par l'activation de la voie Notch (Figure 17).



Nous avons pu aussi montrer que l'activation de la voie Notch par des traitements avec du ligand Jagged1 recombinant, conduit à l'activation de voies anti-apoptotiques, en particulier, la voie AKT, et des voies dépendantes de Bcl-2 (Figure 17).

Une des limites de ce travail est de n'avoir pas su identifier Jagged1 comme le ligand de choix exprimé par les cellules endothéliales E4ORF1. L'utilisation d'ARN interférant ciblant Jagged1 dans le compartiment vasculaire est assez délicate, en effet il s'avère que l'expression de ce ligand est essentielle pour le développement vasculaire et la survie des cellules endothéliales³²¹⁻³²³. Afin de comprendre clairement le rôle de Jagged1 dans l'émergence des résistances aux chimiothérapies, il sera impératif de créer un modèle d'extinction conditionnelle de cette protéine, en utilisant par exemple un ARN interférant placé sous le contrôle d'un système d'expression inducible à la tétracycline.

La création d'un modèle murin sera aussi mise en œuvre, où l'activation d'AKT de la niche vasculaire sera dirigée cette fois-ci, non pas par le gène de l'adénovirus E4ORF1, mais par la forme myristoylée, constitutivement active de la protéine AKT.

Ainsi en plus d'orchestrer la réponse immunitaire anti-tumorale, de participer à la néo-angiogenèse tumorale, nous proposons un mécanisme indépendant de la perfusion, par lequel les cellules endothéliales, régulent directement la croissance tumorale : la production de facteurs angiocrines pro-tumoraux³²⁴. La transformation maligne est souvent associée à la réactivation de voies de transduction régulant les processus

développementaux lors de l'organogenèse³²⁵. Des données issues de modèles murins suggèrent que lors du développement embryonnaire le développement de la vasculature précède la spécification d'un organe^{326,327}, soulevant la possibilité que les cellules endothéliales pourraient initier les phénomènes de différenciation, de spécification et d'organogenèse. Par exemple, les cellules endothéliales exprimant le récepteur tyrosine kinase VEGFR2 sont capables d'établir une niche vasculaire qui, en produisant un jeu de facteurs angiocrines et de composants de la matrice extracellulaire tels que la laminine, induisent et dirigent l'organogenèse pancréatique et hépatique^{326,327}. Ces données indiquent que durant le développement embryonnaire l'interaction directe entre les cellules endothéliales et les cellules d'un tissu donné régule les processus d'organogenèse.

Par extension, la proximité des cellules endothéliales avec les cellules souches, de certains progéniteurs ou de leurs équivalents malins, suggère que la production de facteurs angiocrines pourrait réguler l'homéostasie des compartiments souches. La première démonstration de ce concept a été la conception d'un modèle murin dans lequel les cellules endothéliales sinusoidales médullaires, lorsqu'elles sont cultivées en présence de sérum, de VEGFA et de FGF2, sont capables de maintenir transitoirement les cellules hématopoïétiques CD34+^{235,328}. De nombreuses sources d'endothélium, comme les cellules endothéliales dérivées du cerveau³²⁸⁻³³⁰, ainsi que les cellules endothéliales dérivées de cordon ombilical^{331,332}, sont capables de stimuler, en présence de sérum, l'expansion des précurseurs neuronaux par la sécrétion de cytokines telles que le Brain-Derived Neurotrophic Factor 1 (BDNF1), de BMP, du pigment-epithelium derived factor (PEDF, aussi connu sous le nom de SERPINE1).

Les cellules endothéliales peuvent aussi supporter la survie et la prolifération des cellules malignes leucémiques de manière dépendante du contact cellulaire. Les interactions potentielles entre les cellules endothéliales et les cellules leucémiques sont régulées en partie par les complexes VCAM1-Fibronectin-Integrin $\alpha 4\beta 1$ (aussi connue sous le nom de VLA4)³³³ et CD44-hyaluronan³³⁴. Ces résultats corroborent des observations *in vivo* où les cellules malignes leucémiques sont retrouvées apposées aux cellules endothéliales non seulement dans la moelle osseuse^{236,335}, mais aussi dans des organes distants tel que le foie³³⁶.

Une série de données obtenues *in vitro* et *in vivo* supportent l'idée que les cellules leucémiques, à l'instar des cellules tumorales ovariennes, secrètent un set de facteurs pro-angiogéniques, et en particulier le VEGFA. Le VEGFA va activer les cellules endothéliales, cette activation conduit à la sécrétion de facteurs qui promeuvent la croissance des cellules leucémiques et par extension la croissance des cellules tumorales^{236,335,337}. Les cellules endothéliales, par la sécrétion de facteurs angiocrines,

tels que, l'IL6, l'IL3, le granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), ou le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), ou le Nitric Oxyde (NO), sont capables de provoquer la croissance des cellules tumorales. L'inhibition de l'activité des cellules endothéliales, par l'injection chez la souris xéno greffée, de facteurs anti-angiogéniques est capable à elle seule d'inhiber l'activité paracrine des cellules endothéliales sur la croissance tumorale ^{236,335,337}.

Les cellules endothéliales interviennent aussi sur l'homéostasie des cellules initiatrices de glioblastomes. Comme les cellules leucémiques, les cellules initiatrices de glioblastome sont retrouvées in situ en localisation péri-vasculaire. Un nombre croissant d'études suggère que la propagation de cellules glioblastomateuses Nestin+CD133+ est directement régulée par la production de facteurs dérivés de l'endothélium, et que l'inhibition de l'activité endothéliale par des inhibiteurs de l'angiogenèse abroge l'expansion des cellules initiatrices de glioblastomes, et par conséquent la croissance de la tumeur.

De plus, les cellules de médulloblastomes, qui elles aussi se localisent au niveau de la niche péri-vasculaire, présentent une résistance aux radiations ionisantes lorsqu'elles sont en contact avec les cellules endothéliales. De façon assez similaire à nos travaux, l'induction de la résistance est liée à l'activation de la protéine AKT dans les cellules de médulloblastomes. L'inhibition de la phosphorylation d'AKT restaure la sensibilité de cellules de médulloblastomes de la niche péri-vasculaire aux radiations ionisantes ³³⁸. Ainsi ces données corroborent le travail que nous avons pu effectuer, suggérant que la niche péri-vasculaire peut, d'une part soutenir la croissance tumorale par la production d'un jeu de facteurs angiocrines, dont la régulation et l'expression est indépendante du contexte perfusif. Et d'autre part, générer l'émergence de résistances aux thérapies, notamment par l'activation de la voie PI3K-AKT-mTOR.

Une des questions que pose ce travail, est comment la niche vasculaire est capable à la fois de maintenir l'homéostasie tissulaire et de promouvoir la croissance tumorale. Une des explications possibles pourrait être que l'activation de la niche vasculaire durant les processus d'inflammation ou de néo-angiogenèse initierait la mise en place de certaines voies de transduction qui amènerait les cellules endothéliales à produire et/ou sécréter des facteurs accélérant la cicatrisation ou la croissance tumorale. En effet, au « repos » les cellules endothéliales chez l'adulte constituent un compartiment quiescent, et sécrètent des facteurs favorisant la dormance des cellules tumorales ^{191,339}. Cependant, en réponse à certains stress, tels que l'hypoxie, l'inflammation, la transformation maligne, l'augmentation de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF-A ou la famille des FGF, stimule la sortie de quiescence des cellules endothéliales et favorise

l'initiation du bourgeonnement angiogéniques. Les facteurs pro-angiogéniques activant la niche vasculaire, induisent la sécrétion par les cellules endothéliales de facteurs favorisant cette fois-ci non plus la dormance tumorale, mais bel et bien sa croissance.

Pour supporter cette idée, les facteurs pro-angiogéniques activent la protéine AKT des cellules endothéliales, qui par l'inactivation de la signalisation dépendante de forkhead box O (FOXO) induisent la sécrétion de facteurs tels que MMP10, de cytokines (IL8) ou encore des composants de la matrice extracellulaire comme la laminine ³⁴⁰. De plus, l'activation chronique d'AKT dans la vasculature tumorale supporte la croissance tumorale en activant la voie mTOR. La rapamycine, un inhibiteur de la voie mTOR, bloque la croissance tumorale et restaure une perméabilité vasculaire normale en modulant l'état d'activation de l'axe AKT-mTOR dans les cellules endothéliales associées aux tumeurs ²³³.

L'activité anti-tumorale de la rapamycine pourrait donc être multifactorielle, d'une part agissant directement sur les cellules tumorales en inhibant des voies de survie clés, d'autre part en perturbant l'activation de la niche vasculaire en supprimant les signaux pro-angiogéniques ²³³. Ces données soulèvent une question clé concernant les effets des cellules endothéliales sur la biologie des tumeurs ; l'activation de la niche vasculaire par la voie AKT-mTOR induirait la production de facteurs angiocrines pro-tumoraux, alors que l'ajout de molécules anti-angiogéniques forcerait la quiescence des cellules endothéliales, et par conséquent la sécrétion de facteurs favorisant la dormance tumorale. Comme l'état angiogénique des cellules endothéliales est régulé par un jeu de facteurs tels que le VEGF-A, le FGF-2, il est concevable que l'activation différentielle des voies AKT, ERK, ou encore JNK puisse aboutir à des effets dépendants des voies de transduction activées. Par exemple, dans le système hématopoïétique, l'état d'activation de la niche vasculaire orchestre la balance entre le maintien, l'expansion et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques ²⁰⁴. Ainsi au repos, les cellules endothéliales participent au maintien du pool de HSC grâce à l'activation de la voie Notch ²⁰⁵. Suite à un stress tel que la myélo-ablation, l'activation d'AKT dans la niche vasculaire conduit à la sur expression de facteurs angiocrines tels que IGFBP2, FGF2, Dhh et BMP4 favorisant l'expansion du pool de cellules souches hématopoïétiques. Et enfin, lorsque la niche vasculaire sort de son état quiescent pour entrer dans un état angiogénique (AKT+MAPK), elle favorise la différenciation des HSC, et donc la reconstitution hématopoïétique, par la production d'IL6 et d'angiopoïétine 2 par exemple ²⁰⁴.

Si la fonction de l'endothélium est dépendante de son état d'activation, on peut ici suggérer que la participation de celui-ci au sein de tumeurs pourrait être envisagée en dehors de sa fonction vasculogénique. Ainsi dans une tumeur solide, il coexiste au moins deux types d'endothélium, une partie quiescente et une partie proliférante. A la vue des

données de la littérature on est en droit de s'interroger si l'impact des cellules endothéliales n'est pas pléiotropique et dépendant de son état d'activation.

Afin d'interroger le rôle potentiel des facteurs angiocrines sur la croissance tumorale, il sera requis de développer des modèles murins dans lesquels l'expression de ce facteur sera inhibé spécifiquement au niveau des vaisseaux activés. Cependant comme certains facteurs angiocrines (tels que les ligands de Notch) exercent une fonction essentielle lors du développement embryonnaire, la création de modèles d'extinction conditionnelle sera impérative.

En conclusion, l'exploitation potentielle des facteurs angiocrines dérivés de l'endothélium pourrait ouvrir une fenêtre thérapeutique importante. Cibler les facteurs pro-tumoraux sécrétés ou produits par l'endothélium nous permettrait d'inhiber la croissance tumorale liée à l'activation de la niche vasculaire. Comprendre comment l'endothélium orchestre la balance entre la régénération tissulaire et la croissance tumorale nous permettrait aussi de maximiser l'efficacité des traitements anti-angiogéniques tout en minimisant leur toxicité.

5 Références bibliographiques.

1. HAS. Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Cancer de l'ovaire. (2010).
2. Milne, R.L. & Antoniou, A.C. Genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Annals of Oncology* **22**, i11-i17 (2011).
3. Fishman, A. The Effects of Parity, Breastfeeding, and Infertility Treatment on the Risk of Hereditary Breast and Ovarian Cancer A Review. *International Journal of Gynecological Cancer* **20**, S31-S33 (2010).
4. Pfisterer, J. & Ledermann, J.A. Management of Platinum-Sensitive Recurrent Ovarian Cancer. *Seminars in Oncology* **33**, 12-16 (2006).
5. Lutz, A.M., *et al.* Early Diagnosis of Ovarian Carcinoma: Is a Solution in Sight? *Radiology* **259**, 329-345 (2011).
6. du Bois, A., *et al.* 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCO 2004). *Annals of Oncology* **16**, viii7-viii12 (2005).
7. Pignata, S., *et al.* Chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Letters* **303**, 73-83 (2011).
8. Vergote, I., *et al.* Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIC or IV Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine* **363**, 943-953 (2010).
9. Recamier, J.C. *Recherches sur le traitement du cancer sur la compression methodique simple ou combinee et sur l'histoire generale de la meme maladie.*, (1829).
10. Talmadge, J.E. & Fidler, I.J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research* **70**, 5649-5669 (2010).
11. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **133**(1889).
12. Virchow, R. As Based upon Physiological and Pathological Histology. *Nutrition Reviews* **47**, 23-25 (1989).
13. Ewing, J. *Neoplastic diseases : a treatise on tumors*, (Philadelphia (PA) : WB Saunders, 1928).
14. Fidler, I. & Kripke, M. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* **197**, 893-895 (1977).

15. Hart, I.R. & Fidler, I.J. Role of Organ Selectivity in the Determination of Metastatic Patterns of B16 Melanoma. *Cancer Research* **40**, 2281-2287 (1980).
16. Nguyen, D.X., Bos, P.D. & Massague, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**, 274-284 (2009).
17. Willis, R.A. *The spread of tumors in the human body*, (1952).
18. Kerbel, R.S. Tumor Angiogenesis. *New England Journal of Medicine* **358**, 2039-2049 (2008).
19. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998 (2002).
20. Zitvogel, L., *et al.* The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 1991-2001 (2008).
21. Chaffer, C.L. & Weinberg, R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* **331**, 1559-1564 (2011).
22. Weiss, L.M., E. ; Rapp, D.G. ; Holmes, J.C. Metastatic inefficiency in mice bearing B16 melanomas. *Br J Cancer* **1**, 44-53 (1982).
23. Fidler, I.J. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst.* **45**, 773-782 (1970).
24. Alizadeh, A.A., *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503-511 (2000).
25. Golub, T.R., *et al.* Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science* **286**, 531-537 (1999).
26. Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S. & Golub, T.R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* **33**, 49-54 (2003).
27. Perou, C.M., *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752 (2000).
28. van 't Veer, L.J., *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530-536 (2002).
29. Konstantinopoulos, P.A., Spentzos, D. & Cannistra, S.A. Gene-expression profiling in epithelial ovarian cancer. *Nat Clin Prac Oncol* **5**, 577-587 (2008).
30. Berchuck, A., *et al.* Patterns of Gene Expression That Characterize Long-term Survival in Advanced Stage Serous Ovarian Cancers. *Clinical Cancer Research* **11**, 3686-3696 (2005).

31. Berchuck, A., *et al.* Prediction of optimal versus suboptimal cytoreduction of advanced-stage serous ovarian cancer with the use of microarrays. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **190**, 910-923 (2004).
32. Hartmann, L.C., *et al.* Gene Expression Profiles Predict Early Relapse in Ovarian Cancer after Platinum-Paclitaxel Chemotherapy. *Clinical Cancer Research* **11**, 2149-2155 (2005).
33. Spentzos, D., *et al.* Gene Expression Signature With Independent Prognostic Significance in Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **22**, 4700-4710 (2004).
34. Simon, R. Roadmap for Developing and Validating Therapeutically Relevant Genomic Classifiers. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 7332-7341 (2005).
35. Sotiriou, C. & Piccart, M.J. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer* **7**, 545-553 (2007).
36. Quackenbush, J. Microarray Analysis and Tumor Classification. *New England Journal of Medicine* **354**, 2463-2472 (2006).
37. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609-615 (2011).
38. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell population. *Science* **194**, 791-798 (1976).
39. Crespi, B. & Summers, K. Evolutionary biology of cancer. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 545-552 (2005).
40. Kerbel, R.S.W., C. ; Korczack B. ; Lagarde, A. ; Breitman, M.L. Clonal dominance of primary tumours by metastatic cells : genetic analysis and biological implications. *Cancer Surv.* **7**, 597-629 (1988).
41. Bernards, R. & Weinberg, R.A. Metastasis genes: A progression puzzle. *Nature* **418**, 823-823 (2002).
42. Tarin, D., *et al.* Mechanisms of Human Tumor Metastasis Studied in Patients with Peritoneovenous Shunts. *Cancer Research* **44**, 3584-3592 (1984).
43. Amadori D., S.E., Amadori A. Ovarian cancer: Natural history and metastatic pattern. *Frontiers in Bioscience* **1**, 56-59 (1996).
44. Pickel, H.L., M. Girardi, F. Tamussino, H. Stettner, H.: Intraperitoneal and retroperitoneal spread of ovarian cancer. *Ovarian Cancer: Biologic and Therapeutic challenges*, (Sharp, C.F. Mason, W.P. Leake, R., 1990).
45. Souter, R.G., Wells, C., Tarin, D. & Kettlewell, M.G.W. Surgical and pathologic complications associated with peritoneovenous shunts in management of malignant ascites. *Cancer* **55**, 1973-1978 (1985).

46. Hiratsuka, S., *et al.* MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* **2**, 289-300 (2002).
47. Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H. & Maru, Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* **8**, 1369-1375 (2006).
48. Kaplan, R.N., *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820-827 (2005).
49. Kaplan, R.N., Rafii, S. & Lyden, D. Preparing the 'Soil': The Premetastatic Niche. *Cancer Research* **66**, 11089-11093 (2006).
50. Rosenberg, B., Van Camp, L. & Krigas, T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **205**, 698-699 (1965).
51. Jamieson, E.R. & Lippard, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin, DNA Adducts. *Chemical Reviews* **99**, 2467-2498 (1999).
52. Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J.J. & Reed, E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *The Journal of Clinical Investigation* **94**, 703-708 (1994).
53. Dabholkar, M., *et al.* ERCC1 and ERCC2 Expression in Malignant Tissues From Ovarian Cancer Patients. *Journal of the National Cancer Institute* **84**, 1512-1517 (1992).
54. Cejka, P., *et al.* Methylation-induced G2/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1. *EMBO J* **22**, 2245-2254 (2003).
55. di Pietro, M., *et al.* Mismatch Repair-Dependent Transcriptome Changes In Human Cells Treated with the Methylating Agent N-Methyl-N,N-Dinitro-N-Nitrosoguanidine. *Cancer Research* **63**, 8158-8166 (2003).
56. Bellon SF., C.J., Lippard SJ. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* **13**, 8026-8035 (1991).
57. Knipp, M. Metallothioneins and Platinum(II) Anti-Tumor Compounds. *Current Medicinal Chemistry* **16**(2009).
58. Hagrman, D., Goodisman, J., Dabrowiak, J.C. & Souid, A.-K. Kinetic study on the reaction of cisplatin with metallothionein. *Drug Metabolism and Disposition* **31**, 916-923 (2003).
59. Kaina, B., Lohrer, H., Karin, M. & Herrlich, P. Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by

- alkylating agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 2710-2714 (1990).
60. Surowiak, P., *et al.* Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Archiv* **450**, 279-285 (2007).
61. Wilce, M.C.J. & Parker, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1205**, 1-18 (1994).
62. Ikeda K., S.K., Yamamoto R., Hareyama H., Tsumura N., Watari H., Shimizu M., Minakami H., Sakuragi N.,. Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1, and p53 in stages II–IV ovarian cancer. . *International Journal of Gynecological Cancer* **13**, 776-784 (2003).
63. Satoh, T., Nishida, M., Tsunoda, H. & Kubo, T. Expression of glutathione S-transferase pi (GST-pi) in human malignant ovarian tumors. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **96**, 202-208 (2001).
64. Mayr D., P.U., Baretin GB., Gropp M., Meier W., Flens MJ., Sceper R., Diebold J.,. Immunohistochemical analysis of drug resistance-associated proteins in ovarian carcinomas. *Pathol Res Pract* **196**, 469-475 (2000).
65. Hall, M.D., Okabe, M., Shen, D.-W., Liang, X.-J. & Gottesman, M.M. The Role of Cellular Accumulation in Determining Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**, 495-535 (2008).
66. Siu, L.L., *et al.* The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein, and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* **4**, 559-565 (1998).
67. Arts, H.J.G., *et al.* Drug Resistance-associated Markers P-Glycoprotein, Multidrug Resistance-associated Protein 1, Multidrug Resistance-associated Protein 2, and Lung Resistance Protein as Prognostic Factors in Ovarian Carcinoma. *Clinical Cancer Research* **5**, 2798-2805 (1999).
68. Komatsu, M., *et al.* Copper-transporting P-Type Adenosine Triphosphatase (ATP7B) Is Associated with Cisplatin Resistance. *Cancer Research* **60**, 1312-1316 (2000).
69. Katano, K., *et al.* The Copper Export Pump ATP7B Modulates the Cellular Pharmacology of Carboplatin in Ovarian Carcinoma Cells. *Molecular Pharmacology* **64**, 466-473 (2003).

70. Nakayama, K., *et al.* Prognostic Value of the Cu-Transporting ATPase in Ovarian Carcinoma Patients Receiving Cisplatin-Based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research* **10**, 2804-2811 (2004).
71. Ohbu, M., *et al.* Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human gastric carcinoma. *Cancer letters* **189**, 33-38 (2003).
72. Kanzaki A, T.M., Neamati N, Miyashita H, Oubu M, Nakayama K, Bando H, Ogawa K, Mutoh M, Mori S, Terada K, Sugiyama T, Fukumoto M, Takebayashi Y. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **93**, 70-77 (2002).
73. Giaccia, A.J. & Kastan, M.B. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* **12**, 2973-2983 (1998).
74. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science* **116**, 4077-4085 (2003).
75. Zamzami, N. & Kroemer, G. p53 in apoptosis control: An introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**, 685-687 (2005).
76. Schuijjer, M. & Berns, E.M.J.J. TP53 and ovarian cancer. *Human Mutation* **21**, 285-291 (2003).
77. Fraser, M., *et al.* Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**, 66 (2003).
78. Mabuchi, S., *et al.* Inhibition of Inhibitor of Nuclear Factor- κ B Phosphorylation Increases the Efficacy of Paclitaxel in in Vitro and in Vivo Ovarian Cancer Models. *Clinical Cancer Research* **10**, 7645-7654 (2004).
79. Mansouri, A., *et al.* Sustained Activation of JNK/p38 MAPK Pathways in Response to Cisplatin Leads to Fas Ligand Induction and Cell Death in Ovarian Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 19245-19256 (2003).
80. Niedner, H., Christen, R., Lin, X., Kondo, A. & Howell, S.B. Identification of Genes That Mediate Sensitivity to Cisplatin. *Molecular Pharmacology* **60**, 1153-1160 (2001).
81. Fraser, M., *et al.* p53 Is a Determinant of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein/Akt-Mediated Chemoresistance in Human Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research* **63**, 7081-7088 (2003).
82. Jordan, M.A., *et al.* Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit and Apoptotic Cell Death. *Cancer Research* **56**, 816-825 (1996).
83. Schiff, P.B.e.a. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1561-1565 (1981).

84. Rowinsky, E.K. & Donehower, R.C. Paclitaxel (Taxol). *New England Journal of Medicine* **332**, 1004-1014 (1995).
85. Snyder, J.P., Nettles, J.H., Cornett, B., Downing, K.H. & Nogales, E. The binding conformation of Taxol in α -tubulin: A model based on electron crystallographic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 5312-5316 (2001).
86. Rowinsky, E., Tolcher, AW. Antimicrotubule agents. in *Cancer Principles and Practice*. (ed. Devita VT Jr, H.S., Rosenberg SA) 431–452 (Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001).
87. Lecureur, V., *et al.* Cloning and Expression of Murine Sister of P-Glycoprotein Reveals a More Discriminating Transporter Than MDR1/P-Glycoprotein. *Molecular Pharmacology* **57**, 24-35 (2000).
88. Gottesman, M.M., Fojo, T. & Bates, S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**, 48-58 (2002).
89. Hopper-Borge, E., Chen, Z.-S., Shchhaveleva, I., Belinsky, M.G. & Kruh, G.D. Analysis of the Drug Resistance Profile of Multidrug Resistance Protein 7 (ABCC10). *Cancer Research* **64**, 4927-4930 (2004).
90. Lê, L.H., *et al.* Phase I study of the multidrug resistance inhibitor zosuquidar administered in combination with vinorelbine in patients with advanced solid tumours. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **56**, 154-160 (2005).
91. Hill, B.W., RD., Shellard, SA., McClean, S., Hosking, LK. . Differential cytotoxic effects of docetaxel in a range of mammalian tumor cell lines and certain drug resistant sublines in vitro. *Invest New Drugs* **12**, 169-182 (1994).
92. Kemper, E.M., Verheij, M., Boogerd, W., Beijnen, J.H. & van Tellingen, O. Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *European Journal of Cancer* **40**, 1269-1274 (2004).
93. Gokmen-Polar, Y., *et al.* Beta Tubulin Mutations Are Associated with Resistance to 2-Methoxyestradiol in MDA-MB-435 Cancer Cells. *Cancer Research* **65**, 9406-9414 (2005).
94. Hari, M., *et al.* Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of α -tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 270-278 (2006).
95. Shalli, K., Brown, I., Heys, S.D. & Schofield, A.C. Alterations of α -tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel. *The FASEB Journal* (2005).
96. Diaz, J.F., Valpuesta, J.M., Chacon, P., Diakun, G. & Andreu, J.M. Changes in Microtubule Protofilament Number Induced by Taxol Binding to an Easily Accessible Site. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 33803-33810 (1998).

97. Sale, S., *et al.* Conservation of the Class I Beta-Tubulin Gene in Human Populations and Lack of Mutations in Lung Cancers and Paclitaxel-resistant Ovarian Cancers¹. *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 215-225 (2002).
98. Shionoya, M., Jimbo, T., Kitagawa, M., Soga, T. & Tohgo, A. DJ-927, a novel oral taxane, overcomes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro and in vivo. *Cancer Science* **94**, 459-466 (2003).
99. Roche M, K.H., Seiden M. Drug evaluation: tesetaxel--an oral semisynthetic taxane derivative. *Curr Opin Investig Drugs* **7**, 1092-1099. (2006).
100. Meads, M.B., Gatenby, R.A. & Dalton, W.S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* **9**, 665-674 (2009).
101. Teicher, B., *et al.* Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science* **247**, 1457-1461 (1990).
102. Heidland A., K.A., Sebekova K., Bahner U. Beginning of modern concept of inflammation: the work of Friedrich Daniel von Recklinghausen and Julius Friedrich Cohnheim. *J Nephrol* **22**, 9 (2009).
103. Friedenstein A., D.U.F., Kulagina N.N., Panasuk A.F., Rudakowa S.F., Luria EA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. . *Exp Hematol* **2**, 83-92 (1974).
104. Prockop, D.J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science* **276**, 71-74 (1997).
105. Pittenger, M.F., *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
106. Caplan, A.I. & Bruder, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine* **7**, 259-264 (2001).
107. Bianco, P., Robey, P.G. & Simmons, P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* **2**, 313-319 (2008).
108. Bruder, S.P., *et al.* Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* **16**, 155-162 (1998).
109. Krampera, M., Pizzolo, G., Aprili, G. & Franchini, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* **39**, 678-683 (2006).
110. Vianello, F. & Dazzi, F. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: a double edged sword? *Leukemia* **22**, 463-465 (2008).
111. Wang, L. & Zhao, R. Mesenchymal stem cells targeting the GVHD. *Science in China Series C: Life Sciences* **52**, 603-609 (2009).

112. Noiseux, N., *et al.* Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Akt Dramatically Repair Infarcted Myocardium and Improve Cardiac Function Despite Infrequent Cellular Fusion or Differentiation. *Mol Ther* **14**, 840-850 (2006).
113. Zhang, M., *et al.* SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *The FASEB Journal* **21**, 3197-3207 (2007).
114. Zisa, D., Shabbir, A., Suzuki, G. & Lee, T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **390**, 834-838 (2009).
115. Shabbir, A., *et al.* Activation of host tissue trophic factors through JAK-STAT3 signaling: a mechanism of mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **299**, H1428-H1438 (2010).
116. Xin, H., *et al.* Increasing tPA Activity in Astrocytes Induced by Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Facilitate Neurite Outgrowth after Stroke in the Mouse. *PLoS ONE* **5**, e9027 (2010).
117. Silva, F.H. & Nardi, N.B. From leading role to the backstage: Mesenchymal stem cells as packaging cell lines for in situ production of viral vectors. *Medical Hypotheses* **67**, 922-925 (2006).
118. Caplan, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology* **213**, 341-347 (2007).
119. Klingemann, H., Matzilevich, D. & Marchand, J. Mesenchymal Stem Cells ,Ä Sources and Clinical Applications. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **35**, 272-277 (2008).
120. Karp, J.M. & Leng Teo, G.S. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell* **4**, 206-216 (2009).
121. Mansilla, E., *et al.* Bloodstream Cells Phenotypically Identical to Human Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells Circulate in Large Amounts Under the Influence of Acute Large Skin Damage: New Evidence for Their Use in Regenerative Medicine. *Transplantation Proceedings* **38**, 967-969 (2006).
122. Studeny, M., *et al.* Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interferon-Œ Delivery into Tumors. *Cancer Research* **62**, 3603-3608 (2002).
123. Studeny, M., *et al.* Mesenchymal Stem Cells: Potential Precursors for Tumor Stroma and Targeted-Delivery Vehicles for Anticancer Agents. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 1593-1603 (2004).

124. Nakamizo, A., *et al.* Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Gliomas. *Cancer Research* **65**, 3307-3318 (2005).
125. Yong, R.L., *et al.* Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Intravascular Delivery of Oncolytic Adenovirus α 24-RGD to Human Gliomas. *Cancer Research* **69**, 8932-8940 (2009).
126. Dwyer, R.M., Khan, S., Barry, F.P., O'Brien, T. & Kerin, M.J. Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res Ther* **1**, 25 (2010).
127. Karnoub, A.E., *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557-563 (2007).
128. Kidd, S., *et al.* Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *STEM CELLS* **27**, 2614-2623 (2009).
129. Bernardo, M.E., Locatelli, F. & Fibbe, W.E. Mesenchymal Stromal Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1176**, 101-117 (2009).
130. Dominici, M., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
131. Roobrouck, V.D., Ulloa-Montoya, F. & Verfaillie, C.M. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Experimental Cell Research* **314**, 1937-1944 (2008).
132. Nombela-Arrieta, C.s., Ritz, J. & Silberstein, L.E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 126-131 (2011).
133. Spees, J.L., *et al.* Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2397-2402 (2003).
134. Prockop, D.J., Gregory, C.A. & Spees, J.L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11917-11923 (2003).
135. Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Salagianni, M., Baxevanis, C.N. & Papamichail, M. Cell Culture Medium Composition and Translational Adult Bone Marrow-Derived Stem Cell Research. *STEM CELLS* **24**, 1409-1410 (2006).
136. Wagner, W. & Ho, A. Mesenchymal Stem Cell Preparations—Comparing Apples and Oranges. *Stem Cell Reviews and Reports* **3**, 239-248 (2007).

137. Lodie, T.A., *et al.* Systematic Analysis of Reportedly Distinct Populations of Multipotent Bone Marrow-Derived Stem Cells Reveals a Lack of Distinction. *Tissue Engineering* **8**, 739-751 (2002).
138. Sorrentino, A., *et al.* Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental Hematology* **36**, 1035-1046 (2008).
139. Poloni, A., *et al.* Selection of CD271+ cells and human AB serum allows a Large expansion of mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytotherapy* **11**, 153-162 (2009).
140. Baddoo, M., *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of Cellular Biochemistry* **89**, 1235-1249 (2003).
141. Greco, S.J., Liu, K. & Rameshwar, P. Functional Similarities Among Genes Regulated by Oct4 in Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* **25**, 3143-3154 (2007).
142. Riekstina, U., *et al.* Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. *Stem Cell Reviews and Reports* **5**, 378-386 (2009).
143. Baxter, M.A., *et al.* Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion. *STEM CELLS* **22**, 675-682 (2004).
144. Bonab, M., *et al.* Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology* **7**, 14 (2006).
145. Wagner, W., *et al.* Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS ONE* **3**, e2213 (2008).
146. Hatzistergos, K.E., *et al.* Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cardiac Stem Cell Proliferation and Differentiation / Novelty and Significance. *Circulation Research* **107**, 913-922 (2010).
147. Sorrell, J. & Caplan, A. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Research & Therapy* **1**(2010).
148. Di Nicola, M., *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838-3843 (2002).
149. Glennie, S., Soeiro, I.s., Dyson, P.J., Lam, E.W.-F. & Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* **105**, 2821-2827 (2005).

150. Sioud, M., Mobergslien, A., Boudabous, A. & Fløisand, Y. Evidence for the Involvement of Galectin-3 in Mesenchymal Stem Cell Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation. *Scandinavian Journal of Immunology* **71**, 267-274 (2010).
151. Deng, W., *et al.* Effects of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on T and B Lymphocytes from BXSb Mice. *DNA and Cell Biology* **24**, 458-463 (2005).
152. Corcione, A., *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367-372 (2006).
153. Djouad, F., *et al.* Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *STEM CELLS* **25**, 2025-2032 (2007).
154. Jiang, X.-X., *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **105**, 4120-4126 (2005).
155. Di Ianni, M., *et al.* Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Experimental Hematology* **36**, 309-318 (2008).
156. Crop, M.J., *et al.* Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Explosive T-Cell Proliferation. *Stem Cells and Development* **19**, 1843-1853 (2010).
157. Lee, J.S., *et al.* A Long-Term Follow-Up Study of Intravenous Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Ischemic Stroke. *STEM CELLS* **28**, 1099-1106 (2010).
158. Urdzikova, L., *et al.* Transplantation of Bone Marrow Stem Cells as well as Mobilization by Granulocyte-Colony Stimulating Factor Promotes Recovery after Spinal Cord Injury in Rats. *Journal of Neurotrauma* **23**, 1379-1391 (2006).
159. Syková, E., Jendelová, P., Urdzíkova, L., Lesný, P. & Hejčl, A. Bone Marrow Stem Cells and Polymer Hydrogels—Two Strategies for Spinal Cord Injury Repair. *Cellular and Molecular Neurobiology* **26**, 1111-1127 (2006).
160. Zanone, M.M., *et al.* Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Cellular Immune Response to Islet Antigen Glutamic Acid Decarboxylase in Type 1 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **95**, 3788-3797 (2010).
161. Chanda, D., Kumar, S. & Ponnazhagan, S. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *Journal of Cellular Biochemistry* **111**, 249-257 (2010).
162. Joo, S.-Y., *et al.* Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner. *Cytotherapy* **12**, 361-370 (2010).

163. González, M.A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D. & Delgado, M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis & Rheumatism* **60**, 1006-1019 (2009).
164. Gonzalez-Rey, E., *et al.* Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* **58**, 929-939 (2009).
165. Gonzalez, M.A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D. & Delgado, M. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Colitis by Inhibiting Inflammatory and Autoimmune Responses. *Gastroenterology* **136**, 978-989 (2009).
166. Constantin, G., *et al.* Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *STEM CELLS* **27**, 2624-2635 (2009).
167. Si, Y.-L., Zhao, Y.-L., Hao, H.-J., Fu, X.-B. & Han, W.-D. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Research Reviews* **10**, 93-103 (2011).
168. Dvorak, H.F. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *New England Journal of Medicine* **315**, 1650-1659 (1986).
169. Khakoo, A.Y., *et al.* Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of Experimental Medicine* **203**, 1235-1247 (2006).
170. Duan, X., Guan, H., Cao, Y. & Kleinerman, E.S. Murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interleukin-12 gene delivery into Ewing sarcoma tumors. *Cancer* **115**, 13-22 (2009).
171. Menon, L.G., *et al.* Differential Gene Expression Associated with Migration of Mesenchymal Stem Cells to Conditioned Medium from Tumor Cells or Bone Marrow Cells. *STEM CELLS* **25**, 520-528 (2007).
172. Komarova, S., Kawakami, Y., Stoff-Khalili, M.A., Curiel, D.T. & Pereboeva, L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 755-766 (2006).
173. Coffelt, S.B., *et al.* The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 3806-3811 (2009).
174. Mills, G.B. & Moolenaar, W.H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 582-591 (2003).
175. Lee, M.J., *et al.* Lysophosphatidic acid in malignant ascites stimulates migration of human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **104**, 499-510 (2008).

176. Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.-N., Waring, A.J. & Lehrer, R.I. Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2206-2214 (1998).
177. Zanetti, M., Gennaro, R. & Romeo, D. The Cathelicidin Family of Antimicrobial Peptide Precursors: A Component of the Oxygen-Independent Defense Mechanisms of Neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences* **832**, 147-162 (1997).
178. Pinilla, S., *et al.* Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion. *Cancer Letters* **284**, 80-85 (2009).
179. McLean, K., *et al.* Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *The Journal of Clinical Investigation* **121**, 3206-3219 (2011).
180. Jeon, E.S., *et al.* Cancer-Derived Lysophosphatidic Acid Stimulates Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Myofibroblast-Like Cells. *STEM CELLS* **26**, 789-797 (2008).
181. Righi, E., *et al.* CXCL12/CXCR4 Blockade Induces Multimodal Antitumor Effects That Prolong Survival in an Immunocompetent Mouse Model of Ovarian Cancer. *Cancer Research* **71**, 5522-5534 (2011).
182. Kajiyama, H., *et al.* Involvement of SDF-1 α /CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer* **122**, 91-99 (2008).
183. Kulbe, H., *et al.* The Inflammatory Cytokine Tumor Necrosis Factor- α Generates an Autocrine Tumor-Promoting Network in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research* **67**, 585-592 (2007).
184. Jiang, Y.-p., Wu, X.-h., Shi, B., Wu, W.-x. & Yin, G.-r. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: An independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecologic Oncology* **103**, 226-233 (2006).
185. Spaeth, E.L., *et al.* Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *PLoS ONE* **4**, e4992 (2009).
186. Roodhart, J.M.L., *et al.* Mesenchymal Stem Cells Induce Resistance to Chemotherapy through the Release of Platinum-Induced Fatty Acids. *Cancer Cell* **20**, 370-383 (2011).

187. Cho, J.A., *et al.* Hyperthermia-treated mesenchymal stem cells exert antitumor effects on human carcinoma cell line. *Cancer* **115**, 311-323 (2009).
188. Park, H., Cho, J.-A., Kim, S.-K., Kim, J.-H. & Lee, S.-H. Hyperthermia on mesenchymal stem cells (MSCs) can sensitize tumor cells to undergo cell death. *International Journal of Hyperthermia* **24**, 638-648 (2008).
189. Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* **6**, 273-286 (2007).
190. Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.-P. & Novotny, W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 391-400 (2004).
191. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257 (2000).
192. Duda, D.G., Jain, R.K. & Willett, C.G. Antiangiogenics: The Potential Role of Integrating This Novel Treatment Modality With Chemoradiation for Solid Cancers. *Journal of Clinical Oncology* **25**, 4033-4042 (2007).
193. Thurston, G., Noguera-Troise, I. & Yancopoulos, G.D. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer* **7**, 327-331 (2007).
194. Ebos, J.M., *et al.* Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **15**, 232-239 (2009).
195. Paez-Ribes, M., *et al.* Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* **15**, 220-231 (2009).
196. Jain, R.K. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* **307**, 58-62 (2005).
197. Lammert, E., Cleaver, O. & Melton, D. Induction of Pancreatic Differentiation by Signals from Blood Vessels. *Science* **294**, 564-567 (2001).
198. Lammert, E., Cleaver, O. & Melton, D. Role of endothelial cells in early pancreas and liver development. *Mechanisms of Development* **120**, 59-64 (2003).
199. Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J. & Zaret, K.S. Liver Organogenesis Promoted by Endothelial Cells Prior to Vascular Function. *Science* **294**, 559-563 (2001).
200. Butler, J.M., Kobayashi, H. & Rafii, S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat Rev Cancer* **10**, 138-146 (2010).

201. Seandel, M., *et al.* Generation of a functional and durable vascular niche by the adenoviral E4ORF1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 19288-19293 (2008).
202. Naumov, G.N., Folkman, J., Straume, O. & Akslen, L.A. Tumor-vascular interactions and tumor dormancy *APMIS* **116**, 569-585 (2008).
203. Calabrese, C., *et al.* A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* **11**, 69-82 (2007).
204. Kobayashi, H., *et al.* Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol* **12**, 1046-1056 (2010).
205. Butler, J.M., *et al.* Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell stem cell* **6**, 251-264 (2010).
206. Ding, B.-S., *et al.* Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* **468**, 310-315 (2010).
207. Rosen, J.M. & Jordan, C.T. The Increasing Complexity of the Cancer Stem Cell Paradigm. *Science* **324**, 1670-1673 (2009).
208. Quintana, E., *et al.* Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**, 593-598 (2008).
209. Quintana, E., *et al.* Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients that Is Reversible and Not Hierarchically Organized. *Cancer Cell* **18**, 510-523 (2010).
210. Bergers, G. & Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**, 401-410 (2003).
211. Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M. & McDonald, D.M. Abnormalities of Basement Membrane on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *The American Journal of Pathology* **163**, 1801-1815 (2003).
212. Morikawa, S., *et al.* Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *The American Journal of Pathology* **160**, 985-1000 (2002).
213. Dvorak, H.F. How Tumors Make Bad Blood Vessels and Stroma. *The American Journal of Pathology* **162**, 1747-1757 (2003).
214. Nagy, J.A., *et al.* Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **948**, 305-326 (1989).
215. Baluk, P. & McDonald, D.M. The beta 2-adrenergic receptor agonist formoterol reduces microvascular leakage by inhibiting endothelial gap formation. *American*

- Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **266**, L461-L468 (1994).
216. Feng, D., *et al.* Pathways of Macromolecular Extravasation Across Microvascular Endothelium in Response to VPF/VEGF and Other Vasoactive Mediators. *Microcirculation* **6**, 23-44 (1999).
 217. Feng, D., Nagy, J.A., Dvorak, A.M. & Dvorak, H.F. Different Pathways of Macromolecule Extravasation from Hyperpermeable Tumor Vessels. *Microvascular Research* **59**, 24-37 (2000).
 218. McDonald, D.M. & Baluk, P. Significance of Blood Vessel Leakiness in Cancer. *Cancer Research* **62**, 5381-5385 (2002).
 219. Harris, A.L. Hypoxia [mdash] a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**, 38-47 (2002).
 220. Pal, S., Datta, K. & Mukhopadhyay, D. Central Role of p53 on Regulation of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/VEGF) Expression in Mammary Carcinoma. *Cancer Research* **61**, 6952-6957 (2001).
 221. Rak, J., Filmus, J. & Kerbel, R.S. Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the '[]angiogenesis progression' hypothesis. *European Journal of Cancer* **32**, 2438-2450 (1996).
 222. Rak J, K.R. Ras regulation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Methods Enzymol.* **333**, 267-283. (2001).
 223. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845 (1992).
 224. Benjamin, L.E. & Keshet, E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: Induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF,Å withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 8761-8766 (1997).
 225. Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D. & Keshet, E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of Clinical Investigation* **103**, 159-165 (1999).
 226. Pettersson A, N.J., Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhoefer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC, Dvorak HF. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest.* **80**, 99-115 (2000).

227. Sundberg, C., *et al.* Glomeruloid Microvascular Proliferation Follows Adenoviral Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor-164 Gene Delivery. *The American Journal of Pathology* **158**, 1145-1160 (2001).
228. Dimmeler, S. & Zeiher, A.M. Akt Takes Center Stage in Angiogenesis Signaling. *Circulation Research* **86**, 4-5 (2000).
229. Fujio, Y. & Walsh, K. Akt Mediates Cytoprotection of Endothelial Cells by Vascular Endothelial Growth Factor in an Anchorage-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 16349-16354 (1999).
230. Gerber, H.-P., *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3,Ä±-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 30336-30343 (1998).
231. Liu, W., *et al.* Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* **5**, 323-328 (2000).
232. Ackah, E., *et al.* Akt1/protein kinase BÄ± is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 2119-2127 (2005).
233. Phung, T.L., *et al.* Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell* **10**, 159-170 (2006).
234. Stoeltzing, O., Meric-Bernstam, F. & Ellis, L.M. Intracellular signaling in tumor and endothelial cells: The expected and, yet again, the unexpected. *Cancer Cell* **10**, 89-91 (2006).
235. Rafii, S., *et al.* Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* **86**, 3353-3363 (1995).
236. Dias, S., *et al.* Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 10857-10862 (2001).
237. Gilbertson, R.J. & Rich, J.N. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* **7**, 733-736 (2007).
238. Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N. & Vaubourdolle, M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat. Protocols* **2**, 481-485 (2007).
239. Gorman, L., Mercer, L.P. & Hennig, B. Growth requirements of endothelial cells in culture: Variations in serum and amino acid concentrations. *Nutrition* **12**, 266-270 (1996).

240. Seeger, J.M. & Klingman, N. IMPROVED ENDOTHELIAL CELL SEEDING WITH CULTURED-CELLS AND FIBRONECTIN-COATED GRAFTS. *Journal of Surgical Research* **38**, 641-647 (1985).
241. Mano, Y., Sawasaki, Y., Takahashi, K. & Goto, T. CULTIVATION OF ARTERIAL ENDOTHELIAL-CELLS FROM HUMAN UMBILICAL-CORD. *Experientia* **39**, 1144-1146 (1983).
242. Tsutomu K., K.H., Tomoko T., Hideaki O., Keiji T., Takuya N., Eiso H., Youji M., Masahiko N. Differential gene expressions during immortalization of normal human fibroblasts and endothelial cells transfected with human telomerase reverse transcriptase gene. *International Journal of Oncology* **24**(2004).
243. Oostingh, G.J., Schlickum, S., Friedl, P. & Schon, M.P. Impaired Induction of Adhesion Molecule Expression in Immortalized Endothelial Cells Leads to Functional Defects in Dynamic Interactions With Lymphocytes. *J Invest Dermatol* **127**, 2253-2258 (2007).
244. de Groof, A., *et al.* Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Molecular Cancer* **8**, 54 (2009).
245. Lee, S.S., Weiss, R.S. & Javier, R.T. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor 1protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 6670-6675 (1997).
246. Frese, K.K., *et al.* Oncogenic function for the Dlg1 mammalian homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor. *EMBO J* **25**, 1406-1417 (2006).
247. Frese, K.K., *et al.* Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein. *Oncogene* **22**, 710-721 (0000).
248. Chung, S.-H., Frese, K.K., Weiss, R.S., Prasad, B.V.V. & Javier, R.T. A New Crucial Protein Interaction Element That Targets the Adenovirus E4-ORF1 Oncoprotein to Membrane Vesicles. *J. Virol.* **81**, 4787-4797 (2007).
249. O'Shea, C., *et al.* Adenoviral proteins mimic nutrient/growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication. *EMBO J* **24**, 1211-1221 (2005).
250. Ramalingam, R., Rafii, S., Worgall, S., Brough, D.E. & Crystal, R.G. E1- E4+ Adenoviral Gene Transfer Vectors Function as a Pro-Life Signal to Promote Survival of Primary Human Endothelial Cells. *Blood* **93**, 2936-2944 (1999).
251. Zhang, F., *et al.* Adenovirus E4 Gene Promotes Selective Endothelial Cell Survival and Angiogenesis via Activation of the Vascular Endothelial-Cadherin/Akt Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 11760-11766 (2004).

252. Kopan, R. & Ilagan, M.X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216-233 (2009).
253. Park, J.T., *et al.* Notch3 Gene Amplification in Ovarian Cancer. *Cancer Research* **66**, 6312-6318 (2006).
254. Nakayama, K., *et al.* Amplicon profiles in ovarian serous carcinomas. *International Journal of Cancer* **120**, 2613-2617 (2007).
255. Park, J.T., *et al.* Notch3 gene amplification in ovarian cancer. *Cancer Res* **66**, 6312-6318 (2006).
256. Choi, J.-H., *et al.* Jagged-1 and Notch3 Juxtacrine Loop Regulates Ovarian Tumor Growth and Adhesion. *Cancer Research* **68**, 5716-5723 (2008).
257. Chen, X., *et al.* Jagged1 expression regulated by Notch3 and Wnt/Beta-catenin signaling pathways in ovarian cancer. *Oncotarget; Vol 1, No 3: July 2010* (2010).
258. Jung, S.G., *et al.* Prognostic significance of Notch 3 gene expression in ovarian serous carcinoma. *Cancer Science* **101**, 1977-1983 (2010).
259. Park, J.T., *et al.* Notch3 overexpression is related to the recurrence of ovarian cancer and confers resistance to carboplatin. *Am J Pathol* **177**, 1087-1094 (2010).
260. Carolan, B.J., Harvey, B.-G., De, B.P., Vanni, H. & Crystal, R.G. Decreased Expression of Intelectin 1 in the Human Airway Epithelium of Smokers Compared to Nonsmokers. *The Journal of Immunology* **181**, 5760-5767 (2008).
261. Hackett, N.R., *et al.* Variability of Antioxidant-Related Gene Expression in the Airway Epithelium of Cigarette Smokers. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 331-343 (2003).
262. Harvey, B.-G., *et al.* Modification of gene expression of the small airway epithelium in response to cigarette smoking. *Journal of Molecular Medicine* **85**, 39-53 (2007).
263. Cannistra, S.A. Cancer of the Ovary. *New England Journal of Medicine* **351**, 2519-2529 (2004).
264. Ceelen, W.P. & Bracke, M.E. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *The Lancet Oncology* **10**, 72-79 (2009).
265. Lis, R., *et al.* Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *International Journal of Cancer* **128**, 715-725 (2011).
266. Martinet, L., *et al.* Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *International Journal of Cancer* **126**, 2143-2152 (2010).
267. Pasquet, M., *et al.* Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *International Journal of Cancer* **126**, 2090-2101 (2010).

268. Zhang, S., *et al.* Modulation of prostate cancer cell gene expression by cell-to-cell contact with bone marrow stromal cells or osteoblasts. *Clinical and Experimental Metastasis* **26**, 993-1004 (2009).
269. Ahmed, N., Riley, C., Rice, G. & Quinn, M. Role of Integrin Receptors for Fibronectin, Collagen and Laminin in the Regulation of Ovarian Carcinoma Functions in Response to a Matrix Microenvironment. *Clinical and Experimental Metastasis* **22**, 391-402 (2005).
270. Zand, L., Feng, Q., Roskelley, C., Leung, P. & Auersperg, N. Differential effects of cellular fibronectin and plasma fibronectin on ovarian cancer cell adhesion, migration, and invasion. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **39**, 178-182 (2003).
271. Sundfeldt, K., *et al.* E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary. *Int J Cancer* **74**, 275-280 (1997).
272. Strauss, R., *et al.* Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS ONE* **6**, e16186 (2011).
273. Kenny, H.A., Kaur, S., Coussens, L.M. & Lengyel, E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 1367-1379 (2008).
274. Barbieri, F., Bajetto, A. & Florio, T. Role of Chemokine Network in the Development and Progression of Ovarian Cancer: A Potential Novel Pharmacological Target. *Journal of Oncology* **2010**(2010).
275. Qian, B.-Z., *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222-225 (2011).
276. Fujimoto, S., *et al.* Improved mortality rate of gastric carcinoma patients with peritoneal carcinomatosis treated with intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion combined with surgery. *Cancer* **79**, 884-891 (1997).
277. Helm, C.W., *et al.* Cytoreduction and intraperitoneal heated chemotherapy for the treatment of endometrial carcinoma recurrent within the peritoneal cavity. *International Journal of Gynecological Cancer* **17**, 204-209 (2007).
278. Armstrong, D.K., *et al.* Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **354**, 34-43 (2006).
279. Chua, T., *et al.* Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery in ovarian cancer peritoneal carcinomatosis: systematic review of current results. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **135**, 1637-1645 (2009).

280. Pomel, C., *et al.* Hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy using Oxaliplatin as consolidation therapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. Results of a phase II prospective multicentre trial. CHIPOVAC study. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO) In Press, Corrected Proof*(2010).
281. Kim, J.H., *et al.* Consolidation hyperthermic intraperitoneal chemotherapy using paclitaxel in patients with epithelial ovarian cancer. *Journal of Surgical Oncology* **101**, 149-155 (2010).
282. Charles, K.A., *et al.* The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation* **119**, 3011-3023 (2009).
283. Katz, E., Skorecki, K. & Tzukerman, M. Niche-Dependent Tumorigenic Capacity of Malignant Ovarian Ascites-Derived Cancer Cell Subpopulations. *Clinical Cancer Research* **15**, 70-80 (2009).
284. Tsiatas, M.L.M.D.P., *et al.* Study of T Lymphocytes Infiltrating Peritoneal Metastases in Advanced Ovarian Cancer: Associations With Vascular Endothelial Growth Factor Levels and Prognosis in Patients Receiving Platinum-Based Chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* (2009).
285. Rafii, A., *et al.* Oncologic Trogocytosis of an Original Stromal Cells Induces Chemoresistance of Ovarian Tumours. *PLoS ONE* **3**, e3894 (2008).
286. Kerbel, R.S. Issues regarding improving the impact of antiangiogenic drugs for the treatment of breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)* **18**, S41-S47 (2009).
287. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776 (1999).
288. Park, J.T., Shih, I.-M. & Wang, T.-L. Identification of Pbx1, a Potential Oncogene, as a Notch3 Target Gene in Ovarian Cancer. *Cancer Research* **68**, 8852-8860 (2008).
289. Doucas, H., *et al.* Expression of nuclear notch3 in pancreatic adenocarcinomas is associated with adverse clinical features, and correlates with the expression of STAT3 and phosphorylated Akt. *Journal of Surgical Oncology* **97**, 63-68 (2008).
290. Yao, J. & Qian, C. Inhibition of Notch3 enhances sensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer through an inactivation of PI3K/Akt-dependent pathway. *Medical Oncology* **27**, 1017-1022 (2010).
291. Cho, K.R. & Shih, I.-M. Ovarian Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **4**, 287-313 (2009).

292. Mungamuri, S.K., Yang, X., Thor, A.D. & Somasundaram, K. Survival Signaling by Notch1: Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Dependent Inhibition of p53. *Cancer Research* **66**, 4715-4724 (2006).
293. Meng, R.D., *et al.* γ -Secretase Inhibitors Abrogate Oxaliplatin-Induced Activation of the Notch-1 Signaling Pathway in Colon Cancer Cells Resulting in Enhanced Chemosensitivity. *Cancer Research* **69**, 573-582 (2009).
294. Hayward, R.L., *et al.* Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**, 169-178 (2004).
295. Troiani, T., Lockerbie, O., Morrow, M., Ciardiello, F. & Eckhardt, S.G. Sequence-dependent inhibition of human colon cancer cell growth and of prosurvival pathways by oxaliplatin in combination with ZD6474 (Zactima), an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinases. *Molecular Cancer Therapeutics* **5**, 1883-1894 (2006).
296. Zeng, Q., *et al.* Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer Cell* **8**, 13-23 (2005).
297. Jundt, F., *et al.* Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood* **103**, 3511-3515 (2004).
298. Hirshberg, B., Shouval, D., Fibach, E., Friedman, G. & Ben-Yehuda, D. Flow cytometric analysis of autonomous growth of erythroid precursors in liquid culture detects occult polycythemia vera in the Budd-Chiari syndrome. *Journal of Hepatology* **32**, 574-578 (2000).
299. Zimrin, A.B., *et al.* An Antisense Oligonucleotide to the Notch Ligand Jagged Enhances Fibroblast Growth Factor-induced Angiogenesis in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 32499-32502 (1996).
300. Rizzo, P., *et al.* Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene* **27**, 5124-5131 (2008).
301. Merchant, A.A. & Matsui, W. Targeting Hedgehog, a Cancer Stem Cell Pathway. *Clinical Cancer Research* **16**, 3130-3140 (2010).
302. Takahashi-Yanaga, F. & Kahn, M. Targeting Wnt Signaling: Can We Safely Eradicate Cancer Stem Cells? *Clinical Cancer Research* **16**, 3153-3162 (2010).
303. Pannuti, A., *et al.* Targeting Notch to Target Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research* **16**, 3141-3152 (2010).
304. Said, N.A., *et al.* SPARC inhibits LPA-mediated mesothelial-ovarian cancer cell crosstalk. *Neoplasia* **9**, 23-35 (2007).

305. Said, N.A., Elmarakby, A.A., Imig, J.D., Fulton, D.J. & Motamed, K. SPARC ameliorates ovarian cancer-associated inflammation. *Neoplasia* **10**, 1092-1104 (2008).
306. Said, N., *et al.* Normalization of the Ovarian Cancer Microenvironment by SPARC. *Molecular Cancer Research* **5**, 1015-1030 (2007).
307. Helm, C.W. The Role of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) in Ovarian Cancer. *The Oncologist* **14**, 683-694 (2009).
308. Roti Roti, J.L. Cellular responses to hyperthermia (40,Äì46–∞C): Cell killing and molecular events. *International Journal of Hyperthermia* **24**, 3-15 (2008).
309. Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S. & Robey, P.G. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *STEM CELLS* **19**, 180-192 (2001).
310. Meirelles, L.d.S., Chagastelles, P.C. & Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* **119**, 2204-2213 (2006).
311. Muraglia, A., Cancedda, R. & Quarto, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science* **113**, 1161-1166 (2000).
312. Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M. & Prockop, D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 3213-3218 (2000).
313. DiGirolamo, C.M., *et al.* Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology* **107**, 275-281 (1999).
314. Sarugaser, R., Hanoun, L., Keating, A., Stanford, W.L. & Davies, J.E. Human Mesenchymal Stem Cells Self-Renew and Differentiate According to a Deterministic Hierarchy. *PLoS ONE* **4**, e6498 (2009).
315. Jiang, Y., *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49 (2002).
316. Kuroda, Y., *et al.* Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 8639-8643 (2010).
317. Seandel, M., *et al.* Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* **449**, 346-350 (2007).

318. Panepucci, R.A., *et al.* Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* **22**, 1263-1278 (2004).
319. Lee, R.H., *et al.* Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* **14**, 311-324 (2004).
320. Kaltz, N., *et al.* Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Experimental Cell Research* **316**, 2609-2617 (2010).
321. Dufraigne, J., Funahashi, Y. & Kitajewski, J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* **27**, 5132-5137 (2008).
322. Benedito, R., *et al.* The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis. *Cell* **137**, 1124-1135 (2009).
323. Wu, X., *et al.* Role of Jagged1 in Arterial Lesions After Vascular Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31**, 2000-2006 (2011).
324. Pirtskhalaishvili, G. & Nelson, J.B. Endothelium-derived factors as paracrine mediators of prostate cancer progression. *The Prostate* **44**, 77-87 (2000).
325. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
326. Nikolova, G., *et al.* The Vascular Basement Membrane: A Niche for Insulin Gene Expression and Beta Cell Proliferation. *Developmental cell* **10**, 397-405 (2006).
327. Nikolova, G., Strilic, B. & Lammert, E. The vascular niche and its basement membrane. *Trends in Cell Biology* **17**, 19-25 (2007).
328. Rafii, S., *et al.* Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood* **84**, 10-19 (1994).
329. Shen, Q., *et al.* Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* **304**, 1338-1340 (2004).
330. Ramirez-Castillejo, C., *et al.* Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* **9**, 331-339 (2006).
331. Leventhal, C., Rafii, S., Rafii, D., Shahar, A. & Goldman, S.A. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci* **13**, 450-464 (1999).
332. Louissaint, A., Jr., Rao, S., Leventhal, C. & Goldman, S.A. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* **34**, 945-960 (2002).

333. Matsunaga, T., *et al.* Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med* **9**, 1158-1165 (2003).
334. Jin, L., Hope, K.J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F. & Dick, J.E. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nature medicine* **12**, 1167-1174 (2006).
335. Dias, S., *et al.* Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *The Journal of Clinical Investigation* **106**, 511-521 (2000).
336. Petit, I., *et al.* The microtubule-targeting agent CA4P regresses leukemic xenografts by disrupting interaction with vascular cells and mitochondrial-dependent cell death. *Blood* **111**, 1951-1961 (2008).
337. Dias, S., Shmelkov, S.V., Lam, G. & Rafii, S. VEGF165 promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood* **99**, 2532-2540 (2002).
338. Hambardzumyan, D., *et al.* PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev* **22**, 436-448 (2008).
339. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* **146**, 873-887 (2011).
340. Potente, M., *et al.* Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 2382-2392 (2005).

6 Annexes.

Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells

RAPHAEL LIS^{1,2,3}, JÉROME CAPDET⁴, PEJMAN MIRSHAHI³, MAGALI LACROIX-TRIKI⁴,
FRANCOISE DAGONNET³, CHRISTOPHE KLEIN³, MASSOUD MIRSHAHI³,
JEAN-JACQUES FOURNIÉ¹, ARASH RAFII² and MARY POUPOT¹

¹INSERM U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, F-31300, and Université Paul-Sabatier, Toulouse, F-31400, France; ²Department of Genetic Medicine and Obstetrics and Gynecology, WCMC-Qatar, Doha, Qatar; ³UMRS 872 INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 and Université Paris Descartes, Equipe 18, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 Rue de l'Ecole de Médecine, 75270 Paris cedex 06; ⁴Institut Claudius Regaud, Toulouse, F-31052, France

Received July 9, 2010; Accepted August 30, 2010

DOI: 10.3892/ijo_00000797

Abstract. In breast cancers, the appearance of metastasis is synonymous with poor prognosis. The metastatic process is usually associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) which is often induced by several soluble factors produced either by the tumour cells themselves or by cells constituting the tumour microenvironment. The aim of the present study was to determine whether the mesenchymal properties given by some molecules such as N-cadherin, for instance, could be acquired by cancer cells via the trogocytosis process with cells of the tumour microenvironment. Hospicells are stromal cells which were first isolated from cancer cell aggregates of patients with ovarian cancer. We recently showed that these cells are immunosuppressive for T lymphocyte functions and confer chemoresistance to cancer cells by the transfer of the MDR protein via trogocytosis. In this study, we showed that a mammary cancer cell line (MDA-MB-231) acquires patches of membrane via oncologic trogocytosis with Hospicells. This unidirectional and active process depends on actin polymerization and can be increased via inhibition of the Src family and decreased via inhibition of PI3K. Trogocytosis between Hospicells and MDA-MB-231 does not lead to the direct acquisition of N-cadherin but rather it leads to the production of soluble factor(s) which induce *de novo* expression of N-cadherin by the cancer cells. The novelty here is that this factor is produced only if cancer cells interact and undergo trogocytosis with Hospicells. This

new expression could confer a more invasive phenotype to the cancer cells and thus can explain the correlation of the presence of Hospicells with the number of invaded lymph nodes in patients with mammary adenocarcinoma.

Introduction

Breast cancer is the most common malignant disease in Western women. In these patients, metastasis to distant sites and not the primary tumour are the cause of death. Therefore, the appearance of metastasis is synonymous with a poor prognosis (1).

The metastatic process is the ability of tumour cells to migrate through their surrounding host tissue, enter the circulatory blood stream, arrest in capillary beds of distant organs and invade the host tissue and proliferate (1-3). This series of steps is associated with the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT), in which epithelial cells, such as cancer cells, lose their characteristic polarity, disassemble cell-cell junctions and become more migratory (2,4-8). For this, cancer cells progressively redistribute and down-regulate their apical and basolateral epithelial-specific tight and adherent junction proteins (such as E-cadherin) and re-express mesenchymal molecules (such as vimentin and N-cadherin).

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is induced by several growth factors (TGF- β , HGF, EGF, IGFs, FGFs, MMPs), which are produced either by the tumour cells themselves or by different types of cells constituting the tumour microenvironment (2,3,6). Among these cells, the mesenchymal stem cells (MSCs), which are pluripotent bone marrow-derived cells, have been recently described to localize to breast carcinoma (9). After recruitment in significant numbers to the primary tumour sites, MSCs accelerate the growth of tumour cells (2,9). Moreover, these cells, which serve as local sources of dormant stem cells, are also able to produce metastatic factors to home the cancer cells to tumour-specific pre-metastatic sites and form cellular clusters before the arrival of tumour cells (10).

Correspondence to: Dr Mary Poupot, INSERM 563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, CHU Purpan, place du Dr. Baylac, 31024 Toulouse Cedex, France
E-mail: mary.poupot@inserm.fr

Key words: membrane transfer, epithelial-mesenchymal transition, metastasis, tumour microenvironment

Even though many studies have shown that the soluble factors produced by the cellular components of the tumour microenvironment are implicated in the metastatic process, interactions between tumour cells and stromal cells have not been studied. In fact, cellular interactions leading to an exchange of membrane patches, called trogocytosis, can have several biological implications in some cases. This phenomenon is largely described in immune systems with specific interactions between immune cells, called effectors, and cells recognized as targets, leading to different immune responses, as reviewed by Davis (11) and more recently by Ahmed and colleagues (12). Through trogocytosis with target cells, the effector cells can acquire certain proteins, such as the CMH-associated antigen in the case of dendritic cells recognized by specific T lymphocytes (13), the viral receptor by natural killer (NK) cells (14), the inhibitory receptors of NK cells by cancer cells (15) and the H-ras oncogene by NK cells from transfected lymphoblastic cell lines (16). Despite the transient state at the membrane of these acquired proteins, they can be active for recipient cells such as NK cells which are activated for their proliferation or for the production of cytokines after acquiring the H-ras protein (16), or they are inhibited after acquiring HLA-G1 (17). Furthermore, trogocytosis is also present in non-immunological systems. For example, tetraspanin can be transferred from oocytes to the fertilizing spermatozoa present in the perivitelline space leading to membrane reorganization of the spermatozoa required for the fusion with the oocyte (18). In an oncological context, we first showed the homotypic trogocytosis with B lymphoma (19). Secondly, we recently showed the acquisition by ovarian cancer cells of a membrane molecule conferring chemoresistance (P-gp protein) from an original type of stromal cells, the Hospicells (20). The intercellular transfer of the P-gp protein was also described between drug-resistant and drug-sensitive human neuroblastoma cell lines, leading to a protection of the sensitive cells and to the formation of permanently resistant cells with a *de novo* expression of P-gp (21).

Hospicells were first isolated from cancer cell aggregates contained within peritoneal samples of patients with ovarian cancer, and then they were also found inside ovarian tumours. We recently described this new subset of stromal cells which do not express any of the common markers for other cell types but instead co-express the cell-surface markers CD9, CD10, CD29, CD146, CD166 and HLA-I (20). This co-localization of Hospicells and ovarian cancer cells induces, or is the result of, specific strong interactions between these two types of cells giving an advantage to cancer cells via the acquisition of the P-gp protein through oncologic trogocytosis.

Some of the mammary cancers are metastatic and can acquire the capacity to disseminate either by EMT (22) or not, as demonstrated by a recent work showing that cancer cells are able to spread even if they have not undergone EMT (23). If EMT is a necessary step for the metastatic process, the acquisition of mesenchymal properties could be induced by soluble factors but could also be made via oncologic trogocytosis between cancer cells and cells within the tumour microenvironment. As in ovarian tumours, it was thought that Hospicells would be found in mammary tumours and

Table I. Immunoreactive score (IRS) calculated using the formula: IRS = intensity of stain x percentage of labelled cells.

Stained cells no.	Stain intensity	IRS	Conclusion
<1%	0	0	0-3 Negative
1-10%	1	+	1 4-6 1+
11-50%	2	++	2 7-9 2+
51-80%	3	+++	3 10-12 3+
>80%	4		

that the interactions between cancer cells and Hospicells would lead to an acquisition by the cancer cells of metastatic characteristics through, for example, the *de novo* expression of N-cadherin.

We show here that the breast carcinoma cell line MDA-MB-231 can undergo trogocytosis with Hospicells and that this phenomenon is an active process which depends on adhesion molecules and on certain cytoskeleton elements. This oncologic trogocytosis does not lead to the direct acquisition of N-cadherin but rather it leads to the production of soluble factor(s) which induce N-cadherin expression by the cancer cells. This process could be a step in EMT.

Materials and methods

Tissue micro-array construction and immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on 5- μ m thick routinely processed paraffin sections. Using a tissue micro-array instrument (Beecher Instruments, Alphelys™), we removed representative areas of the tumour from paraffin-embedded tissue blocks.

The antibodies were incubated for 30 or 60 min and then revealed by a system of polymers coupled to the peroxidase (EnVision™ kit, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). The interpretation of the immunostaining was made with the Herceptest™ score (Dako). The semi-quantitative analysis was chosen for the immunomarcages of the oestrogen receptor, progesterone receptor, CXCR4, CD10, CD31, BNH9, KBA62 and LYVE-1 given the percentage of labelled cells and the intensity of the stain (weak, moderate, strong). The IRS (immunoreactive score) was calculated using the following formula (IRS = intensity of stain x percentage of labelled cells) (Table I).

Cell culture. The mammary cancer cell line MDA-MB-231 was purchased from the ATCC. The Hospicells used in this study were isolated from ovarian carcinoma patients as described previously (20) and immortalized with SW40.

Immortalization of Hospicells. The immortalization of ovarian carcinoma-derived Hospicells with the SV40 large T antigen was performed in the laboratory at the Thérapie Génique et d'Amplification de Vecteurs, Inserm U649, Hôtel Dieu, Nantes. Briefly, primary Hospicell cultures isolated from five different ovarian carcinoma patients were infected

with an LT-expressing retroviral vector containing supernatants in the presence of polybrene. Then, SV40 large T antigen-expressing Hospicells were selected in medium containing 500 µg/ml neomycin. Immortalized Hospicell lines were grown at 37°C in 5% CO₂ in RPMI medium supplemented with 5% FCS (Invitrogen, San Diego, CA), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium) until they were used. Intra-peritoneal and subcutaneous injections of immortalized Hospicells in SCID/beige mice did not generate tumours, demonstrating that these cells had not been transformed by retroviral transfection. The immortalized Hospicells retained their ability to specifically interact with ovarian tumour cells. The phenotype of the immortalized Hospicells was analysed by flow cytometry.

Cells culture conditions. The cells were cultured at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ in air in RPMI-1640 culture medium supplemented with penicillin, streptomycin (Cambrex Bio Science), sodium pyruvate and 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen Corporation, Paisley, UK).

Reagents and cellular treatments. Cytochalasin D, SU6656, quadripeptid RGDS and pronase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used at 10 µM, 1 µM, 2 mM and 1 mg/ml, respectively. Latrunculin B (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany) was used at 25 µM and wortmannin and Ly-294002 (Sigma-Aldrich) at 1 µM. The mammary tumoural cell line was treated with these previously mentioned molecules for 1 h then washed twice with PBS before use.

Trogocytosis. Hospicells or MDA-MB-231 cells were stained with the lipophilic green-emitting dye PKH67 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Then, PKH67-positive cells were co-incubated for 3 h with PKH67-negative cells in 96-well U-bottomed culture plates at a cell ratio of 2:1 and with a total of 6x10⁵ cells in 120 µl of complete RPMI-1640 culture medium. The cells were pelleted by gentle centrifugation (110 x g for 1 min) and left in co-incubation for 3 min, 3 h, 5 h or 3 days at 37°C (or 4°C, as indicated) and then washed with 0.5 mM PBS/EDTA. Trogocytosis was measured as the acquisition of PKH67 fluorescence, which was characterized via the increase in mean fluorescence intensity (mfi) of PKH67 by a flow cytometry analysis. Live cells were gated on the basis of FSC/SSC parameters (P1 in Fig. 2) and 10⁴ events were acquired in each experiment using the FL1 channel (log scale) for PKH67 on an LSR-II cytometer using Diva software (both from BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

When specified, the tumour cells were treated by different molecules, as detailed in the reagents section, for 1 h before contact with the Hospicells. For the confocal microscopy, the Hospicells were stained with PKH67 and with the cytoplasmic Cell Tracker™ Orange-CMTMR [5-(and-6)-((4-chloromethyl) benzoyl) amino)tetramethylrhodamine), Molecular Probes, Oregon, USA] according to manufacturer's instructions. After contact (see above), the cells were then gently suspended and plated onto poly-L-lysine (Sigma-Aldrich)-coated slides for 5 min at 37°C. After fixation with PBS containing 4% *p*-formaldehyde, the cells were washed and directly mounted in PBS containing 90% glycerol and 2% 1-4-diaza-

bicyclo (2.2.2) octane (DABCO, Sigma-Aldrich). The samples were examined using a Carl Zeiss LSM 410 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

Adhesion test. The Hospicells were seeded in 96-well flat-bottomed culture plates at a cell concentration of 5x10⁶ cells/ml with a final volume of 80 µl and kept for 4 h at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ in the air. The tumour cells stained with 5 µM of CFSE [5(6)-carboxyfluorescein di-acetate N-succinimidyl ester, Sigma-Aldrich] were deposited on the layer of Hospicells at a concentration of 5x10⁶ cells/ml in a volume of 40 µl. The co-culture was kept for 1 h at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂ in the air. Then, the non-adherent tumour cells were eliminated by two washings with PBS and the adherent tumour cells were quantified by measuring the mean CFSE fluorescence with a Mithras fluorometer.

Western blot analysis. Western blotting was performed using standard protocols.

Protein extraction. Cells (5x10⁶) were diluted in 100 µl of lysis buffer: Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, sodium desoxycholate 1% (NP40), SDS 0.1%, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, NaVO₃ 1 mM, β glycerophosphate 10 mM, NaF 50 mM, leupeptin 2 µg/ml, pepstatin 2 µg/ml, aprotinin 10 mg/ml, PMSF 0.1 mM for 30 min at 4°C. After centrifugation at 10000 x g for 15 min at 4°C, the supernatant was kept at -80°C. The proteins were quantified using the Bradford process.

Electrophoresis and revelation. The migration of proteins was performed at 120 V in 25 mM Tris, 192 mM glycine and 0.1% SDS. The proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane before incubation with 0.1 mg/ml of mAb against human N-cadherin (Sigma-Aldrich) for 12 h at 4°C. After washing, the membrane was incubated for 30 min with purified goat anti-human IgG horseradish peroxidase conjugate (1/5000) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). The anticorps-protein complexes were revealed by chemiluminescence with an ECL kit (Amersham, Biosciences AB, Uppsala, Sweden).

Measurement of N-cadherin expression by flow cytometry. Staining for flow cytometry was performed using the mAb against human N-cadherin (Sigma-Aldrich) or the appropriate IgG isotype mAb as the control, where 0.6x10⁶ cells were diluted in 60 µl of PBS containing 5% FCS and 74 µg/ml of mAb and were then incubated for 45 min at 4°C. The cells were then stained with phycoerythrin-cyanin 5-conjugated goat anti-mouse IgG (Beckman-Coulter-Immunotech, Marseille, France). The cells were washed, resuspended in PBS, and 10⁴ cells were analysed on a LSR-II cytometer using Diva software (both from BD Biosciences). Live cells were gated on the basis of FSC/SSC parameters.

Statistical analysis and graphical representation. The data of Figs. 1B and C, 4A and B were analysed using two-tailed Student's *t*-tests. The results shown are representative of at least three separate experiments and the values are expressed as the mean ± SEM with **p*<0.05, ***p*<0.01 and ****p*<0.005.

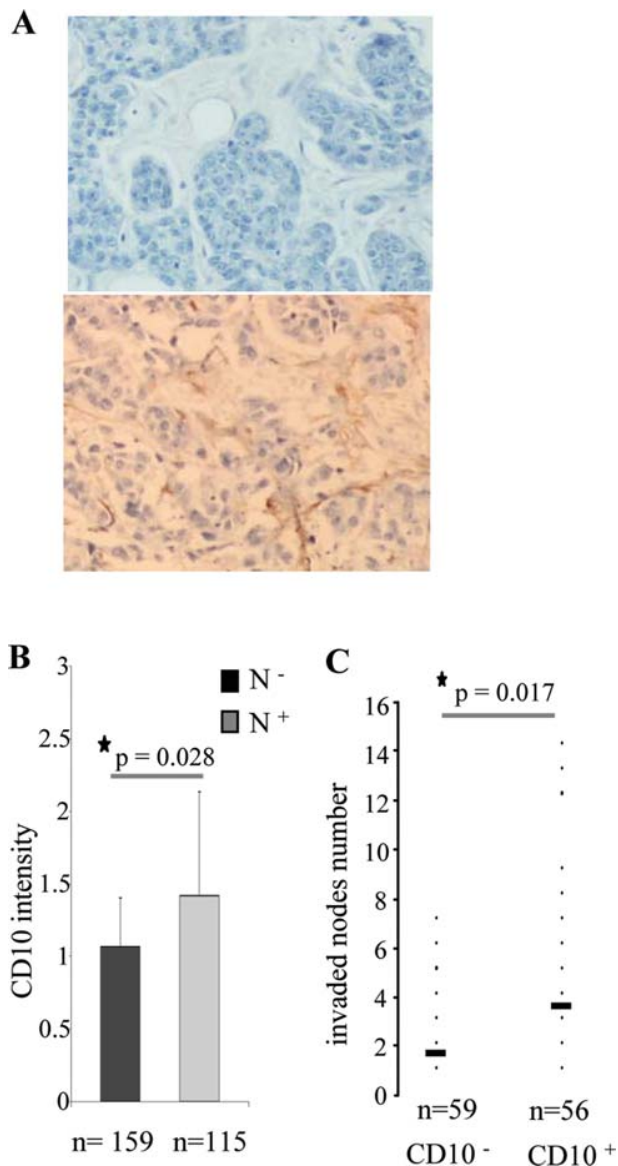


Figure 1. Aggressiveness of the tumour correlates with the presence of Hospicells in the stroma. (A) Tissue micro-arrays of mammary adenocarcinoma with the positive immunohistochemical expression of CD10 in brown for the lower panel and negative for the upper panel. (B) CD10 intensity for the group of patients with a high risk of metastatic development (N⁺) and for the group with a low risk (N⁻). (C) Number of invaded nodes for the CD10-negative patients and for the CD10-positive patients in the N⁺ group.

Results

Detection of Hospicells in mammary adenocarcinoma. To investigate whether or not breast tumours, like ovarian tumours, contain Hospicells, we studied a series of 274 mammary adenocarcinomas for the immunohistochemical expression of CD10. The tissue micro-array analysis in Fig. 1A shows the expression of CD10, which was characteristic for the presence of Hospicells in some mammary tumours (lower panel) whereas other mammary tumours did not contain Hospicells (upper panel). Moreover, the presence of Hospicells in the tumour stroma correlated with the presence of axillary lymph node metastasis. Patients with tumour-positive axillary

lymph nodes and a high risk of metastasis development were classified N⁺ as opposed to the N⁻ patients. The CD10 intensity was statistically higher for the series of the 115 N⁺ patients compared to the series of the 159 N⁻ patients (Fig. 1B). Furthermore, the number of invaded lymph nodes constituted a prognostic marker of the locoregional relapse and morbidity. We could distinguish two groups of patients: one group with an intermediate prognosis, having one to three invaded nodes, and a group with a very poor prognosis, comprised of patients having more than three invaded nodes. Among the 115 N⁺ patients, we showed that the presence of Hospicells correlated with a higher number of invaded lymph nodes; the mean number was 3.36 for the CD10⁺ group compared to 1.86 for the CD10⁻ group (Fig. 1C).

Oncologic trogocytosis between Hospicells and breast cancer cells. The presence of Hospicells in breast adenocarcinoma led us to analyse the *in vitro* interactions between these stromal cells and the breast cancer cell line MDA-MB-231 (24).

First, once seeded onto the Matrigel pre-coated plates containing Hospicells, the eGFP-MDA-MB-231 cells mainly grew on the network previously formed by the stromal cells (Fig. 2A). Then, the electronic microscopy analysis showed membrane fusion domains in the contact zone when the MDA-MB-231 cell line was co-cultured with Hospicells (Fig. 2B).

Thus, we tested the capability of breast cancer cells to undergo oncologic trogocytosis with the Hospicells. After 3 h of contact, the cancer cells acquired fluorescence from the stromal cells which were preliminarily stained with the lipophilic membrane fluorochrome PKH67. Since this green fluorochrome was stable in the membrane, the acquisition of fluorescence by the MDA-MB-231 cells meant that these cells acquired membrane patches containing the green molecule from the Hospicells. This acquisition of PKH67 fluorescence after 3 h of contact was visualized by confocal microscopy (Fig. 2C, D) and measured by flow cytometry (Fig. 2E). To distinguish the two cell types in microscopy, the Hospicells were also stained with a red cytoplasmic fluorochrome, CMTMR. Interestingly, when the cancer cells were stained with PKH67, the Hospicells did not acquire a significant amount of PKH67 fluorescence in the 3 h of contact (Fig. 2F).

We then verified that the acquisition of membrane patches by the cancer cells was really a trogocytosis contact-dependent process and not a fusion with exosomes produced by the Hospicells. We showed that this acquisition after 3 h was inhibited when a 0.4- μ m porous membrane (Transwell™ system) was used to separate the Hospicells from the cancer cells (Fig. 3A, bold line), compared to the experiment when the two cells were in contact (Fig. 3A, grey line). Moreover, trogocytosis was totally inhibited when the Hospicells were preliminarily treated with the *Streptomyces griseus* proteinase, which digests the extracellular parts of membrane proteins (Fig. 3B, bold line). Finally, the total inhibition of trogocytosis between Hospicells and MDA-MB-231 cells at 4°C showed that this process depends on an intracellular signalling process which is abolished at low temperatures (Fig. 3C, bold line).

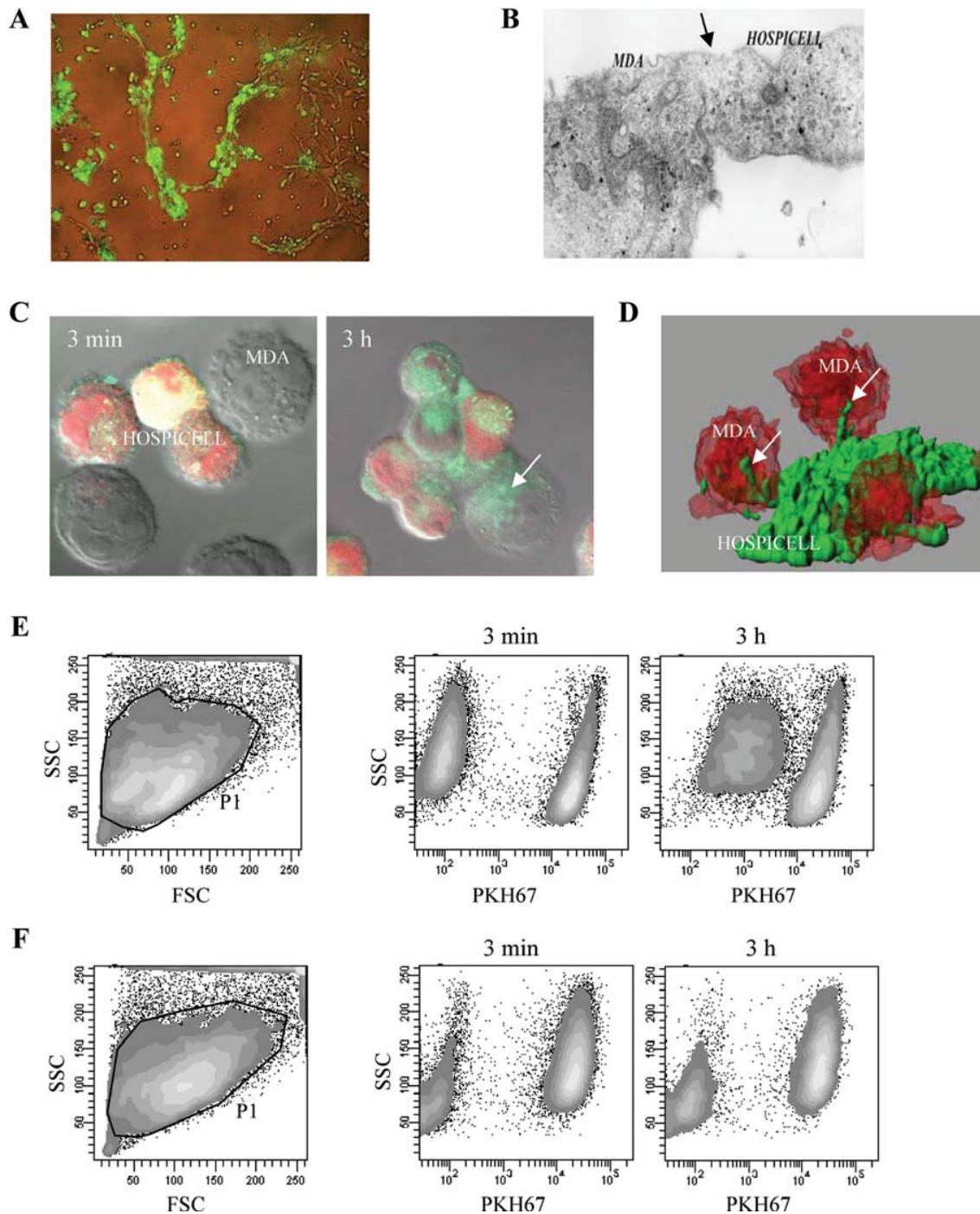


Figure 2. Oncologic trogocytosis between Hospicells and the mammary tumour cell line. (A) Culture in Matrigel of MDA-MB-231 eGFP and Hospicells. (B) Electron microscopy of the contact between MDA-MB-231 cells and Hospicells. (C) Confocal microscopy of conjugates formed after 3 h co-incubation of PKH67-positive and CMTMR-positive Hospicells and the MDA-MB-231 cell line. Arrows: large green patches transferred from PKH67-positive cells on unstained tumour cells. (D) Flow cytometry contour plots of PKH67 versus SSC of the co-culture of PKH67-positive Hospicells and unstained MDA-MB-231 cells at 3 min and 3 h. The live cells were selected by P1 and were detected by their PKH67 fluorescence. (E) Flow cytometry contour plots of PKH67 versus SSC of the co-culture of PKH67-positive MDA-MB-231 cells and unstained Hospicells at 3 min and 3 h. The live cells were selected by P1 and were detected by their PKH67 fluorescence.

The Hospicell/MDA-MB-231 trogocytosis is dependent on actin polarization and on an Src/PI3K-dependent signal. To depict the signalling pathway, which is involved in the oncologic trogocytosis between Hospicells and mammary cancer cells, we pre-treated MDA-MB-231 with different

families of inhibitory molecules. We showed that cytochalasin D and latrunculin B, which inhibit actin polymerization, induced a 50% reduction of trogocytosis. In contrast, a microtubule polymerization inhibitor, taxol, did not affect trogocytosis (Fig. 4A).

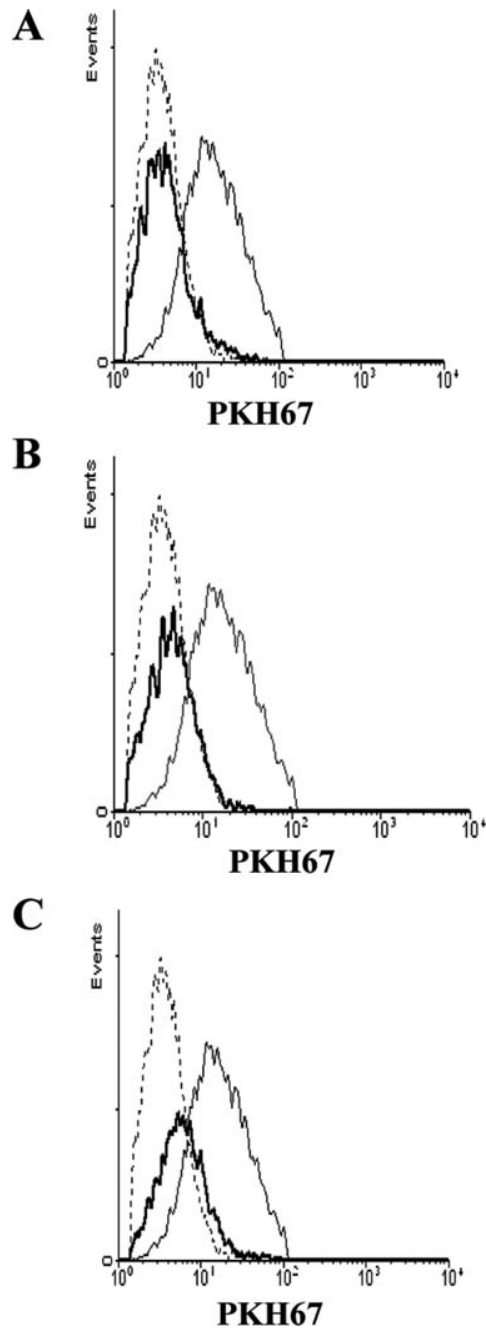


Figure 3. Oncologic trogocytosis is a contact- and signalling-dependent process. (A) The 3-h trogocytosis between PKH67-positive Hospicells and unstained MDA-MB-231 cells is inhibited by using the Transwell system for the co-culture (grey line) compared to 3 h trogocytosis without the Transwell system (black line), the reference being trogocytosis at 3 min (dotted line). (B) The 3-h trogocytosis between PKH67-positive Hospicells and unstained MDA-MB-231 cells is largely reduced by the preliminary action of a proteinase on the tumour cell (grey line). (C) The 3-h trogocytosis between PKH67-positive Hospicells and unstained MDA-MB-231 cells is largely reduced when processing the co-culture at 4°C (grey line) compared to 3 h trogocytosis at 37°C (black line).

Moreover, we tested inhibitors of the Src family (SU6656) and of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (LY294002 and wortmannin), which target transduction modules essential for cell-to-cell adhesion. Inhibition of the Src kinases led to an increase of trogocytosis while the inhibition of PI3K

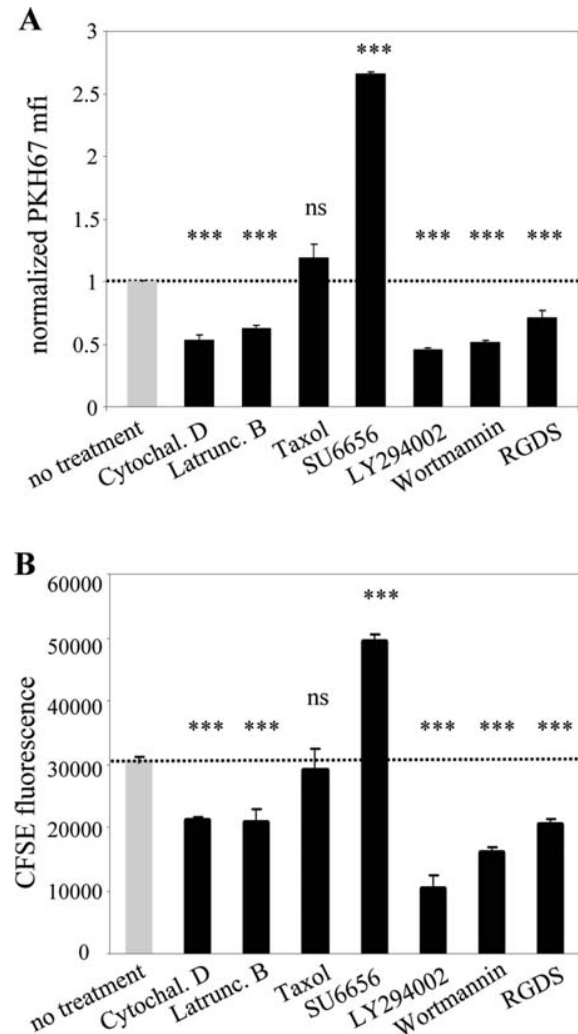


Figure 4. Oncologic trogocytosis is actin dependent and Src/PI3K-dependent. (A) The PKH67 mfi from 3 h trogocytosis between PKH67-positive Hospicells and MDA-MB-231 cells pre-treated for 1 h with different inhibitory molecules. The results are represented by the normalized PKH67 mfi from the experiment with no treatment. (B) The CFSE fluorescence measured from the adhesion of CFSE-positive MDA-MB-231 cells to the adherent Hospicells after a 1 h pre-treatment of the former with different inhibitory molecules. For (A) and (B), the error bars show standard deviations from four independent experiments.

decreased it. Finally, integrin saturation with the RGDS peptide also reduced the Hospicell/MDA-MB-231 trogocytosis (Fig. 4A).

The intensity of immunological trogocytosis is determined by the affinity of the T-cell receptor (TCR) for its antigen: the higher the affinity the more important the trogocytosis between the T lymphocyte and its target (25). In our system, we tried to test the strength of the interactions between Hospicells and the breast cancer cell line using adhesion tests. Using spectrofluorometry, we determined the intensity of the interactions by the measuring the fluorescence intensity after washing a 1-h co-culture of Hospicells and MDA-MB-231 preliminarily stained with CFSE. As with trogocytosis, actin polymerization inhibition reduced adhesion of the stromal cells to the breast cancer cells whilst inhibition of microtubule polymerization had no effect. Furthermore, this

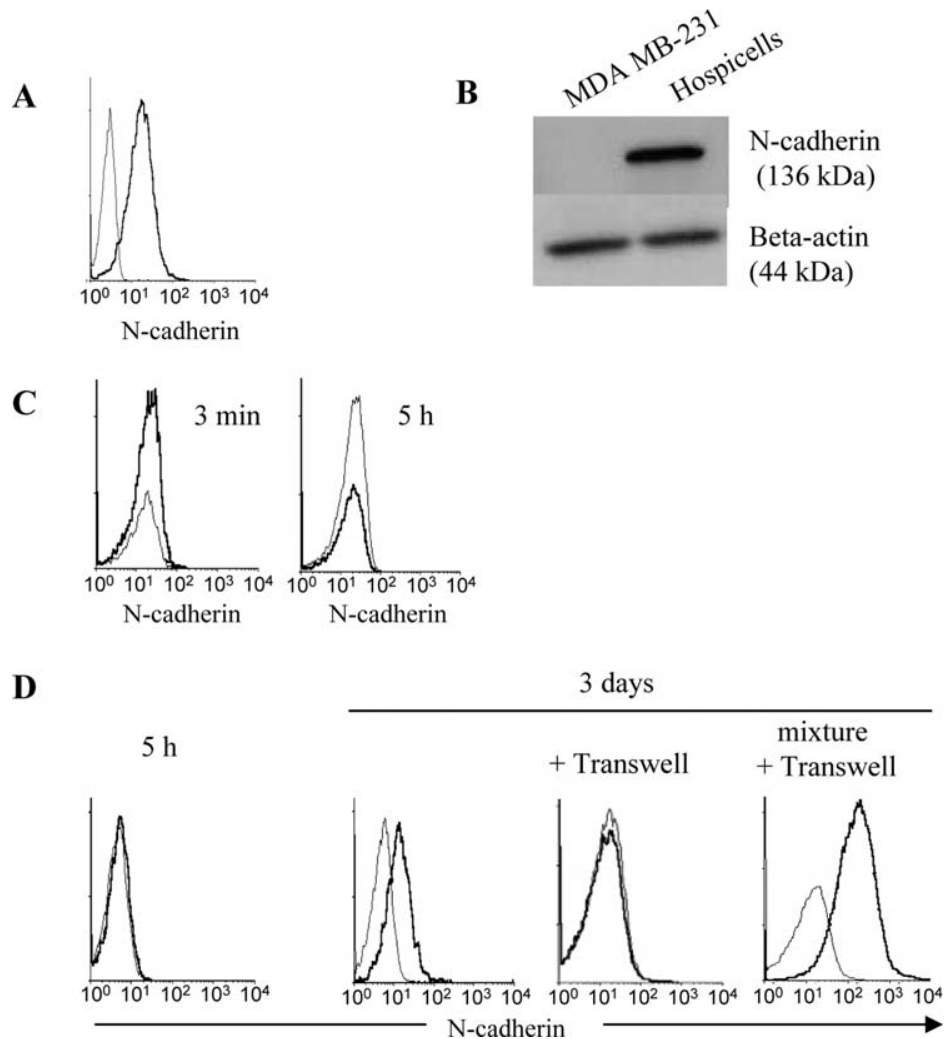


Figure 5. Expression of N-cadherin induced by trogocytosis. (A) N-cadherin expression on Hospicells as measured by flow cytometry. (B) N-cadherin expression on MDA-MB-231 cells and Hospicells measured by Western blot with β -actin as a positive control. (C) N-cadherin expression by MDA-MB-231 cells after co-culture with Hospicells for 3 min and 5 h. (D) N-cadherin expression by MDA-MB-231 cells after co-culture with Hospicells for 5 h or 3 days with or without the Transwell system and after co-culture with a mixture of MDA-MB-231 cells and Hospicells separated by a Transwell system. For each histogram: black line, N-cadherin; grey line, isotype control.

adhesion was also decreased by the inhibition of PI3K and use of the RGDS peptide, and increased by the inhibition of the Src kinases (Fig. 4B).

Trogocytosis with Hospicells induces expression of N-cadherin by breast cancer cells. Expression of N-cadherin during EMT is a crucial step in the dissemination of mammary adenocarcinomas (22). Since trogocytosis allows the transfer of membrane proteins from stromal cells to ovarian cancer cell lines (20), we decided to explore whether the breast cancer cell line MDA-MB-231 could acquire N-cadherin through trogocytosis with Hospicells. First, by using flow cytometry (Fig. 5A) and Western blot (Fig. 5B), we showed the expression of N-cadherin by Hospicells. Then, according to the literature (26), we verified the non-expression of N-cadherin by MDA-MB-231 cells (Fig. 5B).

The acquisition of N-cadherin by the cancer cells was not observed when a specific mAb in a 5 h co-culture of Hospicells and cancer cells was used (Fig. 5C). However, a *de novo* expression of N-cadherin by the MDA-MB-231 cell

line after 3 days of co-culture with the Hospicells was observed (Fig. 5D). This induction was found to be contact dependent when the use of a Transwell system for the 3 days co-culture, which separated the cancer cells from the Hospicells, abolished the *de novo* expression of N-cadherin. Interestingly, MDA-MB-231 showed *de novo* expression of N-cadherin when cultivated for 3 days in a mixture of Hospicells and MDA-MB-231 cells when separated from the mixture by a Transwell system (Fig. 5D).

Discussion

We recently showed that a new type of stromal cells, called Hospicells, isolated from the ascitis of patients with ovarian carcinoma, is able to confer chemoresistance to an ovarian cancer cell line through the transfer of the multi drug resistance protein by trogocytosis (20).

In the current study, we showed that the breast cancer cell line MDA-MB-231 shows *de novo* expression of the membrane N-cadherin protein following trogocytosis between

the cancer cells and the Hospicells. First, we demonstrated that MDA-MB-231 acquires a high amount of membrane patches from Hospicells through trogocytosis, and that this transfer was not reciprocated.

This trogocytosis is an active phenomenon which depends on actin polymerization and can be increased with inhibition of the Src family and decreased with inhibition of PI3K. The induction of cell clustering, as a result of stabilizing transient cell-cell contacts, could explain the increase in trogocytosis when Src catalytic activity was inhibited (27,28). Since the signalling of PI3K is directly linked to cell-cell adhesion, its inhibition correlates with a disruption of cell-cell contacts in intestinal and mammary epithelial cells via the inhibition of F-actin at the site of cell-cell contact (29,30). Inhibition of PI3K signalling destabilizes cell-cell contacts and thus decreases trogocytosis.

This membrane acquisition leads to a new expression of N-cadherin by MDA-MB-231 cells after 3 days of close contact between Hospicells and cancer cells, whilst the use of a Transwell system, which separated the two cell types, prevented this expression. Moreover, the culture of MDA-MB-231 cells for 3 days with a mixture of this cancer cell line and the Hospicells, but separated from this mixture by a Transwell system, led to the expression of N-cadherin at the surface of MDA-MB-231 cells. Thus, trogocytosis between this cancer cell line and the Hospicells did not lead to a direct transfer of N-cadherin from the Hospicell to the cancer cell, but instead it induced the production of a soluble factor which stimulated the *de novo* expression of N-cadherin by MDA-MB-231 cells. This soluble molecule could be produced by the Hospicells or through an autocrine process by the cancer cell line. Collagen I could be a good candidate because of its capability for inducing the up-regulation of N-cadherin in mouse mammary epithelial cells (31) and in human pancreatic cancer cells (32). The growth factors EGF and HGF are also implicated in the promotion of N-cadherin expression in ovarian carcinoma (33). The tumour suppressor TGF- β which inhibits cell proliferation (34), can also promote metastasis in ovarian cancer by the elevation of matrix metalloproteinase secretion or by an increase in the expression of N-cadherin (35). Besides this, human lung cancer cells respond to collagen I by increasing production of TGF- β , which then promotes EMT changes which include, amongst others, the *de novo* expression of N-cadherin (36). Finally, TGF- β is also able to promote the expression of N-cadherin in normal and malignant oral keratinocytes, which is correlated with an increase in the motility of these cells (37). A further reason why TGF- β could also be a good candidate is that recent data showed that ARNm for TGF- β is expressed by Hospicells (38); however, this work did not analyse the expression of EGF or collagen I in these cells. The follow-up to our study will be to determine which soluble factor is produced by the co-culture of Hospicells and the MDA-MB-231 cancer cell line which leads to the expression of N-cadherin by the MDA-MB-231 cells.

N-cadherin is an important molecule in the acquisition of a metastatic phenotype for cancer cells by promoting motility and invasion in carcinoma cells and specifically in breast carcinoma (26,39). Effectively, this molecule contributes directly to the migratory and invasive phenotype through

stable and labile cellular interactions which facilitate dynamic processes which lead to the metastatic effect (40). Moreover, N-cadherin cooperates intimately with the FGF receptor by increasing the sensitivity of cancer cells to FGF-2, leading to an increase in the expression of MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) which is an extracellular matrix-degrading enzyme associated with tumour angiogenesis, invasion and metastasis (41). Concerning the Hospicell/MDA-MB-231 interactions, the *de novo* expression of N-cadherin by the MDA-MB-231 cell line increased sensitivity to FGF-2 produced by the Hospicells (38). Possibly cross-talk between these two cells is necessary for inducing the capability of the cancer cell to respond to the messages of the stromal cell, leading to an increase of its metastatic properties.

Thus, the *de novo* expression of N-cadherin in a carcinoma following trogocytosis with stromal cells can promote a signalling cascade which is implicated in the metastatic process. During this process, cancer cells could change their phenotype to acquire more motility and invasive capabilities by the up-regulation or the acquisition of N-cadherin following tight interactions with stromal cells present in the tumour microenvironment. The MDA-MB-231 cell line used in this study is constitutively E-cadherin and N-cadherin negative but cadherin-11 positive, which confers an invasive phenotype (26). However, cadherin-11-expressing cells are not as invasive or motile as N-cadherin-expressing cells (26). Thus, the *de novo* expression of N-cadherin by this type of cell could enhance its invasive phenotype.

The correlation of the presence of Hospicells with the number of invaded lymph nodes in mammary tumours (Fig. 1) could be explained on one hand by the more invasive phenotype of the cancer cells acquired through interactions with the Hospicells. On the other hand, we recently showed that the Hospicells are immunosuppressive for the proliferation and cytokine production of T lymphocytes (42). Therefore, the Hospicells provide favourable support to tumour development in two ways.

Several works have shown the importance of the micro-environment in the development or the repression of a tumour. Moreover, in a non-pathological system, such as in the bone marrow niche, intercellular transfers between hematopoietic stem-progenitor cells (HSPC) and osteoblasts induce a down-regulation of Smad signalling, increasing the production of stromal-derived factor-1 (SDF-1), a chemokine responsible for HSPC homing to bone marrow (43).

Thus, intercellular transfers are as important in pathological conditions as in physiological systems. Here, we reinforced this idea by showing the possible acquisition of metastatic characteristics by the cancer cell through interactions with the cells in its environment. The novelty here is that interactions between stromal cells and cancer cells induce the production of a soluble factor which leads to new expression of a metastatic phenotype for the cancer cell.

Acknowledgments

This work was supported by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Université Paul Sabatier. We thank

Professor Bettina Couderc for provide us the eGFP-MDA-MB-231 cells.

References

- Weigelt B, Peterse JL and van't Veer LJ: Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5: 591-602, 2005.
- Wels J, Kaplan RN, Rafii S and Lyden D: Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev* 22: 559-574, 2008.
- Chambers AF, Groom AC and MacDonald IC: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2: 563-572, 2002.
- Levayer R and Lecuit T: Breaking down EMT. *Nat Cell Biol* 10: 757-759, 2008.
- Whelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y and Johnson KR: Cadherin switching. *J Cell Sci* 121: 727-735, 2008.
- Christofori G: New signals from the invasive front. *Nature* 441: 444-450, 2006.
- Suyama K, Shapiro I, Guttman M and Hazan RB: A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* 2: 301-314, 2002.
- Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454, 2002.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, *et al*: Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449: 557-563, 2007.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, *et al*: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438: 820-827, 2005.
- Davis DM: Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat Rev Immunol* 7: 238-243, 2007.
- Ahmed KA, Munegowda MA, Xie Y and Xiang J: Intercellular trogocytosis plays an important role in modulation of immune responses. *Cell Mol Immunol* 5: 261-269, 2008.
- Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A and Barratt-Boyes SM: Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 166: 3717-3723, 2001.
- Tabiasco J, Vercellone A, Meggetto F, Hudrisier D, Brousset P and Fournie JJ: Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J Immunol* 170: 5993-5998, 2003.
- Vanherberghen B, Andersson K, Carlin LM, *et al*: Human and murine inhibitory natural killer cell receptors transfer from natural killer cells to target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16873-16878, 2004.
- Rechavi O, Goldstein I, Vernitsky H, Rotblat B and Kloog Y: Intercellular transfer of oncogenic H-Ras at the immunological synapse. *PLoS ONE* 2: e1204, 2007.
- Caumartin J, Favier B, Daouya M, *et al*: Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J* 26: 1423-1433, 2007.
- Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Bomsel M, Wolf JP and Ziyat A: Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB J* 21: 3446-3449, 2007.
- Poupot M and Fournie JJ: Spontaneous membrane transfer through homotypic synapses between lymphoma cells. *J Immunol* 171: 2517-2523, 2003.
- Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, *et al*: Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One* 3: e3894, 2008.
- Levchenko A, Mehta BM, Niu X, *et al*: Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1933-1938, 2005.
- Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G and Palacios J: Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68: 989-997, 2008.
- Podsypanina K, Du YC, Jechlinger M, Beverly LJ, Hambardzumyan D and Varmus H: Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science* 321: 1841-1844, 2008.
- Cailleau R, Olive M and Cruciger QV: Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14: 911-915, 1978.
- Hudrisier D, Riond J, Mazarguil H, Gairin JE and Joly E: Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol* 166: 3645-3649, 2001.
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR and Wheelock MJ: N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 147: 631-644, 1999.
- Owens DW, McLean GW, Wyke AW, *et al*: The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* 11: 51-64, 2000.
- Zhao Y and Planas-Silva MD: Mislocalization of cell-cell adhesion complexes in tamoxifen-resistant breast cancer cells with elevated c-Src tyrosine kinase activity. *Cancer Lett* 275: 204-212, 2009.
- Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ and Rivard N: Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277: 8226-8234, 2002.
- Somasiri A, Wu C, Ellchuk T, Turley S and Roskelley CD: Phosphatidylinositol 3-kinase is required for adherens junction-dependent mammary epithelial cell spheroid formation. *Differentiation* 66: 116-125, 2000.
- Shintani Y, Wheelock MJ and Johnson KR: Phosphoinositide-3 kinase-Rac1-c-Jun NH2-terminal kinase signaling mediates collagen I-induced cell scattering and up-regulation of N-cadherin expression in mouse mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell* 17: 2963-2975, 2006.
- Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Svoboda R, Wheelock MJ and Johnson KR: Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J Cell Biol* 180: 1277-1289, 2008.
- Colomiere M, Findlay J, Ackland L and Ahmed N: Epidermal growth factor-induced ovarian carcinoma cell migration is associated with JAK2/STAT3 signals and changes in the abundance and localization of alpha6beta1 integrin. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1034-1045, 2008.
- Siegel PM and Massague J: Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 807-821, 2003.
- Do TV, Kubba LA, Du H, Sturgis CD and Woodruff TK: Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cancer Res* 6: 695-705, 2008.
- Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR and Wheelock MJ: Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 95-104, 2008.
- Diamond ME, Sun L, Ottaviano AJ, Joseph MJ and Munshi HG: Differential growth factor regulation of N-cadherin expression and motility in normal and malignant oral epithelium. *J Cell Sci* 121: 2197-2207, 2008.
- Pasquet M, Golzio M, Mery E, *et al*: Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 126: 2090-2101, 2009.
- Hazan RB, Kang L, Whooley BP and Borgen PI: N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 4: 399-411, 1997.
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L and Aaronson SA: Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148: 779-790, 2000.
- Kleiner DE and Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 (Suppl): S42-S51, 1999.
- Martinet L, Poupot R, Mirshahi P, *et al*: Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T cell immune responses. *Int J Cancer* 126: 2143-2152, 2009.
- Gillette JM, Larochelle A, Dunbar CE and Lippincott-Schwartz J: Intercellular transfer to signalling endosomes regulates an ex vivo bone marrow niche. *Nat Cell Biol* 11: 303-311, 2009.

Stem Cells in Therapeutic Medicine

*Baljevic M.,*Lis R.,**Gehani A.A.,***Rafi A.

*Stem Cell Laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar

**Department of Cardiology & Cardiovascular Surgery, Hamad Medical Corporation, Doha, Qatar

***Department of Genetic Medicine and Gynecology & Obstetrics, Weill Cornell Medical College, NY

Introduction:

Stem cells concept surfaced in the early 1960s from the pioneering findings of several Canadian scientists who for the first time showed a clear evidence of clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells⁽¹⁾. Conceptually however, stem cells have been with us from the very beginning. They are present at all stages of development, beginning with the zygote which can be considered the master stem cell, continuing through all embryologic stages, and ultimately staying with us in the form of organ-specific stem cells. These are responsible for the maintenance of organs through everyday "wear-and-tear" process, with some of organs shedding their cells to the great extent (e.g. daily sloughing of intestinal mucosa, high turnover of the skin, and hematopoietic cells). As the evidence continues to accumulate, there is no reason to think that stem cells do not exist in all multicellular organisms, and it is not far fetched to assume there are specific stem cells for most, if not all, tissues.

During embryological development, the blastocyst stage marks the first transition among the dividing cluster of cells, whereby specialized inner cell mass maintains the exclusive capacity to form the rest of the organism. When these inner cell mass cells are isolated and allowed to grow and replicate in vitro, they become embryonic stem cells (ESCs) (Figure 1 ESCs)⁽²⁾. Embryonic stem cells are responsible for the formation of not only all types of somatic cells but also of a germ cell line. The cells surrounding the inner mass have the task of imbedding the transforming blastocyst into the uterine wall by providing for the base of extraembryonic tissue - the placenta. This marks the implantation stage. As opposed to ESCs, stem cells that have slightly lower capacity in terms of differentiation are multipotent stem cells, such as mesenchymal stem cells.

Address for correspondence:

Muhammed Baljevic (4th Year Medical Student)

Weill Cornell Medical College in Qatar

P. O. Box 24144, Education City, Doha, Qatar

Phone: (+974) 5454 868

E-mail: mub2004@qatar-med.cornell.edu

(MSCs) (Figure 2). These cells can be used to differentiate into variety of cell types, but not all body cell types (Figure 3 and Figure 4).

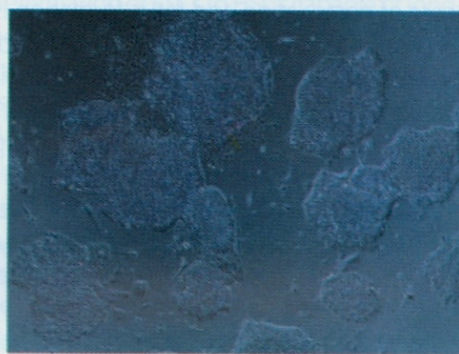


Figure 1: Embryonic Stem Cells (ESCs)

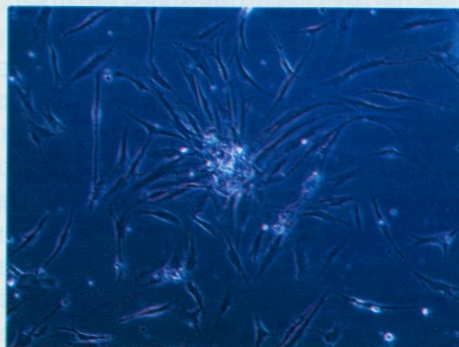


Figure 2: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in culture.

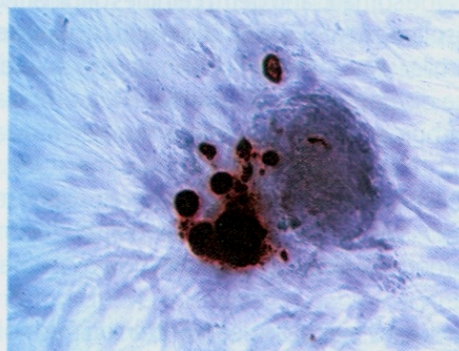


Figure 3: Adipocytes differentiated from MSCs under appropriate instructive conditions.

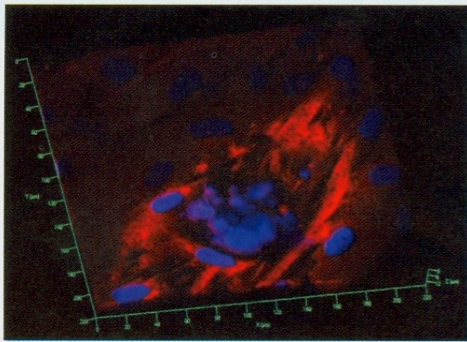


Figure 4: Osteoblasts differentiated from MSCs under appropriate instructive conditions

From the implantation stage onwards, our understanding of further embryologic development including a key process of gastrulation and fetus formation is fairly understood from the holistic, developmental standpoint. We however lack the major insight into the complicated cellular circuitry as well as the autocrine and paracrine factors that specifically govern the formation of specialized tissue types in the human body. The question of the existence of so called "multisomatic" stem cells whereby a particular tissue-specific stem cell gives rise to cell types of disparate tissues at any stage of the developments remains obscure as well. Numerous crossroads and transition stages from the ESCs to the terminally differentiated somatic cell lines are yet to be elucidated. Finally, it is as fascinating as it is unclear how the finite number of organ specific stem cells survives the demanding pressures of maturation and differentiation the vast majority of cells to follow.

Stem cells are characterized by the unique capacity not only to give rise to more stem cells - a property known as self-renewal - but also to generate differentiated progeny of one or several lineages⁽³⁾. Because of that, and according to their developmental potential, they are usually classified into several categories (*Table 1*).

Stem cell biology provides for an unprecedented way to study some of disease processes in their inception. This can be done by either mutating or repairing genes of transplantable mouse embryonic cells (mESCs) into the blastocyst, such that the resulting mouse will be a chimera formed by the somatic and germ cell lines originating from both transplanted mESCs and original blastocyst cells.

In a similar way, insertion of human genes underpinning some diseases into mESCs has yielded useful animal models of human diseases. Perhaps the best indicator of the impact this approach has made on the study of the disease is illustrated by the fact that three scientists who were responsible for the development of this technology were awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2007.

Numerous reviews have been written on the molecular biology of stem cells and the regulation of their differentiation. In this review we will only focus on the potential application of stem cells for regenerative medicine.

Potency	Capacity
Unipotent	Stem cell only able to give rise to one type of specialized cells, e.g. spermatogonial stem cells, intestinal stem cells...
Multipotent	Stem cells capable to give rise to multiple cell lines of the same lineage, e.g. hematopoietic or mesenchymal stem cells.
Pluripotent	Stem cells that can form cell types of any lineage in the body, e.g. embryonic stem cells.
Totipotent	Cells that can form extra embryonic tissue (e.g. placenta) as well as all lineages in the body, e.g. the zygote or the first cleavage blastomeres.

Table 1: Stem Cell classification in the increasing order of versatility.

STEM CELLS: Potential in Focus

Pathophysiology of disease is a complex interplay of genetic and environmental factors, but diseases considered to carry the greatest toll on the global society in terms of morbidity and mortality are at their core, problems of cellular insufficiency. Having the ability to generate clinically relevant numbers of defined cell populations from pluripotent ESCs places in our hands the basic elements for tissue repair and generation⁽⁴⁾. To this end, three basic approaches have been utilized in directing differentiation of ESCs: (1) the formation three-dimensional clusters known as embryoid bodies; (2) monolayers of ESCs cultured on extracellular matrix proteins and; (3) cultures of ESCs directly on supportive stromal layers⁽⁴⁾. These methods have yielded major advances in recapitulating the hematopoietic, cardiac, neuronal and pancreatic lineages. While these efforts have represented the most significant stride toward effective cellular therapies, new directions with alternative sources of pluripotency have launched the beginning of a new era in therapeutic stem cell therapy.

Recent years and advancing research have brought forth a breach-of concept idea of generating pluripotent ES-like cells from tissues that in theory should not contain these cells per se, or any other cell type that could conventionally give rise to them. One of the first reports confirming this showed a successful establishment of ES-like cells from germ line cells in neonatal mouse testis⁽⁵⁾. A study of human testes remarkably showed similar results, whereby human adult germline stem cells that resemble ES cells were successfully derived from spermatogonial cells of adult human testis⁽⁶⁾. Being able to derive pluripotent stem cells from the adult human testis carries significant implications for biotechnology and regenerative medicine⁽⁷⁾. This means that simple testicular biopsies may provide therapeutic medicine with a non-controversial access to individualized, cell-based therapy that escapes ethical and

immunological implications associated with human ESCs. Finally, while all of this certainly brings a lot of hope for the treatment of male patients, it still remains to be seen whether ovaries carry the similar therapeutic option for female patients.

Whereas the above-described approach entails the use of unipotent stem cells for the development of pluripotent stem cells, the latest advance in stem cell biology manages to span the borders of conventional thinking by introducing the concept of induced pluripotency (iPS). Induced pluripotent stem cells are cells that have undergone somatic cell reprogramming to a pluripotent, ES-like state⁽⁸⁾. As it was shown in the first study of this kind, this is achieved through lentiviral introduction of a defined and limited set of transcription factors (Oct3/4, Sox2, klf4 and c-myc) and culturing the transformed cells under the ES cell conditions⁽⁹⁾. The approach has since then been successfully applied on human somatic cell lines by several groups⁽¹⁰⁻¹²⁾. Importantly, recent reports have showed the iPS cells can be engineered without the use of an oncogene c-myc in the reprogramming cocktail⁽¹³⁾. In terms of potential use of iPS cells, the ideas are no different from the initially conceived ones with ES cells: patient-specific therapy, adequate vessel for pharmaceutical testing, reproducing normal development, model for human diseases and a direct stimulus for the development of new technologies. This novel approach of generating ES-like cells is entirely independent of the availability of ES cells and currently represents the mainstream of stem cell research.

Hematopoietic Stem Cells (HSCs):

Bone marrow transplants save thousands of lives each year. Unfortunately, nearly 70% of all patients awaiting bone marrow transplants fail to find an immunogenetically suitable match. HSC is a primitive cell within the bone marrow that gives rise to all lineages of the blood. Many clinical applications of HSCs would become reality if there was a good manufacturing practice (GMP) culture system that expands HSC numbers while maintaining stemness. In particular, the ex vivo expansion of human cord blood HSCs or the ability to expand and adequately differentiate HSCs derived from human embryonic stem cells (hESCs) would make this important sources of cells useful for clinical applications. This is particularly important for unique populations, such as Qatar. Due to genetic diversity and lack of a large population, the genetic pool will limit identification of immunologically matched donors for bone marrow transplantation.

Numerous attempts have been made to expand human cord blood HSCs in culture. However, up to now a serum- and cytokine-free co-culture system to maintain and expand authentic repopulating HSCs for therapeutic hematopoietic reconstitution has not been fully established. It has also been demonstrated that even putative HSCs derived from hESC, upon cytokine treatment, will not have the same functionality as HSCs isolated from

adult bone marrow. This suggests that the differentiation protocols, relying primarily on known cytokines to specify HSC differentiation are not adequate, and fail to generate functional and transplantable HSCs.

HSCs have the potential to regenerate repopulating HSCs as well as undergo programmed lineage specific differentiation into all of the components of the hematopoietic cells, including myeloid, erythroid, megakaryocytic and immune as well as vascular cells. Therefore, HSCs provide multipotent stem cells with the potential for the reconstitution of hemangiogenesis in patients⁽³⁷⁾.

Pluripotent hESC as well as pluri- or multi-potent adult stem cells (MASCs) derived from spermatogonial stem cells (SSCs)⁽¹⁴⁾ are promising alternative sources of repopulating HSCs that may allow large-scale generation of immunologically competent HSCs⁽¹⁵⁾.

Differentiation of ESCs to HSCs capable of long-term engraftment in recipient animals remains one of the greatest challenges in the field of ESC biology⁽⁴⁾. Indeed the HSCs represent a particular challenge in the field of regenerative medicine. Any potential cell therapy would need to fulfill the following requirements:

(a) Ensure a life-time engraftment in the patient with a high turnover of the hematopoietic cells. The hemangioblasts should therefore be identified and used for therapeutic purposes. However, the genetic manipulation of cells with such high turn over might have side effects such as development of neoplastic disease.

(b) Adequate maturation of the HSC population in order to give rise to the appropriate functional progenitors and subsequently to the cellular components of the different lineages. It has been demonstrated that ESC-derived HSCs and somatic HSCs have different gene expression signatures⁽¹⁶⁾. Unless we differentiate HSCs and find ways to give them the appropriate functionality, it will not be possible to use them in regenerative medicine. In addition, current approaches to generate HSCs from pluripotent or multipotent stem cells result in generation of HSCs that lack full functional capacity to home and engraft into recipient's bone marrow. These observations suggest that HSCs derived from hESCs and MASCs must undergo as of yet, unrecognized molecular and cellular reprogramming to allow efficient homing to the bone marrow, thereby allowing interaction with specific stem cell niches for successful engraftment⁽¹⁷⁾. Therefore, interaction of the HSCs with their niches may not only be important for their long-term maintenance but also their specification from pluripotent stem cells.

Even though genetic modifications of ESCs with conditionally expressed factors (Cdx4 HoxB4) do yield a multi-lineage repopulating progenitors⁽⁴⁾, the next step of trying to achieve this without genetic manipulation has yet to be achieved. Para-aortic splanchnopleura (P-Sp) is one of the early sites of hematopoiesis in the mouse embryos and is the only one responsible for generating HSCs as well as multipotential myeloid, lymphoid and

erythroid progenitors. Elucidating precisely the pathway that guides the development of P-Sp hematopoiesis will be a prerequisite for successful generation of clinically relevant populations of HSCs.

Cardiovascular Regenerative Medicine:

Heart disease is one of the leading cause of death in Qatar and worldwide. Afflicting millions annually, ischemic heart disease (IHD) serves as a source of significant morbidity and mortality⁽¹⁸⁾. The end result of ischemic myocardial damage has long been considered irreversible, as cardiomyocytes have been viewed as terminally differentiated and nonproliferating. Stem cell transplantation is currently generating a great deal of interest in the treatment of IHD as the replacement of akinetic scar tissue by viable myocardium should improve cardiac function, impede progressive left ventricular remodeling and revascularize ischemic areas.

The primary task in cardiovascular field has been to generate ESC-derived cardiomyocytes that would be able to replace damaged cardiac tissue after a major insult such as myocardial infarction. Several groups have shown so far that human ESCs can be effectively induced under defined serum-free medium conditions (supplemented with activin and BMP4) to form cardiomyocytes⁽¹⁹⁾. These cells demonstrate similar electrophysiological and contractile properties to that of native cardiac cells. After transplantation studies, it became apparent that transplanted cells have the capacity to incorporate effectively to the delivery region, hypertrophy and normalize electrophysiologic function of the effected region of the myocardium. Different sources of pluripotent cells have been used so far in the treatment of IHC beside the embryonic stem cells. Bone marrow derived stem cells describe several cell populations that have the capacity to differentiate and proliferate into varying cell types, including HSC, MSCs, endothelial progenitor stem cells (EPC), and others.

Some cell types retain an ability to differentiate into mature cardiomyocyte-like cells. Cells expressing CD34 or CD 133 or both on their cell surface have the ability to differentiate into functional cardiac cells after transplantation into damaged myocardium⁽²⁰⁾. MSCs have similarly been shown to differentiate into functional cardiomyocytes and to improve left-sided heart function^(21, 22).

Bone marrow cell transplantation seems to lead to smaller infarct sizes and improved long-term myocardial function. Indeed, it has been demonstrated that BMCs engraft, survive, and proliferate interacting with resident myocardium. Stem cells may also exert their benefits through paracrine effect, serving as a reservoir for vascular progenitors⁽²³⁾. The results of this study importantly emphasize the therapeutic role of BMCs in the treatment of heart failure.

Tissue-specific stem cells (TSSCs) include several partially differentiated cell populations that demonstrate the intrinsic ability to proliferate into cells resembling their tissue of origin. Examples of some TSSC include resident

myocardial stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and umbilical cord derived stem cells. TSSC avoid an immune response following delivery. In the field of cardiology this has resulted in a paradigm shift in our understanding of the heart and response to ischemic injury. The classical belief that the heart is a terminally differentiated organ has since become challenged. Beltrami et al described a population of resident cardiac myocytes with mitotic activity within peri-infarct cardiac tissue of rats following ischemic injury⁽²⁴⁾. These multipotent cells were c-kit positive. Upon injection into ischemic rat hearts, the cells participated in the reconstitution of well differentiated cardiac myocytes with vasculogenesis. Other studies confirmed the findings of similar resident cardiac progenitor cells^(25, 26). Nevertheless, our knowledge does not allow the use of resident cardiac stem cells for restorative capacity or for areas of damaged myocardium in clinical practice.

Stem cell therapy in cardiac disease is expecting further challenges. For example, transplanted cardiomyocytes display a high rate of apoptosis. It has been suggested that the vascular supply limitation might be the cause of such phenomenon. Indeed, cultured cardiomyocytes that incorporate more vascular structures in vivo demonstrate significantly greater survival⁽²⁷⁾. Therefore, increasing capillary density through angioblast-dependant neovascularization will probably be mandatory for tissue cell repair. Other clinical parameters such as the timing, concentrations, source and route of delivery of the cells have to be addressed in pre-clinical model as well as Phase I type of trial after addressing all ethical issues.

Finally, it seems mandatory that the synergistic cellular therapies would rely on additional pharmacological strategies aiming at providing the most favorable environment for cardiomyocytes and endothelial differentiation, over fibroblast proliferation and collagen secretion.

Pancreatic Regeneration for Diabetes:

The prospect of being able to grow insulin-producing pancreatic β -cells has spurred the exciting promise of being able to treat DM Type I. The work in this arena has offered the conclusion that the key lies in fully deciphering the events that regulate the embryologic development of pancreas. Initial experimental efforts to derive pancreatic cells with hESCs yielded perhaps more immature progenitors of β -cells, as the produced cells shared many characteristics with endogenous β -cells but were non-responsive to glucose⁽²⁸⁾. Subsequent groups have however been able to surpass this obstacle by creating cells that responded to glucose by secreting C-peptide⁽²⁹⁾ - this being the focal feature of mature β -cells. Important lesson that has been learned so far is the fact that when hESCs are co-transplanted with mouse pancreatic tissue but not with fetal liver or telencephalon cells, they will give rise to insulin-positive cells⁽³⁰⁾. Nevertheless, a major hurdle still remains in the development of culture conditions that will enable efficient maturation of the population to the end stage functional β -cells⁽⁴⁾.

Much of the analysis of the developmental time line of pancreatic beta cells has been focused on whether the exact origin of beta cells resides in the stem-cell progenitors or some other cell population capable of transforming into functional endocrine tissue.

Analysis of some recent studies seem to suggest that pre-existing β -cells, rather than pluripotent stem cells, are the major source of new β -cells during adult life and after pancreatectomy in mice⁽³¹⁾. This study that introduced a method for genetic lineage tracing to determine the contribution of stem cells towards a tissue of interest, in this case pancreas, further concluded that pre-existing β -cells are the major source for new β -cells during adult life, as well as during regeneration from partial pancreatectomy. This as a result poses a challenge to the notion that adult stem cells play any significant role in the maintenance of β -cell homeostasis. These experiments provide solid evidence that terminally differentiated β -cells retain a proliferative capacity that can account for turnover and expansion throughout⁽³¹⁾.

One of the more challenging goals of regenerative medicine is to instructively reprogram adult, differentiated cells into other cell types for therapeutic purposes. There are isolated examples of how this is achieved; for example, studies with embryonic cells have shown that dermal fibroblasts and retinal epithelial cells can be converted into muscle-like cells⁽³²⁾, and pancreatic tissue to liver⁽³³⁾. However, there is no clear understanding of the underlying paradigm of how to complete the transformation process in a controlled fashion.

Recent study has utilizing a strategy of re-expressing key developmental regulators in vivo, identified a specific combination of transcription factors (Ngn3/Neurog3, Pdx1 and Mafa) that result in reprogramming of differentiated pancreatic exocrine cells in adult mice, into cells that closely resemble β -cells. These induced β -cells are virtually indistinguishable from endogenous islet β -cells in size, shape and ultrastructure. They express genes essential for β -cell function and can ameliorate hyperglycaemia by remodelling local vasculature and secreting insulin⁽³⁴⁾.

The approach utilized in this study provides a successful example of cellular reprogramming using defined factors in an adult organ. The experiments were carried out in vivo such that any transformation that may yield induced β -cells leaves them in their native environment - something that would certainly increase the chances of their maturation and/or survival. This approach also puts forth the general principle of how to avoid the strategy of transient resetting to a pluripotent stem cell intermediate, that is subsequently further used to achieve final target cell transformation. This certainly reduces the number of manipulation steps and reduces the risk of uncontrolled outcomes.

Pancreatic exocrine and β -cells as might be expected, share a good part of their epigenetic constitution, which is why the reprogramming of the exocrine pancreas occurred relatively quickly, with first cells being recognized

after 3 days. This is in contrast to iPS cell transformation that deals with epigenomes of vastly disparate cell populations (starting fibroblasts and target-cell population), such that the similar process commonly takes place in 7-30 days. Furthermore, efficiency rate of 20% that follows exocrine pancreas transformation is several orders of magnitude higher than the common transformation rate of iPS cells (0.1 %)⁽³⁴⁾.

Challenges Facing Stem Cell Therapeutics:

Dealing with sources of pluripotent progenitors conceptually brings the same amount of uncertainty and risk together with great prospective. The very same plasticity that allows ESCs to form vast number of clinically relevant cell types makes them difficult to manage. Immediate safety concern is the fact that pluripotent cells are defined by their ability to form teratomas - tumors derived from all three germ layers. Some studies also raise the concern for excessive proliferation of transplanted progenitors⁽³⁵⁾. Both problems however could be solved with improvements in purification protocols, which would screen for the presence of undifferentiated progenitors. Other problem that follows the transplantation of cells whether it is intended for cardiovascular repair, treatment of Parkinson's disease, islet cell transplantation for diabetes or myogenic precursor transplantation for muscular dystrophy, is the problem of cell death⁽⁴⁾. Perhaps improving the pro-survival cocktail associated with the transplant is a way to improve the efficiency of the procedure, but this may provide for a drawback of uncontrolled proliferation. There is always a question of adequate model for preclinical testing as well. Current stem cell therapy is focused for therapeutics targeted at treating the disease once it is full blown. This kind of approach precludes the use of stem cells in prevention of the disease. The future quality control is also likely to be expensive.

The challenges following iPS technology raise a number of interesting questions⁽³⁶⁾: can cells of other lineages such as endoderm-derived epithelial cells or ectoderm-derived keratinocytes be differentiated to a pluripotent state as well? How complicated is the induction of proliferation going to be in terminally differentiated cells such as neurons? Ultimately, the introduction of reprogramming factors to the target cells depends on the lentiviral transduction approach - something that carries a risk of insertional mutations or activation of oncogenes.

Conclusion:

Stem cell biology has advanced to the point where therapeutic potential of ESCs and other stem cells is well on its way of being tested. At this point, it is crucial for the general public and legislative power to understand the fundamentals of stem-cell biology. The scarcity of public funds stemming from misinformation and misrepresentation of stem cell research has been the major obstacle in its continued development. Moreover, the physicians need to recognize that this knowledge has already altered and

will continue to change the way we think about, not only the origin of tissues and their regeneration, but also our understanding of normal physiology and disease process in particular. Studies of the available embryonic stem cell lines and those that could come with time are expected to exert a major impact in the arena of pharmaceutical research and development of cell-based therapies. This will allow for more efficient screening of novel and better drug treatments directly on human cells.

Latest progress in the cellular reprogramming to pluripotent state brings a new appreciation of the potential

to re-differentiate "what has differentiated long ago" during developmental process - terminally committed somatic cells. However, it is still premature to predict where this will take us in terms of understanding intimate cellular processes that govern cell fates through their existence, all up until their senescence and eventual death. The key obstacle remains our limited insight into molecular processes occurring during reprogramming. Nevertheless, this kind of research certainly assures to advance what at this point seems to be rather promising future for stem cell therapeutics.

References:

1. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197: 452-454.
2. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-7638.
3. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 2000; 287: 1442-1446.
4. Charles E. Murry and Gordon Keller (2008). Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell* 132, 661-680.
5. Kanatsu-Shinohara M (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119(7): 1001-1012.
6. Sabine Conrad (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*. doi:10.1038/nature07404.
7. De Rooij DG. Rapid expansion of the spermatogonial stem cell tool box. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 7939-7940 (2006).
8. Shin-Ichi Nishikawa (2008). The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature*. doi: 10. 1038/nrm2466.
9. Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
10. Takahashi K (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
11. Yu J et al (2007). Induced pluripotent stem cells from adult human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
12. Lowry WE et al (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 2883-2888.
13. Nakagawa M et al (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol* 26, 101-106.
14. Seandel M et al (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+germline progenitors. *Nature*. 2007 Sep 20; 449(7160): 346-350.
15. Zambidis ET. et al. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematopoietic, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3): 860-870.
16. Wang L, Menendez P, Shojaei F, Li Li, Mazurier F, Dick JD, Cerdan C, Krysta Levac, and Mickie Bhatia. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J. Exp. Med.*, May 2005; 201: 1603-1614.
17. Kabrun et al. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. 1997 May; 124(10): 2039-2048.
18. Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics: 2008 update - a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; 117: e25-e146.
19. Laflamme, M.A. et al. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* 25, 1015-1024.
20. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 221-229, discussion 229-230.
21. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, et al. Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 56: 77-82.
22. Grauss RW, Winter EM, van Tuyn J, et al. Mesenchymal stem cells from ischemic heart disease patients improve left ventricular function after acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2438-H2447.
23. Rota M, Kajstura J, Hosoda T, et al. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 17783-17788.
24. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.
25. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004; 95: 911-921.
26. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al. Postnatal Isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433: 647-653.
27. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE (2001) Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 33: 907- 921.
28. D'Amour KA et al (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.
29. Jiang, J Au et al (2007). Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 5, 1940-1953.
30. Brolen GK, Heins N, Edsbagge J, and Semb H (2005). Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* 54, 2867-2874.
31. Yuval Dor, Juliana Brown, Olga I. Martinez & Douglas A. Melton. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004 May 6; 429(6987): 41-46.
32. Choi J et al. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 7988-7992 (1990).
33. Shen, C. N., Slack, J. M. & Tosh, D. Molecular basis of trans-differentiation of pancreas to liver. *Nature Cell Biol.* 2, 879-887 (2000).
34. Qiao Zhou, Juliana Brown, Andrew Kanarek, Jayaraj Rajagopal & Douglas A. Melton. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to b-cells. *Nature* 2008 Oct 2; 455(7213): 627-632.
35. Roy, N.S. et al. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12, 1259-1268.
36. Rudolf Jaenisch and Richard Young (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
37. Lensch MW, Daley GQ (2006). Scientific and clinical opportunities for modeling blood disorders with embryonic stem cells. *Blood Apr 1; 107(7): 2605-2612.*

Titre : Implication du microenvironnement sur la survenue de la maladie métastatique et l'apparition d'une maladie résiduelle dans les adénocarcinomes ovariens séreux.

Résumé: Trop souvent diagnostiqués à des stades tardifs du fait de leur quasi asymptotie, les adénocarcinomes séreux ovariens posent un véritable problème de santé publique.

Malgré les progrès récents de prise en charge chirurgicale, l'émergence d'une maladie résiduelle microscopique chimiorésistante impacte grandement le pronostic des patientes.

Le microenvironnement tumoral est un acteur clé de la progression tumorale et de l'émergence de résistances aux traitements anticancéreux. Durant ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à deux composants majeurs du stroma tumoral, d'une part les cellules souches mésenchymateuses, d'autre part les cellules endothéliales.

Nous avons pu démontrer que les cellules souches mésenchymateuses participent à la progression tumorale et l'émergence de résistances. Enfin nous avons démontré que les cellules endothéliales, via la production de facteurs angiocrines, participent à la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes.

Dans ce travail, nous avons pu définir de nouvelles cibles thérapeutiques mettant en jeu la relation entre les cellules tumorales ovariennes et l'hôte.

Mots clés : cancer de l'ovaire, chimiorésistance, microenvironnement tumoral, cellules souches mésenchymateuses, cellules endothéliales.

Title : Role of ovarian cancer microenvironment in metastatic disease progression and chemoresistance.

Abstract: Ovarian cancers constitute a poor prognosis disease. Due to their absence of symptoms, ovarian cancers are generally diagnosed at late stages. Despite major breakthrough regarding ovarian cancer surgery, minimal residual disease-induced relapse is still a hurdle for clinicians.

Tumor microenvironment is a key actor on disease progression and resistance to therapy. In this study, we have focused on two major components of the tumor stroma, on one hand, the mesenchymal stem cells, and the endothelial cells on the other hand.

We were able to demonstrate that mesenchymal stem cells are critically involved in ovarian cancer progression and resistance to therapy, while the endothelium, through production of angiocrine factors, is deeply involved in resistance of ovarian cancer cells to platinum and taxane based therapy.

Here, we set forth the idea that disrupting the relationship between ovarian cancer cells and their host stroma constitute a new therapeutic window.

Key words: ovarian cancer, chemoresistance, tumor microenvironment, mesenchymal stem cells, and endothelial cells.

Centre de recherches des Cordeliers – INSERM UMRS872

Resistance des cellules tumorales - Equipe 18

15 rue de l'école de médecine

75006 Paris.