



HAL
open science

Influence de sécrétions ascitiques sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes : identification de cibles moléculaires adhésives.

Ludovic Carduner

► **To cite this version:**

Ludovic Carduner. Influence de sécrétions ascitiques sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes : identification de cibles moléculaires adhésives.. Sciences agricoles. Université de Cergy Pontoise, 2013. Français. NNT : 2013CERG0658 . tel-00958464

HAL Id: tel-00958464

<https://theses.hal.science/tel-00958464>

Submitted on 27 Nov 2014

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.

THESE

Présenté par

Ludovic CARDUNER

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE CERGY-PONTOISE

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Sur le sujet :

**Influence de sécrétions ascitiques sur le comportement des cellules
cancéreuses ovariennes: identification de « cibles moléculaires adhésives ».**

Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules EA 1391

Soutenue le 20 décembre 2013

Membres du jury

Bettina COUDERC, Professeur, Université de Toulouse Paul Sabatier	Rapporteur
Sylvie RICARD-BLUM, Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Laurent MARTINY, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne	President de jury
Pascal GAUDUCHON, Professeur, Université de Caen Basse Normandie	Examineur
Marc POCARD, Professeur, Université Paris 7	Examineur
Franck CARREIRAS, Professeur, Université de Cergy Pontoise	Directeur de thèse
Sabrina KELLOUCHE-GAILLARD, Docteur, Université de Cergy Pontoise	Co-encadrant de thèse



UNIVERSITE DE CERGY-PONTOISE

Ecole doctorale Sciences et Ingénierie

THESE

Présenté par

Ludovic CARDUNER

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE CERGY-PONTOISE

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Sur le sujet :

**Influence de sécrétions ascitiques sur le comportement des cellules
cancéreuses ovariennes: identification de « cibles moléculaires adhésives ».**

Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules EA 1391

Soutenue le 20 décembre 2013

Membres du jury

Bettina COUDERC, Professeur, Université de Toulouse Paul Sabatier	Rapporteur
Sylvie RICARD-BLUM, Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Laurent MARTINY, Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne	President de jury
Pascal GAUDUCHON, Professeur, Université de Caen Basse Normandie	Examineur
Marc POCARD, Professeur, Université Paris 7	Examineur
Franck CARREIRAS, Professeur, Université de Cergy Pontoise	Directeur de thèse
Sabrina KELLOUCHE-GAILLARD, Docteur, Université de Cergy Pontoise	Co-encadrant de thèse

Ce travail a été effectué grâce au financement d'un contrat doctoral par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, et l'Université de Cergy Pontoise.

Le projet a été en partie financé par le comité du Val d'Oise de la Ligue Contre le Cancer.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire ERRMECe (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule), et plus particulièrement dans l'équipe Matrice Extracellulaire, Comportement cellulaire et Physiopathologie (MEC-uP), coordonnée par le Professeur Franck Carreiras.

Je tiens à remercier vivement les deux rapporteurs qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : le Professeur Bettina Couderc, chercheur de l'unité EA 4553-Individualisation des traitements des cancers ovariens à l'institut Claudius Regaud (ICR) de Toulouse, et le Professeur Sylvie Ricard-Blum, responsable de l'équipe Réseaux d'interactions extracellulaires au sein de l'UMR 5086-Bases Moléculaires et Structurales des Systèmes Infectieux à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) de Lyon.

Je remercie également le Professeur Pascal Gauduchon, chercheur au sein de l'équipe Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Agressifs (BIOTICLA) à Caen, le Professeur Laurent Martiny, responsable de l'équipe Récepteurs matriciels, signalisation et régulation de la protéolyse au sein du laboratoire Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC) à Reims, et le Professeur Marc Pocard, directeur de l'unité INSERM U965 Angiogenèse et recherche translationnelle à Paris, d'avoir acceptés de participer au jury de thèse.

Je remercie les Professeurs Véronique Larreta-Garde et Olivier Gallet, directeurs du laboratoire ERRMECe au cours de ma thèse, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je souhaite également remercier le Dr Villefranques de l'hôpital René Dubos, le Dr Fromantin de l'Institut Curie et le Dr. Blanc-Fournier du Centre de lutte contre le cancer François Baclesse qui nous ont permis d'avoir accès à des échantillons d'ascites au cours de cette étude.

Je voudrais remercier vivement le Pr. Franck Carreiras, directeur de ma thèse. C'est la qualité de vos enseignements au cours de la Licence qui a développé mon intérêt pour la biologie cellulaire. J'ai ensuite réalisé plusieurs stages dans votre équipe, qui nous ont permis de construire précisément le projet de ma thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre écoute au cours de l'avancé de ce projet. Merci de m'avoir donné l'opportunité de participer à plusieurs congrès et de m'avoir intégré dans le développement de projets en collaborations avec d'autres laboratoires. Je souhaite à beaucoup de doctorants d'avoir un directeur de thèse comme vous.

Je remercie le Dr. Sabrina Kellouche, co-encadrante de ma thèse, pour sa participation dans la rédaction de ma thèse et notamment pour les relectures attentives. Merci également, d'avoir pris en main la rédaction d'un des articles de ma thèse.

Je remercie vivement Cédric Picot. Ton coaching a commencé dès mon Master, lorsque j'ai eu à faire ma première présentation orale pour un congrès, puis tu as toujours été présent par la suite. Tu m'as transmis ton rythme de manip, une organisation exemplaire et surtout ton savoir-faire pour rendre les Powerpoints « s... ». Je te remercie également pour ta disponibilité, ton bureau est toujours resté ouvert pour répondre à mes nombreuses questions. Merci pour tes visites régulières chez les thésards où tu en profitais pour donner un petit commentaire toujours très constructif sur la manipulation en préparation ou le paragraphe en rédaction. Si cette thèse s'est si bien passée, c'est aussi parce tu y es pour beaucoup.

Je remercie Johanne, Charlotte et Olivier pour les nombreuses discussions que nous avons partagées au cours des réunions d'équipe.

Merci à l'équipe de sport d'ERRMECe composée d'Agnès, Damien, Adeline, Charlotte et Cédric. Au cours de cette thèse, j'ai pu grâce à vous repousser mes limites en réalisant plusieurs semi-marathons, plus de 150 km de vélo en une journée, 54 km de marche de nuit au mois de janvier et de nombreuses autres courses sur des terrains souvent très accidentés.

Mes remerciements s'adresse ensuite aux autres membres passés ou présents d'ERRMECe : Michel pour m'avoir toléré très souvent dans ton bureau, Patrick pour tes encouragements, Isabelle, Rémy, Elodie, Christophe et Cécile pour votre aide au quotidien et Julien F pour tout ce que tu m'as transmis avec une très grande patience. Merci à l'équipe des thésards, Lyvia, Elodie, Rumezsa et Eléonore pour votre présence nécessaire lors des moments de décompression.

Merci également à la prépa-bio pour votre gentillesse et votre efficacité.

Enfin, un très grand merci à ma famille et à mes amis pour m'avoir accompagné au cours de cette thèse. Votre soutien et vos encouragements ont été très importants.

Liste des abréviations

Liste des abréviations utilisées

Ac : Anticorps

Adh : Adhérentes

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AKT : Protéine kinase B

ARN : Acide Ribonucléique

Asc : Ascite

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Brca (1 et 2) : Breast Cancer-1 et -2

BSA : Bovine Serum Albumin

CAF : Cancer Associated Fibroblast

CD : Cluster of Differentiation

Cdk : Cyclin-Dependent Kinase

Chx : Cycloheximide

Coll : Collagène

CSC : Cellule Souche Cancéreuse

DAPI : 4,6-diamidino-2-phénylindole

DLS : Dynamic Light Scattering

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E- ; N-cadhérine : Ephitéliale- ; Neurale-cadhérine

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EOS : Epithélium Ovarien de Surface

ERK : Extracellular signal-Regulated kinases

FACIT : Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices

FAK : Focal Adhesion Kinase

FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrie

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FLIP : FLICE (caspase 8)-Inhibitory Proteins

Fn : Fibronectine

Fnc : Fibronectine cellulaire

Fnp : Fibronectine plasmatique

FSH : Follicle-Stimulating Hormone

GAG : Glycosaminoglycane

GTP : Guanosine Triphosphate

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HGSOC : High-Grade Serous Ovarian Carcinoma

IGF : Insulin-like Growth Factor

IL : Interleukine

JNK : Jun amino-terminal Kinase

kDa : Kilo Dalton

LH : Luteinizing Hormone

LYVE : Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronic acid receptor

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia sequence 1

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MKP : Map Kinase Phosphatase

MMP : Matrix MetalloProteinase

MMR : DNA MisMatch Repair

NC : séquence Non hélicoïdale du Collagène

NFκB : Nuclear Factor-kappa B

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

PARP : Poly ADP Ribose Polymerase

PBS : Phosphate Buffered Saline

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PDI : PolyDispersity Index

PDK 1 et 2 : Phosphoinositide-Dependent Kinase-1 et -2

PFA : Paraformaldéhyde

PG : Protéoglycanes

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

PIP2 : PhosphatidyInositol 4,5-bisPhosphate

PIP3 : PhosphatidyInositol (3,4,5)-trisPhosphate

PKC : PKA : Protéine Kinase C ou A

PMA : Phorbol Myristate Acetate

PMSF : Phénylméthanesulfonyl fluoride

PNPP : Para-nitrophénylphosphate

PTEN : Phosphatase and Tensin homolog

RAD : Arginine-Alanine-Aspartate

Rb : Rétinoblastome

RGD : Arginine-Glycine-Aspartate

RH : Rayon Hydrodynamique

ROS : Reactive Oxygen Species

RTK : Récepteurs à activité Tyrosine Kinase

SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor 1

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SPARC : Secreted Protein Acidic Rich Cysteine (osteonectin)

STIC : Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma

STP : Staurosporine

SVF : Sérum de Veau Foetal

TBS : Tris Buffered Saline

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF : Transforming Growth Factor

TIMP : Tissue Inhibitor of MetalloProteinase

TME : Transition Mésoenchymato-Epithéliale

TMB : Tétraméthylbenzidine

TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand

uPA : Urokinase-type Plasminogen Activator

uPAR : Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Vn : Vitronectine

Table des illustrations

Table des illustrations

Figure 1 Le matrisome et ses sous-catégories.	10
Figure 2 Assemblages supramoléculaires des collagènes.	11
Figure 3 Diversité des protéoglycanes.	11
Figure 4 Rôles des protéoglycanes.	12
Figure 5 Structure primaire de la fibronectine.	13
Figure 6 Principales étapes de la fibrillogenèse de la fibronectine.	15
Figure 7 Structure primaire de la vitronectine.	16
Figure 8 Modèle de transition de conformation de la vitronectine.	17
Figure 9 Répertoire des intégrines liant des protéines de la matrice extracellulaire.	20
Figure 10 Signalisation bidirectionnelle des intégrines.	21
Figure 11 Organisation des différentes structures d'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire.	23
Figure 12 Représentation schématique de l'organisation des molécules constituant l'adhésome.	24
Figure 13 Les intégrines induisent des voies de survie et des voies pro-apoptotiques.	25
Figure 14 Voie de signalisation des MAPK.	27
Figure 15 Voie de signalisation des PI3K/AKT.	28
Figure 16 Interconnexion des voies de signalisation constituant l'adhésome.	29
Figure 17 Localisation anatomique des ovaires.	33
Figure 18 Rupture de l'EOS lors de l'ovulation.	33
Figure 19 Localisation des Fimbriae.	34
Figure 20 Coupe transversale de la cavité péritonéale.	34
Figure 21 Organisation structurale du péritoine.	34
Figure 22 Sous-types des cancers ovariens et leur fréquence relative.	36
Figure 23 Observation histologique des principaux sous-types des cancers de l'EOS.	36
Figure 24 Modifications génétiques associées aux différents sous-types de cancer de l'épithélium ovarien.	36
Figure 25 Sélection clonale des cellules cancéreuses.	40
Figure 26 Localisation des STIC (Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma).	42
Figure 27 Le foyer tumoral ovarien.	44
Figure 28 Modèle de la progression tumorale ovarienne.	47
Figure 29 L'hétérogénéité des phénotypes épithéliaux et mésenchymateux révèle la plasticité des cellules cancéreuses ovariennes.	49
Figure 30 La transition épithélio-mésenchymateuse et la dissémination intrapéritonéale.	49
Figure 31 Origine des cellules souches cancéreuses.	49

Figure 32 Enrichissement de la population cellulaire en cellules souches cancéreuses lors de la perte d'ancrage.	50
Figure 33 Induction de la mort cellulaire lors de la perte d'ancrage à la matrice extracellulaire (MEC).	51
Figure 34 La transition épithélio-mésenchymateuse participe à la résistance à l'anoïkis.	51
Figure 35 Proportion du phénotype épithéliale (E) ou mésenchymateux (M) des cellules cancéreuses en suspension au cours de traitements.	53
Figure 36 Résistance aux traitements des cellules en sphéroïdes.	53
Figure 37 Implantation péritonéale de cellules cancéreuses ovariennes.	55
Figure 38 L'altération du péritoine lors de l'implantation des cellules cancéreuses ovariennes conduit à la production d'ascite.	58
Figure 39 Hétérogénéité des cellules isolées à partir des ascites de patientes.	59
Figure 40 Dissémination des cellules cancéreuses ovariennes par les courants ascitiques.	61
Figure 41 Schéma bilan de l'influence de l'ascite sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes.	62
Figure 42 Formation et viabilité des sphéroïdes d'adénocarcinomes ovariens.	67
Figure 43 Effet de la perte d'ancrage des cellules sur l'expression de molécules de mort et de survie cellulaire.	69
Figure 44 La phosphorylation d'ERK1/2 est nécessaire pour la survie des cellules cancéreuses ovariennes en sphéroïdes.	70
Figure 45 Les signalisations induites par les PKC sont impliquées dans la résistance à l'anoïkis.	71
Figure 46 Importance de l'expression des intégrines αv dans la résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis.	72
Figure 47 Les signalisations de la PKC et des intégrines αv conduisent à l'activation d'ERK1/2.	72
Figure 48 Schéma illustrant les signalisations permettant la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses ovariennes organisées en sphéroïdes.	73
Figure 49 Modifications morphologiques des cellules cancéreuses ovariennes cultivées en ascite.	76
Figure 50 Localisation de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux des cellules cancéreuses ovariennes après incubation en ascite.	77
Figure 51 Influence de l'ascite sur les comportements cellulaires.	79
Figure 52 L'ascite modifie la résistance à l'anoïkis des cellules IGROV1.	80
Figure 53 Caractérisation des métalloprotéases ascitiques.	81
Figure 54 Localisation des intégrines αv et détermination de leur influence dans la formation de sphéroïdes de cellules IGROV1.	82
Figure 55 Localisation des intégrines αv et influence sur la migration des cellules SKOV3.	83
Figure 56 Importance des intégrines αv dans la formation de colonies par les cellules cancéreuses ovariennes.	84
Figure 57 Schéma illustrant l'influence de l'ascite sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes.	85
Figure 58 Caractérisation de la vitronectine (Vn) et de la fibronectine (Fn) dans les ascites.	88
Figure 59 Schéma de purification de la Fn et de la Vn à partir d'un même échantillon d'ascite.	88
Figure 60 Purification combinée de la Fn et de la Vn ascitiques.	89
Figure 61 Analyse de la pureté et des fragments de la Fn et de la Vn ascitiques.	90

Figure 62 Spectre d'émission de fluorescence des tryptophanes de la Fn et de la Vn ascitiques et distribution des tailles de la Fn ascitique.	91
Figure 63 Cellules cancéreuses en environnement ascitique: prolifération et organisation de la Vn et de la Fn ascitiques.	92
Figure 64 L'ascite constitue un réservoir de Vn et de Fn pour les cellules cancéreuses ovariennes.	93
Figure 65 Adhérence et migration des cellules cancéreuses ovariennes avec les protéines ascitiques purifiées.	94
Figure 66 Remodelage des protéines ascitiques purifiées par les cellules cancéreuses ovariennes et localisation des intégrines αv et $\beta 1$ après 6h d'adhérence.	95
Figure 67 Remodelage des protéines ascitiques purifiées par les cellules cancéreuses ovariennes et localisation des intégrines αv et $\beta 1$ après 48h d'adhérence.	96
Figure 68 La Fn et la Vn ascitiques induisent une résistance à l'anoïkis par les cellules cancéreuses ovariennes.	97
Figure 69 Schéma de conclusion.	110
Figure 70 Lignées cellulaires d'adénocarcinome ovarien cultivées en condition adhérente.	113
Figure 71 Principe de l'analyse par diffusion dynamique de la lumière	123

Tableau 1 Interaction entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les intégrines.	26
Tableau 2 Classification FIGO des différents stades des cancers de l'ovaire.	37
Tableau 3 Analyse semi-quantitative de l'expression et de l'organisation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux.	78
Tableau 4 Dosage ELISA de la pro-MMP-2, de la Vn et de la Fn dans les ascites de patientes et dans les plasmas de donneurs sains.	81
Tableau 5 Volume, pureté, quantité de protéines purifiées et temps nécessaires pour la purification de la Vn et de la Fn à partir de plasma ou d'ascites.	90
Tableau 6 Diffusion dynamique de la lumière de la Fn plasmatique et ascitique.	91
Tableau 7 Anticorps utilisés pour la réalisation des marquages immunofluorescents.	117
Tableau 8 Anticorps utilisés pour la réalisation des western blots.	119

Table des matières

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	1
AVANT-PROPOS	4
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
<i>Chapitre 1 - Implication de la matrice extracellulaire (MEC) dans les interactions cellules- microenvironnement</i>	8
1. <i>Biologie de la matrice extracellulaire.....</i>	9
1.1. La MEC.....	9
1.1.1. Définition.....	9
1.1.2. Le Matrisome, une vue d'ensemble de la MEC	9
1.1.3. Les collagènes.....	10
1.1.4. Les protéoglycanes	11
1.1.5. Les glycoprotéines adhésives	12
1.2. La Fibronectine	13
1.2.1. Distribution et structures	13
1.2.2. Fonctions biologiques.....	15
1.3. La Vitronectine	16
1.3.1. Distribution et structures	16
1.3.2. Fonctions biologiques.....	18
2. <i>Interactions cellules-microenvironnement matriciel.....</i>	19
2.1. Les récepteurs d'adhérence cellulaire.....	19
2.1.1. Les intégrines.....	20
2.1.2. Les autres récepteurs	22
2.1.3. Dynamique des structures d'adhérence, notion d'adhésome.....	23
2.1.4. Intégrines et cancer	24
2.2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase.....	25
2.3. Induction de signalisation.....	26
2.3.1. La voie MAPK.....	26
2.3.2. La voie PI3K/AKT.....	28
2.3.3. Interconnexions des voies de signalisations	29
<i>Chapitre 2 - Les cancers de l'ovaire</i>	31
1. <i>Généralités sur les cancers ovariens</i>	32
1.1. Données épidémiologiques	32
1.2. Généralité sur l'ovaire	32
1.2.1. Notion anatomique	33
1.2.2. L'épithélium ovarien de surface	33
1.2.3. L'environnement des ovaires	34
1.2.4. Origine embryonnaire et différenciation.....	34
1.3. Les tumeurs de l'ovaire	35
1.3.1. Etiologie des cancers de l'ovaire	35

1.3.2.	Hétérogénéité / Classification	36
1.3.3.	Stade de dissémination et grade	37
1.3.4.	Les traitements des cancers ovariens.....	38
2.	<i>Importance de la MEC et des interactions cellulaires lors de la dissémination des tumeurs épithéliales de l'ovaire</i>	40
2.1.	Foyer primaire	40
2.1.1.	Cancérogenèse de l'épithélium ovarien de surface.....	40
2.1.2.	Organisation du foyer tumoral	42
2.2.	Dissémination intrapéritonéale des cellules cancéreuses ovariennes	46
2.2.1.	L'organisation en sphéroïdes.....	47
2.2.2.	Survie des sphéroïdes.....	50
2.3.	Les métastases péritonéales	53
2.3.1.	Le microenvironnement péritonéal.....	54
2.3.2.	Implantation des cellules cancéreuses	55
	Chapitre 3 - L'environnement ascitique des cellules cancéreuses ovariennes	56
1.	<i>Définition de l'ascite</i>	57
1.1.	Conditions de formation de l'ascite	57
1.1.1.	Pathologies associées	57
1.1.2.	Description clinique.....	57
1.1.3.	Mécanisme de formation	58
1.2.	Composition de l'ascite	59
1.2.1.	Composante cellulaire.....	59
1.2.2.	Composante moléculaire.....	59
2.	<i>Influence de l'ascite sur les cellules cancéreuses ovariennes</i>	61
2.1.	Impact sur la dissémination.....	61
2.2.	Modification des comportements cellulaires.....	62
	PRESENTATION DES RESULTATS	64
	<i>Etude des mécanismes de résistance à l'anoïkis au sein des sphéroïdes tumoraux ovariens : contribution des intégrines αv et des voies de signalisation dépendantes d'ERK 1/2 et des PKC.</i>	65
1.	<i>Présentation de l'étude</i>	66
2.	<i>Résultats</i>	67
2.1.	Formation et survie des sphéroïdes de cellules cancéreuses ovariennes	67
2.2.	Induction de signalisation de mort et de survie cellulaire en absence d'ancrage.....	68
2.3.	La survie des sphéroïdes dépend de l'activation d'ERK 1/2	70
2.4.	Résistance à l'anoïkis : importance des PKC et des intégrines αv	71
3.	<i>Conclusions</i>	73
	<i>Influence des sécrétions ascitiques sur le comportement de cellules cancéreuses ovariennes</i>	74
1.	<i>Présentation de l'étude</i>	75
2.	<i>Résultats</i>	76

2.1.	Effet de l'ascite sur le phénotype cellulaire	76
2.1.1.	Modification de la morphologie cellulaire.....	76
2.1.2.	Redistribution des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux	77
2.2.	Effet de l'ascite sur les comportements cellulaires	79
2.2.1.	Influence de l'ascite sur la prolifération, la migration et la formation de sphéroïdes tumoraux	79
2.2.2.	L'ascite favorise la résistance à l'anoïkis des cellules IGROV1.....	80
2.3.	Influence des intégrines αv et de ses partenaires en environnement ascitique	81
2.3.1.	Caractérisation des composants matriciels ascitiques	81
2.3.2.	Importance des intégrines αv dans les phénotypes invasifs	81
2.3.3.	Implication des intégrines αv dans la formation de colonies en ascite	84
3.	<i>Conclusions</i>	85
	<i>Caractérisation de protéines matricielles contenues dans l'ascite : purification combinée, caractérisation moléculaire et effet de la vitronectine et de la fibronectine ascitiques sur le comportement de cellules cancéreuses ovariennes.</i>	86
1.	<i>Présentation de l'étude</i>	87
2.	<i>Résultats</i>	88
2.1.	Caractérisation de la vitronectine et fibronectine ascitiques.....	88
2.2.	Mise au point d'un protocole combiné de purification de la Vn et de la Fn ascitiques.	88
2.3.	Caractérisation de la Vn et de la Fn purifiées à partir d'ascites	90
2.4.	Etat conformationel de la Vn et de la Fn purifiées à partir d'ascites	90
2.5.	Organisation <i>in vitro</i> de la Vn et Fn ascitiques	92
2.6.	Capacités de la Vn et de la Fn ascitiques à promouvoir l'adhérence, la migration et la survie cellulaire.....	93
3.	<i>Conclusions</i>	98
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	99
	MATERIEL ET METHODES	112
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	124
	ANNEXES	139

Publications et communications

Publications

Ovarian cancer ascites-derived vitronectin and fibronectin: Combined purification, molecular features and effects on cell response.

L. Carduner, R. Agniel, S. Kellouche, C.R. Picot, C. Blanc-Fournier, J. Leroy-Dudal, F. Carreiras
BBA - General Subjects, October 2013. **(Annexe 1)**

Cell cycle arrest or survival signaling through αv integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids

L. Carduner, C.R. Picot, J. Leroy-Dudal, L. Blay, S. Kellouche, F. Carreiras.
Sous-presses à Experimental Cell Research. **(Annexe 2)**

Formulation of tripentone-loaded nanoparticles for the targeted treatment of ovarian cancers.

J. Tomasina, L. Poulain, E. Abeilard, E. Brotin, **L. Carduner**, F. Carreiras, P. Gauduchon, S. Rault, A. Malzert-Fréon.
International J. of Pharmaceutics, September 2013.

Shell extracts from the marine bivalve *Pecten maximus* regulated extracellular matrix synthesis of primary cultured human skin fibroblasts.

T. Latire, F. Legendre, N. Bigot, **L. Carduner**, S. Kellouche, M. Bouyoucef, F. Carreiras, F. Marin, J.M. Lebel, P. Galéra, A. Serpentine.
Soumis à Biomaterials.

Communications orales

Influence of ascitic fluids on ovarian cancer cell behavior: Importance of Vitronectin and αv integrins.

Réunion annuelle de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire.

L. Carduner, C.R. Picot, J. Fernandes, S. Kellouche, O. Gallet, J. Leroy-Dudal and F. Carreiras.
Toulouse ; 2011. Prix de la meilleure communication.

Microenvironmental regulation of ovarian carcinoma cells dissemination: Influence of ascitic fluids on cell proliferation, migration and aggregates formation.

International Symposium of the Federative Research Institute n°53 Cell-microenvironment interactions.

L. Carduner, C.R. Picot, J. Fernandes, S. Kellouche, O. Gallet, J. Leroy-Dudal and F. Carreiras.
Reims; 2010.

Communications par affiches

Ascitic microenvironment influences ovarian cancer cell behavior : importance of vitronectin and Fibronectin.

L. Carduner, C.R. Picot, L. Blay, R. Agniel, L. Poulain, J. Leroy-Dudal¹, O. Gallet, S. Kellouche and F. Carreiras.

Tumor Ecosystem in cancer progression and metastasis.

Nice; 2012.

Purification and characterization of Vitronectin and Fibronectin from unique ovarian tumor microenvironment that is ascites : a possible way towards identification of markers ?

50th Anniversary of the French Society for Extracellular Matrix Biology

L. Carduner, C.R. Picot, L. Blay, R. Agniel, J. Leroy-Dudal, S. Kellouche and F. Carreiras.

Paris; 2012.

Design and evaluation of tripentone-loaded lipidic nanoparticles, a new poorly water soluble anticancer agent, able to actively target ovarian carcinoma.

J. Tomasina, F. Giffard, F. Carreiras, **L. Carduner**, S. Rault, P. Gauduchon, L. Poulain, A. Malzert-Fréon.

8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology

Istanbul, Turkey; 2012.

Involvement of microenvironment vitronectin and fibronectin in human ovarian cancer cell dissemination : cell aggregates formation and extracellular matrix remodeling.

J. Fernandes, S. Kellouche, L. Heyman, **L. Carduner**, O. Gallet, J. Leroy-Dudal and F. Carreiras.

5th International Conference On Tumor Microenvironment : Progression, Therapy and Prevention

Versailles; 2009.

Avant-propos

Les cancers ont longtemps été considérés comme des pathologies dont le déclenchement et l'évolution dépendaient seulement des altérations génétiques. Au cours de ces dernières années, le rôle crucial du foyer tumoral environnant les cellules cancéreuses a été mis en évidence. Le foyer tumoral peut être considéré comme un organe à part entière composé d'une population cellulaire hétérogène dont une partie seulement est maligne et d'un tissu environnant. La composante cellulaire assure notamment l'irrigation, par les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et un contexte inflammatoire est généré par les cellules immunitaires. Au sein de ce micro-écosystème, les cellules sont au contact de la matrice extracellulaire (MEC) qui est un élément déterminant du microenvironnement. Les protéines matricielles participent à l'organisation architecturale du tissu et régulent de nombreux aspects du comportement cellulaire. Lors du développement d'un foyer tumoral, la composition de la MEC est modifiée et peut constituer une part des événements responsables de la dissémination tumorale.

Lors du diagnostic des cancers de l'ovaire, plus d'un tiers des patientes présentent une accumulation de liquide inflammatoire dans la cavité péritonéale. Ce liquide, appelé ascite, constitue un véritable microenvironnement tumoral permettant aux cellules cancéreuses ovariennes de disséminer. Au cours de cette dissémination « ascitique » les cellules peuvent acquérir une chimiorésistance. L'ascite agit ainsi comme un réservoir de cellules et de facteurs solubles favorables à la progression tumorale. Cette progression s'illustre notamment par le détachement, à partir de l'épithélium ovarien de surface, de cellules isolées ou sous forme d'agrégats multicellulaires appelés sphéroïdes tumoraux. Ces regroupements cellulaires baignant dans l'ascite sont capables de résister à l'anoïkis, une mort cellulaire de type apoptotique induite par la perte d'ancrage. La réimplantation des sphéroïdes tumoraux sur le péritoine, site privilégié de dissémination pour ce type de cancer, entraîne la formation de foyers tumoraux secondaires.

Dans ce contexte, l'objectif global du travail a été de contribuer à la compréhension des mécanismes de résistance à la perte d'ancrage des cellules cancéreuses ovariennes et évaluer l'influence de l'ascite sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes. Approfondir les connaissances des processus cellulaires et moléculaires conduisant à la dissémination intrapéritonéale et à l'émergence de chimiorésistance ainsi que déterminer le

rôle potentiel de protéines ascitiques dans ces processus pourraient permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans le cadre du travail de Doctorat présenté, le manuscrit comporte une première partie bibliographique divisée en trois chapitres. Le premier décrit les interactions entre les cellules et leur microenvironnement matriciel. La composition de la matrice extracellulaire et la description des récepteurs cellulaires responsables des interactions cellules-matrice sont présentées et les voies des signalisations modulant le comportement cellulaire sont abordées. Le second chapitre présente les cancers de l'ovaire et les processus cellulaires responsables de la dissémination tumorale. Une description des modifications du microenvironnement matriciel et des interactions cellulaires accompagnant la formation de métastases est réalisée. Le dernier chapitre de la bibliographie décrit la composition cellulaire et moléculaire de l'ascite et aborde à son influence sur la dissémination tumorale.

A la suite de cette synthèse bibliographique, les résultats sont présentés en trois parties. Dans un premiers temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de résistance à l'anoïkis des cellules organisées en sphéroïdes car elles sont le plus souvent responsables du développement de chimiorésistance en environnement ascitique. La contribution de la signalisation dépendante des intégrines αv et des voies MAP Kinases dans l'établissement d'une résistance à la mort cellulaire par perte d'ancrage a été déterminée. Dans un second temps, l'influence de l'ascite sur les comportements cellulaires impliqués dans la dissémination tumorale a été évaluée. L'organisation et le rôle des intégrines αv au cours de ces processus ont été suivis. Enfin, nous avons recherchés et caractérisés au sein de prélèvements ascitiques les ligands potentiels des intégrines αv , la vitronectine et la fibronectine. Une méthode de purification combinée a été mise au point afin d'analyser ces protéines matricielles ascitiques et évaluer leurs influences sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes. L'ensemble des résultats obtenus sont ensuite discutés et les perspectives de ce travail sont énoncées. Enfin, les matériels et les méthodes utilisés dans cette étude sont exposés, les références bibliographiques sont ensuite répertoriées. Une partie annexe comporte un article publié et un article en cours de soumission concernant ce travail de thèse.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 - Implication de la matrice extracellulaire (MEC) dans les interactions cellules-microenvironnement

1. BIOLOGIE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

1.1. La MEC

1.1.1. Définition

Les tissus ne sont pas composés uniquement de cellules. L'espace extracellulaire représente un volume important, formé d'un réseau intriqué de macromolécules constituant la MEC. Cette matrice est formée par de nombreuses protéines et polysaccharides assemblés en un maillage interagissant avec la surface des cellules. La proportion de matrice par rapport aux cellules est plus abondante dans certains tissus et détermine leurs propriétés physiques. En effet, le cartilage et l'os sont principalement constitués de matrice, alors qu'elle est un constituant mineur du cerveau et de la moelle épinière. D'autre part, la diversité des macromolécules matricielles ou et de leurs organisations conduisent à une diversité de propriétés pouvant répondre aux fonctions de chaque tissu. La matrice peut être calcifiée pour former des structures rigides pour les os ou les dents, être transparente dans la cornée, ou être assemblée en fibrilles pour résister à des tensions importantes comme dans les tendons. La MEC, par sa composition et son organisation, participe à la caractérisation des propriétés physiques des tissus, mais elle est aussi un acteur majeur contrôlant le comportement cellulaire. La diversité des macromolécules matricielles et leurs organisations influencent la survie, la différenciation, la migration, la prolifération et les fonctions métaboliques (Alberts *et al.*, 2002).

1.1.2. Le Matrisome, une vue d'ensemble de la MEC

La MEC est formée de nombreuses protéines qui diffèrent par leurs structures et leurs fonctions, mais présentent certaines caractéristiques communes. Les protéines de la MEC sont souvent des macromolécules avec des masses moléculaires fréquemment comprises entre 100 et 1000 kDa. Ces protéines contiennent souvent des glycosylations et elles sont organisées en modules, avec des répétitions de modules identiques ou différents, arrangés de manières spécifiques. L'homologie des modules a été déterminée par comparaison des séquences en acides aminés. La combinaison de différents domaines conduit à une multifonctionnalité retrouvée dans les protéines matricielles. Certains

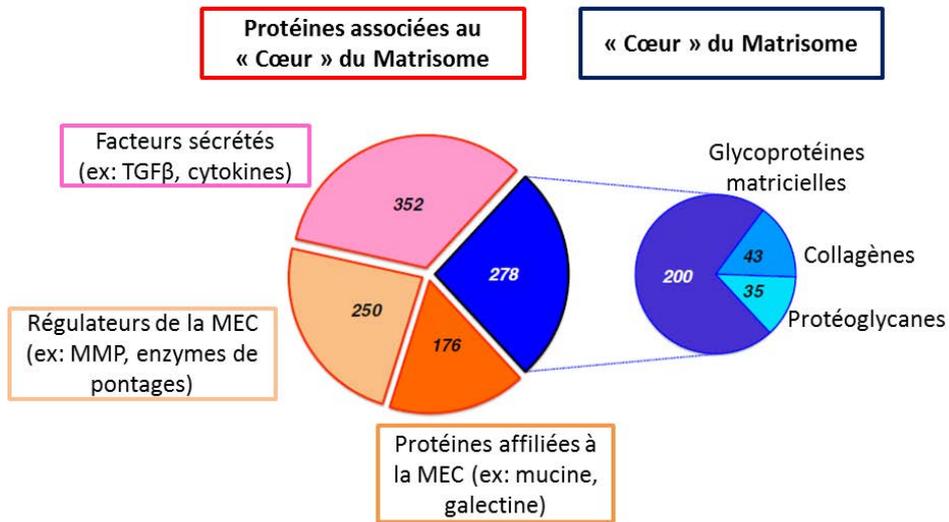


Figure 1 Le matrisome et ses sous-catégories.

D'après Naba *et al.* 2012.

domaines d'une protéine peuvent agir de manière concertée. Des interactions inter-domaines avec d'autres protéines permettent l'émergence de nouvelles fonctions. D'autre part, ces interactions favorisent la formation de fibres et d'autres assemblages supramoléculaires constituant la MEC (Engel et Chiquet, 2011).

Grâce au séquençage complet du génome, il devient possible d'obtenir raisonnablement une liste complète des protéines matricielles. La diversité des protéines matricielles s'explique par des mécanismes moléculaires de brassages d'exons (domaines) au cours de l'évolution. Toutes les protéines qui contribuent à la MEC dans différentes situations constituent le matrisome. Cet ensemble comprend des protéines d'autres familles comme des protéases, des facteurs de croissances ou des cytokines. Un sous-groupe, formant le « noyau » du matrisome a été identifié avec des protéines qui ne sont pas seulement en interactions avec la matrice mais sont vues comme des protéines matricielles à part entière (Figure 1). Cette liste du « core » du matrisome contient environ 300 protéines dont 43 de types collagéniques, au moins 35 protéoglycanes et environ 200 glycoprotéines (Hynes et Naba, 2012; Naba *et al.*, 2012).

1.1.3. Les collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères représentant 30% de la masse des protéines totales. La famille des collagènes comprend 28 membres, nommés de I à XXVIII, qui sont caractérisés par au moins un domaine organisé en triple hélice. Ces hélices sont majoritairement composées d'une séquence répétée d'acides aminés $(\text{Gly-X-Y})_n$ où X et Y sont souvent, respectivement, la proline et l'hydroxyproline. Les hélices peuvent contenir des interruptions permettant une plasticité et une flexibilité importantes. Les collagènes existent sous la forme d'homotrimères composés de trois chaînes α identiques (ex : $(\alpha 1)_3$) ou d'hétérotrimères composés de deux (ex : $([\alpha 1]_2\alpha 2)$) ou trois chaînes différentes (ex : $(\alpha 1\alpha 2\alpha 3)$). Les collagènes fibrillaires contiennent un domaine majoritaire en triple hélices qui confère une rigidité à la molécule (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII). D'autres collagènes, les FACIT (Fibrils-Associated Collagens with Interrupted Triple-helices), sont capables de s'associer avec les fibres précédentes et contiennent entre les domaines organisés en triple hélices des domaines non collagéniques (NC). Ces domaines NC apportent

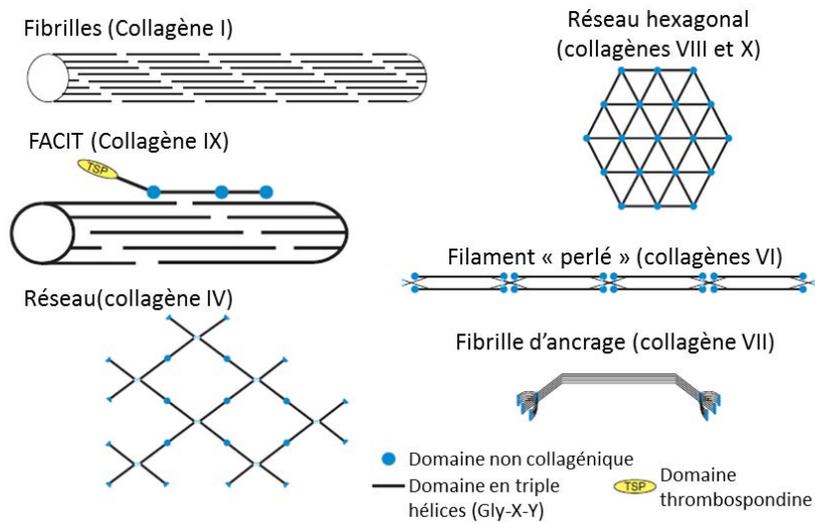


Figure 2 Assemblages supramoléculaires des collagènes.

D'après Ricard Blum *et al.* 2011.

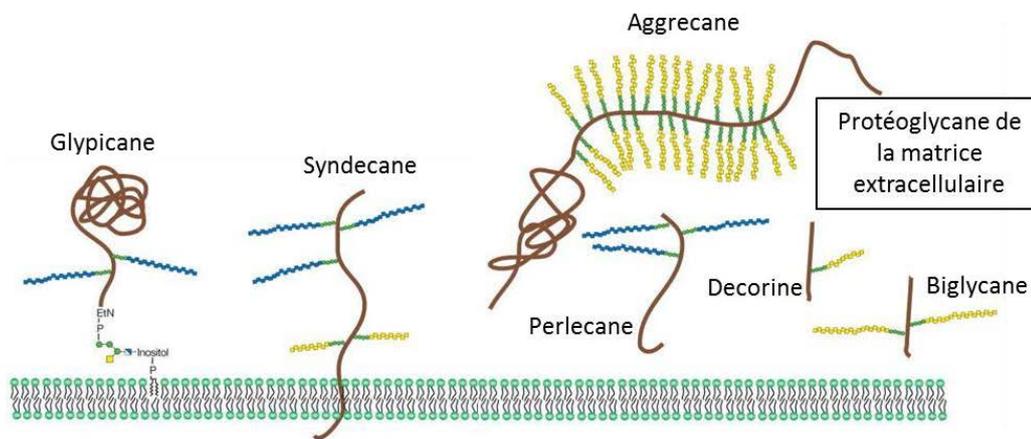


Figure 3 Diversité des protéoglycans.

Les protéoglycans sont constitués d'un corps protéique (marron) et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycans (bleu : héparane sulfate, jaune: chondroïtine sulfate ou dermatane sulfate). D'après Esko *et al.* 2009.

des propriétés d'assemblages inter-moléculaires et d'activités biologiques originales à ces collagènes (IX, XII, XIV, XVI, XIX-XXII). Les collagènes formants des réseaux regroupent les collagènes de petites tailles (VIII et X) qui forment des réseaux hexagonaux et le collagène de type IV qui est spécifique de la lame basale. Certains collagènes sont membranaires (XIII, XVII, XXIII, XXV), ils contiennent un domaine transmembranaire et les triples hélices sont exclusivement du côté extracellulaire. Le collagène VI forme des filaments « perlés » interrompu par des domaines NC et le collagène VII s'assemble en fibrilles d'ancrages reliant l'épiderme au derme. Les collagènes ont donc un rôle structural et contribuent aux propriétés mécaniques de nombreux tissus (Figure 2). Ils interagissent avec les cellules *via* des récepteurs cellulaires et régulent la prolifération, la migration et la différenciation (Ricard-Blum, 2011).

1.1.4. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des protéines sur lesquelles sont liées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) (Figure 3). Les GAG sont constitués d'unités disaccharidiques répétitives dont un des deux résidus est toujours un glucide aminé. La composition en résidus glucidiques a permis de définir cinq catégories de GAG : les héparanes-sulfates, les chondroïtines-sulfates, les dermatanes-sulfates, les kératanes-sulfates et l'acide hyaluronique. Ce dernier est le seul que l'on peut trouver sous la forme de GAG non lié à une protéine. La diversité des GAG et des glycoprotéines associées engendrent une diversité de macromolécules très variées en tailles, structures et fonctions. Les protéoglycanes peuvent être localisées dans la MEC (ex : décorine, agrécane), dans la membrane plasmique (ex : syndécane, glypicane) ou être dans des granules intracellulaires qui pourront également être sécrétés (ex : serglycine) (Kolset *et al.*, 2004; Skliris *et al.*, 2013).

Les propriétés des protéoglycanes et des GAG modulent de nombreux processus physiologiques. Une propriété commune des protéoglycanes est la capacité à fixer l'eau, en raison des charges hautement négatives des GAG, entraînant la formation de matrice hydratée (Hynes et Naba, 2012). Ces molécules remplissent l'espace entre les cellules. Dans les cartilages, les protéoglycanes et l'acide hyaluronique constituent une matrice capable d'absorber des forces de compression importante par désorption et résorption de l'eau. Les

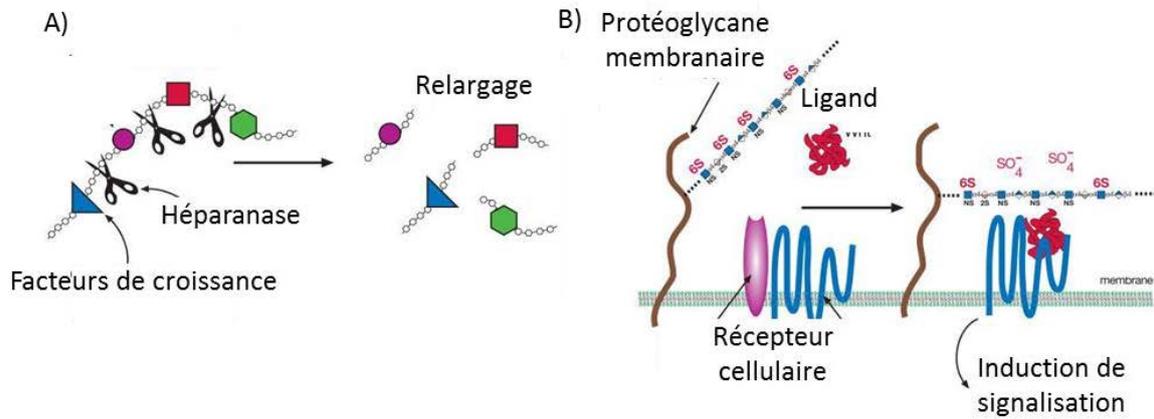


Figure 4 Rôles des protéoglycanes.

A) Les protéoglycanes peuvent servir de réservoir de facteurs de croissances libérables par dégradation sélective par des héparanases. B) Les protéoglycanes membranaires peuvent coopérer avec des récepteurs cellulaires pour faciliter la liaison et la reconnaissance des ligands (d'après Esko et al. 2009 et Vlodaysky I et al. 2007).

protéoglycanes de la matrice extracellulaire peuvent interagir avec des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance les protégeant ainsi de la protéolyse. De par ces interactions, les protéoglycanes peuvent aussi servir de réservoir de molécules délivrables par dégradation sélective de la matrice sous l'action de glycosydase tel que l'héparanase (Vlodavsky *et al.*, 2007)(Figure 4). Les protéoglycanes peuvent agir comme récepteur de protéases et d'inhibiteur de protéases régulant leurs distributions spatiales et leurs activités. Les protéoglycanes membranaires peuvent coopérer avec les récepteurs aux facteurs de croissance et avec les intégrines en favorisant la reconnaissance des ligands. Ils peuvent ainsi participer à la modification des signalisations affectant la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaire (Esko *et al.*, 2009). Au cours de la progression tumorale, les protéoglycanes modulent les comportements cellulaires impliqués dans l'angiogenèse, la croissance et l'invasion des cellules cancéreuses (Iozzo et Sanderson, 2011).

1.1.5. Les glycoprotéines adhésives

En plus des collagènes et des protéoglycanes apportant notamment les propriétés de résistance mécanique et de remplissage de l'espace intercellulaire, il y a également les glycoprotéines qui constituent la matrice extracellulaire. Leurs nombreuses capacités d'interactions sont impliquées dans l'assemblage de la MEC et favorisent l'adhérence cellulaire en induisant des signalisations. Les glycoprotéines sont capables de fixer les facteurs de croissance pour moduler leur biodisponibilité. Les glycoprotéines peuvent être insolubles, incorporées dans la matrice, ou circulantes. Des analyses *in silico* et protéomiques ont permis d'identifier environ 200 glycoprotéines composant la matrice extracellulaire (Naba *et al.*, 2012). Les plus étudiées sont les laminines et la fibronectine. Par leur taille, leur diversité et leur capacité à s'associer à différentes protéines de la matrice, les laminines jouent un rôle d'organisateur de la matrice (Hohenester et Yurchenco, 2013). Elles sont le composant majoritaire de la lame basale et possèdent de nombreuses fonctions biologiques (Greciano *et al.*, 2012). Leurs rôles lors de la morphogenèse des poumons ou des reins et dans le développement de la plaque neuromusculaire ont notamment été démontrés. La formation de la lame basale requiert notamment la sécrétion laminine-511 (composé des chaînes $\alpha 5$, $\beta 1$ et $\gamma 1$) et son auto-assemblage sous la forme d'un réseau

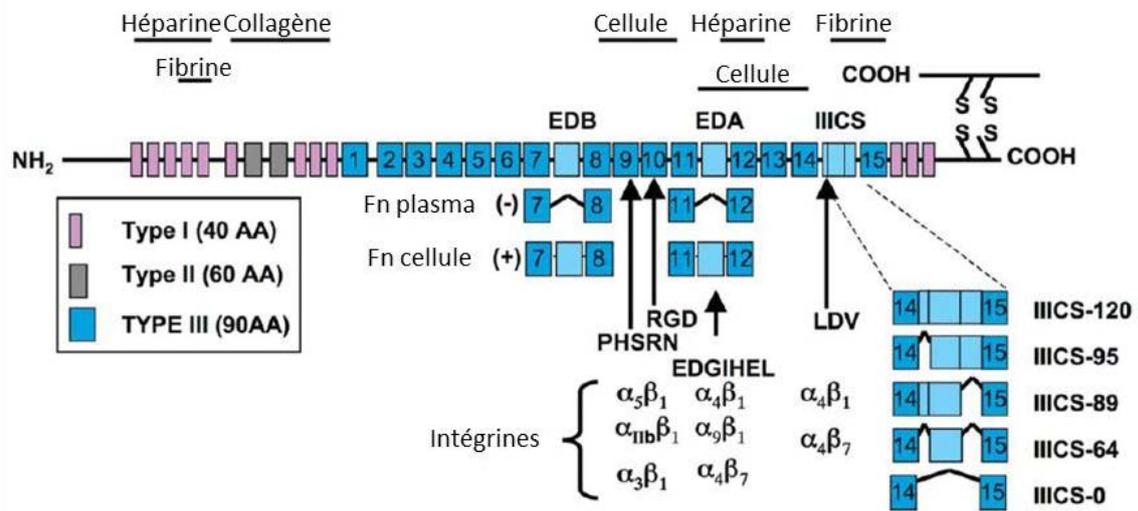


Figure 5 Structure primaire de la fibronectine.

Le schéma représente un dimère de de fibronectine (Fn) formé par des ponts disulfures inter-chaines en C-terminal (SS) et ses sites d'interactions. Les différents modules de type I, II et III sont représentés. Les modules EDA et EDB sont exclus des domaines de type III. Différents sites de liaisons par les intégrines sont représentés. EDA, EDB et IIICS sont des domaines variables en fonction des épissages alternatifs. D'après White *et al.* 2011.

entrelacé de molécules. Le réseau auto-assemblé de collagènes de type IV s'intercale dans le maillage de laminine et forme une pré-matrice basale. L'association d'autres composants permet la constitution d'une lame basale mature.

Parmi les glycoprotéines circulantes sont retrouvées principalement celles intervenant dans l'hémostase telle que le facteur de von Willebrand, le fibrinogène, la fibronectine et la vitronectine. Les monomères du facteur de von Willebrand s'associent en dimères de 500 kDa reliés par un pont disulfure. Des changements de conformation de certains domaines lors de l'hémostase primaire induisent la formation de multimères contenant plus de 40 monomères. Ces assemblages s'organisent en longues fibrilles favorables à l'adhérence primaire des plaquettes à la paroi vasculaire (Bergmeier et Hynes, 2012). La forme soluble du fibrinogène peut être clivée par la thrombine pour former la fibrine insoluble. L'auto-assemblage de la fibrine conduit à la formation d'un caillot insoluble nécessaire à la coagulation. Les plaquettes adhèrent à la fibrine par les intégrines $\alpha IIb\beta 3$.

Les rôles et les organisations de la fibronectine et de la vitronectine dans la matrice sont détaillés dans le paragraphe suivant.

Malgré l'intérêt porté pour l'étude des glycoprotéines matricielles, il reste parmi les 200 membres de cette catégorie de nombreuses protéines dont la fonction ou le mécanisme d'action reste inconnu.

1.2. La Fibronectine

1.2.1. Distribution et structures

La fibronectine est retrouvée dans le plasma sous forme soluble (0,3 mg/mL), sécrétée directement par les hépatocytes dans la circulation (Fn plasmatique, ou Fn_p), ou déposée en fibrilles insolubles dans les MEC des tissus (Fn cellulaire, ou Fn_c). La Fn retrouvée dans la MEC des tissus est principalement synthétisée par des cellules de types fibroblastiques, toutefois une fraction de Fn est apportée par le plasma (Mosesson et Umfleet, 1970).

La fibronectine est une glycoprotéine constituée de deux sous-unités de 230 à 270 kDa, chacune reliée par deux ponts disulfures à l'extrémité C-terminale (Figure 5). Les

monomères sont constitués de 3 types de modules appelés type I, II et III. Ces trois modules ont des structures différentes. Les modules I et II sont organisés en feuillet β antiparallèles et possèdent des ponts disulfures intra-modules. Les modules III sont organisés en tonneau β (β -barrel) et sont les plus abondants (Hynes, 1985; Schwarzbauer et DeSimone, 2011).

La fibronectine est codée par un seul gène, *FN1*, mais jusqu'à 20 isoformes différentes sont observées chez l'Homme. La diversité de ces protéines est due aux épissages alternatifs de trois domaines de type III : l'Extra Domain A et B (EDA, EDB) et le connecting segment (IIICS). La Fn_p ne contient pas les modules EDA et EDB alors que la Fn_c peut contenir des proportions variables de ces domaines (White et Muro, 2011).

La Fn contient différents domaines fonctionnels qui peuvent interagir simultanément avec d'autres molécules de Fn , d'autres composants de la MEC (fibrine, collagènes, héparine), des récepteurs cellulaires et des enzymes extracellulaires. Les capacités d'interaction de la Fn sont modulées par l'exposition ou la séquestration des sites de reconnaissance avec les autres molécules ou par des modifications induites par les épissages alternatifs. En effet, l'adhérence et la migration cellulaire peut être modulée en fonction de la présence de modules tel que le IIICS qui contient des sites d'interaction avec les intégrines ($\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$) et les protéoglycanes (Kamarajan *et al.*, 2010; Mostafavi-Pour *et al.*, 2001).

La Fn est une glycoprotéine qui contient des N- et O-glycosylations qui représentent jusqu'à 5% de la masse totale de la protéine. Ces sites se trouvent principalement sur les domaines de type III et sur le domaine de liaison au collagène. Les glycosylations portées par la molécule sont spécifiques des tissus. La Fn la plus glycosylée est la Fn onco-fœtale présente dans le liquide amniotique (Poulouin, 2002). Les profils de glycosylation au sein d'une même localisation peuvent varier au cours de processus physiopathologique comme lors de la gestation ou d'hépatectomie partielle (Sano *et al.*, 2008). Ces différents profils de glycosylation permettent d'expliquer les modifications d'interactions entre la Fn et d'autres ligands matricielles ou cellulaires modulant l'étalement et l'adhérence cellulaire (Jones *et al.*, 1986; Zheng et Hakomori, 2000). La Fn subit d'autres modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation des résidus sérine et thréonine et la sulfatation des résidus tyrosine (Paul et Hynes, 1984).

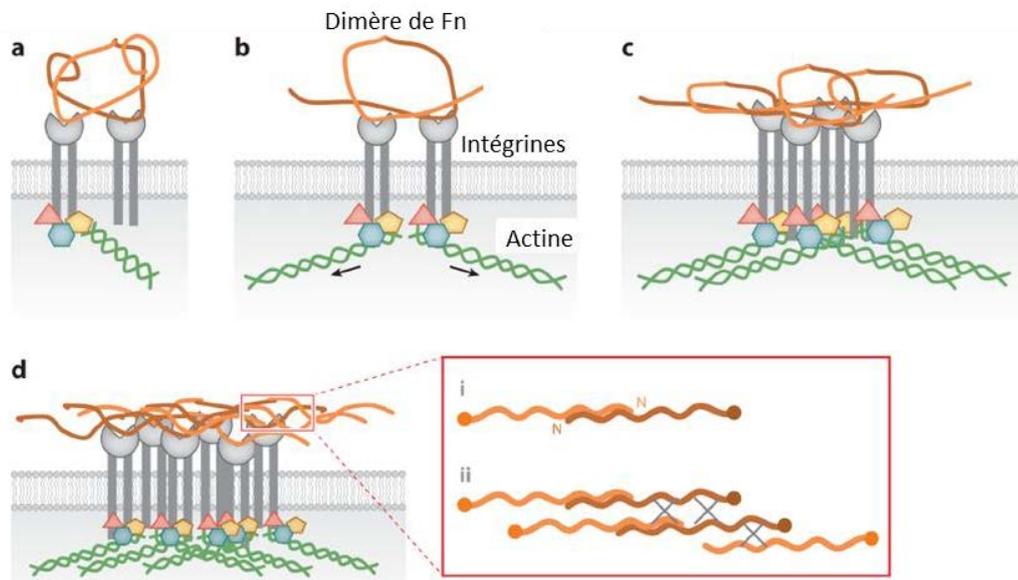


Figure 6 Principales étapes de la fibrillogenèse de la fibronectine.

a) Reconnaissance de la fibronectine (Fn) par les intégrines. b) Recrutement de protéines de signalisation et formation des sites d'adhésion focale. c) Réorganisation du cytosquelette d'actine et regroupement des intégrines. d) La tension engendrée par les intégrines conduit à l'exposition des domaines de la Fn permettant sa fibrillation. D'après Singh *et al.* 2010.

1.2.2. Fonctions biologiques

Différents modules de la Fn présentent des sites d'interaction avec de nombreuses protéines dont des récepteurs cellulaires. Les intégrines $\alpha 5\beta 1$, exprimées à la surface cellulaire, reconnaissent la fibronectine par la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) dans le domaine III₁₀. Un second site dans le module III₉, appelé site de synergie, contribue à la liaison des intégrines. Ces interactions participent à la fibrillogenèse de la Fn par les récepteurs cellulaires à partir de Fn soluble (Schwarzbauer et DeSimone, 2011). Le processus conduisant à la fibrillogenèse est constitué de quatre étapes : i) la Fn en solution dans une conformation compacte est reconnue par les intégrines $\alpha 5\beta 1$ *via* le site RGD et le site de synergie ii) des protéines de signalisation et du cytosquelette sont recrutées sur les domaines cytoplasmiques des intégrines et forment des sites d'adhésions focales (riche en paxilline et vinculine) iii) les cascades de signalisation déclenchées initient la réorganisation du cytosquelette d'actine et le regroupement d'intégrines, « clustering » iiiii) la tension engendrée par le réarrangement du cytosquelette, associée à une augmentation de la concentration locale en Fn, induit un changement de conformation qui expose les sites de liaisons de la Fn et favorise ainsi les interactions intermoléculaires (Figure 6). Finalement, ce processus conduit à la formation d'une matrice insoluble de Fn (Geiger *et al.*, 2001; Schwarzbauer et DeSimone, 2011).

D'autres intégrines ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 11\beta 3$) peuvent reconnaître le site RGD ainsi que d'autres situés dans les régions d'épissage alternatif, mais l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ permet le processus de fibrillogenèse le plus efficace (Pankov *et al.*, 2000). D'autre part, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ peut coopérer avec des protéoglycanes membranaires pour lier la fibronectine et contribuer à l'adhérence cellulaire (Moyano *et al.*, 1999). Les variétés de récepteurs et de structures de Fn génèrent des réponses intracellulaires différentes et contribuent à la régulation de nombreux processus comme l'adhérence, la migration, la prolifération ou la différenciation cellulaire (Singh *et al.*, 2010). Son implication dans de nombreux processus physiopathologiques est démontrée notamment lors du développement embryonnaire ou de la tumorigenèse (White et Muro, 2011; Yaqoob *et al.*, 2012).

La Fn interagit avec de nombreuses molécules de la MEC *via* différents domaines. Ces interactions participent à l'organisation de la MEC et à la régulation des comportements

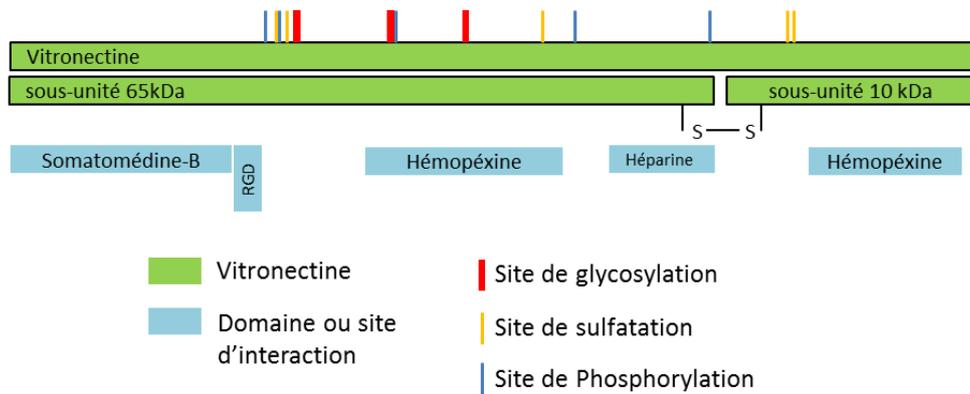


Figure 7 Structure primaire de la vitronectine.

Le schéma représente la vitronectine composée par les sous-unités de 65 kDa et de 10 kDa liées par un pont di-sulfure. Les sites d'interaction sont représentés en bleus et les différents sites de glycosylations, de sulfatations ou de phosphorylations sont indiqués. D'après la Protein Data Bank #P04004.

cellulaires. Par exemple, l'interaction de la Fn avec le collagène VI dans la MEC des cellules épithéliales intestinales régule la fibrillogenèse (Benoit *et al.*, 2012). La Fn peut aussi interagir avec la fibrine lors de la coagulation favorisant l'adhérence et la migration cellulaire nécessaire à la formation du clou plaquettaire (Cho et Mosher, 2006). Ces multiples interactions avec de nombreux ligands matriciels confèrent à la Fn un rôle d'organisateur de la MEC.

Au cours du remodelage matriciel, certains sites de la Fn, appelés matricryptiques, subissent des réorganisations structurales entraînant l'émergence de certaines propriétés à la protéine. La Fn contient plusieurs sites matricryptiques dans différents domaines pouvant stimuler la migration, inhiber la prolifération et participer à l'adhérence (Davis *et al.*, 2000). De même, l'action de protéases sur la Fn entraîne la formation de fragments ayant des propriétés spécifiques. Certains fragments de la Fn ont des activités protéolytiques notamment sur d'autres protéines de la MEC (collagènes et laminines) et sur la Fn elle-même. D'autres fragments activent la phosphorylation de MAP kinases (Labat-Robert, 2012; Steffensen *et al.*, 2011; Unger et Tschesche, 1999).

Ainsi, la Fn est une molécule modulaire présente sous forme soluble dans les fluides et sous forme insoluble incorporée dans les MEC. Sa capacité à lier de multiples partenaires lui confère un rôle d'organisateur clé de la MEC et de régulateur de nombreux processus biologiques.

1.3. La Vitronectine

1.3.1. Distribution et structures

La vitronectine (Vn) est une glycoprotéine multifonctionnelle retrouvée dans le sang (0,2 à 0,4 mg/mL) et dans les matrices extracellulaires. Le foie est le principal site de synthèse de la Vn toutefois d'autres sites comme la rétine, le cerveau et les cellules musculaires lisses en synthétisent.

Le poids moléculaire apparent de la Vn est de 75 kDa, elle contient trois sites de glycosylations pouvant contribuer jusqu'à 30% de sa masse moléculaire. Cinq sites de sulfatations et cinq sites de phosphorylations, notamment par les protéines kinases A et C et la caséine kinase II, ont été identifiés (Figure 7). Ces modifications post-traductionnelles

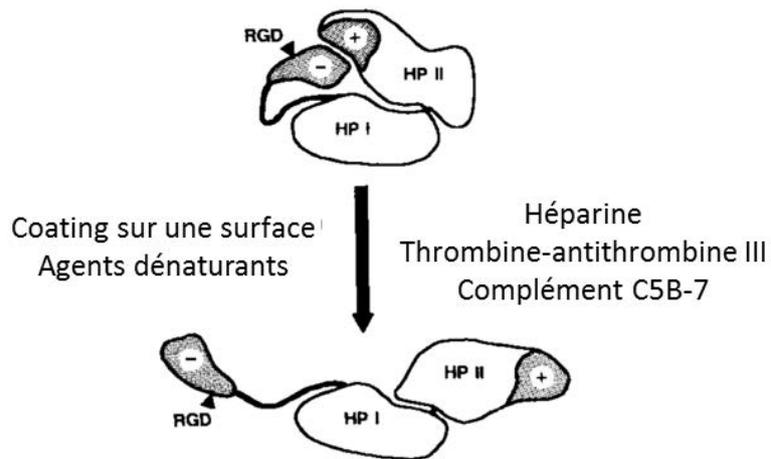


Figure 8 Modèle de transition de conformation de la vitronectine.

Différentes conditions sont capables d'induire le changement de conformation de la vitronectine d'un état replié à un état plus ouvert. L'organisation des domaines hémopéxines (HP) entre eux est modifiée lors du changement de conformation. D'après Preissner ,1991.

modulent la conformation et la fonction de la Vn en la rendant moins sensible à l'action de protéases ou en favorisant l'adhérence cellulaire (Preissner et Reuning, 2011; Preissner, 1991; Schwartz *et al.*, 1999).

Les propriétés multifonctionnelles de la Vn proviennent de ses capacités à interagir avec de nombreuses autres protéines *via* différents domaines. A l'extrémité N-terminal, le domaine somatomédine B est impliqué dans la liaison avec l'uPA (urokinase Plasminogen Activator) ou le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1). Deux domaines de type hémopexine permettent la fixation de différents ligands comme le collagène I, l'héparine ou des protéines du complément. La Vn contient une séquence RGD qui permet l'adhérence et l'étalement cellulaire par l'intermédiaire de récepteurs de type intégrines. D'autre part, un site d'interaction avec l'héparine est responsable des capacités de liaisons des glycoaminoglycanes et participe à l'oligomérisation de la Vn. Ce site d'interaction avec l'héparine constitue un site cryptique car dans la forme monomérique circulante de la Vn, le domaine de liaison à l'héparine n'est pas exposé et ne permet pas d'interaction avec d'autres molécules. Lorsqu'un changement de conformation conduit au dépliement partiel de la Vn, le domaine de liaison à l'héparine est davantage exposé et permet des interactions avec d'autres protéines de la MEC (Figure 8). De plus, le changement de conformation de la vitronectine peut s'accompagner de la multimérisation de plusieurs molécules de Vn entre-elles. Ce processus est modulé en fonction des glycosylations présentes sur la Vn et modifie l'activité biologique de la protéine (Sano *et al.*, 2007).

La Vn est synthétisée par le foie sous la forme d'une seule chaîne. Toutefois une forme clivée en deux chaînes de 65 kDa et 10 kDa maintenues ensemble par un pont disulfure est également retrouvée. Elle peut être aussi clivée par la thrombine et apparaît sous forme d'un fragment de 57 kDa (Gechtman *et al.*, 1997). La Vn est également sensible à d'autres protéases comme la plasmine, la MMP-2, la MMP-9 et les fragments de l'élastine (Imai *et al.*, 1995). Ces différents sites de clivage permettent une régulation de la biodisponibilité de la Vn lors de différents processus physiopathologiques tels que la cicatrisation ou la progression tumorale.

1.3.2. Fonctions biologiques

La Vn interagit avec les cellules par l'intermédiaire de la séquence RGD qui est reconnue par de nombreux récepteurs comme les intégrines de type αv ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ et $\alpha v\beta 8$). Ces intégrines activent des voies de signalisation et régulent la réorganisation du cytosquelette et l'expression de gènes. La phosphorylation en cascade de protéines est une des réponses les plus rapides après l'interaction entre la Vn et les intégrines et conduit à l'activation de la voie MAP Kinase. Ces événements favorisent l'adhérence, l'étalement et la migration cellulaire (Madsen et Sidenius, 2008; Schwartz *et al.*, 1999).

La Vn participe à des processus physiologiques comme l'hémostase. En fixant l'héparine, connue pour être un anticoagulant, elle exerce un effet pro-coagulant. De plus, la Vn interagit avec PAI-1, cette interaction stabilise l'inhibiteur du plasminogène sous une forme active exerçant ainsi une activité anti-fibrinolytique et donc pro-coagulante. La phosphorylation de la sérine 378 par la PKA, libérée lors de l'activation des plaquettes, change la conformation de la Vn ce qui ne permet plus la fixation de PAI-1. L'inhibiteur n'est plus stabilisé sous sa forme active et n'inhibe plus le plasminogène et donc la fibrinolyse (Schwartz *et al.*, 2002).

Les propriétés d'interaction de la Vn régulent également des processus liés à l'immunité. Une séquence du domaine de liaison à l'héparine est capable d'inhiber la polymérisation de la protéine C9 nécessaire à la formation du complexe d'attaque membranaire du complément. Ainsi, la formation de pores membranaires est limitée et évite la lyse cellulaire. Cette régulation est un des contrôles permettant d'éviter des dommages tissulaires dû à des activations inappropriées du complément (Milis *et al.*, 1993).

La Vn est donc présente sous des formes solubles dans le plasma ou intégrées dans des MEC. Ses différentes capacités d'interactions moléculaires et cellulaires l'impliquent dans la régulation de nombreux processus physiopathologiques.

2. INTERACTIONS CELLULES-MICROENVIRONNEMENT MATRICIEL

Les interactions cellulaires avec la MEC et les cellules voisines contrôlent de nombreux processus essentiels à la régulation du comportement cellulaire. La matrice constitue l'environnement physique dans lequel vivent les cellules et fournit un substrat pour l'ancrage cellulaire. Les récepteurs membranaires sont les liens entre le microenvironnement et les signalisations intracellulaires contrôlant le comportement cellulaire. La diversité des molécules constituant ces zones d'adhérence cellulaire permet une adaptation dynamique entre les cellules et leurs microenvironnements.

2.1. Les récepteurs d'adhérence cellulaire

Les récepteurs d'adhérence cellulaire permettent aux cellules d'interagir avec d'autres cellules et avec leur environnement. Ces interactions entre les récepteurs d'adhérence cellulaire et leurs ligands organisent les cellules au sein des tissus. De nombreuses interactions adhésives, pouvant agir de façon synergique ou antagoniste, sont nécessaires pour déterminer la structure d'un tissu ou le comportement d'une cellule. Il y a un équilibre dynamique des interactions cellulaires pour maintenir les interactions cellules-cellules ou pour favoriser la migration de cellules. En effet, certaines interactions cellulaires sont stables ou d'autres transitoires. Par exemple, les interactions entre les cellules musculaires sont fortes et stables alors que celles permettant aux leucocytes de rouler à la surface des vaisseaux sanguins sont faibles et transitoires.

Toutes les molécules d'adhérence cellulaire sont des protéines transmembranaires comprenant des domaines extracellulaires, membranaires et cytosoliques. Le domaine extracellulaire reconnaît les ligands à la surface des autres cellules ou dans la matrice extracellulaire. Le domaine intracellulaire interagit avec les protéines du cytosquelette pour former un point d'ancrage.

Les interactions des récepteurs d'adhérence peuvent être de type homophile ou hétérophile. Il existe quatre principales familles de récepteurs d'adhérence cellulaire : les intégrines, les cadhérines, la superfamille des immunoglobulines et les sélectines (Coombe et Dye, 2010). Les cadhérines forment de fortes interactions entre les cellules et jouent un rôle fondamental dans la morphogenèse et le développement alors que les intégrines sont

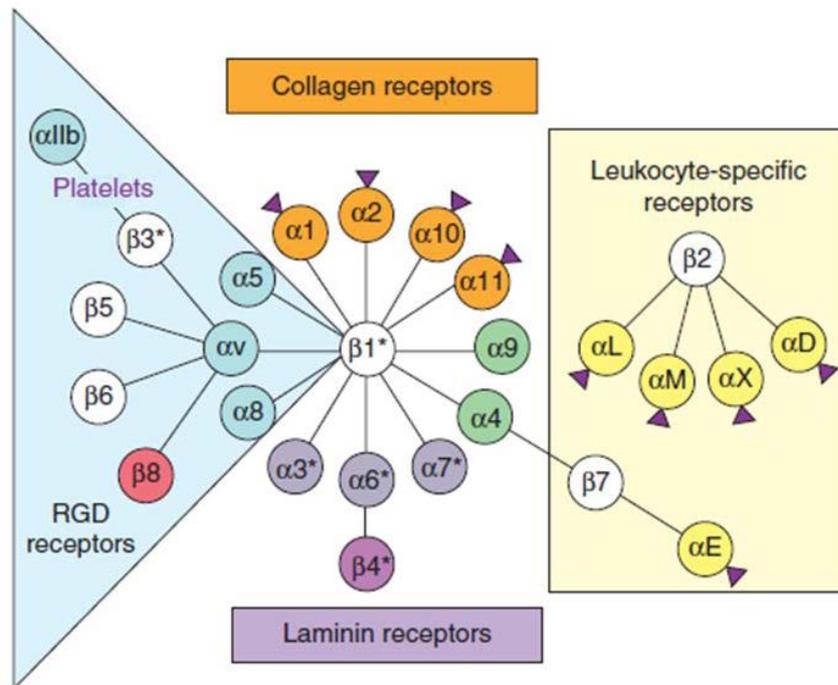


Figure 9 Répertoire des intégrines liant des protéines de la matrice extracellulaire.

Certaines sous-unités présentent des épissages alternatifs (*). D'après Hynes et Naba, 2012.

essentielles aux interactions cellules-MEC et à la migration cellulaire au travers de la matrice. La superfamille des immunoglobulines contribue aux interactions cellules-cellules et les module. Ces trois familles de récepteurs participent à l'adhérence de nombreux types cellulaires dans différents tissus. Les sélectines ont un rôle spécifique pour la migration des leucocytes dans la circulation sanguine.

2.1.1. Les intégrines

2.1.1.1. Structure et classification

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques constituées d'une sous-unité α et β associées de manière non-covalente. Chez les vertébrés, il y a 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui peuvent s'associer pour former 24 récepteurs avec des propriétés originales et une distribution tissulaire différente. Les sous-unités α et β sont constituées de plusieurs domaines avec des liens flexibles entre eux. Chaque sous-unités possède un domaine en hélice intra-membranaire et souvent un court domaine cytoplasmique de 50 acides aminés. Le domaine extracellulaire contient entre 750 et 1000 acides aminés (Campbell et Humphries, 2011).

Les intégrines peuvent être classées selon leur composition en sous-unités α et β ou en fonction de leurs propriétés d'associations avec les ligands (Figure 9). Trois groupes majeurs sont décrits, les intégrines contenant la sous-unité $\beta 1$, $\beta 2$ ou αv . Ainsi, certaines sous-unités α peuvent s'associer avec différentes sous-unités β , comme par exemple $\alpha 4$. A l'inverse, certaines sous-unités α s'associent exclusivement avec un type de sous-unité β , comme $\alpha 5 \beta 1$. La combinaison des deux sous-unités confère à l'intégrine sa spécificité de liaison au ligand. Cette spécificité est caractérisée par l'affinité importante de l'intégrine pour son ligand comme pour l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ interagissant avec la fibronectine, ou l'intégrine $\alpha v \beta 3$ liant notamment la vitronectine, la fibronectine et le fibrinogène.

Les intégrines peuvent être classées en fonction du type de séquence reconnu pour la liaison du ligand. Les intégrines αv , $\alpha 1 \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha 8 \beta 1$ reconnaissent le motif RGD (arginine, glycine, aspartate) contenu dans de nombreuses protéines matricielles (fibronectine, vitronectine, collagène, etc.). Toutefois, certaines molécules de la MEC, comme les collagènes ou certaines isoformes de laminine, doivent être dénaturées ou

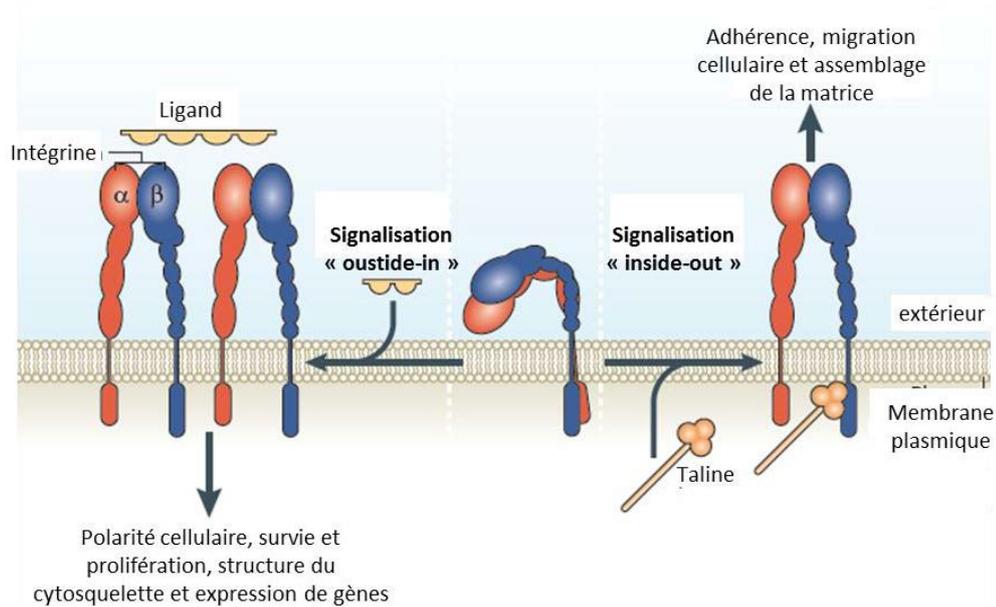


Figure 10 Signalisation bidirectionnelle des intégrines.

Les signalisations issues des intégrines peuvent être bidirectionnelles et avoir des effets biologiques différents. Pendant la signalisation « inside-out » un activateur intracellulaire comme la taline se lie au domaine intracellulaire de la sous-unité β conduisant à des changements conformationnels modifiant l'affinité des intégrines pour des ligands extracellulaires. La signalisation « inside-out » permet une modulation des interactions entre les intégrines et les protéines de la MEC pour transmettre les forces nécessaires à la migration cellulaire et au remodelage matriciel. Les intégrines se comportent comme des récepteurs de signalisation dans la transmission de l'information dans la cellule par des signalisations « outside-in ». La liaison des intégrines à leurs ligands extracellulaires change la conformation des intégrines et en raison de la multivalence de nombreux ligands, conduit au regroupement des intégrines. La combinaison de ces deux processus conduit à l'émergence de signaux cellulaires qui contrôlent la polarité cellulaire, la structure du cytosquelette et l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. D'après Shattil *et al*, 2012.

clivées pour exposer leur séquence RGD. Les intégrines $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$ et les intégrines $\beta 2$ reconnaissent la séquence LDV (leucine, aspartate, valine) de la fibronectine. Les leucocytes expriment spécifiquement les intégrines $\beta 2$ et $\beta 7$. Les intégrines $\beta 1$ ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ et $\alpha 11$) interagissent avec le motif collagénique GFOGER (glycine, phenylalanine, hydroxyproline, glycine, glutamate, arginine). Enfin, une dernière famille d'intégrine comprenant les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ est décrite comme récepteur pour les laminines. Toutefois ces classifications sont des généralités et des exceptions sont retrouvées en raison des multiples capacités d'interaction des intégrines (Campbell et Humphries, 2011; Humphries *et al.*, 2006; Hynes et Naba, 2012).

2.1.1.2. Interaction avec les ligands

La liaison des intégrines avec leurs ligands est dépendante de cations divalents stabilisant la structure, généralement le manganèse et le magnésium (Zhang et Chen, 2012). La plupart des intégrines ne sont pas constitutivement actives et n'induisent pas de signalisation cellulaire. Le processus d'activation permet aux cellules de réguler l'adhérence d'une façon spatiale et temporelle. L'affinité des intégrines est hautement dépendante de la conformation de la partie extracellulaire, l'ectodomaine. Il peut exister en conformation « fermée », en conformation étendue intermédiaire, avec le domaine de liaison du ligand fermé, et une conformation étendue ouverte. Ces organisations peuvent correspondre respectivement à une faible, une intermédiaire et une forte affinité pour le ligand (Shattil *et al.*, 2010). Des interactions entre la chaîne α et β au niveau des domaines membranaires et cytoplasmiques maintiennent les intégrines sous forme inactives. Plusieurs protéines, comme la taline et les kindlines, ont été identifiées dans les signalisations, émergeant de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, « inside-out signalling », conduisant à l'activation des intégrines (Figure 10). D'autre part, le regroupement d'intégrines en « cluster » permet une augmentation de l'avidité des interactions avec les ligands. Le recrutement de plusieurs intégrines peut être induit par des interactions avec des complexes cytosoliques protéiques multivalents ou par liaison de ligands extracellulaire multivalents ou par homo-dimérisation des domaines intra-membranaires (α - α et β - β). Le « clustering » des intégrines en différentes structures est un processus important pour l'induction d'une signalisation de

l'extérieur vers l'intérieur, « outside-in », pour le recyclage des intégrines et pour la méchanotransduction (voir chapitre dynamique des structures d'adhérences) (Campbell et Humphries, 2011; Hynes, 2002; Shattil *et al.*, 2010; Zhang et Chen, 2012).

2.1.2. Les autres récepteurs

2.1.2.1. Les cadhérines

Le contact cellule-cellule est un élément central pour le contrôle de la polarité cellulaire, de l'organisation des tissus et de la compartimentation des organes. Les cadhérines sont une grande famille de protéines transmembranaires comprenant plus de 350 membres très divers structuralement et fonctionnellement. Tous les membres de la famille des cadhérines possèdent un domaine extracellulaire contenant plusieurs sites de liaison au calcium. La cadhérine la plus étudiée est l'E-cadhérine qui a été découverte la première. Elle fait partie d'une famille de cadhérine qui inclue les N-, P-, M-, K- et les VE-cadhérines (Hulpiau *et al.*, 2013). Ces molécules sont localisées dans les sites spécialisés d'adhérences cellule-cellule, les jonctions d'adhérences. Les domaines extracellulaires d'une cadhérine interagissent avec les domaines d'une autre cadhérine sur une cellule voisine. Le domaine cytoplasmique permet de lier les filaments d'actine ou les microtubules par l'intermédiaire des caténines (Coombe et Dye, 2010; Saito *et al.*, 2012; Zaidel-Bar, 2013). La perte de fonction ou d'expression des cadhérines peut entraîner de sérieuses conséquences physiopathologiques. Par exemple, la dérégulation de l'E-cadhérine (épithéliale-cadhérine) contribue à l'acquisition d'un phénotype invasif dans de nombreuses tumeurs de type épithéliales (Rodriguez *et al.*, 2012).

2.1.2.2. Les sélectines

Les sélectines sont exprimées à la surface des leucocytes, des plaquettes et des cellules endothéliales activées. Elles participent à l'adhérence et au « rolling » des leucocytes et des plaquettes sur les endothéliums vasculaires ainsi qu'au recrutement des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires et des leucocytes dans les sites d'inflammations. Il existe 3 types de sélectines (E-, P- et L-sélectine) impliquées dans des interactions

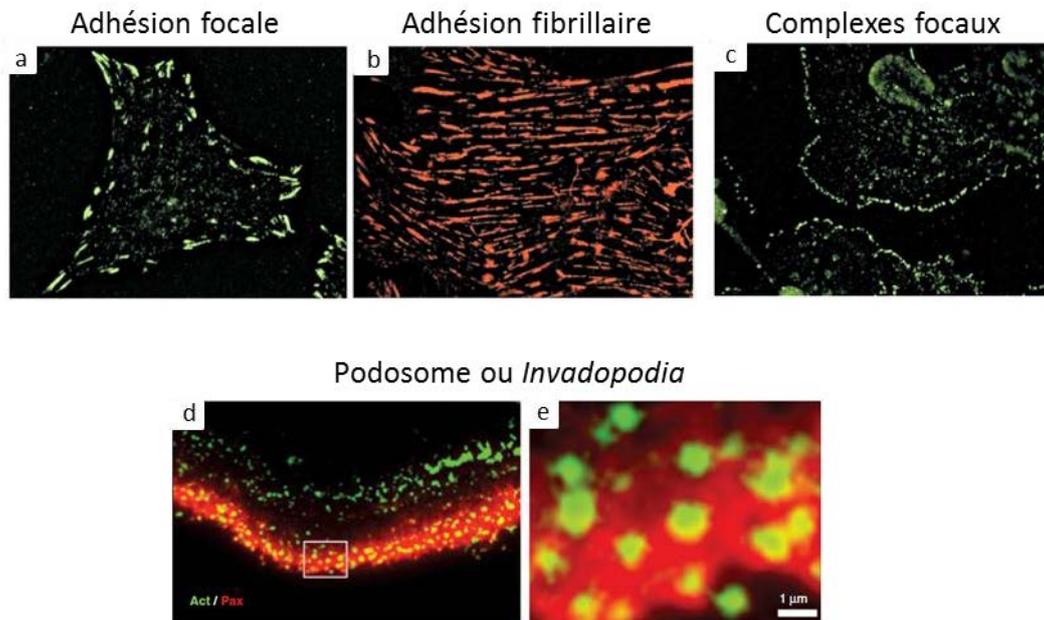


Figure 11 Organisation des différentes structures d'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire.

a) Marquage des phosphotyrosines permettant la localisation des adhésions focales en périphérie des fibroblastes. b) Marquage de l'angiotensine permettant la localisation des adhésions fibrillaires dans des fibroblastes. c) Fibroblaste traité avec l'inhibiteur des kinase-Rho et avec un marquage des phosphotyrosines permettant la localisation de structures punctiformes associées aux lamellipodes et qui sont des complexes focaux. d) Marquage des filaments d'actine (vert) et de la paxilline (rouge) dans des ostéoclastes permettant la localisation des podosomes en bordure de la cellule. e) Agrandissement de la zone indiquée par un rectangle blanc dans l'image d). D'après Geiger *et al*, 2001 et Geiger et Yamada, 2011.

hétérophiliques avec les glycosylations de nombreuses glycoprotéines membranaires (Coombe et Dye, 2010).

2.1.2.3. La superfamille des immunoglobulines

La superfamille des immunoglobulines est une famille comprenant un nombre et une diversité de protéines importantes (plus de 750). Tous les membres de cette famille contiennent au moins un domaine de type immunoglobuline qui a des homologies structurales avec les domaines immunoglobulines des anticorps. La plupart de ces protéines sont exprimées à la surface cellulaire et certaines sont des molécules d'adhérence cellulaire. Les interactions sont de type homophile ou hétérophile liant des intégrines et des sucres (Coombe et Dye, 2010).

2.1.3. Dynamique des structures d'adhérence, notion d'adhésome

Les zones d'adhérence cellulaire sont présentes dans toutes les cellules adhérentes mais se différencient par leurs organisations, leurs tailles et leurs distributions (Figure 11). Toutefois, elles partagent souvent deux caractéristiques ; elles sont composées d'intégrines et interagissent avec le cytosquelette d'actine. Les structures d'adhérence les mieux caractérisées sont les contacts focaux. Ce sont des structures plates, allongées, de quelques micromètres carrés et sont localisées à la périphérie cellulaire. Leur formation est stimulée par la petite GTPase Rho-A. Au niveau des contacts focaux, les filaments d'actine sont colinéaires avec les fibrilles extracellulaires de fibronectine suggérant leurs interactions. Les protéines caractéristiques permettant la transduction du signal dans les contacts focaux sont la vinculine, la taline et la paxilline. D'autres structures d'adhérence, les zones d'adhérence fibrillaire, ont une localisation centrale sur les cellules. Elles sont orientées parallèlement aux fibrilles de la matrice extracellulaire. Typiquement, les zones d'adhérence fibrillaire sont composées de fibrilles de fibronectine liées par les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et la tensine faisant le lien avec les protéines cytoplasmiques. Des structures de plus petites tailles organisées en points forment les complexes focaux. Ils sont présents sur les contours des lamellipodes. Ces sites d'adhérence participent à la migration cellulaire et sont précurseur des contacts focaux. Des structures d'adhérence participent à l'invasion cellulaire ; ce sont les *invadopodia* ou

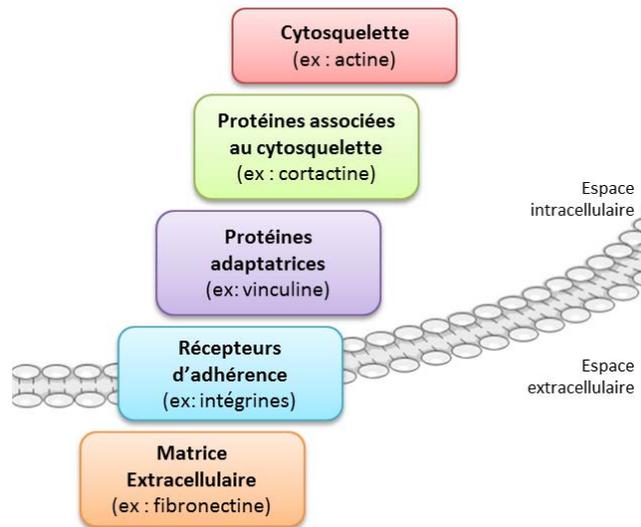


Figure 12 Représentation schématique de l'organisation des molécules constituant l'adhésome.

Les récepteurs d'adhérence exprimés à la surface cellulaire interagissent avec les constituants de la matrice extracellulaire. Des liens sont organisés entre les molécules constituant le cytosquelette et les récepteurs d'adhérence par les protéines adaptatrices et les protéines associées au cytosquelette. D'après Geiger *et al*, 2001.

podosomes. Elles s'organisent en petits points formés par un cylindre d'actine. De nombreuses protéases, comme les MMP-2 et MMP-9, sont secrétées au niveau des *invadopodia* et dégradent la MEC composée de fibronectine et de vitronectine (Weaver, 2006). Ces structures sont retrouvées sur les ostéoclastes, les macrophages et les cellules cancéreuses invasives (Geiger et Yamada, 2011; Geiger *et al.*, 2001)

Pour assurer les fonctions physiques nécessaires aux maintiens des structures intra- et extracellulaires et intégrer les modifications du microenvironnement en induisant des signalisations, les zones d'adhérence cellulaire interagissent avec de nombreuses molécules (Figure 12). Différentes méthodes d'analyses (immunolocalisations, ARN interférence, doubles hybrides,...) ont permis d'identifier au moins 180 molécules composant les contacts focaux. Plus de 700 interactions directes entre ces molécules constituent une part du réseau nécessaire à la modulation des réponses cellulaires et constituent l'adhésome. Les récentes études sur la caractérisation moléculaire des contacts focaux basées sur des méthodes d'analyse protéomique ont multiplié par plus de trois le nombre de protéines impliquées dans ces structures d'adhérence (Geiger et Zaidel-Bar, 2012). Ces molécules peuvent être classées selon leur fonction dans les contacts focaux. Les liens entre les intégrines et le cytosquelette d'actine sont réalisés par deux familles de protéines, les molécules associées à l'actine (ex : cortactine, profiline, actinine) et les protéines adaptatrices (ex : vinculine, vimentine, paxilline). Les molécules adaptatrices sont les intermédiaires entre les intégrines, à la surface membranaire, et les protéines associées à l'actine liant le cytosquelette. La signalisation dynamique nécessaire au processus cellulaire comme la division, la migration ou la différenciation est assurée par des modifications de phosphorylations. Des molécules de signalisation incluant des tyrosines (ex : FAK, FYN, SRC), des sérine/thréonine kinases (ex : PKC, ERK, AKT) et des phosphatases (ex : PTEN, PP2A, SHP2) modulent les interactions et l'activité des molécules constituant l'adhésome (Geiger et Yamada, 2011).

2.1.4. Intégrines et cancer

De nombreuses intégrines contribuent à la progression tumorale. Les intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$ et $\alpha\beta6$ sont habituellement exprimées faiblement dans la plupart des épithéliums sains mais sont souvent surexprimées dans de nombreuses tumeurs. L'expression de

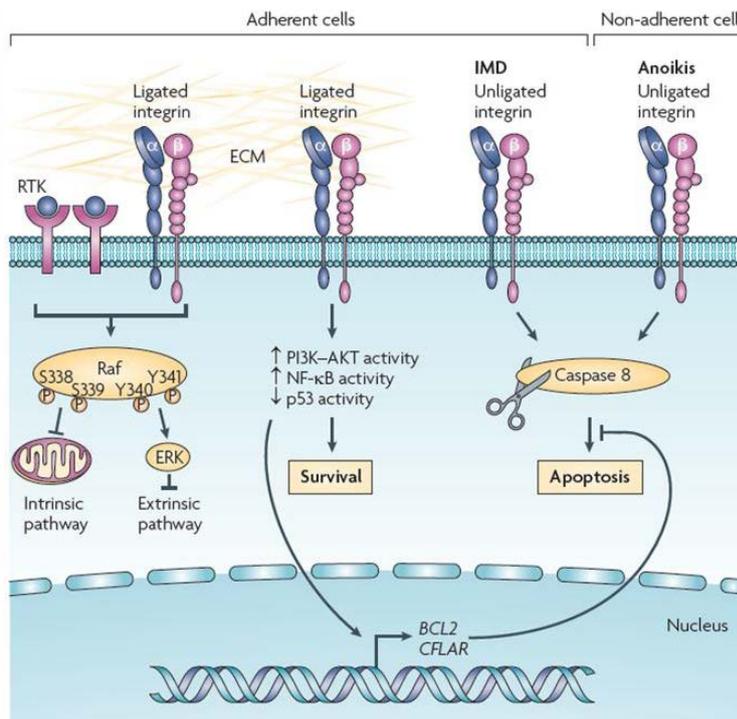


Figure 13 Les intégrines induisent des voies de survie et des voies pro-apoptotiques.

Les intégrines peuvent initier des signalisations pro-survie et pro-apoptotique. La voie qui est la plus active dépend de la liaison par l'intégrine de ligands extracellulaires. Dans une cellule où la plupart des intégrines sont liées, des voies pro-survies sont déclenchées notamment par l'activation de la voie PI3K/AKT ainsi qu'une diminution de l'activation de P53 et une expression accrue de molécules pro-survies (ex : BCL2). De plus, l'activation de Raf entraîne une inhibition des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Dans les cellules adhérentes dans lesquelles la plupart des intégrines sont non liées, les intégrines induisent l'activation de la caspase 8 déclenchant l'apoptose. En cas de perte totale d'adhérence, la mort cellulaire est initiée par un processus appelé anoïkis. D'après Desgrosellier et Cheresch, 2010.

certaines intégrines est liée à la progression tumorale en raison de leur implication dans les processus de migration, d'invasion, de prolifération et de survie cellulaire (Figure 13). Les interactions entre les protéines matricielles et les intégrines permettent la traction cellulaire nécessaire à la migration. Les intégrines contribuent également à l'invasion en régulant la localisation et l'activité de protéases (MMP-2) notamment dans les *invadopodia*. La liaison d'un ligand par les intégrines peut induire des signalisations de survie, incluant l'expression de Bcl-2 (protéine anti-apoptotique), de FLIP (inhibiteur de l'apoptose induite par les récepteurs de mort), l'activation de la voie PI3K-AKT ou du facteur de transcription NFκB et l'inactivation de P53 (Desgrosellier et Cheresh, 2010). L'absence de liaison de ligand pour les intégrines peut induire l'apoptose par le recrutement et l'activation de la caspase 8. Dans le cas de la perte d'ancrage des cellules à un support, cette mort induite par les intégrines est appelée anoïkis. Des cellules cancéreuses sont capables de résister à la mort cellulaire induite par les intégrines en activant des voies de signalisation en aval de la protéine Src (Stupack et Cheresh, 2002). L'originalité de ces observations réside dans le fait que des intégrines sans lien avec un ligand induisent des signalisations d'apoptose (Weis et Cheresh, 2011).

2.2. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont des régulateurs impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire, la migration cellulaire et le métabolisme. Chez l'Homme, 58 RTK sont identifiés. Ils présentent tous la même architecture globale comprenant un domaine de liaison au ligand extracellulaire, une hélice transmembranaire et un domaine cytoplasmique avec une activité tyrosine kinase. Classiquement, l'activation des RTK est réalisée par la liaison de facteurs de croissance qui induisent une dimérisation des récepteurs. Toutefois, certains RTK s'organisent en oligomère même en absence de ligand mais l'activation des récepteurs nécessite toujours un changement de conformation apporté par la liaison du ligand. Les premiers substrats des RTK sont des tyrosines sur le récepteur lui-même. L'autophosphorylation augmente l'efficacité catalytique de 50 à 200 fois et permet le recrutement d'autres molécules de signalisation nécessaires à la transduction du signal. La

Tableau 1 Interaction entre les récepteurs aux facteurs de croissance et les intégrines.

(D'après Somanath et al, 2009)

Growth factor receptor	Integrin(s)
VEGFR2/ <i>Flk1</i>	$\alpha_v\beta_3$
VEGFR3/ <i>Flt4</i>	$\alpha_5\beta_1$
PDGFR	$\alpha_v\beta_3$
FGFR3	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1$
IRS-1	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1$
Tie-2	$\alpha_5\beta_1$
ErB-2	$\alpha_6\beta_4, \alpha_6\beta_1$
ErB-3	$\alpha_5\beta_1$
PlexinB1	$\alpha_5\beta_1$
Met	$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1, \alpha_6\beta_4$

structure globale et les mécanismes d'activation des RTK sont hautement conservés dans l'évolution depuis le nématode *Caenorhabditis elegans* jusqu'à l'Homme démontrant leur importance dans le contrôle du comportement cellulaire (Lemmon et Schlessinger, 2010). De nombreuses pathologies sont associées à une dérégulation de l'abondance, de la distribution cellulaire ou de la régulation des RTK. L'activation aberrante des RTK peut être causée par une activation autocrine, une translocation chromosomique, une surexpression ou une mutation gain ou perte de fonction. L'analyse du génome des cellules cancéreuses démontre que de nombreux RTK sont mutés dans beaucoup de tumeurs. Le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) est muté dans 20% des cancers (Forbes *et al.*, 2009; Somanath *et al.*, 2009). Des signalisations synergiques entre les RTK et les intégrines sont observées dans de nombreux processus physiopathologiques (Tableau 1). Lors de l'angiogenèse, la coopération entre les intégrines $\alpha\beta3$ ou $\alpha5\beta1$ et le RTK Met (récepteur de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor)) activé participe à l'induction de l'adhérence, de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales. La propriété d'interaction entre les intégrines et les RTK peut être expliquée par leurs « co-clustering » dans les rafts membranaires (Somanath *et al.*, 2009).

2.3. Induction de signalisation

Une cellule dans un organisme est exposée à un microenvironnement qu'elle peut appréhender notamment pour la MEC *via* les intégrines et pour les facteurs de croissance par les récepteurs tyrosines kinases. Afin d'adapter la réponse cellulaire au contexte environnant, des voies de signalisation permettent la modulation de l'activité de molécules ou l'expression de gènes. Les deux voies de signalisation principales en aval des intégrines et des RTK sont la voie des MAP Kinases et la voie PI3K/AKT.

2.3.1. La voie MAPK

Les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) constituent une famille d'enzyme conservée au cours de l'évolution. Elles sont le lien entre les signaux extracellulaires et la machinerie de contrôle des comportements cellulaires fondamentaux (prolifération, différenciation, apoptose et migration). Ces familles se divisent en trois sous familles

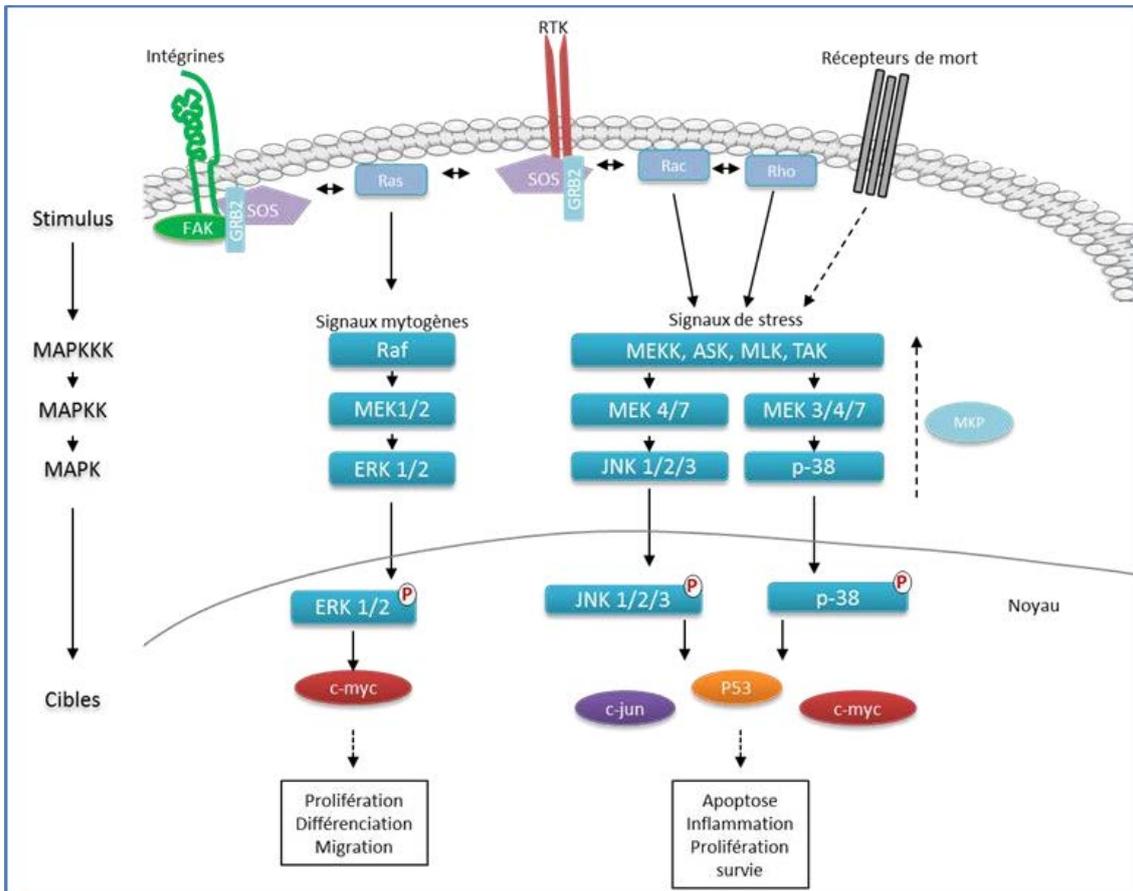


Figure 14 Voie de signalisation des MAPK.

Ces familles se divisent en trois sous familles majeures : les kinases ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38-MAPK. Chaque voie MAPK comporte un module d'au moins trois kinases qui s'activent en cascade. L'activation des MAPK est assurée par la phosphorylation, des résidus thréonine et tyrosine, par des protéines kinases nommées MAP kinase kinases (MAPKK), elles-mêmes activées par les MAP kinase kinase kinases (MAPKKK). Les MAPK peuvent favoriser la survie et la prolifération mais dans certains contextes les sous familles JNK et p38-MAPK peuvent induire l'apoptose.

majeures : les kinases ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38-MAPK. Chaque voie MAPK comporte un module d'au moins trois kinases qui s'activent en cascade. L'activation des MAPK est assurée par la phosphorylation, des résidus thréonine et tyrosine, par des protéines kinases nommées MAP kinase kinases (MAPKK), elles-mêmes activées par les MAP kinase kinase kinases (MAPKKK). En amont, la stimulation des MAPKKK met en jeu une phosphorylation et/ou une interaction avec la famille des petites protéines G (Ras ou Rho), en réponse à un signal mitogène ou à un signal de stress souvent issus des récepteurs membranaires (intégrines, RTK, récepteurs de mort, etc.). Une fois la cascade enclenchée, les MAPK modulent l'activité de protéine en aval par phosphorylation. Parmi leurs cibles, les MAPK comptent notamment des facteurs de transcription (Figure 14). Les facteurs de transcription activés déclenchent l'expression de gènes cibles modifiant le comportement cellulaire. Les régulations transcriptionnelles réalisées par les MAPK sont complexes puisque en plus de leurs impacts sur la régulation des facteurs de transcription, elles modulent l'activité des co-activateurs, des co-répresseurs et des nucléosomes. Les MAPK sont elles-mêmes régulées par des phosphatases, les MAP kinases phosphatases (MKP), ciblant les thréonines et les tyrosines (Dhillon *et al.*, 2007; Morrison, 2012; Wada et Penninger, 2004). En plus de ces caractéristiques communes des MAPK, chaque sous-famille possède des propriétés spécifiques.

La sous famille ERK est la plus étudiée. La cascade de signalisation conduit à l'activation d'ERK1/2 qui sont transloquées dans le noyau où elles phosphorylent de nombreux substrats notamment des facteurs de transcription. ERK1/2 sont classiquement décrites pour avoir un effet pro-prolifératif. En effet, certains facteurs de transcription phosphorylés, comme c-myc, induisent l'expression de molécules (cyclineD2, CDK4) participant au passage du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S et répriment l'expression d'autres molécules maintenant les cellules en quiescence (p21, p15) (Meyer et Penn, 2008).

Les autres MAPK, JNK et p38, participent aux signalisations de stress cellulaire. Lors du développement tumoral, ces voies de signalisation sont particulièrement activées car les cellules cancéreuses sont exposées à de nombreux stress comme l'hypoxie, le détachement cellulaire, l'inflammation et l'environnement gènotoxique induit par les chimiothérapies et la radiothérapie. Les cibles de ces MAPK sont des facteurs de transcription impliqués dans la

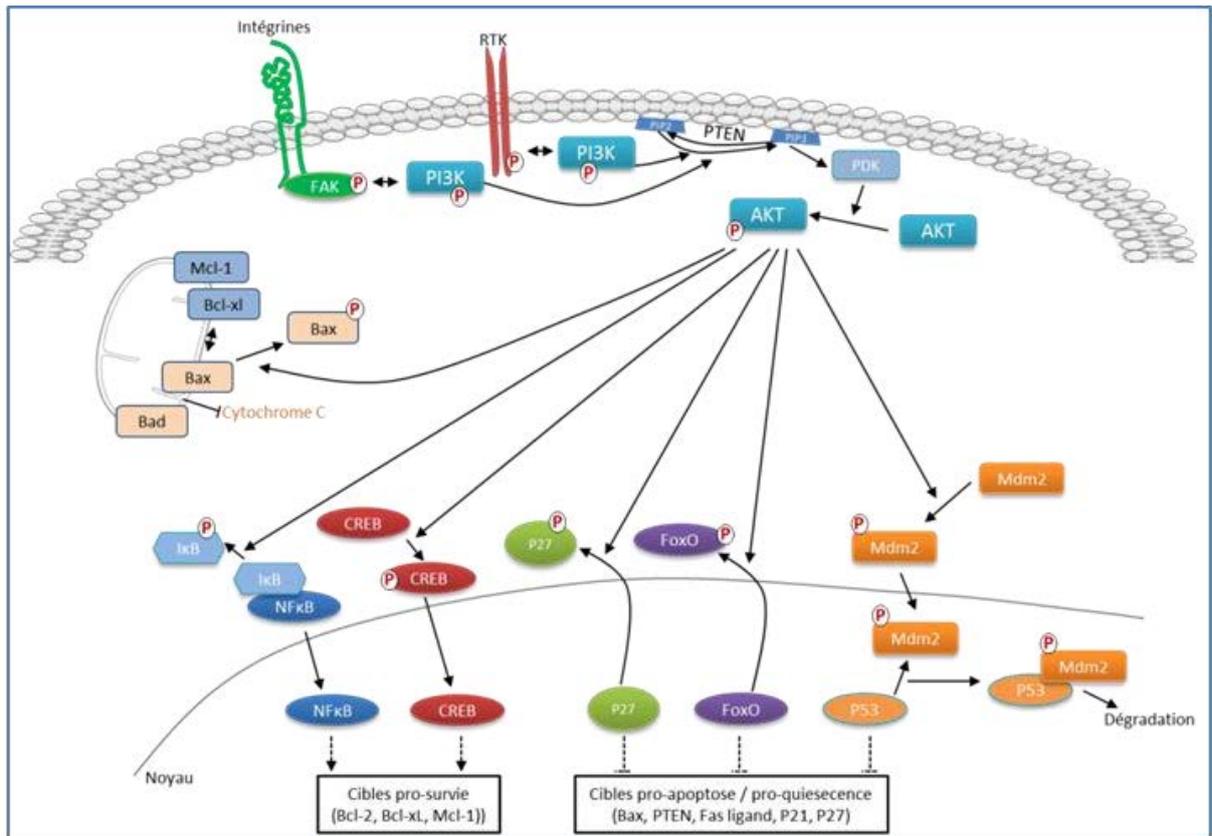


Figure 15 Voie de signalisation des PI3K/AKT.

Les PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) sont une famille de protéines impliquées notamment dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire via l'activation d'AKT. La PI3K peut être activée par les intégrines et les récepteurs tyrosine kinases (RTK). Une fois activée la PI3K conduit à l'activation d'AKT via la PDK. AKT activée entraîne la modulation d'activités de nombreuses molécules localisées au niveau cytosolique, mitochondriale et nucléaire.

régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire. Ainsi ces voies de signalisation activent des facteurs de transcription comme c-jun, p53 et inhibent d'autres molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl). Généralement, les effets de MAPK JNK et p38 sont anti-prolifératifs et pro-apoptotiques mais peuvent varier en fonction du contexte cellulaire et ainsi participer à la progression tumorale (Dhillon *et al.*, 2007).

2.3.2. La voie PI3K/AKT

Les PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) sont une famille de protéines impliquées dans la régulation de la prolifération, de la survie, du métabolisme et du trafic vésiculaire. Ces enzymes possèdent une activité protéine kinase (Ser/Thr kinase) qu'elles exercent notamment sur les MAPK, mais elles sont principalement décrites pour leur activité lipide kinase. Les PI3K phosphorylent les phosphoinositides PI(4,5)P₂ en position 3 de l'inositol pour former le second messager PI(3,4,5)P₃ et activer les voies de signalisation en aval. Le taux de second messager dans les cellules est très régulé grâce à des phosphatases (ex : PTEN, Phosphatase and Tensin homolog) qui transforment le PIP3 en PIP2, incapable d'activer les molécules en aval (Hemmings et Restuccia, 2012). Plusieurs types de récepteurs transmembranaires interviennent dans l'activation des PI3K : les récepteurs qui possèdent une activité tyrosine kinase intrinsèque (RTK), les récepteurs couplés à des tyrosines kinases non réceptrices (intégrines/FAK) ou les récepteurs couplés à des protéines G. Les PI3K sont composées d'une sous unité catalytique (p110) et d'une sous unité régulatrice (p85). L'interaction de la sous unité régulatrice avec les phosphates des récepteurs ou des protéines intermédiaires activées permet la localisation des PI3K à proximité de ses substrats lipidiques ancrés dans la membrane et induit l'activation de la sous unité catalytique par un changement de conformation. Le second messager (PIP3), accumulé dans la membrane plasmique, conduit à la localisation de protéines kinases (PDK1, PDK2) responsables de la phosphorylation d'autres molécules de signalisation (Cully *et al.*, 2006).

La protéine AKT (protéine kinase B) est une des cibles principales de la signalisation induite par les PI3K (Figure 15). AKT, aussi appelé PKB du fait de son homologie de séquence avec la PKA et la PKC, est une protéine kinase capable de phosphoryler plus d'une centaine de substrats modulant principalement la survie et la prolifération cellulaire. Parmi les

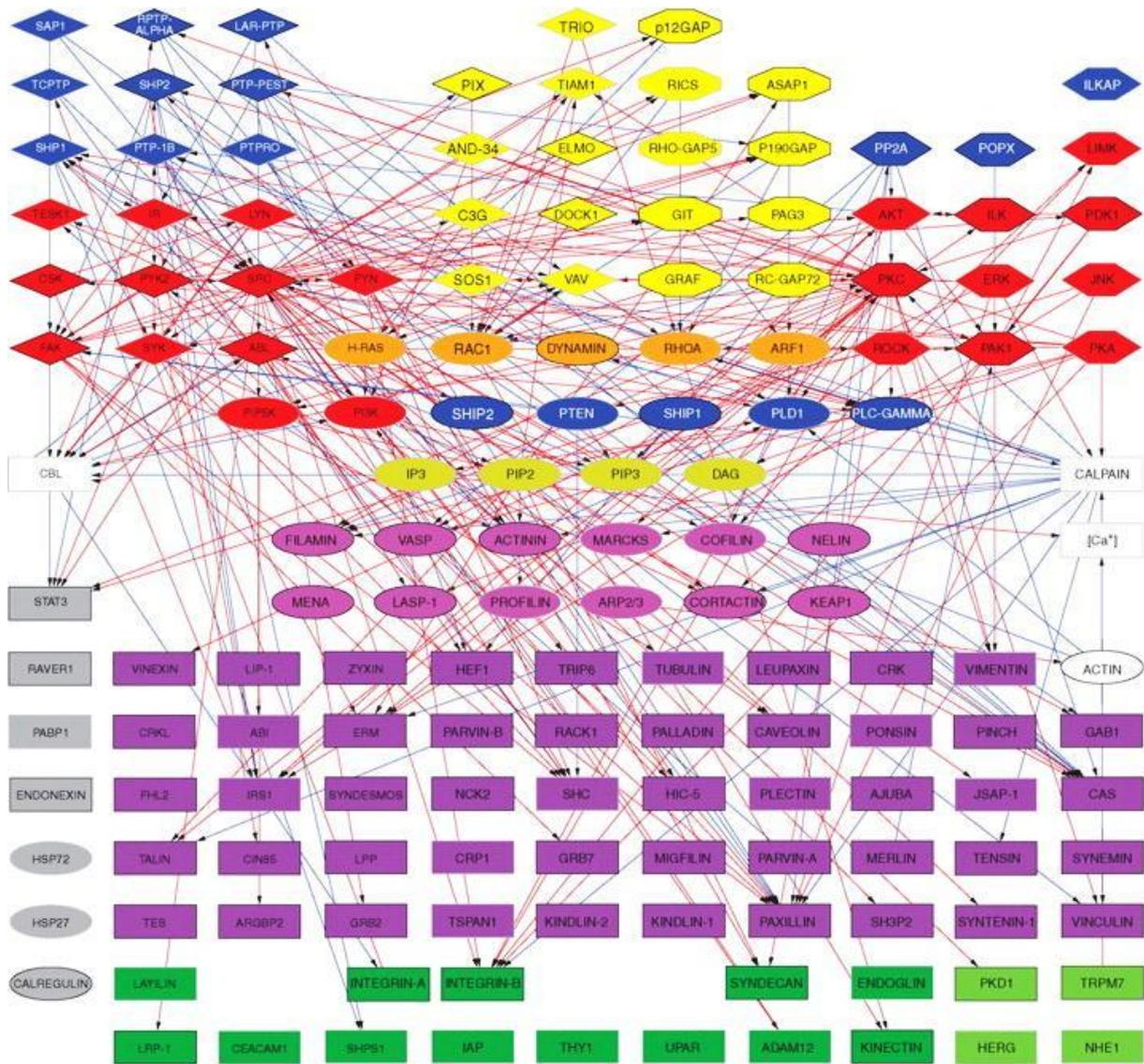


Figure 16 Interconnexion des voies de signalisation constituant l'adhésome.

Les signalisations émergentes des intégrines induisent différents types de réactions : les flèches rouges indiquent des voies d'activation par phosphorylation et les flèches bleues indiquent des déphosphorylations, inactivations ou dégradations de molécules. L'adhésome comprend les récepteurs membranaires (rectangles vert foncés), des protéines adaptatrices (rectangles violets), des protéines associées à l'actine (ovales violet), des tyrosines ou sérine/thréonine kinases (rouge), des phosphatases (bleue), des protéines-G (orange), des GEF (Guanine-nucleotide Exchange Factors) et GAP (GTPases Activating Protein) (jaune). D'après Geiger et Yamada. 2011.

facteurs de transcription activateur de gènes pro-apoptotiques, AKT réprime notamment p53 et la famille des facteurs FoxO qui assurent la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose et/ou la quiescence (ex : Fas-ligand, TRAIL, p27)(X. Zhang *et al.*, 2011). La phosphorylation induit leur exportation hors du noyau. A l'inverse, la protéine AKT induit l'activation de facteurs de transcription comme NFκB et CREB qui activent des gènes codant pour des protéines de survie anti-apoptotiques (Bcl-x_L, Bcl-2, Mcl-1). AKT interfère également dans les mécanismes d'apoptose. La phosphorylation de protéines pro-apoptotiques, comme Bad, Bax, et bak, par AKT modifie leur conformation et empêche leur organisation mitochondriale nécessaire au relargage du cytochrome C pour former l'apoptosome. AKT active la prolifération cellulaire en inhibant p27 qui est nécessaire pour maintenir les cellules dans un état de quiescence. L'inactivation a lieu au niveau transcriptionnel par l'action d'AKT sur le facteur FoxO et au niveau post-traductionnel par la phosphorylation de p27 entraînant sa délocalisation nucléaire et sa séquestration cytosolique (Carracedo et Pandolfi, 2008).

La voie PI3k/AKT est altérée dans de nombreux types de cancers. Ces altérations participent à la tumorigenèse en activant de façon constitutive la voie PI3K/AKT, soit par activation non contrôlée de la PI3K et/ou AKT, soit par inactivation de PTEN, inhibiteur de la voie. D'autre part, les altérations peuvent affecter les récepteurs en amont de la PI3K ou en aval d'AKT (Altomare et Testa, 2005).

2.3.3. Interconnexions des voies de signalisations

Les voies de signalisation précédemment décrites ne fonctionnent pas de façon linéaire, mais sont interconnectées et se régulent entre elles (Figure 16). L'ensemble des molécules de signalisation, incluant de multiples protéines kinases et phosphatases, modifie localement les interactions et l'activité de molécules pouvant générer une modification globale des comportements cellulaires comme la division, la migration, la différenciation et l'apoptose. Ces voies de signalisations forment ainsi un véritable réseau de molécules interconnectées capable de compenser la défaillance de l'une des voies. Certaines protéines en amont des voies de signalisation se trouvent au carrefour de plusieurs d'entre elles, comme Ras, susceptibles d'activer par exemple la voie des raf/MEK/ERK ou la voie PI3K/AKT. D'autres interconnexions sont possibles *via* le PIP3, produit de l'activité de la PI3K, qui active

la phospholipase C (PLC). Le diacylglycérol (DAG), produit par la PLC, est un second messenger pouvant activer la voie MAPK par l'intermédiaire de la PKC (Aksamitiene *et al.*, 2012). Plus de 800 protéines interviennent dans la voie de la PI3K et plus de 2000 sont identifiées pour interagir avec la voie des MAPK (Aksamitiene *et al.*, 2012; Geiger et Yamada, 2011). Ces quelques exemples illustrent la multitude des interactions possibles entre les voies de signalisation. L'ensemble du réseau de signalisation ainsi établi permet une adaptation nécessaire de la réponse cellulaire aux différents contextes biologiques rencontrés.

Chapitre 2 - Les cancers de l'ovaire

1. GENERALITES SUR LES CANCERS OVARIENS

1.1. Données épidémiologiques

Le cancer de l'ovaire est responsable de 140000 décès par an dans le monde. Il représente la première cause de décès par cancer gynécologique et la 7^{ème} cause de décès tous cancers confondus chez la femme. Ce taux de mortalité augmente avec l'âge, passant de 3 pour 100000 femmes entre 40 et 44 ans à plus de 28 pour 100000 femmes au-delà de 74 ans. En France, les cancers de l'ovaire représentent 3% des nouveaux cancers féminins et 4500 cas sont diagnostiqués chaque année (Ferlay *et al.*, 2010)

La survie globale des patientes à 5 ans est proche de 30% (Auersperg, 2013). Ce sombre pronostic s'explique à la fois par la découverte tardive de la maladie et par le développement d'une chimiorésistance au cours du traitement. Dans la majorité des cas, le diagnostic est posé à un stade avancé de la diffusion péritonéale, et l'expression symptomatique banale des cancers ovariens (troubles digestifs, urinaires ou gynécologiques) expliquent en partie la fréquence des diagnostics tardifs (Auersperg *et al.* 2001).

L'étendue de la dissémination au moment du diagnostic est directement corrélée au taux de survie des patientes à long terme. Ainsi, ce taux atteint plus de 90% lorsque la tumeur présente une localisation restreinte aux ovaires et chute à 26% pour les tumeurs présentant une dissémination dans le péritoine et dans d'autres organes (Howlander *et al.*, 2011). Une autre cause du faible taux de survie des patientes est la chimiorésistance. Après la chirurgie et la chimiothérapie, 20% des patientes rechutent dans les 6 mois. Les 80% restant sont sensibles aux chimiothérapies mais le risque de rechute plus tardive est très important (Oza *et al.*, 2011).

1.2. Généralité sur l'ovaire

Les ovaires assurent deux fonctions qui sont la production des ovules, de la puberté à la ménopause et la sécrétion d'hormones stéroïdes, les œstrogènes et la progestérone, qui contrôlent le développement des caractères féminins, le cycle fonctionnel utérin et la grossesse.



Figure 17 Localisation anatomique des ovaires.

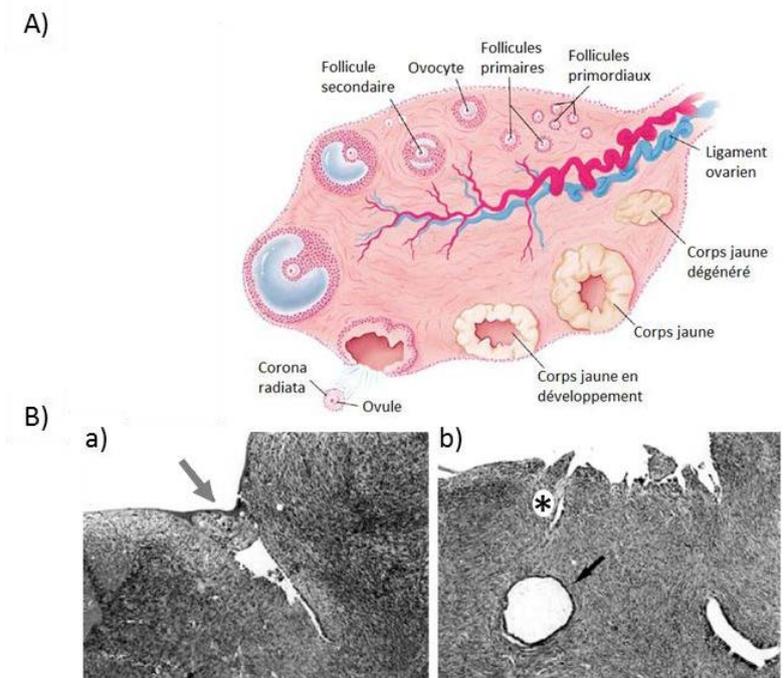


Figure 18 Rupture de l'EOS lors de l'ovulation.

A) Schéma de la libération de l'ovule. B) La surface épithéliale de l'ovaire est indiquée par la flèche grise en a). La réparation de l'épithélium ovarien de surface, suite à la libération de l'ovule, mène à la formation d'invagination (*) et de kystes d'inclusion (flèche noir en B). Grossissement original x25. D'après Okamura *et al.* 2005.

1.2.1. Notion anatomique

Les ovaires, au nombre de deux, sont situés dans la cavité péritonéale pelvienne, de chaque côté de l'utérus (Figure 17). Ils sont ovoïdes, aplatis et mesurent pendant la période d'activité génitale 4 cm de longueur, 2 cm de largeur et 1 cm d'épaisseur. La localisation des ovaires au sein de la cavité péritonéale et la continuité entre le péritoine et l'épithélium ovarien de surface sont des éléments physiopathologiques importants car toute cellule de la surface, notamment cancéreuse, est susceptible de s'exfolier, et de disséminer dans la cavité péritonéale (Feki *et al.*, 2009)

1.2.2. L'épithélium ovarien de surface

Les ovaires sont recouverts d'un épithélium ovarien de surface (EOS) qui est dans la continuité du mésothélium constituant le péritoine (Auersperg, 2013). Ces deux tissus ont une origine mésodermique commune, toutefois ils présentent des différences structurales et fonctionnelles.

A l'inverse des cellules épithéliales du péritoine, les cellules de l'EOS possèdent des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone. D'autre part l'EOS est séparé du stroma ovarien sous-jacent par une lame basale et par la *tunica albuginea*, couche tissulaire dense et riche en collagène ce qui représente une barrière pour la diffusion d'agent bioactif. Les cellules épithéliales de l'EOS sont faiblement ancrées à la matrice extracellulaire et prolifèrent peu. Ces caractéristiques constituent une niche capable de maintenir les cellules isolées et dans un état quiescent ce qui serait idéal pour une population de cellules souches. Des marqueurs de cellules souches ont été identifiés et la capacité des cellules de l'EOS à se différencier en un phénotype fibroblastique ou épithélial en fonction de leur microenvironnement a été observée (Auersperg, 2013).

D'un point de vue fonctionnel, l'EOS participe au développement folliculaire et à sa rupture lors de la libération des ovocytes (Figure 18). En effet, l'ovulation induit une rupture de l'EOS par la sécrétion de protéases provoquant une brèche dans la continuité de l'épithélium. Un processus de cicatrisation est ensuite mis en place entraînant la prolifération des cellules épithéliales afin de reformer la continuité de l'EOS et l'ancien follicule évolue en kyste d'inclusion localisé dans le stroma (Okamura et Katabuchi, 2005).

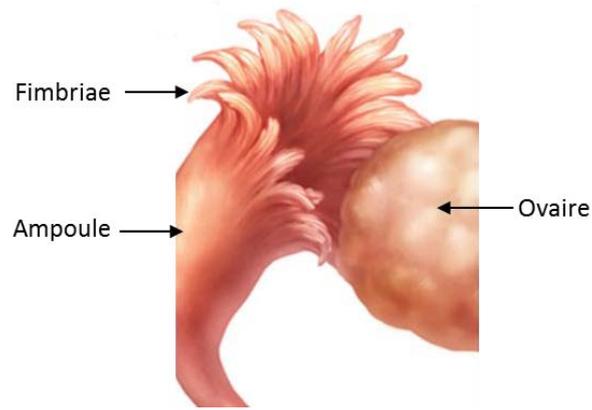


Figure 19 Localisation des *Fimbriae*.

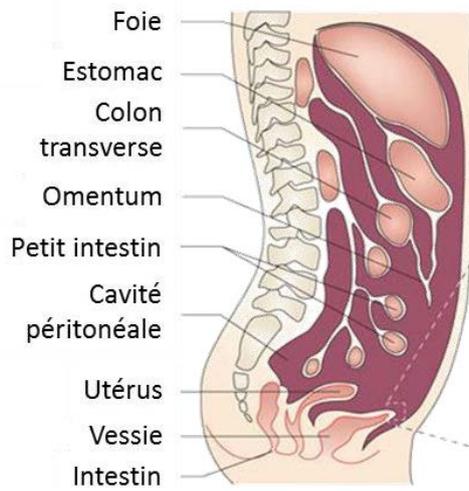


Figure 20 Coupe transversale de la cavité péritonéale.

D'après Kipps *et al.*, 2013.

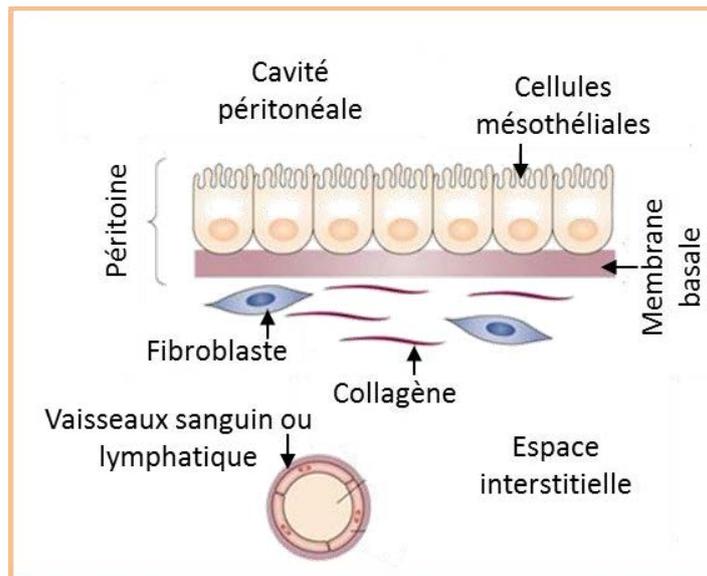


Figure 21 Organisation structurale du péritoine.

D'après Kipps *et al.*, 2013.

1.2.3. L'environnement des ovaires

1.2.3.1. Les *fimbriae* des trompes de Fallope

Les *fimbriae* sont situées à l'extrémité distale des trompes de Fallope (Figure 19). Ce sont des expansions digitiformes orientées vers l'ovaire. Au moment de l'ovulation, les *fimbriae* balayent l'ovaire, capturent l'ovule et le transportent dans l'oviducte par des mouvements ciliaires et péristaltiques. Contrairement à l'EOS, l'épithélium recouvrant les *fimbriae* est colonnaire et composé de 2 types cellulaires : les cellules sécrétrices et ciliées. Les cellules sécrétrices semblent être les cellules progénitrices qui permettent le renouvellement de l'épithélium alors que les cellules ciliées semblent être totalement différenciées.

1.2.3.2. Le péritoine

Le foie, la vésicule biliaire, la rate, l'estomac, les intestins et les ovaires sont bordés par le péritoine qui forme la cavité péritonéale (environ 1.7 m²) (Figure 20). Cette vaste zone, la plus grande cavité dans le corps, est recouverte par un revêtement séreux composé d'une monocouche de cellules mésothéliales formant une barrière avec le tissu conjonctif sous-jacent (Figure 21). Le péritoine a plusieurs fonctions, il maintient des organes en place, il sert de structure de soutien aux vaisseaux et nerfs des organes voisins, il assure le glissement harmonieux des viscères et il participe à la protection immunitaire de l'hôte. Le péritoine est caractérisé par ses capacités de sécrétion et de résorption de liquides qui permettent des échanges passifs et actifs de substances. Les fluides péritonéaux sont principalement formés par des exsudats de liquide interstitiel et réabsorbés par les vaisseaux lymphatiques sous-diaphragmatiques. Dans des conditions physiologiques, le volume de liquide dans le péritoine est de 20 à 50 mL environ ce qui forme un film de 5 µm permettant les déplacements viscéraux (Feki *et al.*, 2009).

1.2.4. Origine embryonnaire et différenciation

Les cellules épithéliales recouvrant les ovaires, le péritoine et les trompes de Fallope dérivent du mésoderme provenant de l'épithélium cœlomique embryonnaire. Initialement l'épithélium cœlomique est pluripotent. Au cours du développement, en fonction des

différents facteurs locaux, les épithéliums se différencient pour acquérir leurs propriétés finales. Bien que l'EOS et le mésothélium extraovarien soient en continuité, leurs états de différenciation ne sont pas identiques. Le CA125, un marqueur de différenciation épithéliale, est retrouvé sur le mésothélium extraovarien mais pas sur l'EOS. Cette différence laisse penser que l'EOS serait moins différencié comparé au mésothélium extraovarien (Auersperg *et al.*, 2001). D'autre part, l'expression de marqueurs de cellules souches comme le CD44, par certaines cellules de l'EOS et l'épithélium des *fimbriae* suggère également une différenciation incomplète (Auersperg, 2013; Bowen *et al.*, 2009).

1.3. Les tumeurs de l'ovaire

1.3.1. Étiologie des cancers de l'ovaire

L'étiologie des cancers de l'ovaire reste peu connue. Cependant, plusieurs facteurs d'ordre physiologique, génétique et épigénétique ont été associés au risque de cancer de l'ovaire.

Le facteur de risque principal semble lié à l'activité génitale de la femme. La répétition fréquente des ovulations entraînant une rupture et une réparation de l'EOS pourrait être à l'origine de la transformation maligne (Fathalla 1971). Cette théorie est renforcée par l'observation que les situations diminuant la fréquence des ovulations, comme la contraception ou l'allaitement, diminuerait le risque de cancer ovarien (Auersperg *et al.*, 2001).

D'autre part, près de 10% des cancers ovariens sont associés avec des prédispositions génétiques. Les mutations principalement décrites affectent particulièrement les gènes *BRCA1* et *BRCA2* impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN. Le risque de développer un cancer ovarien avec des mutations sur les gènes *BRCA1* et *BRCA2* est augmenté de 10 à 25 fois. Ces gènes appartiennent à la famille des gènes suppresseurs de tumeurs, ils codent pour des protéines impliquées dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN afin de maintenir l'intégrité du génome. Toutefois, malgré le rôle majeur du gène *BRCA1* dans la susceptibilité aux cancers de l'ovaire, la diversité des mutations et la méconnaissance des conséquences de certaines d'entre elles rendent complexe l'utilisation de *BRCA1* à titre prédictif. De plus ces mutations ne sont que des facteurs prédisposant ce

<u>Catégories</u>	<u>% des cancers ovariens</u>		<u>Sous-types épithéliaux %</u>	
Epithéliale	85-95			
Cellule stromale gonadique	5-8		Séreux de haut grade	65
Cellule germinale	3-5		Séreux de bas grade	3
Métastase	4-6		Endométriöide	10
Autres	1		Cellules claire	10
			Mucineux	3
			Autres	9

Figure 22 Sous-types des cancers ovariens et leur fréquence relative.

D'après Auersperg et al, 2013.

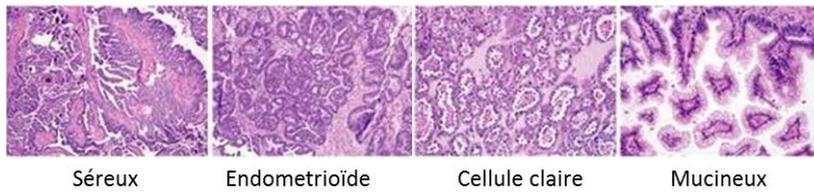


Figure 23 Observation histologique des principaux sous-types des cancers de l'EOS.

D'après Karts et al, 2010.

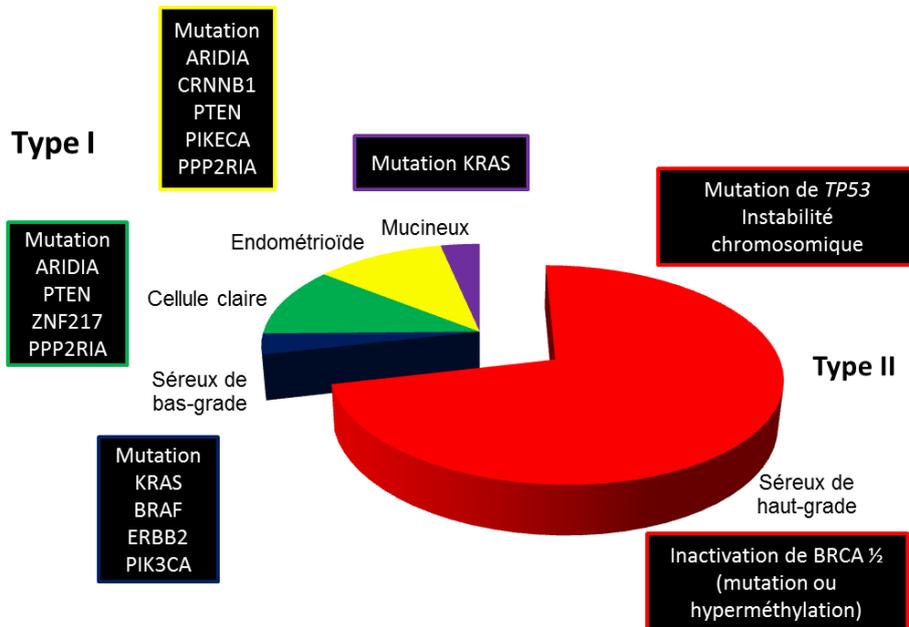


Figure 24 Modifications génétiques associées aux différents sous-types de cancer de l'épithélium ovarien.

D'après Kurman et al. 2011.

qui suggère le rôle important des facteurs épigénétiques dans la survenue des tumeurs ovariennes. L'hyperméthylation de séquence spécifique est observée lors de l'initiation des cancers ovariens et conduit à la répression de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur comme *BRCA1* (Huang *et al.*, 2013).

Une instabilité génétique importante due à des mutations dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) est observée chez les patientes atteintes d'un cancer colorectal héréditaire (syndrome de Lynch). Ces mutations favorisent la survenue le plus souvent de cancers du côlon, de l'endomètre et augmentent de 12% le risque de développer un cancer de l'ovaire (Folkins et Longacre, 2013).

1.3.2. Hétérogénéité / Classification

L'ovaire étant constitué de plusieurs types cellulaires, il existe différents types de cancers associés à chacun d'eux. La majorité des cancers ovariens sont de types épithéliaux (85-95%) et ils se développent le plus souvent sur l'épithélium ovarien de surface (EOS) (Auersperg, 2013).

Une des caractéristiques de la carcinogenèse ovarienne est la modification de l'état de différenciation et d'organisation de l'EOS. En effet, la classification des tumeurs de l'EOS de l'organisation mondiale de la santé (OMS) reconnaît 8 sous-types histologiques : séreux, endométrioïde, mucineux, à cellules claires, à cellules intermédiaires, à cellules squameuses, à cellules épithéliales mixtes et indifférenciées (Figure 22). Certains de ces sous-types présentent des caractéristiques d'épithéliums de type Müllérien. Les cancers ovariens de type séreux, endométrioïde et mucineux ressemblent respectivement à l'épithélium des trompes de Fallope, de l'endomètre et de l'endocervix (Karst et Drapkin, 2010) (Figure 23). Pour chaque sous type de tumeurs, il convient de différencier les tumeurs bénignes (adénomes), les tumeurs à la limite de la malignité (tumeurs « borderline » ou tumeurs à faible potentiel invasif) et les tumeurs malignes (adénocarcinomes).

Un autre moyen de distinguer les sous types de cancer épithéliaux de l'ovaire est de les classer selon des profils moléculaires. Deux groupes peuvent être formés sur des critères de mutation ou d'inactivation de gènes (Figure 24). Les tumeurs de type I incluent les types histologiques séreux, mucineux bénins et les tumeurs à cellules claires et indifférenciées. Ces

Tableau 2 Classification FIGO des différents stades des cancers de l'ovaire.

Stades FIGO	Descriptions
Stades I	▪ Le cancer est limité aux ovaires.
Stades IA	Le cancer est limité à un seul ovaire et reste contenu à l'intérieur.
Stades IB	Le cancer atteint les deux ovaires et reste contenu à l'intérieur.
Stades IC	Le cancer touche un ou les deux ovaires, mais la tumeur peut avoir traversé la capsule ovarienne ou s'être propagée à la surface de l'ovaire. On retrouve des cellules cancéreuses dans le liquide de l'abdomen.
Stades II	▪ La tumeur s'est étendue localement, aux organes du bassin (organes pelviens)
Stade IIA	La tumeur s'est propagée à l'utérus ou aux trompes de Fallope. On ne retrouve pas de cellules cancéreuses dans l'abdomen.
Stade IIB	La tumeur s'est propagée à d'autres organes pelviens (vessie, rectum ...). On retrouve des cellules cancéreuses dans le liquide abdominal.
Stades III	▪ La tumeur s'est étendue au péritoine ou aux ganglions lymphatiques situés dans le bassin (ganglions pelviens). On parle de métastases régionales.
Stade IIIA	Des métastases microscopiques sont découvertes sur le péritoine, lors de l'analyse au microscope réalisée après la chirurgie ou après une biopsie.
Stade IIIB	Les métastases du péritoine mesurent jusqu'à 2 centimètres, mais aucun ganglion pelvien n'est atteint.
Stade IIIC	Certaines métastases du péritoine mesurent plus de 2 centimètres et/ou le cancer s'est propagé aux ganglions pelviens.
Stade IV	▪ Le cancer s'est propagé vers des organes éloignés: la plèvre (enveloppe des poumons), le foie.

tumeurs prolifèrent faiblement et sont détectées durant les premiers stades de la pathologie (précurseurs pré-invasifs et bénins). Des mutations ciblant les gènes *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *CTNNB1*, *PTEN*, *PIK3CA*, *ARDID1A*, *PPP2R1A* impliqués dans les voies de signalisations régulant la prolifération et la différenciation cellulaire, sont particulièrement retrouvées. Ces tumeurs présentent rarement de mutation du gène *TP53* et sont relativement stables génétiquement (Kurman et Shih, 2011).

A l'inverse, les tumeurs de type II regroupent les types histologiques à cellules épithéliales mixtes, indifférenciées et les types mucineux et séreux (majoritairement) de hauts grades. Ces tumeurs sont caractérisées par des mutations du gène *TP53* très fréquentes, associées à une instabilité génétique accrue. De plus, l'expression de *BRCA1/2* est souvent altérée soit par mutation ou par méthylation du promoteur. Ces tumeurs sont agressives et détectées à des stades avancés de la pathologie.

1.3.3. Stade de dissémination et grade

L'extension des tumeurs épithéliales de l'ovaire suit plusieurs stades caractérisés par la taille et la localisation des tissus atteints. L'extension du foyer primaire passe par plusieurs voies. Elle peut être locale et se faire par contiguïté au niveau des organes voisins (ex : trompes, utérus,...). L'extension peut également emprunter la voie péritonéale : les cellules exfoliées à partir de la surface de l'épithélium sont libérées dans la cavité péritonéales sous formes isolées et peuvent former des agrégats multicellulaires appelées sphéroïdes. Ce phénomène s'accompagne le plus souvent de l'accumulation d'un liquide d'ascite, symptôme révélateur du développement de la tumeur. Le péritoine, bordant la cavité abdomino-pelvienne, est le principal site d'implantation des cellules cancéreuses sous forme de nodules tumoraux. Plus rarement, la dissémination se réalise par voie lymphatique ou sanguine, provoquant l'apparition de métastases sur d'autres organes. Le stade d'extension tumorale est défini par référence à la classification de la Fédération Internationale des Gynécologues Obstétriciens (FIGO) (Tableau 2).

D'autre part, les cancers de l'ovaire sont caractérisés par leur grade histologique qui reflète l'état de différenciation de la tumeur. Il peut être apprécié en évaluant la perte de l'architecture du tissu d'origine, la forme et la taille des noyaux cellulaires et le nombre de

cellules en division. Trois grades sont habituellement reconnus en fonction du pourcentage de secteur étant devenu indifférencié : le grade 1 (moins de 5%), le grade 2 (entre 5 et 50%) et le grade 3 (plus de 50%) (INCA et HAS, 2010).

1.3.4. Les traitements des cancers ovariens

La caractérisation de la tumeur (type histologique, stade et grade) est essentielle pour le choix des traitements. Dans 75% des cas, les tumeurs de l'ovaire sont décelées à un stade avancé nécessitant une étape de chirurgie et de chimiothérapie.

1.3.4.1. La chirurgie

La chirurgie occupe une place importante de la prise en charge des cancers de l'ovaire. Elle constitue le premier geste thérapeutique et complète le diagnostic par la précision du stade de dissémination de la tumeur. La qualité de l'exérèse et la taille du résidu tumoral après l'intervention chirurgicale ont un impact direct sur la survie, en particulier pour les stades avancés. Lors de l'opération, une exploration minutieuse de tous les organes de la cavité péritonéale est réalisée. Cette intervention permet l'exérèse des lésions et s'accompagne généralement d'un lavage péritonéal. La majorité des cancers ovariens étant diagnostiquée à un stade tardif, la chirurgie comporte fréquemment une hystérectomie totale (ablation de l'utérus), annexectomie bilatérale (ablation des trompes de Fallope et des ovaires), omentectomie (ablation du grand épiploon) et un curage ganglionnaire pelvien et aortique. Une exérèse digestive partielle peut être nécessaire en cas d'atteintes associées pour réduire au maximum la masse tumorale (Cannistra, 2004)(INCA et HAS, 2010).

1.3.4.2. La chimiothérapie

L'évolution de la chimiothérapie a été marquée par l'utilisation du platine, à la fin des années 1970, et plus récemment des taxanes (famille de molécules isolées de l'if du genre *Taxus*), dans les années 1990. Le protocole standard de chimiothérapie consiste en des cycles répétés de traitement associant des sels de platine (carboplatine) avec des taxanes (paclitaxel). L'association de ces agents chimiothérapeutiques permet d'obtenir une

augmentation du taux de survie des patientes. L'apparition d'une résistance acquise à la chimiothérapie est la principale limite de l'efficacité du traitement. L'utilisation d'autres dérivés de ces molécules en deuxième intention est relativement inefficace en raison de résistances croisées qui apparaissent après le traitement initial (Ozols, 2006).

1.3.4.3. Les thérapies ciblées

Malgré l'association de la chirurgie et des chimiothérapies, l'émergence de chimiorésistances associées au risque de rechute qui est de 25% pour les stades précoces et de 70% pour les stades avancés rendent souvent les cancers ovariens incurables (Ushijima, 2009). Une meilleure compréhension des comportements cellulaires et des mécanismes moléculaires impliqués lors de la dissémination des cellules cancéreuses permet l'émergence de nouvelles cibles moléculaires.

Ainsi, de nombreux essais cliniques visent à utiliser des molécules (anticorps, inhibiteurs) ciblant les processus participant à la croissance et/ou à la dissémination tumorale. Un grand nombre d'anticorps ciblant des molécules intervenant dans l'angiogenèse (VEGF/VEGFR) sont testés en association avec les chimiothérapies. Des inhibiteurs bloquant des systèmes de réparation de l'ADN (PARP) sont aussi développés. Utiliser ces inhibiteurs sur des cellules cancéreuses, dont le système de réparation de l'ADN est déjà endommagé (cellules BRCA déficientes), les conduiraient davantage vers une voie de mort cellulaire que de survie. De même, des molécules anti-apoptotiques, comme Mcl-1, sont surexprimées par les cellules cancéreuses chimiorésistantes et sont des cibles thérapeutiques actuellement étudiées (Tomasina *et al.*, 2013). D'autres stratégies visent à interférer avec des voies de signalisation en inhibant notamment des protéines de la voie MAP kinase dont l'activité est souvent perturbée dans les cancers de type I (Banerjee et Kaye, 2013).

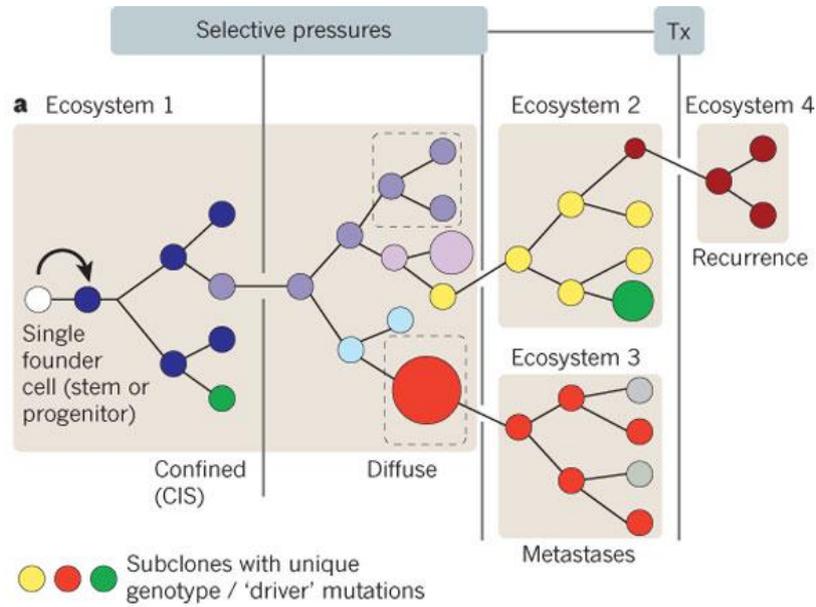


Figure 25 Sélection clonale des cellules cancéreuses.

La pression de sélection induite par les facteurs environnementaux (barres verticales) et les traitements (Tx) conduit à l'émergence de sous-clones différents génétiquement (cercles de différentes couleurs). La taille des cercles représente le développement des sous-clones. Les écosystèmes de 1 à 4 représentent des microenvironnements tissulaires différents. Les carrés en pointillés dans l'écosystème 1 représentent des niches particulières. Ce modèle s'applique aux tumeurs solides qui ont un développement sur des dizaines d'années (CIS : carcinoma *in situ*). D'après Greaves et Maley. 2012.

2. IMPORTANCE DE LA MEC ET DES INTERACTIONS CELLULAIRES LORS DE LA DISSEMINATION

DES TUMEURS EPITHELIALES DE L'OVAIRE

2.1. Foyer primaire

2.1.1. Cancérogenèse de l'épithélium ovarien de surface

Le cancer est une maladie ayant pour origine un dérèglement du génome. Le processus conduisant à la formation d'un foyer tumoral est très variable car il est évolutif et dépend de nombreux facteurs génétiques et environnementaux (Figure 25).

L'initiation du processus tumoral débute par des modifications génétiques perturbant l'expression de quelques gènes impliqués dans le contrôle de la stabilité cellulaire (oncogène ou gène suppresseur de tumeur). Des évènements épigénétiques s'associent avec la survenue des altérations génétiques perturbant davantage l'expression des gènes. Certains clones sont sélectionnés par pression des facteurs environnementaux favorisant l'émergence de différentes sous-populations de cellules cancéreuses (Greaves et Maley, 2012a; Yates et Campbell, 2012).

La diversité des tumeurs épithéliales de l'ovaire rend difficile l'étude et la compréhension du mécanisme à l'origine de la transformation maligne de l'EOS. Toutefois, l'activité physiologique des ovaires entraîne la survenue d'évènements, modifiant le microenvironnement de l'épithélium, propices à l'expansion et la sélection clonale de cellule précurseur de cancer. Différentes hypothèses décrites ci-dessous, non exclusives mutuellement, sont avancées pour expliquer la cancérogenèse ovarienne.

2.1.1.1. Le remodelage de l'EOS

Au cours de l'activité ovarienne, l'EOS est amené à se rompre pour libérer les ovocytes. La lésion de l'épithélium de surface est comblée grâce aux capacités des cellules épithéliales à proliférer et à remodeler leur microenvironnement. Le processus de cicatrisation mène à l'inclusion de cellules épithéliales dans le stroma, entraînant la formation de kyste d'inclusion. La répétition des mécanismes de réparation de l'EOS à chaque ovulation et l'isolement des cellules épithéliales au sein de kyste augmenteraient le

risque de mutation et donc de malignité. Des éléments issus de données épidémiologiques étayaient cette hypothèse : tous les éléments diminuant la répétition des ovulations (contraception orale, allaitement, multiparité) diminuent le risque de cancer de l'ovaire. A l'inverse, l'augmentation de l'incidence est observée pour les femmes soumises à une stimulation d'ovulation. Des expériences chez les primates et d'autres modèles animaux ont confirmé ces observations (Fathalla, 1971; Landen *et al.*, 2008).

2.1.1.2. La stimulation hormonale

Les ovulations entraînent une exposition de l'EOS à des fortes concentrations d'hormones stéroïdiennes et de gonadotrophines. Les hormones FSH (Folliclule-Stimulating Hormone) et LH (Luteinising Hormone) stimulent la prolifération cellulaire en activant des oncoprotéines acteurs de la signalisation cellulaire notamment des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR), les MAPK (ERK1/2) et d'autres protéines kinases (PKA, PKC, PI3K). L'exposition répétée à un taux élevé de gonadotrophine stimulant l'EOS pourrait donc favoriser la survenue de transformation néoplasique ou promouvoir la propagation de cellule transformée (Landen *et al.*, 2008). Toutefois, lors de l'augmentation du grade des tumeurs et suite à une exposition prolongée au ligand, un rétrocontrôle conduirait à la diminution d'expression des récepteurs aux hormones FSH et LH (Mertens-Walker *et al.*, 2012).

2.1.1.3. L'inflammation

Un intérêt croissant est porté sur le rôle de l'inflammation qui accompagne chaque ovulation. Après chaque ovulation et pendant l'étape de cicatrisation, des quantités importantes de cytokines inflammatoires, d'espèces réactives de l'oxygène, d'enzymes remodelant la matrice, de facteurs de croissance et de cellules immunitaires activées sont retrouvés aux abords de l'EOS. L'ensemble de ces composants constitue un environnement pro-inflammatoire entraînant un stress chronique de l'EOS favorisant la survenue de transformation maligne. En accord avec cette hypothèse, les patientes traitées avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens, comme l'aspirine, présentent un risque réduit de cancer de l'ovaire (Landen *et al.*, 2008; Macciò et Madeddu, 2012).

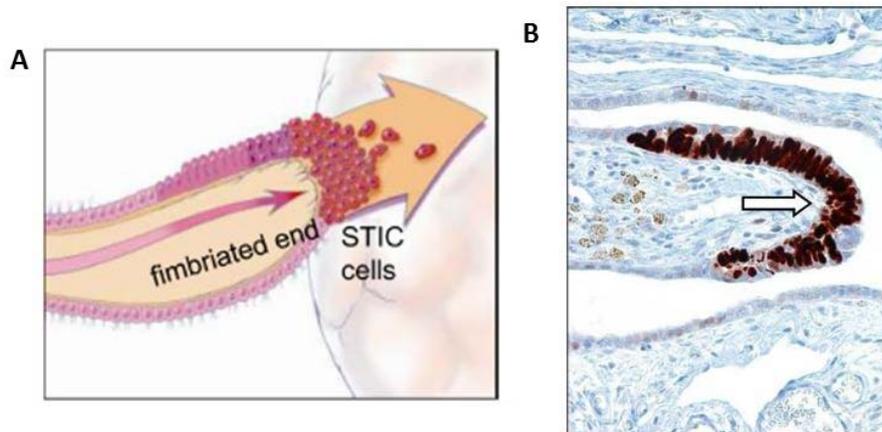


Figure 26 Localisation des STIC (Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma).

A) Représentation schématique de la dissémination directe des STIC sur la surface des ovaires conduisant à la formation de tumeurs séreuses de haut grade. B) Observation des STIC par marquage immunohistochimique de P53 à l'extrémité des *fimbriae*. D'après Kurman et al. 2011.

2.1.1.4. Hypothèse des *fimbriae* comme site d'origine

Lors de l'étude de la cancérogenèse de l'EOS, un défaut persistait dans les différentes hypothèses proposées. L'observation de stade précoce ou de lésions précoces de carcinome ovarien pouvant dériver en haut grade de type séreux (HGSOC, High Grade Serous Ovarian Cancer) est très rare. A l'inverse, très souvent au moment des opérations des HGSOC, des lésions cancéreuses appelées STIC (Serous Tubal Intraepithelial Carcinomas) coexistent sur les *fimbriae* (Figure 26). Une des explications serait que les STIC des *fimbriae* soient à l'origine des cancers de l'ovaire. Ces cellules auraient une prolifération beaucoup plus rapide dans l'environnement des ovaires plutôt que dans celui des *fimbriae*, expliquant la difficulté d'observer des stades précoces. Histologiquement, les STIC sur les *fimbriae* ressemblent au HGSOC et présentent une prolifération accrue, une surexpression de p53 et une diminution de l'expression de p21 et p27. De plus, les STIC avec *TP53* mutés sont détectés en absence de HGSOC suggérant que les STICs précèdent le développement des cancers ovariens et ne sont pas les conséquences de métastases ovariennes. Plus de 70% des patientes avec un cancer ovarien ou péritonéal de type séreux présentent des STIC suggérant leurs rôles potentiels dans la cancérogenèse (Auersperg, 2013; Sehdev *et al.*, 2010).

2.1.2. Organisation du foyer tumoral

Le foyer tumoral regroupe une population hétérogène de cellules, dont une partie seulement est maligne, et un tissu environnant, le stroma. Au sein de ce micro-écosystème, la matrice extracellulaire forme la trame de soutien du tissu. L'irrigation du foyer tumoral est assurée par les vaisseaux sanguins et lymphatiques et la présence de cellules immunitaires génèrent un contexte inflammatoire (Leroy-Dudal *et al.*, 2008).

2.1.2.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure tridimensionnelle hautement organisée et impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques. La MEC, en plus de maintenir l'intégrité tissulaire, régule aussi la migration, la différenciation, la prolifération cellulaire tout en constituant un réservoir de cytokines et de facteurs de croissance. Les cellules tumorales interfèrent avec la MEC physiologique en modifiant sa structure et sa

composition. Le remodelage matriciel, dû à la dégradation par des systèmes protéolytiques et/ou la néo-synthèse de protéines matricielles, sont des déterminants majeurs dans la progression tumorale car ils influencent la croissance et la dissémination tumorale (Ween *et al.*, 2011).

La composition de la MEC des carcinomes ovariens commence à être bien appréhendée. On y retrouve des glycoprotéines fibreuses (collagènes I, III, VI), des polysaccharides tel l'acide hyaluronique et des protéoglycanes associés ou non aux membranes cellulaires (syndécan 1 et perlecan). Les stromas renferment également d'autres glycoprotéines : laminine, tenascine, fibuline-1, SPARC (Secreted Protein Acid in Rich Cystein), thrombospondine-1, fibronectine et vitronectine (Leroy-Dudal *et al.*, 2008; Ricciardelli et Rodgers, 2006). L'ensemble de ces protéines conditionnent les modifications du comportement des cellules cancéreuses ovariennes et influencent l'évolution des tumeurs de l'ovaire.

2.1.2.2. Les cellules stromales

Les cellules majoritaires, dans le stroma des ovaires, sont des fibroblastes quiescents. Lors de la rupture de l'EOS accompagnant l'ovulation, les fibroblastes peuvent être activés temporairement en myofibroblastes, capables de synthétiser des protéines de la MEC et de sécréter des facteurs de croissance, contribuant à la réparation tissulaire. Durant le processus tumorigène, les fibroblastes environnant la tumeur se trouvent en grande majorité activés en permanence et sont appelés CAF (Carcinoma-Associated Fibroblasts). L'origine des CAF reste toujours discutée, il semblerait que des signalisations paracrines des cellules cancéreuses entraînent l'activation des fibroblastes. Des modifications épigénétiques et des modifications d'expression de mi-RNA (miR-155, miR-214, miR31) stabiliseraient les fibroblastes dans leur état activé (Mitra *et al.*, 2012). Les CAF sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6), des chimiokines (CXCL-12/SDF-1 α), des facteurs de croissance (VEGF, PDGFR), des protéases (MMP) et de la MEC (Tenascine C, Fibronectine, collagène-I) (Schauer *et al.*, 2011). Ces molécules conduisent à un remodelage du microenvironnement favorable à la dissémination des cellules cancéreuses. En effet, le VEGF conduit à une augmentation de l'angiogenèse tumorale (cf. 2.1.2.3), le SDF-1 α stimule

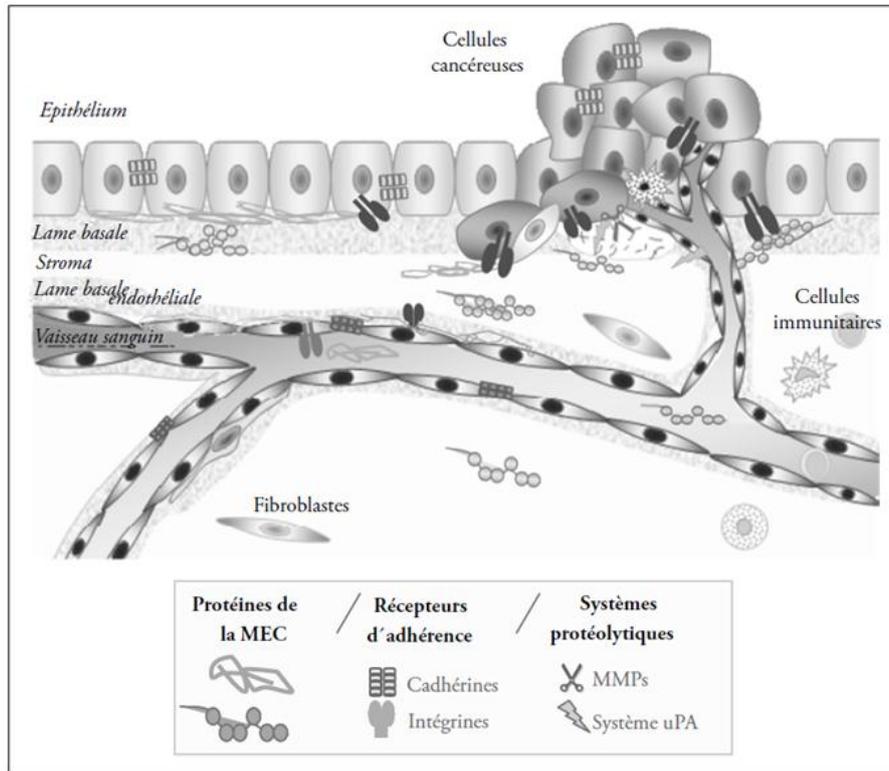


Figure 27 Le foyer tumoral ovarien.

Les cellules cancéreuses, immunitaires et les fibroblastes constituent le foyer tumoral au sein du microenvironnement ovarien. L'irrigation du foyer tumoral est assurée par des vaisseaux sanguins. La matrice extracellulaire assure une trame de soutien. Les cellules remodelent leur microenvironnement *via* les récepteurs d'adhérence et les systèmes protéolytiques
D'après Leroy-Dudal *et al.* 2008b.

également la prolifération cellulaire, le PDGF, les MMP et les protéines matricielles participent à l'augmentation des capacités d'invasion des cellules cancéreuses (Shimoda *et al.*, 2010; Y. Zhang *et al.*, 2011).

Le stroma est également composé de cellules immunitaires telles que des macrophages ou des lymphocytes T. Des molécules sécrétées par les cellules tumorales comme le VEGF, le TGF β , CXCL12, les IL-6 et 10 ou des ROS (Reactive Oxygen Species) agissent en facteurs immunosuppresseurs en perturbant des signalisations entre différentes cellules immunitaires. Par exemple, la chimiokine CXCL12 (SDF1) conduit au recrutement des précurseurs des cellules dendritiques plasmacytoïde dans l'environnement tumoral, celles-ci induisent la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T limitant leur activation et leur prolifération évitant ainsi l'émergence de réponse immunitaire. Ces interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires au sein du microenvironnement tumoral conduisent à une tolérance immunitaire (Preston *et al.*, 2011; Zou, 2005).

2.1.2.3. La vascularisation tumorale

Une tumeur peut grossir jusqu'à un volume d'environ 1-2 mm³ avant d'être limitée par la diffusion de l'oxygène et des nutriments. Pour poursuivre son accroissement, les cellules cancéreuses de la tumeur doivent adopter un phénotype pro-angiogénique pour initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux existants dans le stroma environnant (Hillen et Griffioen, 2007). Ce processus de néoangiogenèse tumorale est contrôlé par de nombreux facteurs pro- et antiangiogéniques. Des facteurs de croissance comme le VEGF et le FGF sont sécrétés par les cellules tumorales entraînant l'activation des cellules endothéliales. La prolifération et la migration des cellules vasculaires activées conduisent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins présentant une organisation et une haute perméabilité caractéristique de l'angiogenèse tumorale. Le foyer tumoral renferme également des structures lymphatiques. Des vaisseaux LYVE-1 positifs (Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronan Receptor-1), considéré comme un marqueur de vaisseaux lymphatiques, sont détectés sur des coupes de tissus tumoraux (Hillen et Griffioen, 2007). Les carcinomes ovariens sont donc des tumeurs solides, vascularisées (Figure 27). Les tumeurs invasives ont une densité vasculaire supérieure à celle des tumeurs *borderline* de

même stade, elles-mêmes plus vascularisées que le stroma sous-jacent à l'épithélium ovarien normal ou bénin. Ces observations suggèrent que le « switch angiogénique » interviendrait dès l'émergence de lésion précurseur non-invasive à partir de l'épithélium. D'autre part, la dissémination hématogène de cellules cancéreuses ovariennes a été décrite mais reste un phénomène rare (Spannuth *et al.*, 2008). Des molécules avec des effets anti-angiogéniques sont développées afin de limiter la croissance de la tumeur. Le VEGF et ses récepteurs sont les principales cibles des traitements actuellement autorisés (Jain et Carmeliet, 2012).

2.1.2.4. Interactions des cellules cancéreuses au sein de leur microenvironnement tumoral

Au cours du développement du foyer tumorale, les interactions cellules-cellules et cellules-MEC sont réorganisées par comparaison au tissu sain d'origine.

- Interactions cellules-cellules

Ainsi, des protéines impliquées dans les jonctions serrées, telles que les claudines 3 et 4, sont fortement exprimées dans le foyer tumoral, alors que des protéines constituant les jonctions communicantes, comme la connexine 43, sont peu détectées dans les cellules des tissus tumoraux (Morin, 2007). La perte des jonctions communicantes serait un moyen pour les cellules cancéreuses d'échapper à une transmission adéquate des signaux régulateurs (Gershon *et al.*, 2008). L'expression des cadhérines, participant à la formation des jonctions adhérentes, varie en fonction de la progression tumorale. L'E-cadhérine est exprimée de façon rare et inconstante dans l'EOS ; les jonctions adhérentes étant assurées par les N-cadhérines selon un mécanisme adhésif propre aux tissus dérivant du mésoderme (Auersperg *et al.*, 2001). L'E-cadhérine participerait aux étapes précoces de la cancérogenèse ovarienne en favorisant la survie et la prolifération cellulaire. La transfection de cellules de l'EOS par le gène de l'E-cadhérine conduit à une lignée cellulaire tumorigène. En revanche son expression est plus variable dans les stades les plus avancés de la pathologie (Auersperg *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2012).

- Interactions cellules-MEC, importance des intégrines αv

Les mécanismes d'adhérence à la MEC, *via* les intégrines, initient des signaux régulant différents aspects des comportements cellulaires essentiels au développement de la tumeur. Le répertoire d'intégrines potentiellement exprimées par les cellules cancéreuses ovariennes comprend les intégrines de la famille $\beta 1$ et αv et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Ahmed *et al.*, 2005; Cannistra *et al.*, 1995; Carreiras *et al.*, 1996; Maubant *et al.*, 2005). De par la diversité de ce répertoire, les cellules cancéreuses interagissent avec la majorité des protéines matricielles dont le collagène, la laminine, la fibronectine et la vitronectine. Ainsi, on observe une augmentation de la prolifération, de l'adhérence et de la migration cellulaire en réponse au collagène de type I, à la laminine et à la fibronectine (Ahmed *et al.*, 2005). Des études montrent que les intégrines αv et leur ligand principal, la vitronectine, sont impliquées dans les comportements adhésif et migratoire des cellules cancéreuses ovariennes (Carreiras *et al.*, 1999a, 1999c). En effet, la sous-unité αv est exprimée par l'EOS sain et dans les tumeurs tandis que la vitronectine est synthétisée par les cellules cancéreuses ovariennes (Carreiras *et al.*, 1996). Quand les cellules s'étalent sur la vitronectine, l'intégrine $\alpha v\beta 3$ est recrutée dans les zones des contacts focaux et participe ainsi à l'ancrage cellulaire (Carreiras *et al.*, 1999a). De plus, sa surexpression stimule la mobilité cellulaire sur ce même substrat (Hapke *et al.*, 2003). Les cellules cancéreuses ovariennes sont également capables d'adhérer et de remodeler la Vn et la Fn composant la matrice extracellulaire endothéliale *via* les intégrines αv et la MMP-2 (Carreiras *et al.*, 2002; Leroy-Dudal *et al.*, 2005a, 2005c). Par ailleurs, les intégrines αv concourent à la transduction de signaux prolifératifs *via* la voie ILK et la voie des MAPK (Cruet-Hennequart *et al.*, 2003; Hapke *et al.*, 2003). Ainsi, les intégrines αv et leurs ligands apparaissent comme des protagonistes clés dans la régulation du comportement cellulaire lors du développement tumoral.

2.2. Dissémination intrapéritonéale des cellules cancéreuses ovariennes

Le processus de dissémination des cancers ovariens diffère du processus classique de métastases par voie sanguine retrouvé dans beaucoup d'autres cancers. En effet, les cellules cancéreuses du sein ou du colon suivent différentes étapes comme l'intra- et l'extravasation des vaisseaux sanguins avant de s'implanter sur d'autres organes (ex : les os, le foie, le

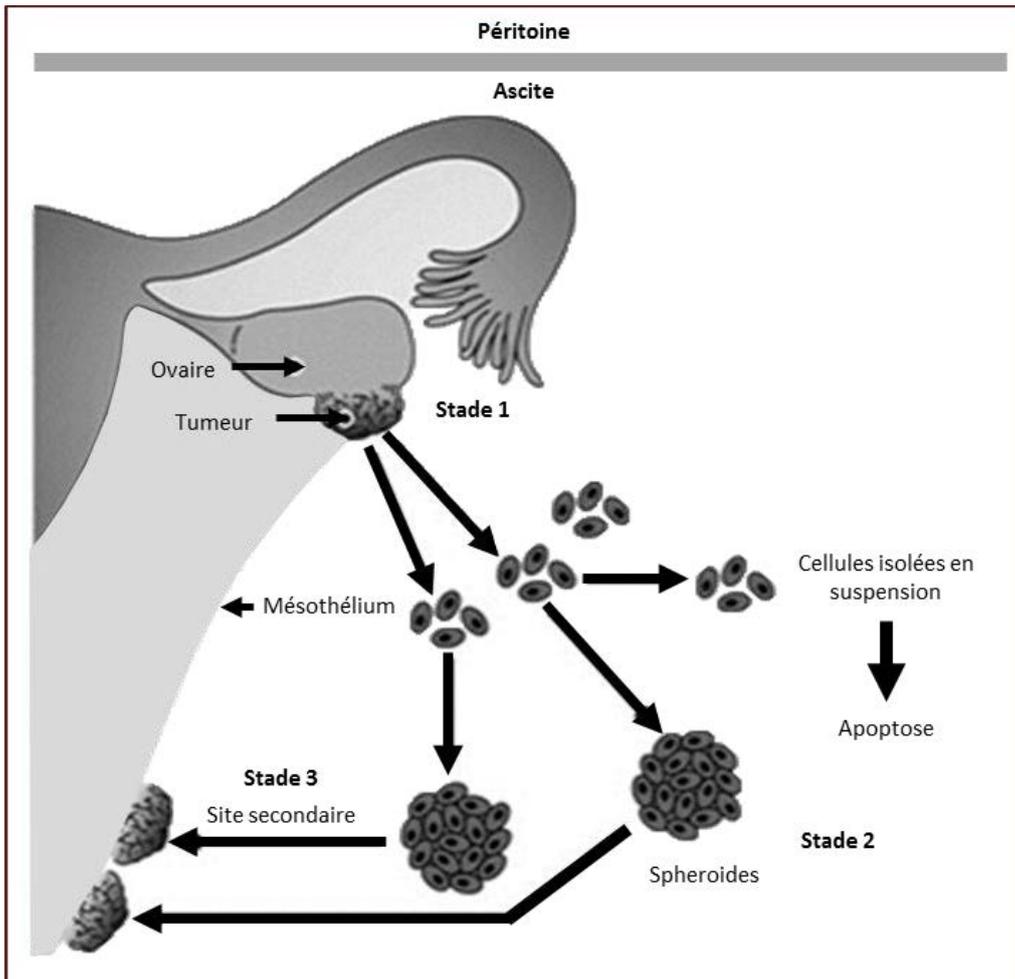


Figure 28 Modèle de la progression tumorale ovarienne.

D'après Shield *et al.* 2009.

cerveau) (Gupta et Massagué, 2006). Cette voie de dissémination hématogène existe pour les cancers ovariens mais reste rarement retrouvée. Classiquement, les tumeurs épithéliales de l'ovaire colonisent par extension les organes adjacents, notamment les trompes de Fallope, l'utérus et le colon sigmoïde. Les cancers de l'ovaire disséminent également très fréquemment par voie transcoelomique. Environ 75% des patientes présentes des métastases péritonéales dans les stades avancés de la maladie (Braicu *et al.*, 2011). Les métastases transcoelomiques sont souvent associées à l'accumulation de fluides, effusions malignes, dans la cavité péritonéale. Ainsi, les cellules cancéreuses se détachent du foyer primaire de façon isolée ou en agrégats multicellulaires, sont transportées passivement par les fluides péritonéaux sur le mésothélium et le colonisent (Figure 28). Des observations cliniques suggèrent que les cellules cancéreuses se développent de façon importante dans l'environnement péritonéal, mais métastasent rarement à l'extérieur, sur d'autres organes.

2.2.1. L'organisation en sphéroïdes

Avant que les cellules cancéreuses ovariennes suivent le processus métastatique par voie péritonéale, elles subissent un réarrangement de leurs interactions cellules-cellules et cellule-MEC pour faciliter le détachement cellulaire du foyer primaire. Ce changement d'organisation semble être permis par la réalisation d'une transition épithélio-mésenchymateuse qui consiste en une dédifférenciation (Ahmed *et al.*, 2007). Cette plasticité cellulaire est notamment une des caractéristiques des cellules souches cancéreuses. L'organisation des cellules et leur réarrangement en agrégats multicellulaires, ou sphéroïdes, permettraient aux cellules cancéreuses de survivre en absence d'ancrage à une matrice extracellulaire avant de former un foyer secondaire à distance.

2.2.1.1. La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est définie comme un programme cellulaire et moléculaire complexe par lequel les cellules épithéliales modifient leur état de différenciation. Ainsi, les cellules perdent leurs caractéristiques en termes d'interactions cellules-cellules, de polarité et de manque de mobilité au profit d'un phénotype mésenchymateux incluant des capacités accrues de migration, d'invasion et de résistance à

l'apoptose. Le processus de TEM dans les cellules cancéreuses est contrôlé par de nombreux acteurs comme des cytokines et des facteurs de croissance secrétés par les cellules du stroma constituant la tumeur (Thiery *et al.*, 2010). Les cytokines de la famille des TGF β sont les inducteurs de TEM les mieux caractérisés dans le développement des cancers (Vergara *et al.*, 2010). Le TGF β influence aussi d'autres facteurs de croissance comme le PDGF et le FGF qui peuvent agir indépendamment ou de concert pour déclencher le processus de TEM. D'autre part, des facteurs environnementaux, comme l'hypoxie, peuvent induire des TEM dans les tumeurs par modification de l'expression des facteurs de transcription (Snail1, Twist1), l'activation des voies de signalisation (Notch, NF κ B) et l'induction de l'hypométhylation de l'ADN. Des études ont également identifié le rôle d'ARN non codant, notamment la famille des miR-200, dans l'induction de TEM dans les cancers. Ces mi-RNA sont impliqués dans la régulation de l'expression des E-cadhérines et de la polarité des cellules épithéliales (Mezzaninica *et al.*, 2010).

La dissémination des cancers ovariens est associée avec la libération de cellules cancéreuses sous formes de cellules isolées ou de sphéroïdes flottants dans la cavité péritonéale. Il y a donc une réorganisation nécessaire des interactions cellules-cellules et cellules-MEC.

La perte d'expression et/ou de fonction des E-cadhérines au profit du gain d'expression des N-cadhérines conduisent à une diminution des interactions cellules-cellules. Ce « switch » d'expression des cadhérines, associé au phénotype mésenchymateux, est cliniquement corrélé avec un mauvais pronostic dans de nombreuses tumeurs (Auersperg *et al.*, 2001). Toutefois, même si l'expression des E- et N- cadhérines est primordiale dans le processus de TEM, il a été mis en évidence ces dernières années que les cellules cancéreuses subissent des TEM incomplètes ou partielles. Ainsi des cellules avec des caractéristiques épithéliales peuvent présenter des capacités migratoires ou invasives augmentées. Ces phénotypes intermédiaires sont observés à la surface de l'épithélium ovarien de surface où les cellules co-expriment des marqueurs épithéliaux incluant les kératines, les jonctions adhérentes (E-cadhérine, caténines), les jonctions serrées (occludine, ZO-1), le collagène de type IV mais aussi des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, les collagènes I, III et les laminines (Ahmed *et al.*, 2007).

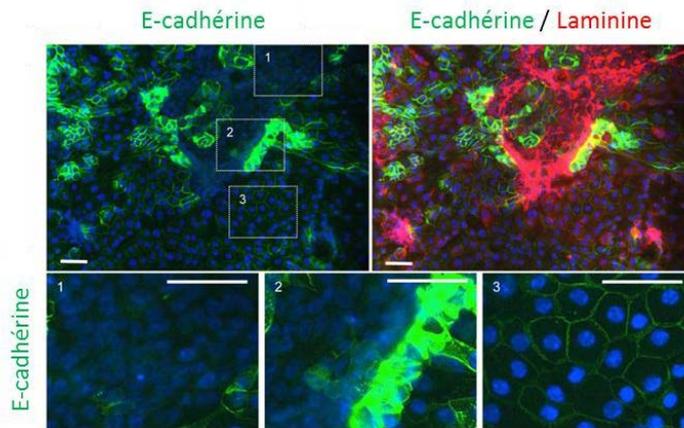


Figure 29 L'hétérogénéité des phénotypes épithéiaux et mésenchymateux révèle la plasticité des cellules cancéreuses ovariennes.

Des marqueurs épithéiaux (E-cadhérine) ou mésenchymateux (Laminine) ont été marqués par immunofluorescence sur des biopsies de cancer ovarien. La barre d'échelle représente 40 μm . D'après Strauss *et al.* 2011.

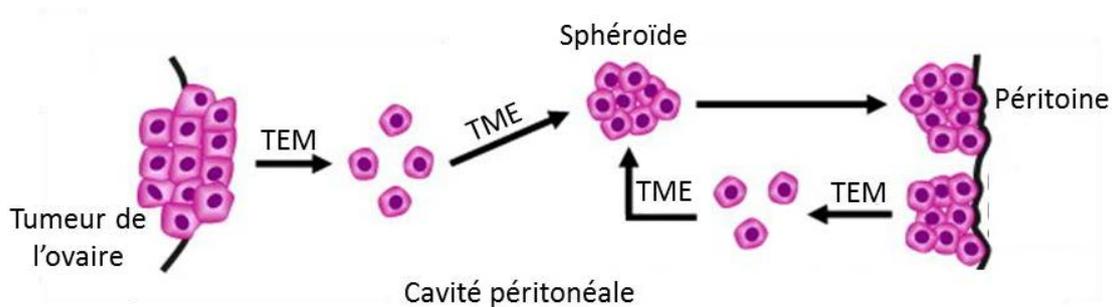


Figure 30 La transition épithélio-mésenchymateuse et la dissémination intrapéritoineale.

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) permet aux cellules cancéreuses de s'exfolier dans la cavité péritonéale. La transition mésenchymato-épithéiale (TME) des cellules en suspension conduit à la formation de sphéroïdes capables de s'implanter sur le mésothélium constituant le péritoine D'après Chua *et al.* 2011.

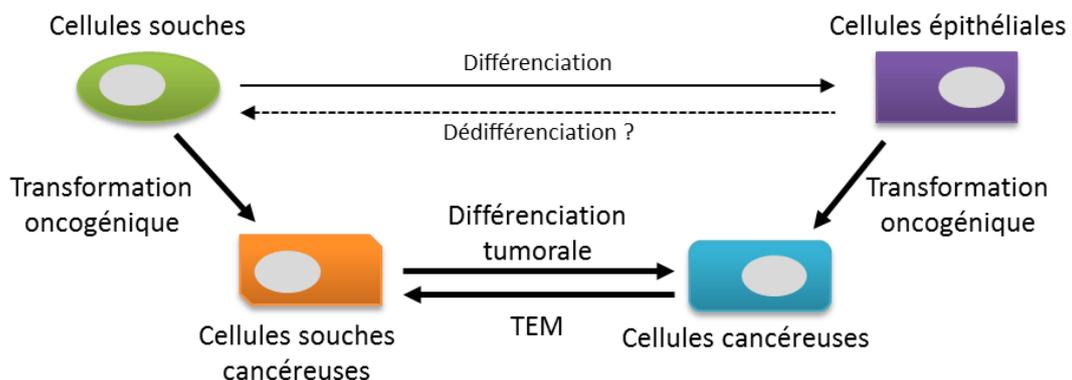


Figure 31 Origine des cellules souches cancéreuses.

Deux hypothèses expliquent l'origine des cellules souches cancéreuses (CSC). La différence provient de l'origine cellulaire des CSC mais les altérations génétiques et/ou la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en sont toujours la cause. D'après Velázquez *et al.* 2012.

Ainsi, les cellules cancéreuses peuvent subir une TEM totale ou partielle conduisant à l'acquisition de nouvelles propriétés favorables à la dissémination. Ce processus peut être réversible *via* des Transitions Mésenchymato-Epithéliale (TME) et mener au sein du foyer tumoral à une hétérogénéité de l'état de différenciation des cellules cancéreuses (Strauss *et al.*, 2011) (Figure 29).

Après la réalisation d'une TME, l'augmentation des interactions cellules-cellules est corrélée à une diminution de la prolifération cellulaire induite par un état de quiescence. Ainsi, les cellules organisées en sphéroïdes se trouvent davantage capables à résister à la mort cellulaire que pourrait induire l'absence d'ancrage à une MEC (Correa *et al.*, 2012). La plasticité des cellules cancéreuses ovariennes leur permet de réaliser des TEM et des TME successives nécessaires pour l'adaptation des cellules aux différents microenvironnements rencontrés au cours de la dissémination tumorales (Chua *et al.*, 2011) (Figure 30).

2.2.1.2. Les cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSC) ou cellules initiatrices de cancers sont un petit sous-groupe de cellules cancéreuses ayant la capacité d'autorenouveau, de différenciation et de générer un nouveau foyer tumoral. L'origine des CSC est controversée. Les études actuelles permettent l'émergence de deux théories qui ne sont pas exclusives (Figure 31). La première propose que les CSC proviennent de la dérégulation des cellules souches normales (pluripotente ou multipotente) suite à des altérations génétiques et épigénétiques. Cette théorie se justifie par les similitudes entre les cellules souches normales et les CSC et la sensibilité des cellules souches à la transformation oncogénique en raison de leur longue durée de vie. La seconde théorie suggère que le développement de CSC soit réalisé au cours de TEM. Les cellules cancéreuses avec un phénotype mésenchymateux présentent des caractéristiques comportementales et des marqueurs moléculaires similaires aux cellules souches saines (Ahmed *et al.*, 2010; Velasco-Velázquez *et al.*, 2012).

Lors d'une TEM, la population des cellules cancéreuses ovariennes s'enrichit en cellules exprimant les marqueurs de surfaces CD44+/CD24-/CD133+ caractéristiques des CSC. Ce même enrichissement en CSC est retrouvé lorsque les cellules cancéreuses ovariennes sont cultivées en condition non adhérentes (Nam *et al.*, 2012) (Figure 32). Dans

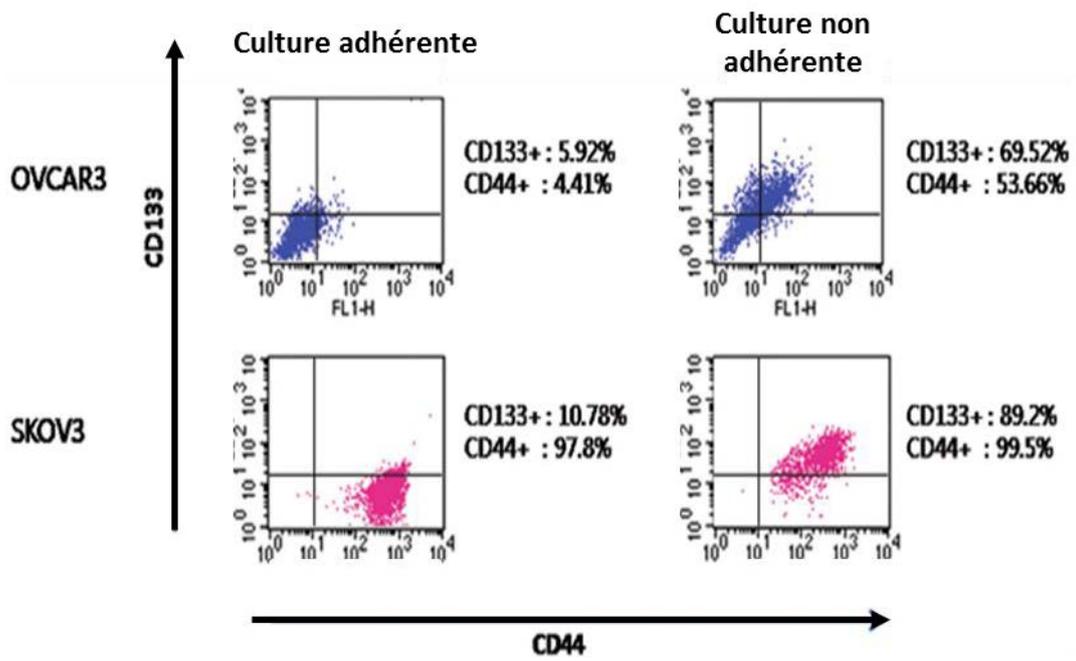


Figure 32 Enrichissement de la population cellulaire en cellules souches cancéreuses lors de la perte d'ancrage.

Analyse de l'expression de marqueurs de cellules souches (CD133 et CD44) sur les cellules cancéreuses ovariennes avant et après culture en absence d'ancrage. D'après Nam *et al.* 2012.

le modèle de dissémination des cancers ovariens par voie péritonéale, le regroupement de cellules cancéreuses en agrégats multicellulaire ou sphéroïdes permettrait la sélection de CSC. Les cellules organisées en sphéroïdes ont un taux de prolifération bas, une résistance à l'anoïkis (mort cellulaire par perte d'ancrage) et aux traitements qui sont des caractéristiques des CSC (Ahmed *et al.*, 2010; Bapat, 2010). Ces cellules ont alors un microenvironnement constitué de liquide d'ascite, contenu dans la cavité péritonéale, qui peut être décrit comme une « niche » pour les CSC en raison de sa capacité à maintenir ces cellules en état de quiescence et de par sa composition en facteurs de croissance, en protéines matricielles et en cellules stromales circulantes (cellules endothéliales, cellules mononuclées associées à la tumeur). Le rôle de l'ascite en tant que « niche pour les CSC » participant à la sélection de cellules cancéreuses responsables des rechutes des patientes reste encore à appréhender.

2.2.2. *Survie des sphéroïdes*

2.2.2.1. Résistance à l'anoïkis

Pour la plus part des cellules, la capacité de proliférer dépend de deux signaux. Tout d'abord les cellules doivent être ancrées dans un tissu de manière approprié. Cette information est fournie par les intégrines qui activent de nombreuses voies de signalisations et influencent le comportement cellulaire. D'autre part, la prolifération cellulaire nécessite des facteurs de croissances et des cytokines. C'est la modulation de ces éléments qui influencerait le développement organisé des tissus. Lorsque les cellules se trouvent dans un environnement inapproprié, entraînant la perte du contact cellules-matrice extracellulaire, le cycle cellulaire est arrêté et un programme de mort cellulaire dépendant des caspases, appelé anoïkis, est initié (Figure 33).

De nombreux mécanismes cellulaire et moléculaire sont mis en place par les cellules cancéreuses pour contrer le phénomène d'anoïkis et ainsi échapper à la nécessité des interactions cellules-matrice extracellulaire. La capacité de prolifération et de survie cellulaire indépendamment de l'ancrage à une matrice extracellulaire est une étape cruciale de la dissémination des cellules cancéreuses.

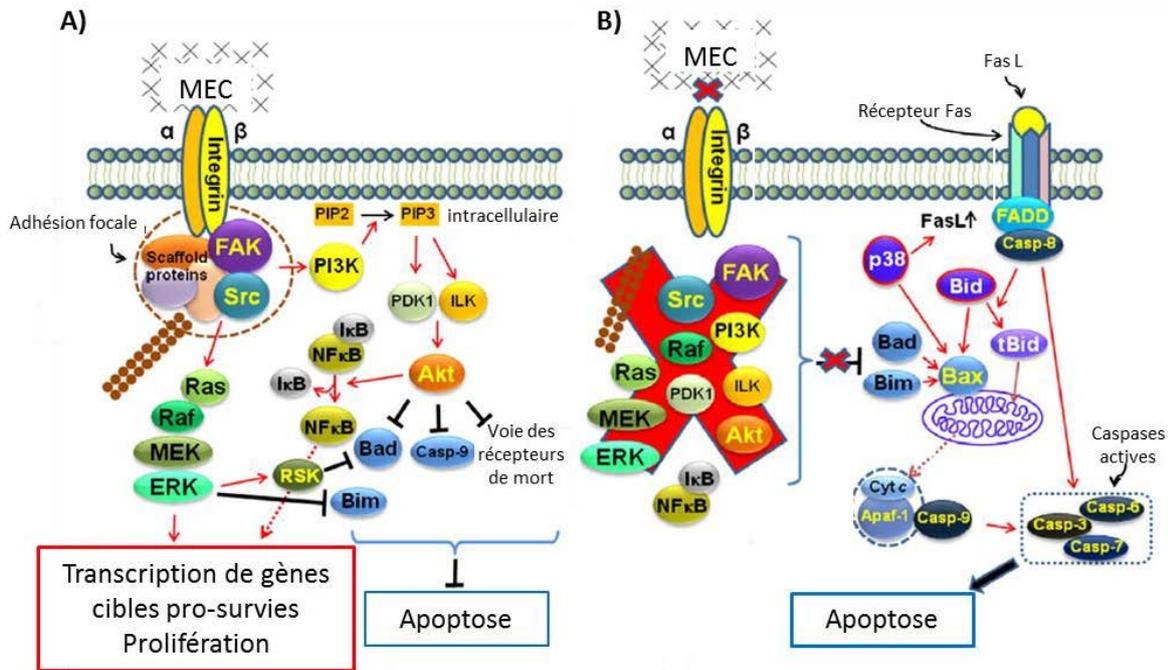


Figure 33 Induction de la mort cellulaire lors de la perte d'ancrage à la matrice extracellulaire (MEC).

A) Les signalisations induites par la liaison des intégrines à la MEC permet d'inhiber les signalisations pro-apoptotiques et de favoriser la prolifération cellulaire. B) Lors de la perte d'ancrage, l'arrêt des signalisations pro-survies induit l'activation des voies de mort et des caspases. D'après Zhong *et al.* 2012.

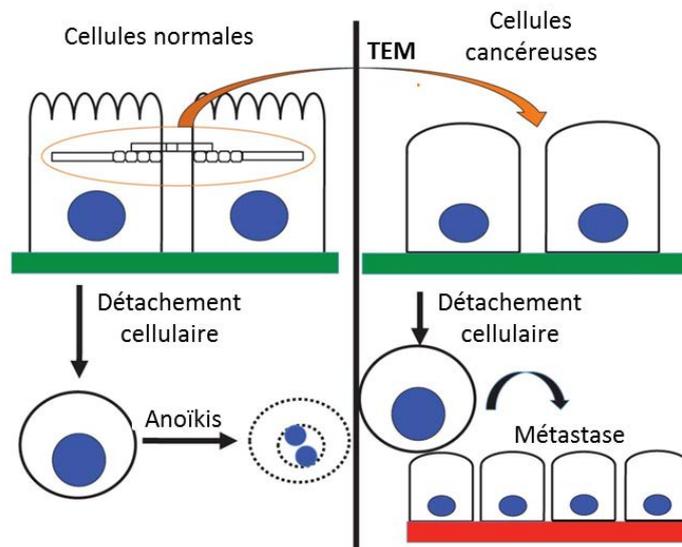


Figure 34 La transition épithélio-mésenchymateuse participe à la résistance à l'anoïkis.

D'après Frisch *et al.* 2013.

Le processus de transition épithélio-mésenchymateuses, associé au détachement des cellules cancéreuses du foyer primaire, partage de nombreuses voies de signalisation avec la résistance à l'anoïkis (Figure 34). Le facteur de transcription Snail, qui induit la TEM en réprimant la transcription de l'E-cadhérine, diminue la mort cellulaire en inhibant la caspase-3 et en activant la voie de signalisation PI3K/AKT. Twist, qui régule la TEM en induisant l'expression de la N-cadhérine et de la fibronectine, favorise la survie par modulation du taux de protéine anti-apoptotique Bcl-2 et pro-apoptotique Bax (Frisch *et al.*, 2013).

Une autre stratégie, pour éviter l'anoïkis induite par la perte d'interaction entre les intégrines et leurs ligands, consiste à la modification d'expression du répertoire des intégrines afin de pouvoir lier d'autres molécules de la matrice extracellulaire présentes dans leur environnement local. Les cellules cancéreuses restituent ainsi une signalisation favorable à la survie (Guo et Giancotti, 2004).

Dans certaines situations, malgré une expression inappropriée des intégrines, les cellules survivent en ignorant les signaux induisant l'anoïkis. Pour contourner la signalisation d'absence de ligand induite par les intégrines, les cellules activent constitutivement certaines voies pro-survies en aval telles que les voies PI3K, Ras-ERK, NF- κ B et RhoGTPase. Celles-ci peuvent être complétées par une sécrétion autocrine de facteurs de croissance comme le bFGF, l'HGF, l'IL-8 et le PDGF associée à la surexpression des récepteurs tyrosines kinases comme l'EGFR ou le récepteur à l'HGF (MET) (Guadamillas *et al.*, 2011).

Des interactions cellulaires peuvent être reconstituées par les cellules cancéreuses pour mimer l'organisation d'un tissu. Ces interactions homotypiques entre cellules cancéreuses conduisent à la formation d'agrégats multicellulaires pouvant s'organiser et ainsi résister à l'anoïkis. Les E-cadhérines sont surexprimées dans les cellules cancéreuses organisées en suspension et induisent une signalisation PI3K/AKT supprimant l'anoïkis (Kang *et al.*, 2007). Les intégrines α_v et leur ligand, la vitronectine, sont nécessaires pour la formation initiale de sphéroïdes (Kellouche *et al.*, 2010). Cette organisation en sphéroïdes est associée, dans les cellules cancéreuses isolées à partir d'ascites, à un état de quiescence permettant de surmonter la perte d'ancrage en attendant un microenvironnement favorable à la ré-adhérence (Correa *et al.*, 2012).

2.2.2.2. Intégrines et sphéroïdes

Le liquide d'ascite accumulé dans la cavité péritonéale où sont retrouvées les cellules cancéreuses en suspension est constitué de nombreuses molécules dont des protéines matricielles. La formation de sphéroïdes ou d'agrégats multicellulaire nécessite une cohésion cellulaire assurée par les contacts cellules-cellules et cellules-MEC. Des protéines matricielles, comme la fibronectine et la vitronectine, retrouvées dans l'environnement des cellules cancéreuses favorisent la formation de sphéroïdes par interactions respectives avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et αv (Casey *et al.*, 2001; Kellouche *et al.*, 2010). D'autres intégrines, dont les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, sont détectées au sein des sphéroïdes. La localisation de la vitronectine dans les zones intercellulaires et au centre des sphéroïdes pourrait induire des signalisations nécessaires à la survie cellulaire en absence d'ancrage. L'étude des protéines matricielles comme piste thérapeutique a été envisagée pour déstabiliser l'organisation des cellules dans le but d'accroître l'efficacité des chimiothérapies. Yoshida *et al.* ont montré qu'un peptide dérivé de la laminine-1 est capable de désagréger des sphéroïdes formés et d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine (Yoshida *et al.*, 2008). Toutefois, les mécanismes moléculaires induits par les interactions cellules-matrice dans les sphéroïdes nécessitent d'être mieux appréhendés afin de comprendre les signalisations mises en jeu dans la résistance à la mort cellulaire par perte d'ancrage et aux chimiothérapies.

2.2.2.3. Résistance aux thérapies

Même si un traitement par chirurgie et chimiothérapie est efficace pour réduire la masse tumorale, la plupart des patientes rechutent rapidement après les traitements. La présence résiduelle de cellules cancéreuses en suspension dans la cavité péritonéale est suffisante pour conduire au développement de nouveaux foyers tumoraux. Plusieurs études ont démontré que des cellules cancéreuses ovariennes cultivées en suspension sont moins sensibles aux agents chimiothérapeutiques que les cellules adhérentes (Frankel *et al.*, 1997; Nam *et al.*, 2012). La compaction des sphéroïdes permettrait une diminution de l'accessibilité des substances thérapeutiques aux cellules (Sodek *et al.*, 2012). D'autre part, le faible taux de prolifération, associé au phénotype de cellules souches cancéreuses retrouvées dans les sphéroïdes, rendrait les cellules cancéreuses moins sensibles aux agents

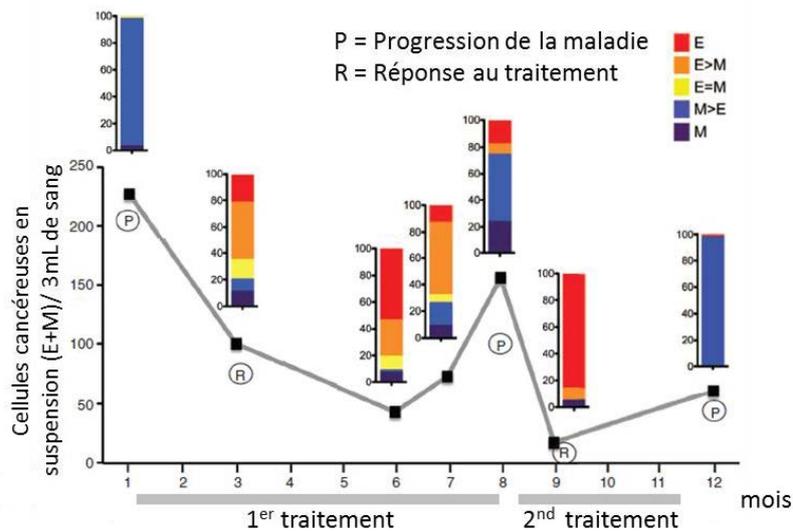


Figure 35 Proportion du phénotype épithéliale (E) ou mésenchymateux (M) des cellules cancéreuses en suspension au cours de traitements.

Le phénotype des cellules cancéreuses circulantes est déterminé par hybridation d'ARN *in situ* ciblant des marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux spécifiques. Le phénotype des cellules est basé sur l'expression de 7 marqueurs épithéliaux et 3 marqueurs mésenchymateux permettant de définir si les cellules sont de types épithéliales (E), mésenchymateuses (M) ou de caractériser leurs états intermédiaires (E>M, E=M et M>E). Le premier traitement est réalisé avec des inhibiteurs de la PI3K et de MEK et le second traitement est une chimiothérapie (adriamycine). D'après Yu *et al.* 2013.

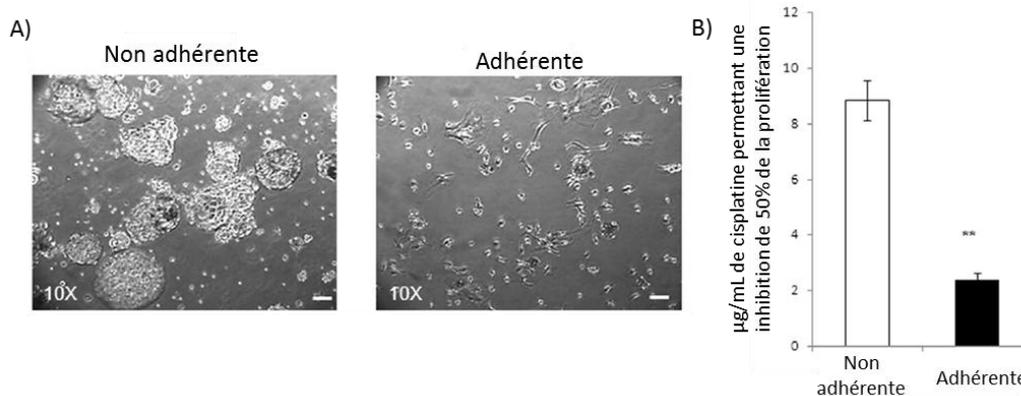


Figure 36 Résistance aux traitements des cellules en sphéroïdes.

A) Dans les cellules isolées à partir d'ascites, des cellules sont organisées en sphéroïdes flottants et d'autres sont de type fibroblastique et capables d'adhérer sur des surfaces permettant un faible attachement cellulaire (barre d'échelle = 50 µm). B) Les cellules en sphéroïdes sont moins sensibles au traitement par le cisplatine. D'après Latifi *et al.* 2012.

thérapeutiques ciblant le cycle cellulaire (Frankel *et al.*, 1997). Les CSC ont la capacité de sécréter des facteurs solubles comme des interleukines (IL-6) favorables à la chimiorésistance (Guo *et al.*, 2010). Récemment, la TEM a été associée à la résistance aux agents thérapeutiques des cellules cancéreuses non adhérentes dans les cancers du sein. Le phénotype des cellules cancéreuses non adhérentes a été suivi au cours de l'évolution de la pathologie (Figure 35). Initialement, la majorité des cellules expriment des marqueurs mésenchymateux. Après un traitement, la proportion de cellules présentant un phénotype épithélial devient majoritaire. Alors qu'une fois le traitement terminé, les cellules cancéreuses de phénotypes mésenchymateux redeviennent majoritaires et la progression de la maladie est de nouveau observée (Yu *et al.*, 2013). La pression de sélection induite par la chimiorésistance favoriserait les cellules cancéreuses présentant des propriétés épithéliales. En effet, les cellules cancéreuses ovariennes, isolées à partir d'ascite, exprimant des facteurs épithéliaux, sont 4 fois plus résistantes au cisplatine comparées aux cellules exprimant des facteurs mésenchymateux (Latifi *et al.*, 2012) (Figure 36).

D'autre part, au moment où les traitements sont administrés, la plupart des patientes présentes une accumulation de liquide d'ascite dans la cavité péritonéale qui constitue un microenvironnement unique pour les cellules cancéreuses en suspension. Les nombreux facteurs solubles, comme les protéines de la MEC, les facteurs de croissance, les cytokines, constituant l'ascite sont capables d'activer de nombreuses voies de signalisation favorable à la survie cellulaire. Des études soulignent l'importance des interactions MEC/intégrines dans la résistance à l'apoptose induite par les chimiothérapies. Les voies PI3K/AKT en aval de ces interactions régulent des molécules impliquées dans la survie cellulaire et la résistance de nombreuses tumeurs (Aoudjit et Vuori, 2012).

2.3. Les métastases péritonéales

La plupart des patientes atteintes de cancers de l'ovaire présentent des métastases péritonéales. L'ancrage des cellules cancéreuses au péritoine représente une étape importante de la dissémination métastatique des carcinomes ovariens. Le péritoine est considéré à ce jour comme le site métastatique privilégié de ces tumeurs.

Les cellules cancéreuses ovariennes, ayant proliféré au niveau de l'épithélium ovarien ou étant véhiculé dans le liquide d'ascite, sont capables d'adhérer sur le mésothélium. La constitution du microenvironnement péritonéal, en termes de matrice extracellulaire et de récepteurs, participe au tropisme des cellules cancéreuses. Une fois les cellules implantées au niveau du péritoine, elles prolifèrent, migrent, envahissent leur environnement local et forment des foyers secondaires.

2.3.1. Le microenvironnement péritonéal

Le péritoine est constitué par le mésothélium en surface et par un tissu conjonctif sous-jacent. Ce tissu conjonctif lâche est constitué de fibroblastes, de macrophages, de lymphocytes et dans certaines régions il peut être riche en adipocytes. Le péritoine présente une vascularisation sanguine et lymphatique riche.

Le mésothélium bordant le péritoine est formé d'une monocouche de cellules mésothéliales reposant sur une fine membrane basale. Ces cellules mésothéliales secrètent à leur pôle apical des glycosaminoglycanes (principalement du hyaluronane), des surfactants (la phosphatidylcholine) et des protéoglycanes. L'ensemble de ces molécules forme une surface anti-adhésives nécessaire au glissement des organes les uns contre les autres et évitant la fusion des organes intra-abdominaux (Mutsaers, 2004). Les cellules mésothéliales régulent l'entrée des leucocytes et des autres cellules inflammatoires dans la cavité péritonéale. En cas de lésion, elles expriment des chimiokines (IL-8) et des récepteurs membranaires (ICAM-1, VCAM-1) reconnus par les leucocytes. Des marqueurs épithéliaux (cytokératine 6, 8, 18 et 19) et mésenchymateux (vimentine, desmine) sont exprimés par les cellules mésothéliales témoignant de leurs capacités à réaliser une transition épithélio-mésenchymateuse nécessaire pour la cicatrisation de lésions à la surface du péritoine (Sodek *et al.*, 2012).

La matrice extracellulaire mésothéliale est composée de collagène de type I et IV, de laminine, de fibronectine et de vitronectine. Le collagène IV est limité immédiatement sous le mésothélium et co-localisé avec la laminine et la fibronectine. Le collagène I est distribué de façon diffuse dans le stroma péritonéal (Heyman *et al.*, 2008; Witz *et al.*, 2001).

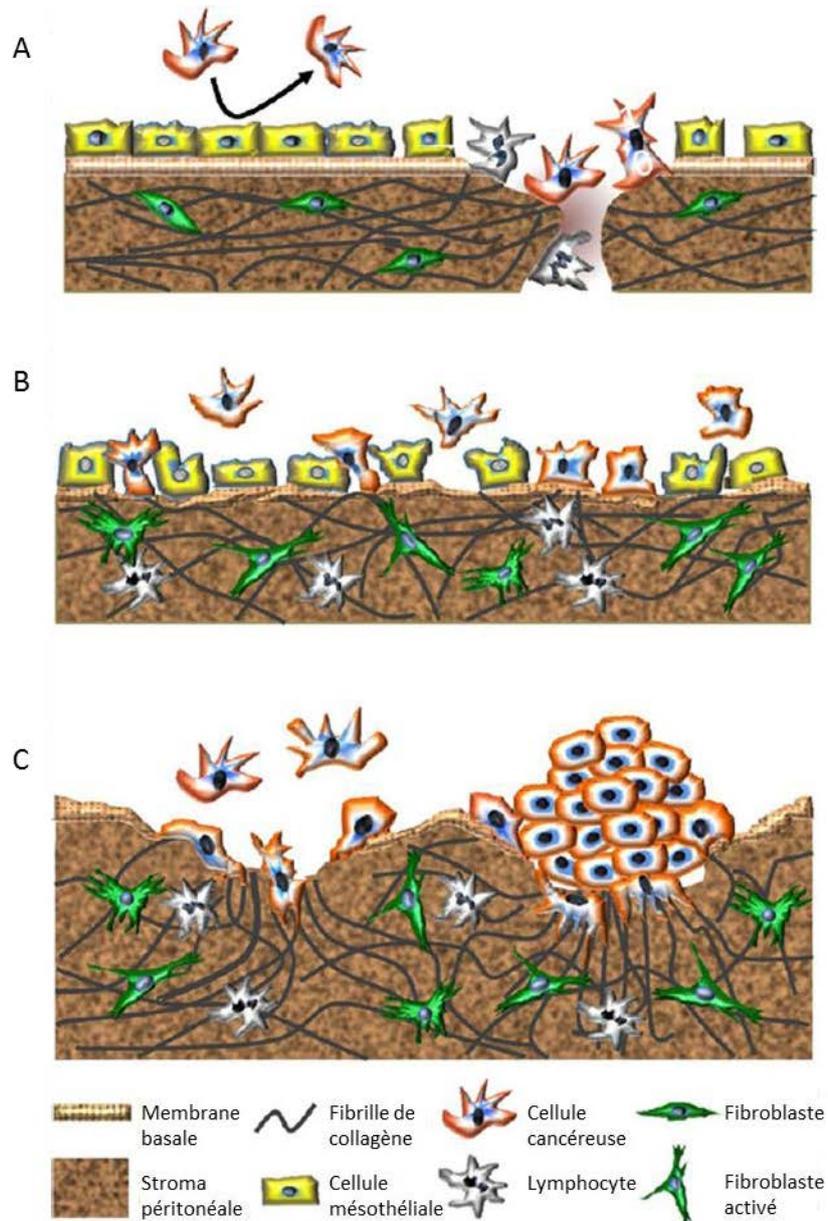


Figure 37 Implantation péritonéale de cellules cancéreuses ovariennes.

A) Les cellules cancéreuses doivent rompre les jonctions entre les cellules mésothéliales pour avoir accès au tissu conjonctif composé notamment de collagène I favorable à leur prolifération. Lorsque les jonctions mésothéliales sont maintenues les cellules cancéreuses adhèrent faiblement sur le mésothélium. B) Avec la progression de la pathologie et en réponse à l'augmentation de la concentration en facteurs inflammatoires, les cellules mésothéliales se rétractent et se détachent. L'exposition de la MEC sous-jacente avec une membrane basale discontinue, facilite l'implantation de métastases péritonéales. C) Les cellules présentant un phénotype invasif forment des sphéroïdes compacts dans les fluides ascitiques ce qui les protèges contre l'anoïkis et les chimiothérapies. Ces sphéroïdes adhèrent et envahissent la matrice péritonéale. Leur capacité d'invasion est associée à la sécrétion de protéases capable de remodeler le collagène I. D'après Sodek *et al.* 2012.

2.3.2. Implantation des cellules cancéreuses

L'implantation péritonéale nécessite la succession de processus cellulaires comme l'adhérence, la migration, la prolifération et l'invasion (Figure 37). Les cellules cancéreuses ovariennes adhèrent au mésothélium *via* les récepteurs CD44 et les intégrines de la famille $\beta 1$ et αV . Le CD44 interagit avec le hyaluronane exprimé à la surface des cellules mésothéliales et les intégrines $\beta 1$ et αV interagissent respectivement avec la fibronectine et la vitronectine (Heyman *et al.*, 2008; Iwanicki *et al.*, 2011; Ween *et al.*, 2011). L'adhérence des cellules cancéreuses sur le mésothélium induit une augmentation de l'expression et de l'activité de la métalloprotéase-2 (MMP-2). Kenny *et al.* ont démontré que le clivage de la fibronectine et de la vitronectine par la MMP-2 conduisait à une augmentation de l'adhérence des cellules cancéreuses *via* les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ (Kenny *et al.*, 2008). De plus, la vitronectine synthétisée par les cellules mésothéliales stimule la migration des cellules cancéreuses (Heyman *et al.*, 2010). Pour rompre la barrière mésothéliale et pouvoir ainsi envahir le tissu sous-jacent, les cellules cancéreuses ovariennes doivent rompre les interactions entre cellules mésothéliales. Les intégrines $\alpha 5\beta 1$, interagissant avec la fibronectine, sont capables d'induire une activation de la myosine dans les sphéroïdes et de transmettre cette force de traction pour promouvoir le déplacement des cellules mésothéliales (Iwanicki *et al.*, 2011). La matrice extracellulaire du tissu conjonctif se retrouve ainsi exposée et constitue un réservoir de cellules stromales et de molécules favorables à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses. Les adipocytes se trouvant dans le stroma péritonéal peuvent servir de réservoir énergétique en fournissant des acides gras pour le métabolisme des cellules cancéreuses ovariennes (Nieman *et al.*, 2011). Ces données illustrent la diversité et la complexité des interactions moléculaires et cellulaires conduisant à l'implantation de cellules cancéreuses ovariennes sur le péritoine.

Chapitre 3 - L'environnement ascitique des cellules cancéreuses ovariennes

1. DEFINITION DE L'ASCITE

L'ascite est une accumulation de liquide inflammatoire causée par différentes pathologies. Le volume de liquide dans la cavité péritonéale peut atteindre plusieurs litres. La composition des ascites varie en fonction des pathologies.

1.1. Conditions de formation de l'ascite

1.1.1. Pathologies associées

L'ascite peut s'accumuler lors de différentes pathologies comme la cirrhose hépatique, cause principale dans 81% des cas, par une insuffisance cardiaque (3%), par la tuberculose (2%) ou par le développement tumoral (10%). Le principal cancer associé à l'accumulation d'ascite est le cancer ovarien, représentant 38% des ascites malins chez la femme. Les patients avec d'autres adénocarcinomes abdominaux incluant les cancers pancréatiques ou gastriques développent des ascites dans respectivement 21% et 18% des cas. Les ascites peuvent être retrouvées dans des cancers non abdominaux comme les cancers du sein, du poumon ou encore dans des lymphomes. Dans la plupart des cancers, l'ascite est un signe d'une pathologie avancée et d'un mauvais pronostic. Il est suggéré que la présence de métastases sur le mésothélium serait directement associée à la production d'ascite. En effet, la réduction de la masse tumorale par chirurgie ou par chimiothérapie entraîne une diminution du volume d'ascite accumulé (Kipps *et al.*, 2013).

1.1.2. Description clinique

Il est difficile de diagnostiquer les ascites de petits volumes car elles sont le plus souvent indolores et asymptomatiques. Lorsque l'accumulation d'ascite dépasse un volume de 1500 mL, elle devient détectable cliniquement. Les symptômes sont causés par le volume occupé par l'ascite dans l'abdomen et par des carences en protéines plasmatiques en raison de leur accumulation dans l'ascite. L'anorexie (perte d'appétit), les nausées, une gêne respiratoire, une augmentation de la taille de l'abdomen et une hypoprotéïnémie sont les principaux symptômes observés lors de la présence d'un volume important d'ascite (Kipps *et al.*, 2013).

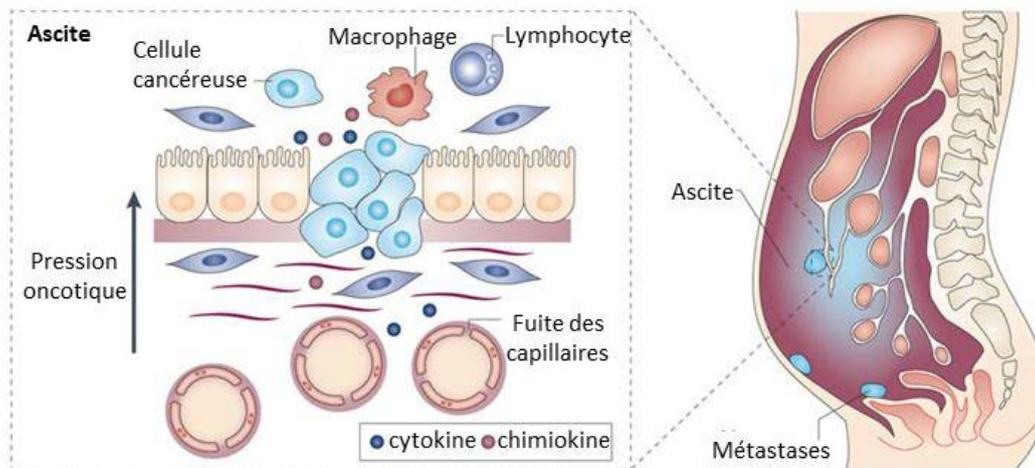


Figure 38 L'altération du péritoine lors de l'implantation des cellules cancéreuses ovariennes conduit à la production d'ascite.

L'accumulation de chimiokines et de cytokines associée à la concentration importante en protéine dans la cavité péritonéale conduit à une augmentation de la perméabilité des capillaires et à une fuite des liquides interstitiels entraînant l'augmentation du volume de l'ascite. D'après Kipps *et al.* 2013.

Pour les patientes atteintes par un adénocarcinome ovarien, l'ascite n'est pas traitée directement, mais l'utilisation de chimiothérapie diminuant la masse tumorale permet de réduire le volume d'ascite. Cependant, lorsque les tumeurs sont chimiorésistantes, le volume des ascites est réduit par ponction dans la cavité péritonéale. De nouvelles stratégies sont utilisées pour limiter la production d'ascite en ciblant le VEGF, un des facteurs responsables de la formation des ascites, mais il est nécessaire de mieux comprendre l'environnement ascitique pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (Tewari et Eskander, 2012).

1.1.3. Mécanisme de formation

L'accumulation de l'ascite est due à un déséquilibre de la balance entre la production et la résorption de fluides dans la cavité péritonéale. Le drainage péritonéal est assuré, dans des conditions physiologiques, par les capillaires lymphatiques situés sous le mésothélium. La présence de cellules cancéreuses dans la cavité péritonéale est associée avec une diminution des efflux vers la circulation lymphatique. Les cellules cancéreuses pourraient obstruer les vaisseaux lymphatiques et ainsi entraîner une diminution du drainage du liquide péritonéal (Kipps *et al.*, 2013). L'accumulation de fluides ascitiques est accentuée par le processus de néo-angiogenèse au sein du foyer tumoral. Les vaisseaux néoformés présentent une perméabilité importante en raison de la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales. De plus, le développement du foyer tumoral conduit à une sécrétion de protéines s'ajoutant aux protéines exsudatives du plasma entraînant un déséquilibre de la pression oncotique (pression osmotique exercée par les protéines) favorable à la fuite de liquide interstitiel (Flessner, 2005). L'augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins, le déséquilibre de la pression oncotique dans la cavité péritonéale et l'obstruction des vaisseaux lymphatiques sont les principales causes de l'accumulation d'ascite (Figure 38).

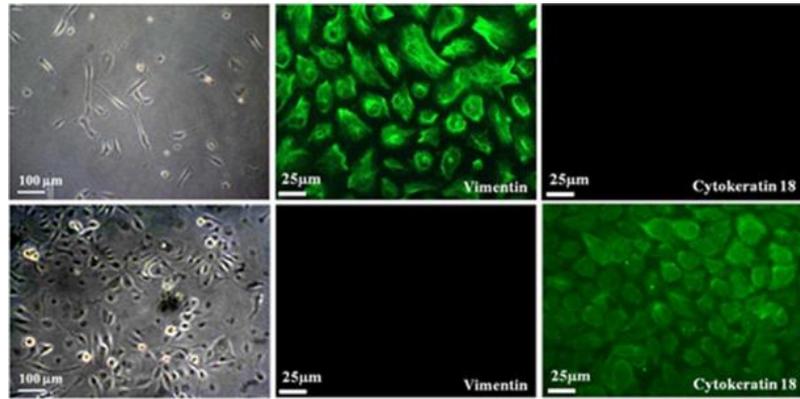


Figure 39 Hétérogénéité des cellules isolées à partir des ascites de patientes.

Les cellules isolées à partir d'ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire, peuvent présenter des morphologies différentes et exprimer des marqueurs soit épithéliaux (cytokératine 18), soit mésenchymateux (vimentine). D'après Ho *et al.* 2012.

1.2. Composition de l'ascite

1.2.1. Composante cellulaire

L'ascite s'accumule dans un environnement composé de nombreux types cellulaires différents pouvant s'exfolier de leur site d'origine. Dans le cas du développement d'un adénocarcinome ovarien, l'ascite peut être composée de cellules cancéreuses, représentant moins de 0.1% de la population cellulaire totale, et de cellules originaires des tissus environnants (Kipps *et al.*, 2013). Ces dernières peuvent être constituées par les hématies, les cellules immunitaires, les fibroblastes, les adipocytes, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules mésothéliales et endothéliales. Lorsque l'ascite est mise en culture *in vitro*, les cellules capables d'adhérer et de proliférer peuvent présenter des phénotypes différents (Figure 39). Certaines ont une morphologie de type mésenchymateuse et expriment des marqueurs associés comme la vimentine et d'autres présentent une morphologie de type épithéliale exprimant la cytokératine 18 (Ho *et al.*, 2012). Ces cellules ont la propriété d'autorenouvellement et prolifèrent de façon importante. L'ensemble de ces caractéristiques associé à l'expression de l'antigène CD44, suggère que ces cellules seraient des cellules souches. Des interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules souches mésenchymateuses, pouvant provenir des différents tissus et isolées dans les ascites, peuvent promouvoir l'angiogenèse et ainsi favoriser la progression tumorale (Castells *et al.*, 2012). La compréhension des interactions entre les cellules stromales et les cellules cancéreuses dans l'ascite permettrait de mieux comprendre les mécanismes de dissémination et de résistance des cellules cancéreuses aux thérapies.

1.2.2. Composante moléculaire

L'ascite étant formée principalement par des exsudats de plasma, les protéines matricielles circulantes peuvent s'accumuler dans la cavité péritonéale. Une augmentation de la concentration en laminine a été observée dans les ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire par rapport à la concentration dans leur sérum ou dans des fluides péritonéaux sains (Byers *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 2002). De façon corrélée, le récepteur de la laminine, 67LR, est surexprimé dans les stades avancés des cancers ovariens et serait

favorable à la prolifération cellulaire (Song *et al.*, 2012). La fibronectine a également été identifiée dans des ascites issues de patients avec des pathologies différentes, elle potentialise notamment les capacités migratoires des cellules de mélanome (Kohn *et al.*, 2005). Le taux en fibronectine dans les ascites a été envisagé pour évaluer la malignité des ascites mais les résultats obtenus sont controversés (Adamsen *et al.*, 1991; Siddiqui *et al.*, 1992). Toutefois, il y a très peu d'études sur la fibronectine contenue dans les ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Les métalloprotéases-2 et -9, capables de dégrader de nombreuses protéines matricielles, ont été identifiées dans des ascites sous les formes zymogènes et actives ainsi que certains de leurs inhibiteurs comme le TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2) (Kohn *et al.*, 2005). Ces protéases peuvent être retrouvées dans des vésicules membranaires, constituant un réservoir de molécules, capables de faciliter la formation de métastases en participant à l'invasion cellulaire (Graves *et al.*, 2004). D'autre part, l'activité de la MMP-2 sur la fibronectine et la vitronectine conduit à la formation de fragments de protéines matricielles qui augmentent l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes sur le mésothélium *via* les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ (Kenny *et al.*, 2008). En plus de l'accumulation de certaines protéines ou la présence de fragments de dégradation, des modifications des profils de glycosylations des protéines sont observées dans les ascites. Les cellules cancéreuses ovariennes peuvent présenter une dérégulation de l'expression des sialyltransférases responsables de modification des glycosylations de protéines cellulaires ou extracellulaires (Wang *et al.*, 2005). Ces modifications post-traductionnelles des protéines ascitiques pourraient modifier le comportement des cellules cancéreuses et servir de marqueur pour le suivi des pathologies (Christie *et al.*, 2008; Kuzmanov *et al.*, 2008).

L'ascite contient également des cytokines capables d'influencer le comportement des cellules cancéreuses. Ces cytokines sont produites par les cellules tumorales et mésothéliales et s'accumulent dans la cavité péritonéale. Une analyse du profil de cytokines retrouvées dans les ascites issues d'adénocarcinome ovarien a permis une meilleure caractérisation de ce microenvironnement (Matte *et al.*, 2012). Des cytokines comme l'angiogénine ou l'IL-8 participant à l'angiogénèse, nécessaire au développement tumoral, sont retrouvées dans l'ascite. L'IL-10, participant à la survie cellulaire après induction de la mort cellulaire par TRAIL (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) est également accumulée dans l'ascite. La présence du VEGF (Vascular Epidermal Growth Factor), cytokine pro-

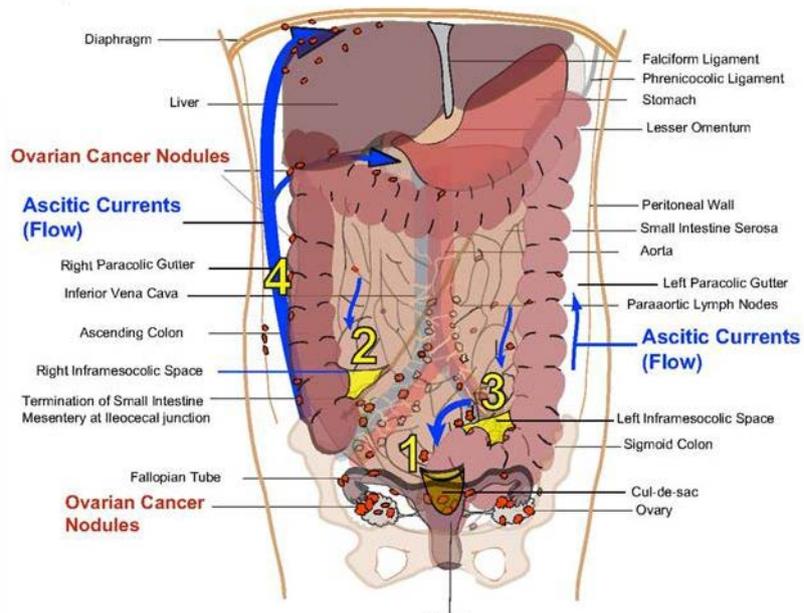


Figure 40 Dissémination des cellules cancéreuses ovariennes par les courants ascitiques.

Les cellules cancéreuses ovariennes métastasent préférentiellement dans les zones numérotées de 1 à 4 principalement en raison des mouvements des fluides (flèches bleues) dans la cavité péritonéale. Les foyers tumoraux sont indiqués en orange. D'après Rizvi *et al.* 2013.

angiogénique, dans les ascites est corrélée avec la dissémination des cellules cancéreuses. Le VEGF ascitique agit sur la dissémination tumorale de manière directe en augmentant la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses et indirecte en augmentant la perméabilité vasculaire responsable de la production d'ascite. Des agents thérapeutiques, comme des anticorps (ex : Bevacizumab), sont utilisés pour neutraliser les effets du VEGF ascitique (Moghaddam *et al.*, 2011). De nombreuses autres molécules incluant le TGF β , le TNF α , l'EGF ou l'acide phosphatidique (LPA) ont été identifiées dans les ascites et sont décrites comme participant au développement des cancers ovariens.

2. INFLUENCE DE L'ASCITE SUR LES CELLULES CANCEREUSES OVARIENNES

2.1. Impact sur la dissémination

Le processus de dissémination des adénocarcinomes ovariens le plus couramment décrit dans la bibliographie se déroule en plusieurs étapes : après avoir colonisé la surface de l'EOS, les cellules cancéreuses se détachent du foyer primaire sous forme d'agrégats multicellulaires ou de sphéroïdes dans la cavité péritonéale, puis colonisent la surface du mésothélium en se désagrégeant (Shield *et al.*, 2009). L'ascite, s'accumulant dans la cavité péritonéale, constitue à chaque étape du processus de dissémination une part importante du microenvironnement tumoral. La formation de sphéroïdes et l'implantation péritonéale sont des étapes qui nécessitent une réorganisation des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Les molécules présentes dans l'ascite comme les facteurs de croissance, les protéines de la MEC et les protéases peuvent participer à l'adaptation des cellules aux différents microenvironnements rencontrés au cours du processus de dissémination. D'autre part, l'ascite étant un milieu liquide, les contraintes physiques induites par les courants ascitiques participent au transport des cellules cancéreuses vers des sites métastatiques distant du foyer primaire (Figure 40). De plus, ces courants ascitiques induisent des modifications d'expression de gènes, comme une diminution de l'expression de l'E-cadhérine, favorable à l'émergence d'un phénotype cellulaire davantage agressif (Rizvi *et al.*, 2013).

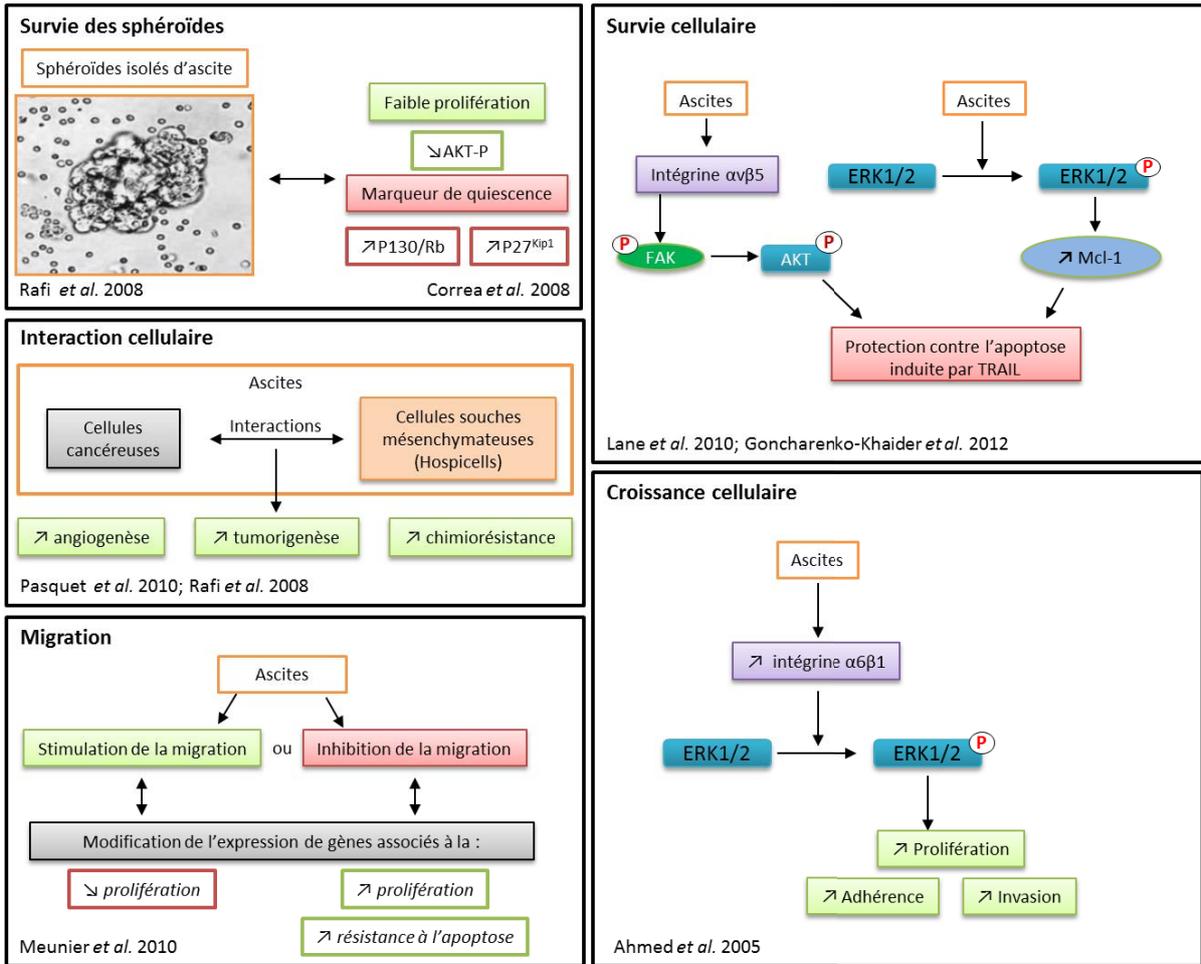


Figure 41 Schéma bilan de l'influence de l'ascite sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes.

2.2. Modification des comportements cellulaires

L'environnement ascitique accompagne le développement et la progression tumorale, néanmoins, son influence sur les mécanismes moléculaires modifiant les comportements des cellules cancéreuses reste peu comprise (Figure 41). Toutefois, il a été montré que l'ascite influençait directement la progression tumorale en augmentant les capacités prolifératives, adhésives et migratoires de cellules cancéreuses ovariennes sans avoir d'effet sur des cellules épithéliales ovariennes saines. Ces effets sont notamment dépendants des intégrines $\alpha 6\beta 1$ et de l'activation de ERK1/2 (Ahmed *et al.*, 2005). L'étude de l'effet de l'ascite sur la migration des cellules cancéreuses ovariennes, avec un plus grand nombre de prélèvements, révèlent que certaines ascites ont un effet stimulateur et d'autres un effet inhibeur (Meunier *et al.*, 2010a). La diminution des capacités migratoires des cellules cancéreuses est corrélée avec l'expression de gènes impliqués dans la croissance et la survie cellulaire alors que les ascites favorisant la migration induisent l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt de la croissance cellulaire. Ces résultats suggèrent que les ascites peuvent contenir différents régulateurs du comportement cellulaire influençant de manière différente la progression tumorale.

D'autre part, l'ascite participe à la protection des cellules cancéreuses contre l'induction de mort cellulaire par les récepteurs de mort. Les ligands de ces récepteurs, comme TRAIL, sont exprimés par les cellules immunitaires (ex : lymphocyte T cytotoxique, macrophage) et peuvent ainsi induire l'apoptose des cellules cancéreuses sensibles. L'ascite induit une signalisation activant FAK et AKT de manière intégrine $\alpha \beta 5$ dépendante, permettant une résistance à l'apoptose induite par TRAIL (Lane *et al.*, 2010). De même, l'ascite favorise la survie de cellules exposées à TRAIL en induisant l'expression de Mcl-1, protéine de survie de la famille des Bcl-2, *via* la phosphorylation d'ERK1/2 (Goncharenko-Khaider *et al.*, 2012). L'ascite est donc un environnement favorable à la résistance des cellules cancéreuses contre des signalisations induisant la mort cellulaire.

Les cellules cancéreuses s'organisant en sphéroïdes et se trouvant en suspension dans l'ascite sont capables de résister à des conditions hypoxiques et à l'absence d'ancrage à un tissu en induisant un état de dormance transitoire. Ces sphéroïdes ascitiques présentent une diminution de la phosphorylation d'AKT par comparaison avec les cellules adhérentes et

une augmentation de l'expression de P130/RBL2 et p27^{Kip1} caractéristiques d'un état de quiescence. Lorsqu'une surface favorable à l'adhérence cellulaire des sphéroïdes est retrouvée, les cellules sortent de leur état de quiescence au profit de la ré-adhérence et de la prolifération (Correa *et al.*, 2012).

De plus, au sein de la cavité péritonéale, les cellules cancéreuses peuvent interagir avec les cellules stromales composant l'ascite. Les Hospicells, cellules souches mésenchymateuses associées au cancer, ont pu être isolées à partir d'ascites. Ces cellules potentialisent la tumorigénicité des cellules cancéreuses quand elles sont co-injectées *in vivo* chez la souris (Pasquet *et al.*, 2010). Les Hospicells participent au développement tumoral en accroissant la chimiorésistance des cellules cancéreuses et en favorisant l'angiogenèse pouvant participer à la production d'ascite (Rafii *et al.*, 2008).

Ces études soulignent l'importance d'étudier l'influence de l'ascite sur les comportements cellulaires afin de mieux comprendre les processus cellulaires conduisant à la dissémination et à la chimiorésistance des cellules cancéreuses ovariennes.

Présentation des résultats

**Etude des mécanismes de résistance à l'anoïkis au sein des sphéroïdes
tumoraux ovariens : contribution des intégrines αv et des voies de
signalisation dépendantes d'ERK 1/2 et des PKC.**

(Article sous-presse dans le journal Experimental Cell Research)

1. PRESENTATION DE L'ETUDE

Comme précédemment décrit dans la partie bibliographique, les cancers de l'ovaire sont principalement diagnostiqués à un stade avancé de la pathologie. La présence d'ascite dans la cavité péritonéale est une complication fréquente pour le traitement de cette pathologie. En effet, la présence de cellules cancéreuses isolées ou organisées en sphéroïdes dans l'ascite, favorise le développement de foyers tumoraux secondaires sur le péritoine. Ces cellules sont devenues capables de survivre en l'absence d'ancrage à une MEC solide.

En effet, le maintien des interactions entre la matrice extracellulaire et les récepteurs d'adhérence, exprimés à la membrane des cellules, est essentiel à la viabilité cellulaire. Lors de la perte d'ancrage des cellules, une signalisation intracellulaire de mort cellulaire est déclenchée et conduit à une mort par apoptose particulière, appelée l'anoïkis (Guadamillas *et al.*, 2011). Ainsi, les cellules cancéreuses issues de l'EOS et se trouvant dans le liquide ascitique doivent acquérir une capacité de résistance à l'anoïkis pour survivre dans la cavité péritonéale.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires nécessaires à la résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis, permettrait de développer des nouvelles stratégies thérapeutiques visant à réduire cette résistance afin de limiter la dissémination tumorale.

Les études précédentes de notre groupe de recherche ont démontré l'implication de la vitronectine et l'importance de ses interactions avec les intégrines αv , dans la formation initiale de sphéroïdes cancéreuses ovariennes (Kellouche *et al.*, 2010). Ainsi, il nous est apparu intéressant d'approfondir l'hypothèse selon laquelle le blocage des intégrines αv avec leurs ligands matriciels au sein des sphéroïdes pourrait entraîner une mort cellulaire par apoptose et donc engendrer le processus d'anoïkis au sein de ces sphéroïdes tumoraux. Dans ce cadre, les mécanismes moléculaires par lesquels ces intégrines participent à la résistance à l'anoïkis ont été investigués.

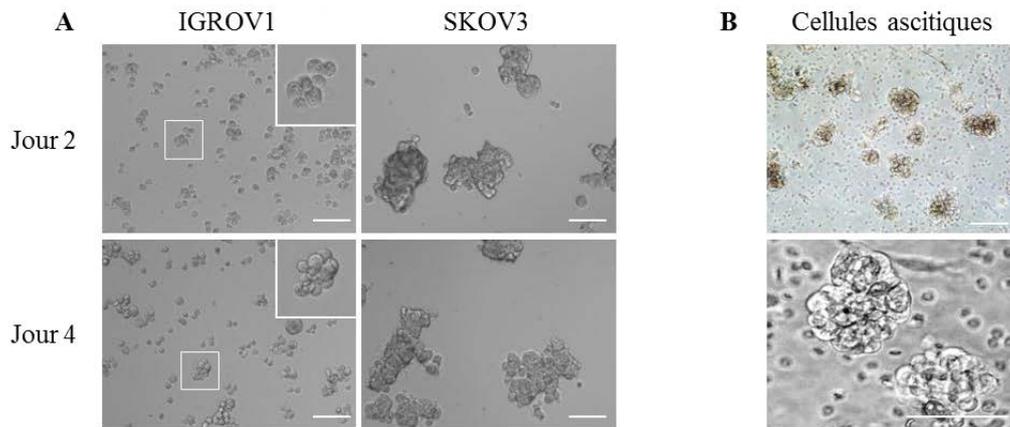


Figure 42 Formation et viabilité des sphéroïdes d'adénocarcinomes ovariens.

Les cellules cancéreuses ovariennes IGROV1 et SKOV3 sont cultivées en condition non adhérente pendant 2 et 4 jours et observées par microscopie à contraste de phase (A) (barres d'échelle = 100 μm). Un agrandissement est réalisé pour les sphéroïdes de cellules IGROV1 (carrés blancs). Les cellules organisées en sphéroïdes et contenues dans une ascite de patientes sont observées en microscopie à contraste de phase (B).

2. RESULTATS

2.1. Formation et survie des sphéroïdes de cellules cancéreuses ovariennes

- Les cellules IGROV1 et SKOV3 forment deux types de sphéroïdes différents

La mise au point d'une méthode de culture des cellules cancéreuses ovariennes sur un substrat non-adhésif nous a permis de disposer, à partir de lignées caractéristiques d'adénocarcinomes ovariens, de cellules organisées en amas multicellulaire ou sphéroïdes.

En effet, lorsque des cellules cancéreuses ovariennes sont cultivées au sein d'un environnement non-adhésif, elles forment spontanément des sphéroïdes (Casey *et al.*, 2001; Kellouche *et al.*, 2010). Ainsi, la capacité de survie des cellules cancéreuses ovariennes humaines, lors de la perte d'ancrage à un support, a été analysée. Deux lignées cellulaires d'adénocarcinomes ovariens ayant des origines, des morphologies et des comportements différents ont été cultivées sur un support ne permettant pas l'adhérence cellulaire. Les cellules cancéreuses IGROV1 sont issues de l'ovaire d'une patiente et les cellules cancéreuses SKOV3 sont isolées à partir d'une ascite (*cf.* matériels et méthodes). L'agrégation des cellules et la formation des sphéroïdes ont été suivies pendant 7 jours.

La Figure 42 montre que les cellules IGROV1 et SKOV3 forment des sphéroïdes mécaniquement stables au cours de l'expérience. Après quelques heures de culture, les cellules commencent à se regrouper en petits amas. Puis, au cours du temps, les agrégats cellulaires se compactent et atteignent une taille d'environ 50 à 100 μm pour les cellules IGROV1 et plus de 300 μm pour les cellules SKOV3 (Figure 42A). Les sphéroïdes de cellules IGROV1 conservent, pendant les 7 jours de culture, leur structure contenant de 6 à plus de 20 cellules. Certaines cellules IGROV1 restent isolées dans le milieu de culture. Il est à noter que cette organisation en sphéroïdes obtenue *in vitro* est fortement comparable à celle observée sur des sphéroïdes contenus dans les ascites (Figure 42B). Les sphéroïdes de cellules SKOV3 sont organisés différemment. Le nombre de cellules par agrégats est supérieur à 50 cellules dès 2 jours de culture et la compaction des cellules entre-elles semble moins importante comparé aux cellules IGROV1. De plus, à l'inverse des cellules IGROV1, aucune cellule SKOV3 isolée n'est observable en condition non adhérente.

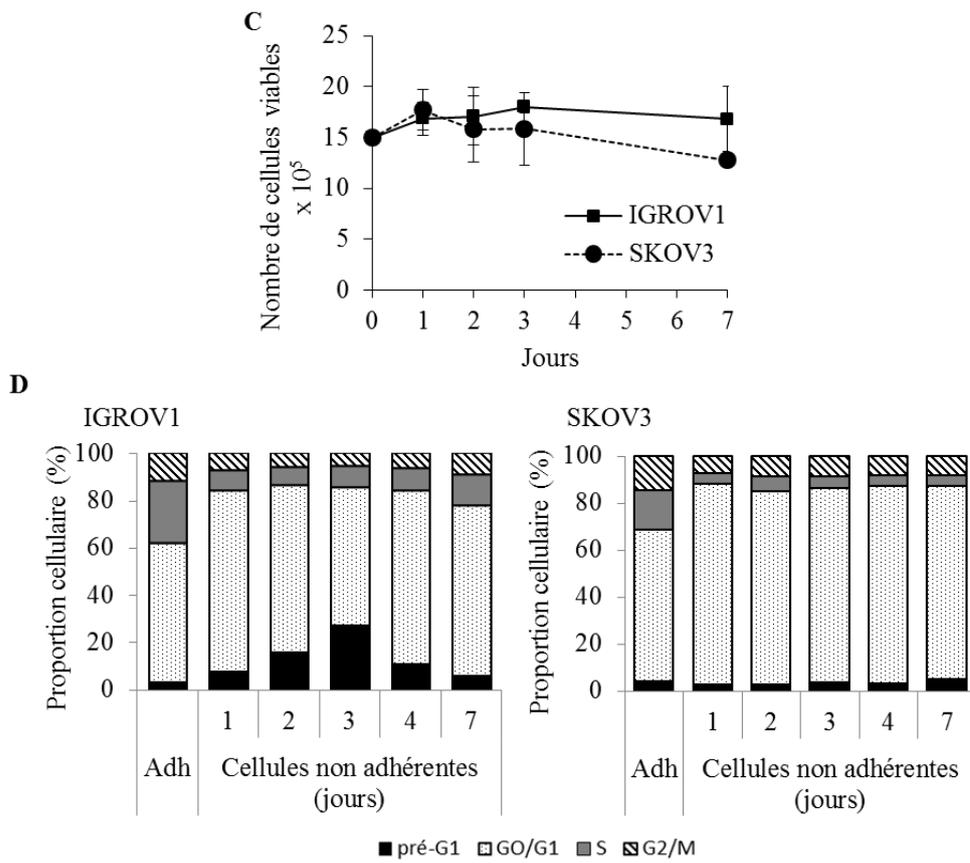


Figure 44 Formation et viabilité des sphéroïdes d'adénocarcinomes ovariens.

Les cellules IGROV1 et SKOV3 sont cultivées pendant 7 jours en suspension. Le nombre de cellules viables est estimé par comptage après incubation avec le bleu Trypan (C) et la répartition des cellules dans le cycle cellulaire est déterminée par cytométrie en flux (D). Les témoins sont des cellules cultivées en condition adhérente pendant 2 jours (Adh). Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules présentes dans chaque phase du cycle.

- La survie des sphéroïdes de cellules IGROV1 et SKOV3 dépend de deux réponses différentes

L'étude de la survie cellulaire au sein des sphéroïdes a été réalisée au cours de 7 jours de culture. Les cellules viables sont comptées après dissociation enzymatique et mécanique des agrégats. Le nombre de cellules viables d'IGROV1 et de SKOV3 reste constant au cours du temps indiquant que les deux lignées cellulaires sont capables de survivre en condition non adhérente (Figure 42C). Ces résultats sont confirmés par une analyse en cytométrie en flux de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire au cours d'une cinétique. Lorsque les cellules sont placées en condition non adhérente, le pourcentage de cellules en phase G0-G1 du cycle cellulaire augmente significativement de 65 % à 86 % pour les cellules IGROV1 et de 59 % à 77 % pour les cellules SKOV3 (Figure 42D). Au cours de ce même temps, une diminution de la prolifération est observée comme indiqué par la diminution du pourcentage de cellules en phase S ; passant de 17 % à 5 % pour les cellules IGROV1 et de 26 % à 9 % pour les cellules SKOV3.

Les deux lignées cellulaires présentent des réponses différentes à la perte d'ancrage en termes de proportion cellulaire en phase pré-G1 représentant les débris cellulaires et les cellules apoptotiques. En effet, une augmentation transitoire de la proportion cellulaire dans le pic pré-G1 est observée de 1 à 3 jours de culture pour les cellules IGROV1 puis entre 4 et 7 jours de culture ce pourcentage diminue. Cette diminution du pourcentage de cellules dans le pic pré-G1 suggère la sélection et l'adaptation des cellules IGROV1 résistantes à l'absence d'ancrage. Ainsi, un équilibre entre la mort (par apoptose) et la survie cellulaire permettrait aux cellules IGROV1 de survivre en condition non adhérente. A l'inverse, pour les cellules SKOV3, il n'y a pas d'augmentation de la proportion de cellules mortes ou de débris au cours de l'expérience.

2.2. Induction de signalisation de mort et de survie cellulaire en absence d'ancrage

La présence simultanée de cellules viables et apoptotiques lors de la perte d'ancrage, nous a conduits à analyser au cours du temps l'expression de marqueurs de survie et d'apoptose.

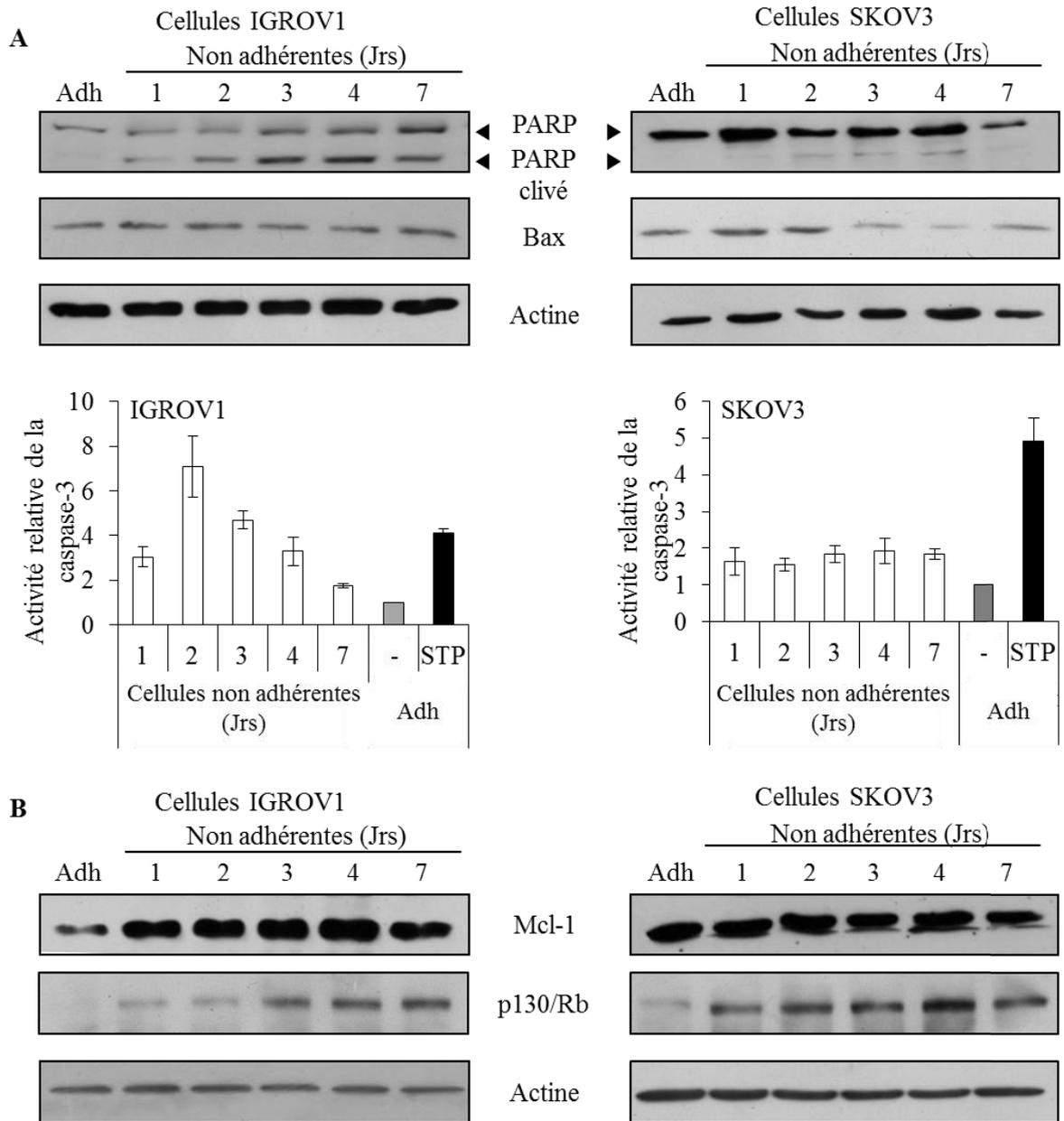


Figure 43 Effet de la perte d'ancrage des cellules sur l'expression de molécules de mort et de survie cellulaire.

L'expression de PARP et de son clivage ainsi que de Bax est suivie par western blot dans les cellules cultivées en condition non adhérente (A). L'expression de l'actine est utilisée comme témoin de dépôt. L'activité de la caspase-3 est quantifiée par l'utilisation d'un test colorimétrique. L'activité de la caspase-3 dans les cellules adhérentes est utilisée comme référence (Adh) et le traitement à la staurosporine ($1\mu\text{M}$, STP) est le contrôle positif de l'induction de l'apoptose. L'expression des protéines Mcl-1 et p130/Rb par les cellules IGROV1 et SKOV3 est estimée par western blot avec l'actine comme témoin de dépôt (B).

Le clivage de la protéine PARP révèle le déclenchement d'une signalisation apoptotique au sein des cellules. Ce clivage a ainsi été suivi par Western blot au cours de la formation des sphéroïdes de cellules IGROV1 et SKOV3. La Figure 43A révèle que la perte d'ancrage conduit à l'augmentation du clivage de PARP au sein des cellules IGROV1 jusqu'à 4 jours de culture. L'induction d'un processus apoptotique est donc soulignée. Toutefois, une diminution du clivage de PARP est observée à partir du septième jour de culture non adhérente. A l'inverse, les cellules SKOV3 présentent un faible clivage de PARP au cours des 7 jours de culture en absence d'ancrage.

Ces deux résultats ont été confirmés par la mesure de l'activation de la caspase-3. Alors que l'activité caspase-3 augmente pendant les premiers jours de culture en condition non adhérente pour les cellules IGROV1, elle n'est pas activée dans les cellules SKOV3 malgré la capacité de ces cellules à entrer en apoptose lors de traitement avec 1 μ M de staurosporine. De manière comparative, l'expression de Bax, un marqueur pro-apoptotique, ne varie pas lors de la culture des cellules IGROV1 en absence d'ancrage alors que son expression diminue après trois jours de culture pour les cellules SKOV3. De la même manière, l'expression de marqueurs de survie a été suivie (Figure 43B). Mcl-1, un marqueur anti-apoptotique, est fortement surexprimé par les sphéroïdes de cellules IGROV1 pendant les premiers jours de culture par comparaison aux cellules adhérentes. Mcl-1 peut être sur-régulé pendant des transitions critiques du comportement cellulaire et peut permettre une augmentation rapide de la viabilité cellulaire. Pour les cellules SKOV3, l'expression de Mcl-1 ne varie pas lors de la perte d'ancrage comparé aux cellules adhérentes.

Une alternative cellulaire pour prévenir l'apoptose est l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G0/G1. L'expression et l'activation de molécule telle que la protéine du rétinoblastome P130 (P130/Rb) caractérisent en partie ce blocage. Comme le révèle la Figure 43B, l'augmentation significative de l'expression de P130/Rb, dans les cellules IGROV1, est observée à partir du troisième jour de formation des sphéroïdes, alors que pour les cellules SKOV3, l'expression de P130/Rb augmente dès le premier jour de culture en absence d'ancrage. Ces résultats confortent les analyses précédentes du cycle cellulaire indiquant une augmentation de la proportion de cellules SKOV3 en phase G0/G1 lors de la formation des sphéroïdes.

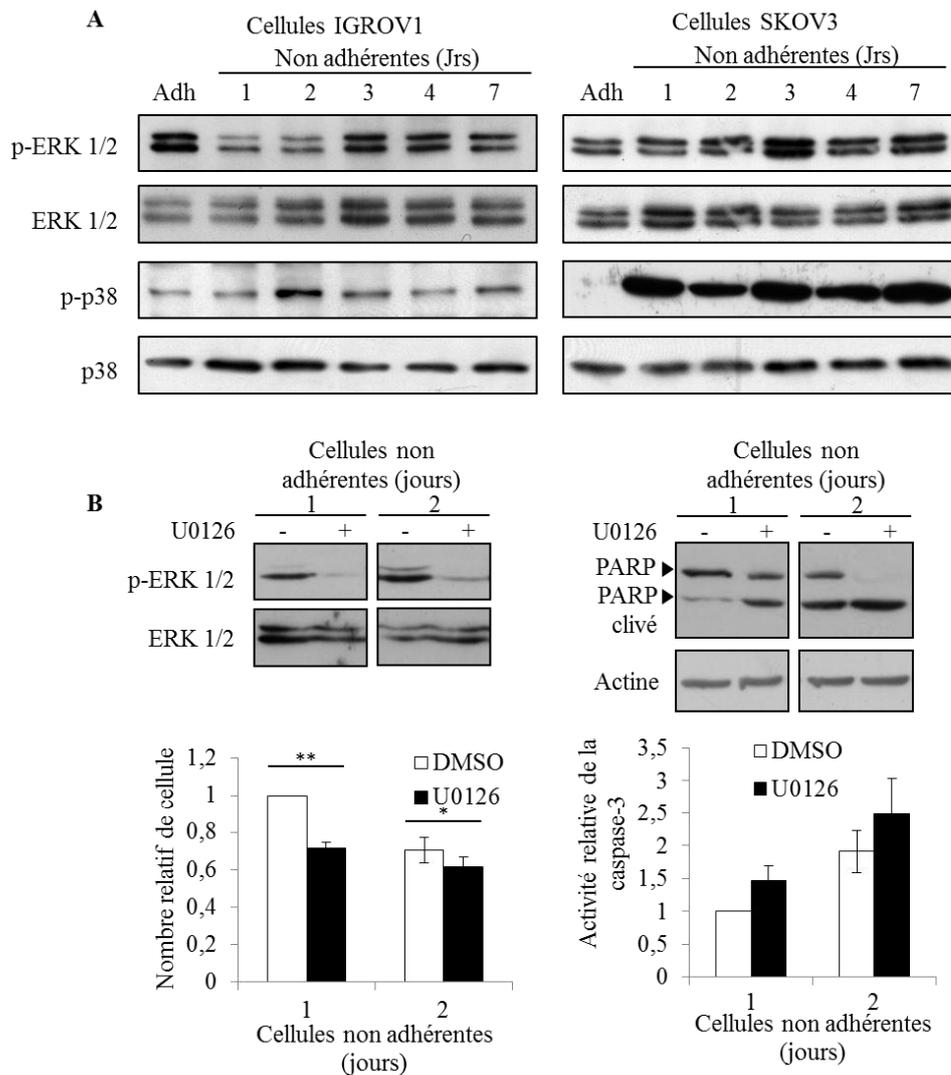


Figure 44 La phosphorylation d'ERK1/2 est nécessaire pour la survie des cellules cancéreuses ovariennes en sphéroïdes.

La phosphorylation d'ERK1/2 et de p38 sont suivies par western blot au cours de la formation de sphéroïdes par les cellules IGROV1 et SKOV3 (A). Les cellules IGROV1, en condition non adhérente, sont traitées avec 10 μ M de U0126 (+), un inhibiteur de la phosphorylation d'ERK1/2, ou avec du DMSO (-) comme contrôle (B). L'inhibition de la phosphorylation d'ERK1/2 est vérifiée par western blot. L'effet du traitement sur la viabilité est déterminé par comptage du nombre de cellules viables et l'apoptose est suivie par observation du clivage de PARP et par mesure de l'activité caspase-3. La significativité des résultats est indiquée par * et ** si les probabilités sont respectivement $<0,05$ ou $<0,01$.

2.3. La survie des sphéroïdes dépend de l'activation d'ERK 1/2

L'ensemble de ces résultats indiquent que les cellules IGROV1 sont capables de survivre en absence d'ancrage à un support après une « période apoptotique », suggérant l'induction d'une signalisation de survie et de mort pendant la formation des sphéroïdes. De manière différente, les cellules SKOV3 survivent dès la perte d'ancrage par l'induction d'un état de quiescence.

Les réponses cellulaires à des stress environnementaux, comme la perte d'ancrage à un support, sont régulées par des modifications des signalisations intracellulaires. La voie de signalisation des MAP Kinases est essentielle à la régulation de processus de prolifération, de survie et d'apoptose. Le rôle de la phosphorylation d'ERK 1/2 et de p38 et donc de leurs activations dans la survie des sphéroïdes de cellules IGROV1 et SKOV3 a ainsi été estimé.

La culture des cellules IGROV1 en absence d'ancrage engendre une diminution de la phosphorylation d'ERK 1/2 pendant les premiers jours de culture par comparaison aux cellules adhérentes. A plus longs termes, les cellules IGROV1 non adhérentes présentent un état de phosphorylation d'ERK 1/2 proche des cellules adhérentes (Figure 44A). La phosphorylation de p38 varie également au cours de la formation des sphéroïdes. Une phosphorylation maximale de p38 est observée pendant les premiers jours, ensuite, après 4 jours de culture, une diminution de cette phosphorylation est observée. Ce profil d'activation de p38 par les cellules IGROV1 semble être corrélé avec l'induction d'une signalisation apoptotique illustrée par le clivage de PARP et l'activation de la caspase-3 (Figure 43A).

Les profils d'activation d'ERK 1/2 et de p38 dans les sphéroïdes de SKOV3 sont différents. Lorsque les cellules sont cultivées en condition non adhérente, la phosphorylation d'ERK1/2 ne varie pas significativement par comparaison avec les cellules adhérentes alors que p38 est activé dès la formation initiale des sphéroïdes comme l'indique le profil de phosphorylation (Figure 44A).

Enfin, l'importance de l'activation d'ERK 1/2 dans la résistance des cellules IGROV1 à l'anoïkis a été confortée en inhibant cette activation par la molécule pharmacologique U0126 au cours des deux premiers jours de formation des sphéroïdes. Ainsi, dans ces conditions et comme le révèle la Figure 44B, le nombre de cellules non adhérentes viables

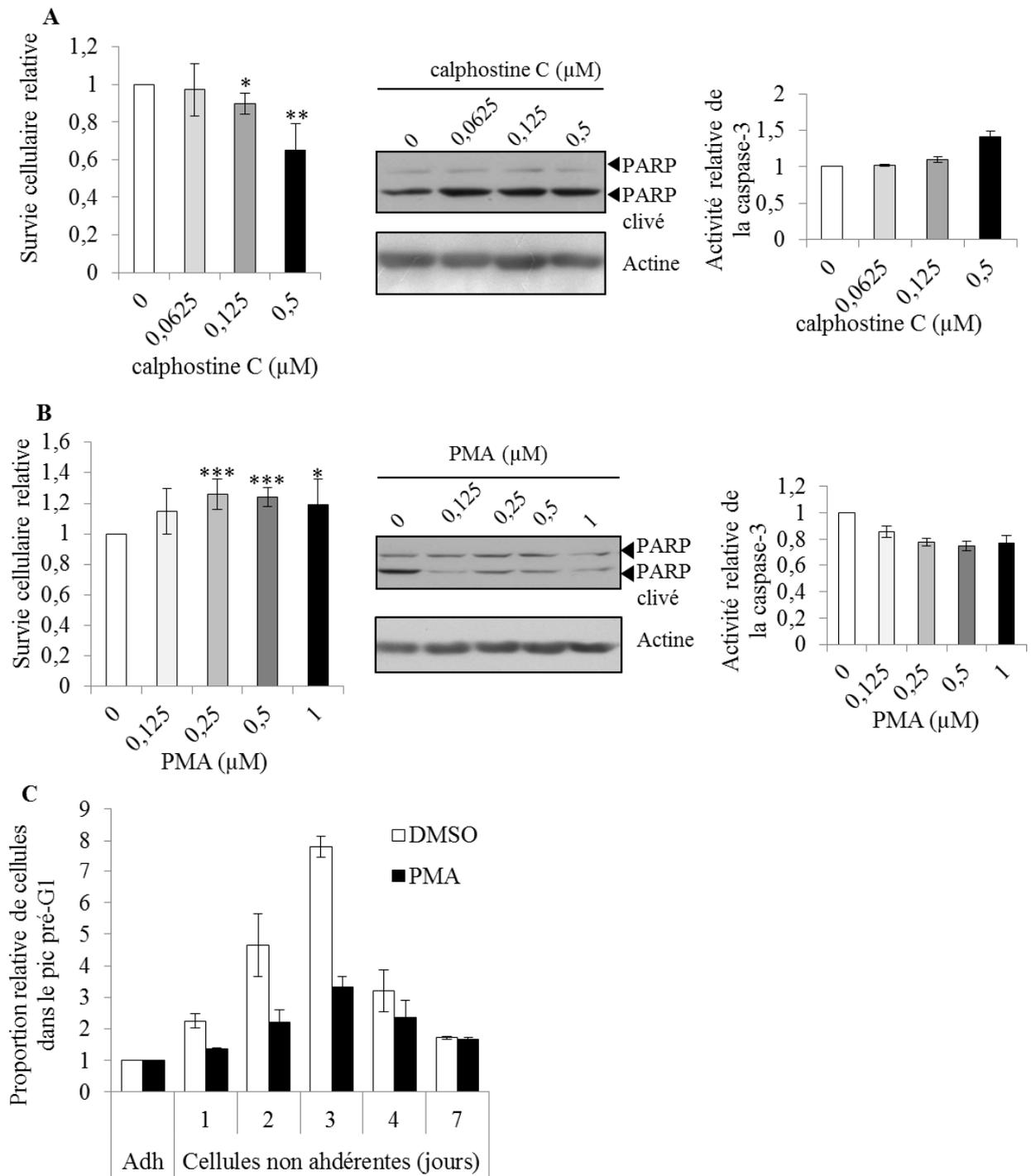


Figure 45 Les signalisations induites par les PKC sont impliquées dans la résistance à l'anoïkis.

La viabilité des cellules IGROV1 en condition non adhérente est estimée en présence de calphostine C (A) un inhibiteur des PKC ou de PMA un activateur des PKC (B) pendant les premiers jours de la formation des sphéroïdes (2 jours). L'apoptose est suivie par un western blot de PARP et PARP clivé (avec l'actine comme témoin) et par mesure de l'activité caspase-3. La proportion de cellules IGROV1 dans le pic pré-G1 obtenue par cytométrie en flux, représentant les cellules mortes et les débris cellulaires, est suivie au cours de la formation des sphéroïdes après un traitement avec 1 μ M de PMA (C).

diminue en présence de l'inhibiteur U0126. De plus, ce traitement augmente le clivage de PARP ainsi que l'activité caspase-3.

Ces résultats suggèrent que les cellules IGROV1 résistent au « stress apoptotique », induit par la perte d'ancrage, en activant la protéine ERK 1/2, membre de la voie des MAP kinases.

2.4. Résistance à l'anoïkis : importance des PKC et des intégrines α v

- Influence de l'activité des PKC sur la survie des sphéroïdes

Les protéines Kinase C (PKC) sont des sérines/thréonines kinases qui régulent un grand nombre de fonctions cellulaires incluant la prolifération et l'apoptose. Ainsi, il nous est apparu pertinent d'évaluer leur importance dans l'acquisition d'une résistance à l'anoïkis par les sphéroïdes cancéreux.

Le traitement par l'inhibiteur des PKC, la calphostine C, des cellules IGROV1 pendant les deux premiers jours de formation des sphéroïdes, induit l'augmentation de la mortalité cellulaire, du clivage PARP et de l'activité caspase-3 (Figure 45A). Par ailleurs, l'activation des PKC par le PMA engendre une augmentation de la survie cellulaire et une diminution simultanée du clivage de PARP et de l'activité caspase-3 (Figure 45B). L'analyse des résultats de cytométrie en flux révèle que l'activation des PKC induit une diminution importante des débris cellulaires et des cellules mortes pendant les trois premiers jours de la formation des sphéroïdes de cellules IGROV1 (Figure 45C). Ces résultats suggèrent ainsi que l'activation des PKC favorise la viabilité des sphéroïdes et donc concourent à l'acquisition d'un phénotype cellulaire résistant à l'anoïkis.

- Implication des intégrines α v dans la survie des sphéroïdes

Comme précédemment décrit dans la partie bibliographique, les intégrines α v semblent être fortement impliquées dans la biologie des cancers de l'ovaire (Hapke *et al.*, 2003; Maubant *et al.*, 2005; Reuning, 2011). Notre groupe de recherche a notamment démontré leurs rôles dans de nombreux comportements cellulaires impliqués lors de la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes (Carreiras *et al.*, 2002, 1999c; Heyman *et al.*, 2008; Leroy-Dudal *et al.*, 2005b). Plus particulièrement, les intégrines α v et leur ligand privilégié, la

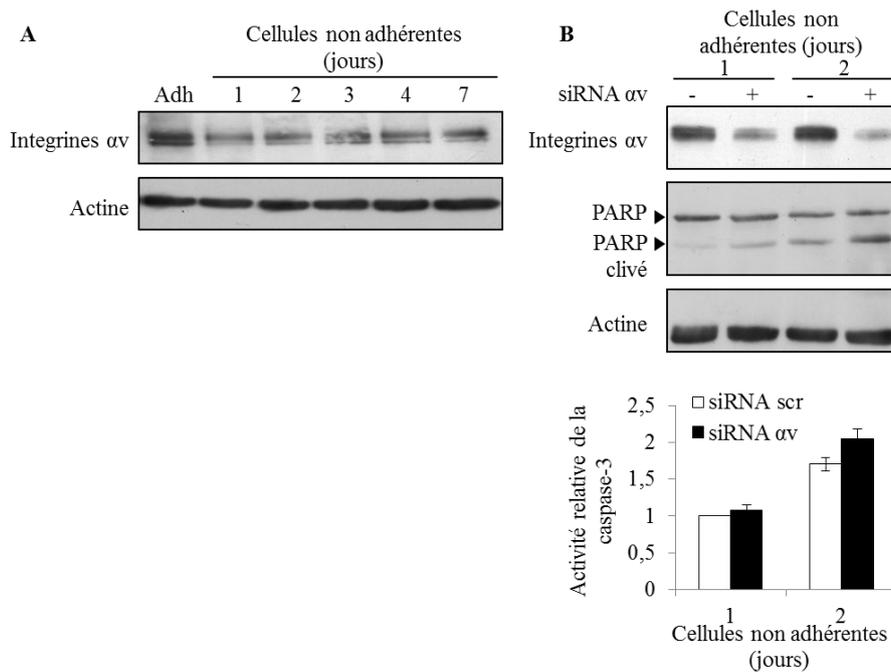


Figure 46 Importance de l'expression des intégrines αv dans la résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis.

L'expression des intégrines αv par les cellules IGROV1 est suivie pendant 7 jours de culture en condition non adhérente ou dans les cellules adhérentes (Adh) par western blot avec l'actine comme témoin de dépôt (A). Détermination de l'effet de la diminution de l'expression des intégrines αv sur la viabilité des sphéroïdes en formation (B). Les cellules adhérentes sont transfectées avec un siRNA dirigé contre l'ARNm des intégrines αv (siRNA αv) ou avec un siRNA scramble (siRNA scr). Puis les cellules sont incubées en condition non adhérentes pendant 1 et 2 jours. L'efficacité de la diminution d'expression des intégrines αv est contrôlée par western blot. L'induction de l'apoptose est suivie par western blot de PARP et PARP clivée et par mesure de l'activité caspase-3.

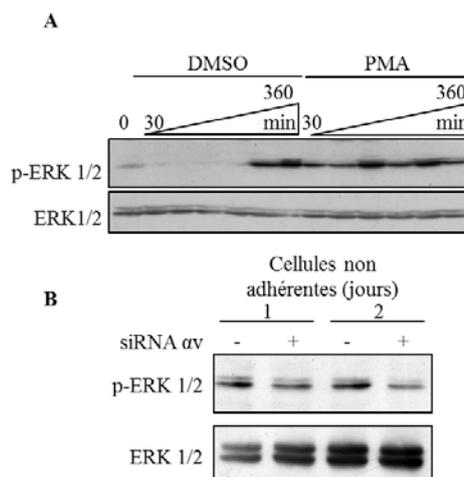


Figure 47 Les signalisations de la PKC et des intégrines αv conduisent à l'activation d'ERK1/2.

Augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 après traitement des cellules au PMA (A). Durant les étapes initiales de la formation des sphéroïdes (de 0 à 360 min), les cellules IGROV1 en condition non adhérente sont traitées avec 1 μ M de PMA ou du DMSO et l'activation d'ERK1/2 est suivie par western blot. Implication des intégrines αv dans la phosphorylation d'ERK1/2 (B). La phosphorylation d'ERK1/2 est analysée par western blot après diminution de l'expression des intégrines αv par siRNA (+) ou après transfection avec un siRNA scramble (-).

vitronectine, sont exprimés au cœur des sphéroïdes de cellules IGROV1 et sont impliqués dans leur formation (Kellouche *et al.*, 2010). Ces données nous ont donc conduit à estimer leur importance dans la résistance des sphéroïdes à la mort cellulaire.

Comme observé dans la Figure 46A, l'expression des intégrines α_v est maintenue constante au cours de la formation des sphéroïdes. Toutefois, le niveau d'expression des intégrines α_v est légèrement plus faible que pour les cellules adhérentes. Le rôle de ces intégrines, dans la survie des sphéroïdes, a été déterminé par une approche d'ARN interférence. L'expression de ces intégrines a donc été diminuée grâce à l'utilisation d'un siRNA dirigé contre l'ARNm des intégrines α_v . La diminution d'expression des intégrines α_v dans les cellules IGROV1 non adhérentes induit une augmentation du clivage de PARP et de l'activité caspase-3 suggérant une stimulation de la voie apoptotique (Figure 46B).

- Convergence des voies de signalisations des PKC et des intégrines α_v vers l'activation d'ERK 1/2

Les interconnexions entre les voies de signalisations sont des éléments majeurs de régulation permettant une adaptation des cellules aux modifications de leur microenvironnement. L'interconnexion entre la voie MAPK et la signalisation des PKC en est un exemple. Les PKC peuvent activer la cascade de signalisation ERK 1/2 et ainsi favoriser la migration des cellules cancéreuses ovariennes ou activer ERK 1/2 lors de l'apoptose induite par des dommages à l'ADN (Basu et Tu, 2005; Rucci *et al.*, 2005). Dans ce contexte, le rôle de l'activation de la PKC, lors des stades précoces de la formation des sphéroïdes, sur l'activation d'ERK 1/2 a été déterminé. Les deux premières heures de mise en culture en condition non adhérente se caractérisent par une absence d'activation d'ERK 1/2 (Figure 47A). La phosphorylation d'ERK 1/2 est maintenue lors de la perte d'ancrage lorsque les PKC sont activées par traitement avec le PMA. Par ailleurs, la diminution d'expression des intégrines α_v , s'accompagne d'une diminution d'activation d'ERK 1/2 (Figure 47B)

L'ensemble de ces résultats suggère que les signalisations dépendantes des intégrines α_v et de l'activation des PKC convergent vers l'activation d'ERK 1/2 et donc favorisent la résistance, des cellules IGROV1, à l'anoïkis pendant la formation des sphéroïdes.

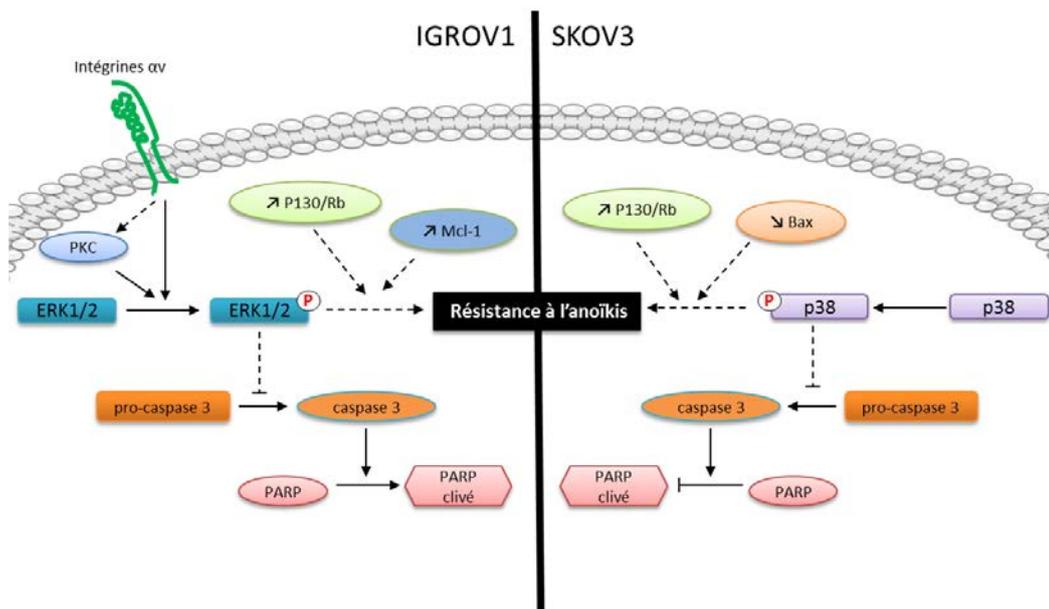


Figure 48 Schéma illustrant les signalisations permettant la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses ovariennes organisées en sphéroïdes.

Pour les cellules IGROV1, la perte d'ancrage induit une double signalisation d'apoptose et de survie. La résistance à l'anoïkis nécessite la phosphorylation d'ERK1/2 qui dépend de l'activation des PKC et de la signalisation dépendant des intégrines α_v . Une fois qu'ERK1/2 est activé, l'apoptose est inhibée comme indiqué par la diminution du clivage de PARP et de l'activité caspase-3. En parallèle, l'expression de molécules de survie, comme Mcl-1, est augmentée. Pour les cellules SKOV3, la perte d'ancrage induit rapidement l'accumulation de P130/Rb, protéine connue pour être impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G0/G1. D'autre part, la phosphorylation de p38 participe à l'entrée en quiescence des cellules. Cet état protège les cellules SKOV3 de l'anoïkis comme le montre la diminution des marqueurs apoptotiques (clivage de PARP, activité caspase-3 et expression de Bax). Les flèches pleines indiquent des effets directs et les flèches en pointillées indiquent les effets indirects décrits dans la bibliographie.

3. CONCLUSIONS

Cette première partie d'expérimentation nous permet d'illustrer l'hétérogénéité des cellules cancéreuses ovariennes. Selon l'état de différenciation des cellules cancéreuses, les comportements cellulaires adaptés face au « stress » induit par la perte d'ancrage à une matrice extracellulaire sont différents. Deux types de sphéroïdes sont formés et deux types de réponses à la survie sont mis en évidence. Les résultats obtenus, notamment avec le modèle de sphéroïdes de cellules IGROV1 révèlent l'importance des MAP kinases ERK 1/2. Pour résister à l'anoïkis engendrée par la perte d'ancrage, les cellules doivent maintenir des signalisations « de survie » pour compenser les signalisations de mort cellulaire engendrées par la perte d'ancrage (Figure 48). Les signalisations induites par les intégrines αv , suite à leur interaction avec leur ligand, et l'activation des PKC convergent vers la phosphorylation d'ERK 1/2 favorisant la survie cellulaire. Une fois que les cellules sont organisées en sphéroïdes, « l'arrêt » du cycle cellulaire par la mise en place d'un état de quiescence est observé. Ainsi, les cellules cancéreuses sont capables de survivre en attendant de se trouver dans un microenvironnement permettant leur prolifération.

Les résultats obtenus sur le modèle de sphéroïde de cellules SKOV3 doivent être complétés, notamment concernant l'importance des PKC et des intégrines αv dans la régulation de l'activation de la voie des MAPK et dans l'induction de l'état de quiescence permettant une résistance à l'anoïkis des cellules.

In vivo, les cellules cancéreuses présentent à la surface de l'épithélium ovarien et les sphéroïdes tumoraux sont en contact perpétuel avec le liquide ascitique. Il est évident que ce microenvironnement particulier et complexe, influence le comportement des cellules. De ce fait, dans la deuxième et troisième partie des résultats, nous nous sommes intéressés d'une part à son influence sur le comportement cellulaire et d'autre part à sa composition en protéines matricielles.

**Influence des sécrétions ascitiques sur le comportement de cellules
cancéreuses ovariennes**

(Article en cours de rédaction)

1. PRESENTATION DE L'ETUDE

Les difficultés rencontrées lors du traitement des cancers de l'ovaire sont principalement dues à la dissémination des cellules cancéreuses dans la cavité péritonéale.

Comme mentionné dans la partie bibliographique du manuscrit l'ascite constitue un microenvironnement particulier et caractéristique de la physiopathologie tumorale ovarienne. Les composants moléculaires et cellulaires des ascites contribuent à la formation de foyers tumoraux secondaires et à l'acquisition d'une chimiorésistance accompagnant l'extension de la pathologie. L'étude de l'influence de l'ascite sur le comportement de cellules cancéreuses ovariennes a donc été réalisée.

Nos collaborations avec le Centre de lutte contre le cancer François Baclesse (Caen), l'institut Curie (Paris) et le service d'oncologie de l'Hôpital René Dubos (Pontoise) nous ont permis d'avoir accès à des prélèvements ascitiques survenus chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire. La difficulté de maintenir dans des conditions de stérilité satisfaisante les échantillons prélevés *in vivo* a été un facteur limitant et contraignant pour cette étude. De plus, la variabilité des échantillons, notamment en termes de volume, a nécessité la sélection de certaines ascites permettant de reproduire les expériences un nombre de fois suffisant.

Les intégrines sont des récepteurs exprimés à la surface cellulaire et sont en grandes parties responsables des interactions entre l'environnement matriciel et les cellules. Organisées au sein de structures d'adhérences et suite à leurs interactions avec les ligands matriciels, les intégrines déclenchent une signalisation intracellulaire conditionnant le comportement des cellules.

Il a récemment été démontré que l'ascite active les intégrines $\alpha 6\beta 1$ ou $\alpha v\beta 5$ et ainsi favorise la croissance ou la survie cellulaire (Ahmed *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 2010). D'autres études menées au sein de notre équipe de recherche ont permis de décrire le rôle central des intégrines αv dans la migration cellulaire ou la formation des sphéroïdes par les cellules cancéreuses ovariennes (Carreiras *et al.*, 1999c; Kellouche *et al.*, 2010).

Ainsi, l'organisation des intégrines αv lorsque les cellules sont dans un environnement ascitique et leur rôle dans la régulation des comportements cellulaires mis en jeu lors de la dissémination tumorale ont été étudiés.

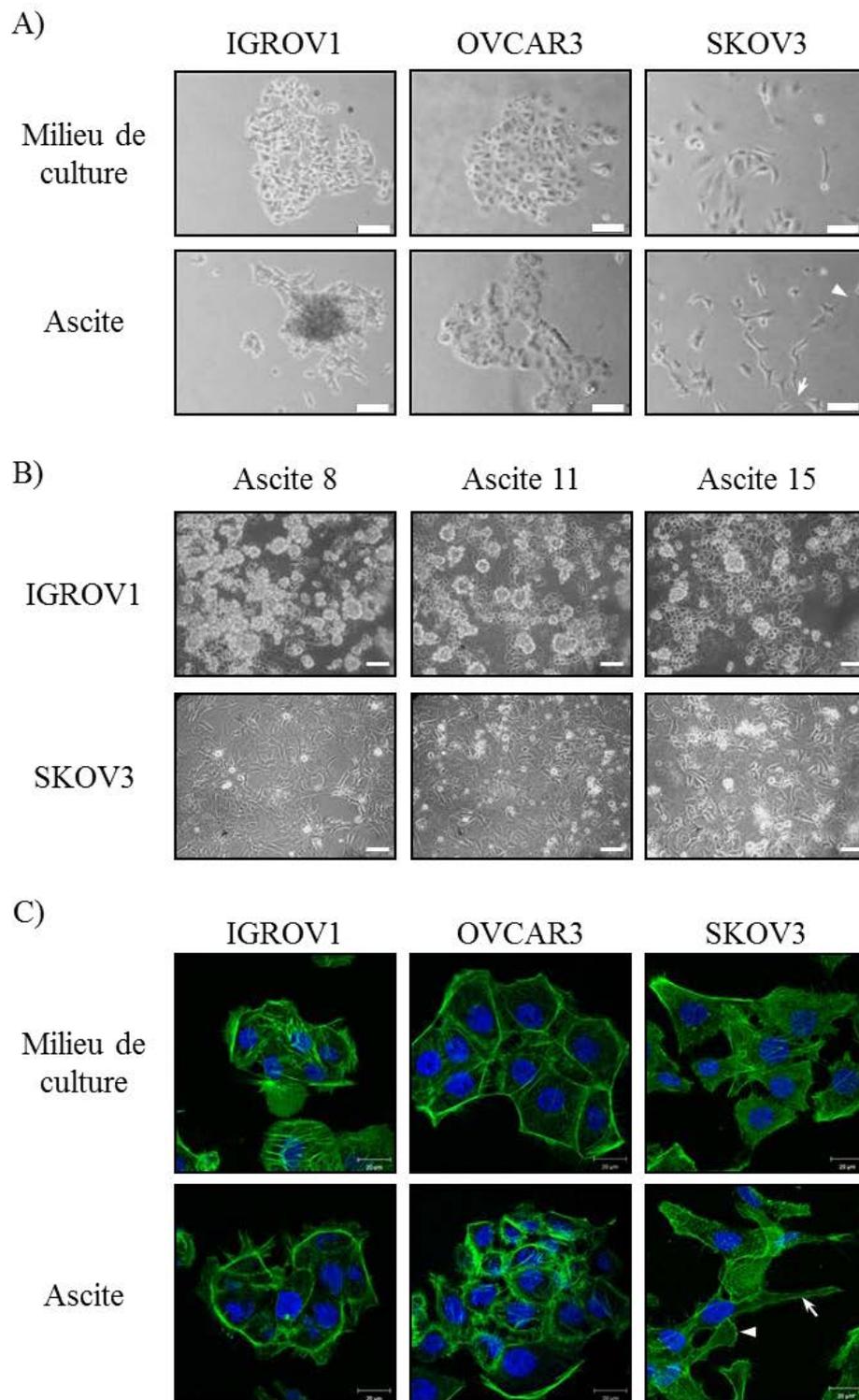


Figure 49 Modifications morphologiques des cellules cancéreuses ovariennes cultivées en ascite.

Les cellules IGROV1, SKOV3 et OVCAR3 sont incubées 48h en milieu de culture ou en ascite et leur morphologie est observée en microscopie à contraste de phase (A). Les pointes de flèches indiquent les nanotubes et les flèches les cytonèmes (barre d'échelle=100 µm). La morphologie des cellules IGROV1 et SKOV3 est observée après incubation dans des prélèvements ascitiques de plusieurs patientes (B) (barre d'échelle=100 µm). L'organisation du cytosquelette d'actine des cellules incubées en milieu de culture et en ascite est visualisée par microscopie confocale après un marquage à la phalloïdine-FITC, les noyaux cellulaires sont marqués par le DAPI (C) Les pointes de flèches indiquent les *lamellipodia* et les flèches les *filipodia* (barre d'échelle=20 µm).

2. RESULTATS

2.1. Effet de l'ascite sur le phénotype cellulaire

2.1.1. *Modification de la morphologie cellulaire*

Les cellules cancéreuses ovariennes peuvent présenter plusieurs phénotypes (voir introduction bibliographique §2.2.1.1). Ces modifications de comportements et d'organisations cellulaires pourraient être la conséquence de l'adaptation des cellules aux différents microenvironnements rencontrés au cours de la progression tumorale. Dans le but d'étudier l'influence de l'environnement ascitique sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes, plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées pour refléter l'hétérogénéité des cellules cancéreuses composant les adénocarcinomes ovariens.

La lignée cellulaire IGROV1 est issue de l'ovaire d'une patiente atteinte d'un cancer de l'ovaire de stade III et les lignées cellulaires SKOV3 et OVCAR3 ont été établies à partir de cellules isolées d'ascites. Les cellules SKOV3, incubées en milieu de culture classique, ont une morphologie de type fibroblastique et les cellules IGROV1 et OVCAR3 ont une morphologie de type épithéliale (Figure 49A). Après une incubation de 48h au sein d'un prélèvement ascitique, des modifications morphologiques des cellules sont observées. Les cellules IGROV1 s'agrègent et forment des amas cellulaires présentant une organisation en sphéroïdes et se détachent des îlots de cellules adhérentes (Burleson *et al.*, 2004). Les cellules SKOV3 présentent une organisation cellulaire très étalée avec la formation d'extension cytoplasmique pouvant correspondre à des cytonèmes (Koizumi *et al.*, 2012). Certaines de ces extensions semblent s'organiser entre les cellules pour former des nanotubes (Lou *et al.*, 2012). Les cellules OVCAR3 incubées en ascite forment des îlots cellulaires avec une organisation compacte. Les modifications morphologiques les plus importantes, notamment celles des cellules IGROV1 et SKOV3, sont observées avec différents échantillons d'ascites (Figure 49B).

L'altération de la morphologie cellulaire observée lors d'une incubation en ascite s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette d'actine (Figure 49C). En effet, les filaments d'actine, organisés en fibres de tension dans les cellules IGROV1 et OVCAR3 incubées en milieu de culture, présentent une organisation corticale plus marquée après une incubation en ascite. Dans les cellules SKOV3, l'ascite induit la formation de structures

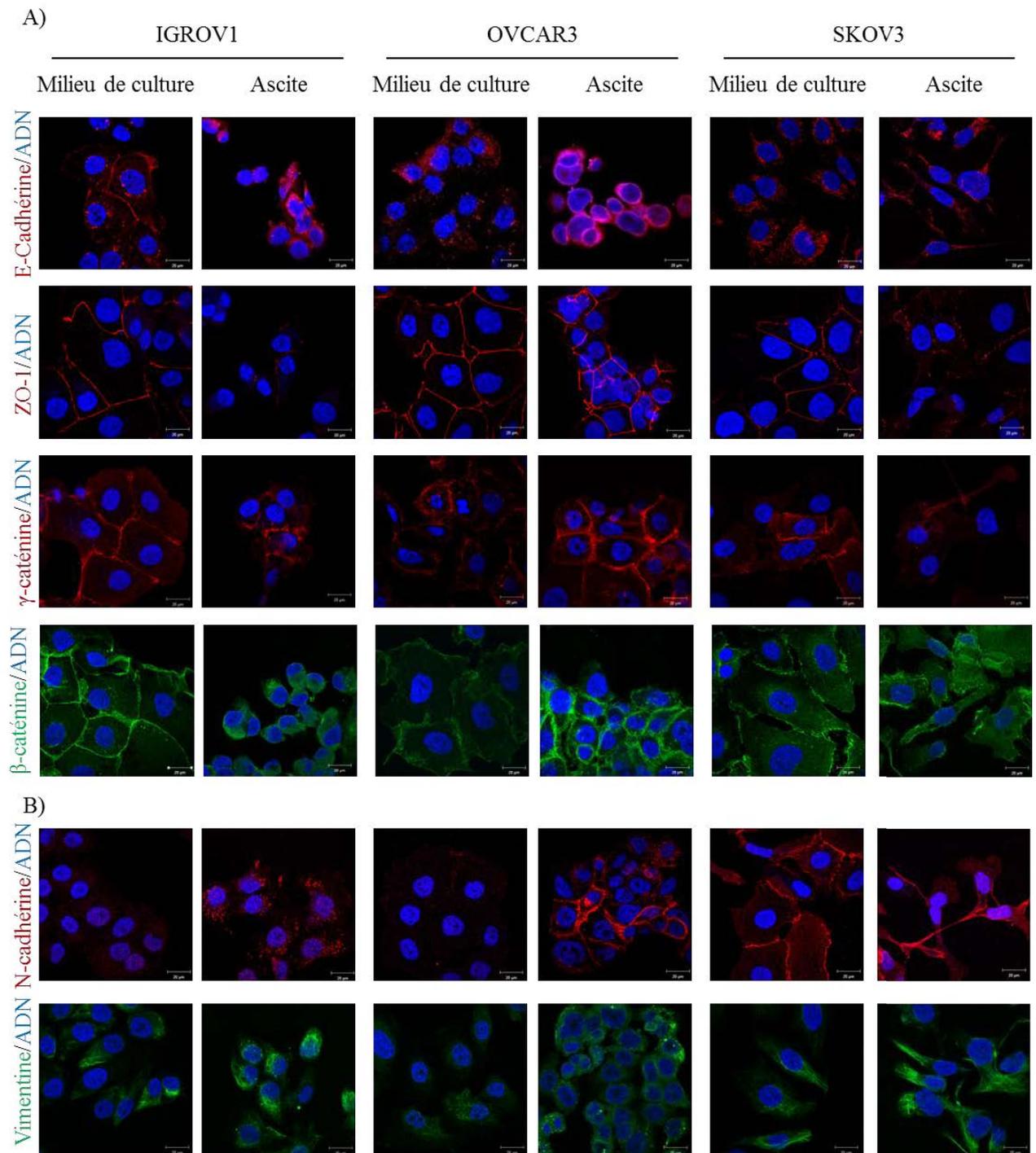


Figure 50 Localisation de marqueurs épithéiaux et mésenchymateux des cellules cancéreuses ovariennes après incubation en ascite.

Les cellules IGROV1, OVCAR3 et SKOV3 sont incubées pendant 48h en milieu de culture ou en ascite. Puis des immunomarquages de marqueurs épithéiaux (A) (E-cadhérine, ZO-1, γ -caténine et β -caténine) et mésenchymateux (B) (N-cadhérine et vimentine) sont réalisés. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (barre d'échelle= 20 μ m).

protrusives pouvant correspondre à des *lamellipodia* et/ou des *filopodia*. De plus, des marquages punctiformes d'actine sont observés dans les cellules SKOV3 et sont évocateur d'*invadopodia*.

2.1.2. Redistribution des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux

Suite aux modifications de l'organisation morphologique des cellules et à la réorganisation du cytosquelette engendrées par l'ascite, nous nous sommes intéressés à l'organisation des interactions cellulaires. La localisation de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux a été réalisée sur les trois lignées cellulaires en milieu de culture classique et en ascite (Figure 50).

Les cellules IGROV1 incubées en milieu de culture classique présentent une localisation membranaire des marqueurs épithéliaux (Figure 49A). En effet, l'E-cadhérine, le marqueur des jonctions serrées ZO-1, la γ -caténine et la β -caténine, protéines intermédiaires entre les cadhérines et le cytosquelette, sont localisées dans les zones de jonctions cellulaires. Toutefois, la localisation de l'E-cadhérine est plus irrégulière par comparaison au marqueur ZO-1 et à la γ - et β -caténine. Après incubation des cellules IGROV1 en ascite, l'organisation intercellulaire de l'E-cadhérine est disloquée, le marquage de ZO-1 n'est plus détectable, la redistribution membranaire de la γ -caténine et une translocation perinucléaire de la β -caténine sont observées.

Les cellules OVCAR3 cultivées en milieu de culture présentent une organisation punctiforme de l'E-cadhérine dans le cytosol et une localisation de ZO-1 et de la γ - et β -caténine dans les jonctions cellulaires. Après une incubation en ascite, ces cellules présentent une localisation de l'E-cadhérine plus diffuse et périnucléaire alors que l'organisation de ZO-1 n'est pas modifiée. Les marquages de la γ - et β -caténine sont plus intenses dans les zones intercellulaires.

Pour les cellules SKOV3, le marquage de l'E-cadhérine est punctiforme et cytosolique aussi bien dans les conditions de culture classique qu'en ascite. Les marquages intercellulaires de ZO-1 et de la γ -caténine observés aux jonctions intercellulaires tendent à disparaître quand les cellules sont cultivées en ascite. La localisation membranaire de la β -caténine devient discontinue.

Tableau 3 Analyse semi-quantitative de l'expression et de l'organisation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux.

L'organisation et le niveau d'expression de différents marqueurs sont évalués de façon comparative entre les lignées cellulaires sur une échelle 1 à 5 en fonction du caractère mésenchymateux ou épithélial des immunomarquages (Moreno-Bueno G. *et al.* 2009).

		Marqueurs épithéliaux				Actine	Marqueurs mésenchymateux		Moyenne	Phénotype
		E-cadhérine	ZO-1	γ -caténine	β -caténine		N-cadhérine	Vimentine		
IGROV1	SVF	4	5	5	5	4	5	4	5	E
	ASC	3	1	2	2	5	4	3	3	E=M
OVCAR3	SVF	2	5	4	2	4	5	5	4	E>M
	ASC	4	5	5	5	5	1	4	4	E>M
SKOV3	SVF	3	4	4	4	3	1	3	3	E=M
	ASC	3	2	2	3	2	2	1	2	M>E

1	2	3	4	5
M	M>E	E=M	E>M	E

Dans un second temps, la localisation et l'organisation de marqueurs mésenchymateux ont été étudiées (Figure 50B). La N-cadhérine n'est pas détectée dans les cellules IGROV1 et OVCAR3 en milieu de culture classique alors qu'en environnement ascitique un marquage punctiforme ou intercellulaire est observé. Les cellules SKOV3 présentent une localisation de la N-cadhérine dans les zones de contacts entre les cellules. Après une incubation en ascite, ces cellules expriment toujours la N-cadhérine, mais sa localisation est plus hétérogène probablement en raison de l'isolement plus important des cellules. D'autre part, les cellules IGROV1 et SKOV3, en ascite, présentent un marquage plus intense de la vimentine par comparaison aux cellules en milieu de culture. De plus, dans ces cellules, des structures typiques des filaments intermédiaires sont visualisées. Pour les cellules OVCAR3, dans les deux conditions de culture, peu de variations d'expression et d'organisation de la vimentine sont observées.

Dans le Tableau 3, une estimation semi-quantitative du niveau d'expression ou d'organisation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux précédemment décrits est présentée. Ainsi, il est possible de déterminer qu'elle est l'influence de l'ascite sur le phénotype des cellules cancéreuses ovariennes. L'indice 1 définit un niveau d'expression ou d'organisation de la molécule d'intérêt caractéristique d'un phénotype mésenchymateux (ex : réseau de vimentine) et l'indice 5 désigne un phénotype épithélial (ex : localisation membranaire de ZO-1) (Moreno-Bueno *et al.*, 2009). Le niveau d'expression est déterminé selon l'intensité du marquage et l'organisation des marqueurs caractérise la localisation et la structuration du marquage. Les cellules IGROV1, en milieu de culture classique, ont donc un phénotype épithélial d'après les marqueurs étudiés (indice 5), et leur phénotype devient intermédiaire lors d'une incubation en ascite (indice 3). Les cellules SKOV3 ont un phénotype plutôt mésenchymateux après mise en culture en ascite (indice 2), alors qu'elles sont intermédiaires en milieu de culture classique (indice 3). Le phénotype global des cellules OVCAR3 ne varie pas en fonction des conditions de culture, il reste plutôt de type épithélial (indice 4).

L'ensemble de ces résultats indique que les prélèvements ascitiques issus de patientes peuvent induire une modification du phénotype de cellules cancéreuses ovariennes. Les variations d'expression et de localisation des différents marqueurs étudiés

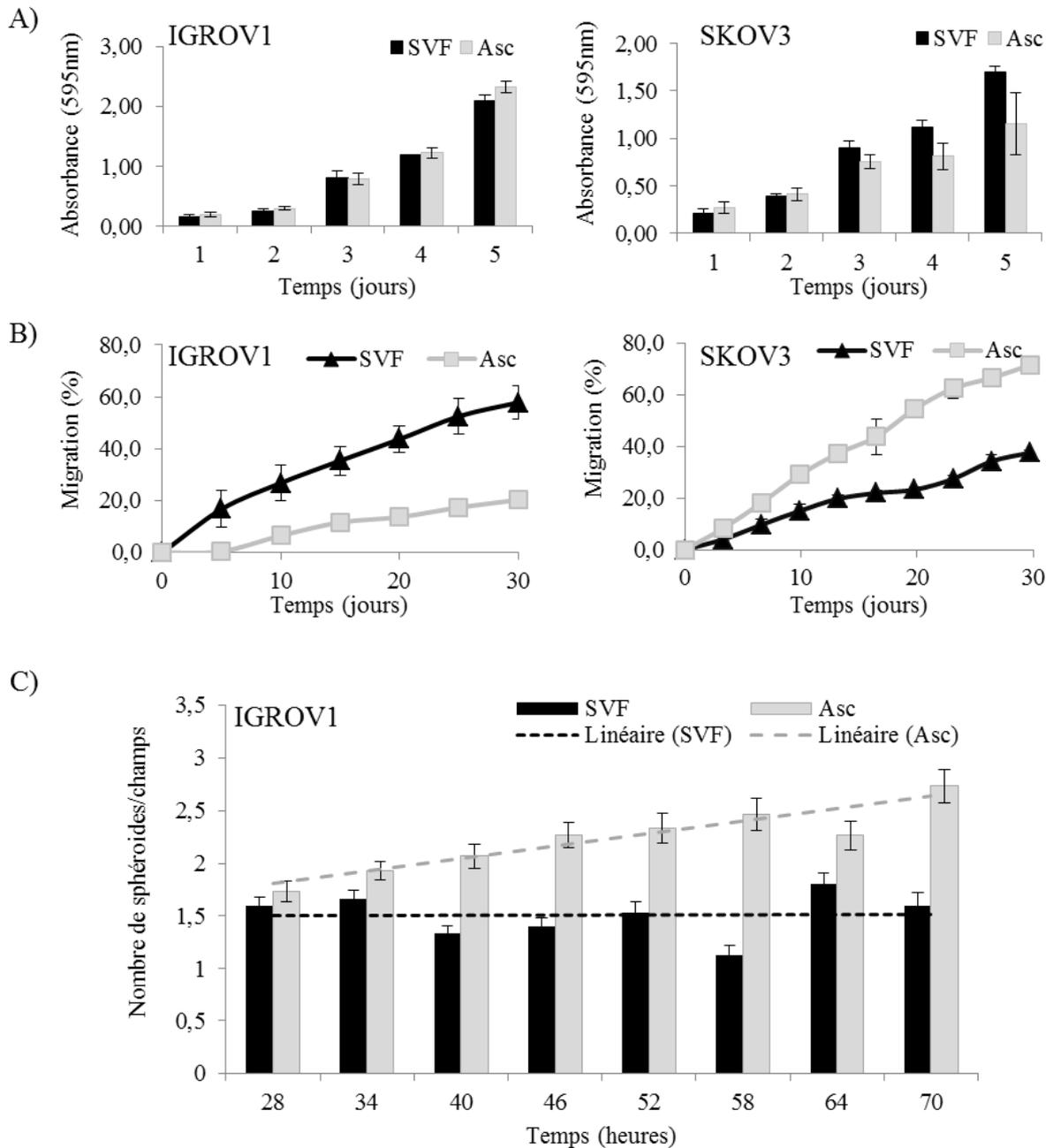


Figure 51 Influence de l'ascite sur les comportements cellulaires.

La prolifération des cellules IGROV1 et SKOV3 incubées en milieu de culture (SVF) ou en ascite (Asc) est suivie sur 5 jours de culture par coloration au cristal violet et mesure de l'absorbance à 595 nm (A). La migration des cellules est mesurée pendant 30h après avoir réalisé une blessure de la monocouche cellulaire (B). Le pourcentage de migration des cellules est estimé en mesurant la surface de la blessure comblée par les cellules. La capacité des cellules IGROV1 à former spontanément des sphéroïdes à partir de cellules adhérentes est suivie au cours du temps par quantification du nombre de sphéroïdes de plus de 5 cellules sur plusieurs champs (C). La régression linéaire de chaque condition est représentée en pointillé.

suggèrent la capacité de l'ascite à modifier l'état de différenciation cellulaire notamment par le déclenchement d'une transition épithélio-mésenchymateuse.

2.2. Effet de l'ascite sur les comportements cellulaires

2.2.1. Influence de l'ascite sur la prolifération, la migration et la formation de sphéroïdes tumoraux

Après avoir étudié les modifications intracellulaires induites par l'ascite, nous avons cherché à caractériser l'effet de l'ascite sur des comportements cellulaires impliqués dans la dissémination tumorale ovarienne. Ces expériences ont été réalisées sur les lignées IGROV1 et SKOV3, car ces cellules présentent des modifications phénotypiques marquées lors de l'incubation en ascite.

Les capacités prolifératives des cellules IGROV1 et SKOV3 ont été estimées par un test colorimétrique au cristal violet (Figure 51A). Le nombre de cellules IGROV1, au cours des 5 jours d'incubation en milieu de culture et en ascite, évolue de la même manière. A l'inverse, le nombre de cellules SKOV3 est inférieur lors de l'incubation en ascite par comparaison à la condition en milieu de culture.

Ensuite, l'influence de l'ascite sur la migration cellulaire a été suivie par vidéomicroscopie et quantifiée par analyse d'image (Figure 51B). Le pourcentage de migration cellulaire représente le comblement de la surface sans cellule au cours du temps. Les capacités migratoires des cellules IGROV1 diminuent après une incubation en ascite par comparaison au milieu de culture. En effet, après 30h, la migration des cellules IGROV1 est de 58% en milieu de culture et diminue à 20% après une incubation en ascite. Pour les cellules SKOV3, le phénomène inverse est observé. A la fin du test de migration, les cellules SKOV3 incubées en milieu de culture ont un pourcentage de migration de 38% et celui-ci augmente à 72% après une incubation en ascite.

Nous avons vu dans la Figure 49 que l'ascite induit la formation de sphéroïdes de cellules IGROV1 capables de se décrocher du tapis cellulaire. Pour mieux caractériser ces observations, un suivi au cours du temps du nombre de sphéroïdes formés par champs, en ascite et en milieu de culture a été réalisé (Figure 51C). Ainsi, nous observons que l'ascite

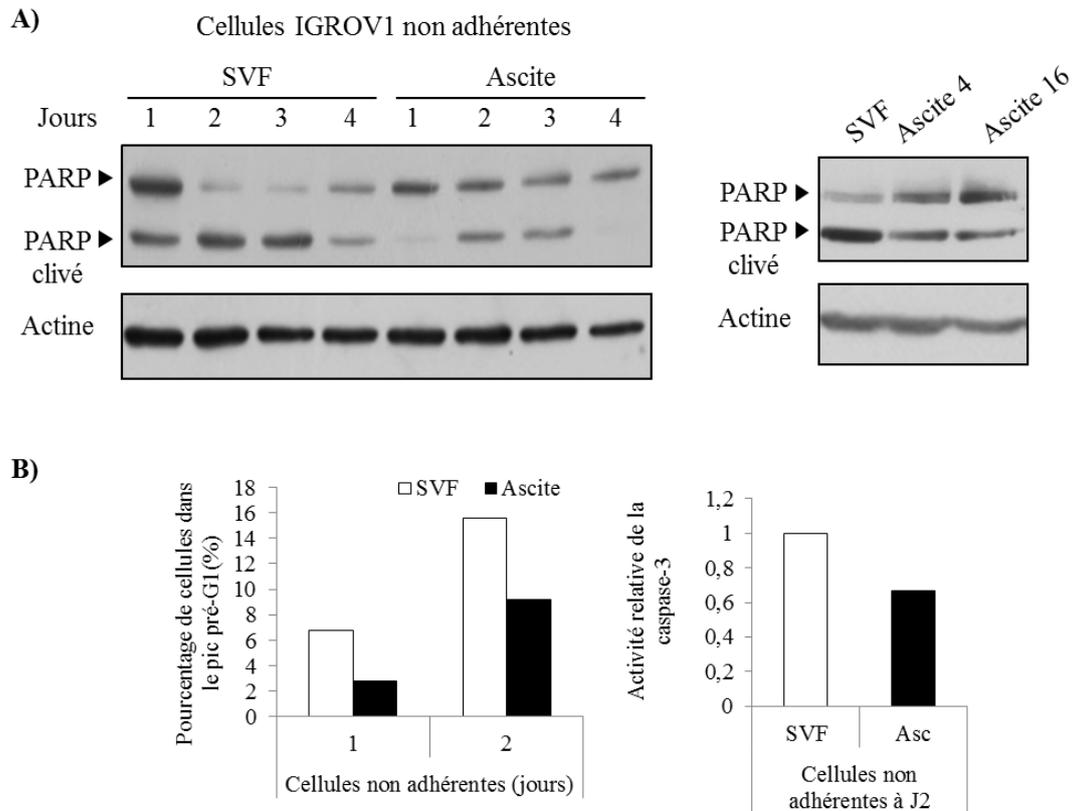


Figure 52 L'ascite modifie la résistance à l'anoïkis des cellules IGROV1.

Le clivage de PARP est suivi par western blot pendant 4 jours dans les cellules IGROV1 cultivées en absence d'ancrage en milieu de culture classique (SVF) ou en ascite (A). L'expression de l'actine est utilisée comme témoin de dépôt. Le clivage de PARP est également évalué après 48h d'incubation dans des ascites de différentes patientes (ascites 4 et 16). La proportion de cellules dans le pic pré-G1 (cellules mortes et débris cellulaire) est mesurée par cytométrie de flux après 1 et 2 jours d'incubation en ascite ou en milieu de culture (SVF) (B). L'activité de la caspase-3 est également déterminée pour ces deux conditions après 2 jours de culture.

engendre la formation de sphéroïdes de cellules IGROV1 de manière croissante au cours du temps alors que ce nombre ne varie pas en milieu de culture.

En ascite, les cellules IGROV1 présentent un phénotype de type épithélial et forment des sphéroïdes mais leur capacité de migration est inhibée alors que les cellules SKOV3 avec un phénotype de type mésenchymateux prolifèrent moins mais migrent davantage que les cellules incubées en milieu de culture. L'ascite affecte donc les comportements cellulaires selon le phénotype initial des cellules.

2.2.2. L'ascite favorise la résistance à l'anoïkis des cellules IGROV1

La dissémination des cellules cancéreuses ovariennes peut s'accompagner de la formation de sphéroïdes « flottants » dans l'ascite. Pour survivre dans ces conditions, les cellules doivent acquérir une résistance à l'anoïkis (voir introduction bibliographique §2.2.2. et chapitre 1 des résultats). D'après les résultats précédents, l'ascite induit la formation spontanée de sphéroïdes par les cellules IGROV1. Nous avons donc voulu savoir si l'ascite était un environnement favorable à l'émergence d'une résistance à la mort induite par la perte d'ancrage.

Quand les cellules IGROV1 sont cultivées en absence d'ancrage et en environnement ascitique, le clivage de PARP (produit de l'activation des caspases), observé pendant 4 jours est moins prononcé à celui observé en milieu de culture classique (Figure 52A). Cet effet, traduisant une diminution de l'apoptose, est démontré avec tous les prélèvements ascitiques testés. De plus, une analyse par cytométrie de flux indique que la proportion de cellules dans le pic pré-G1 représentant les cellules mortes et les débris cellulaires, est moins importante lors de l'incubation des cellules en ascite par comparaison à la condition classique de culture (Figure 52B). La mesure de l'activité de la caspase-3 confirme que les cellules IGROV1 incubées en ascite sont moins sensibles à la perte d'ancrage.

L'ensemble de ces résultats suggère que des molécules présentes au sein de l'ascite participent à la constitution d'un microenvironnement favorable la formation des sphéroïdes résistants à l'anoïkis.

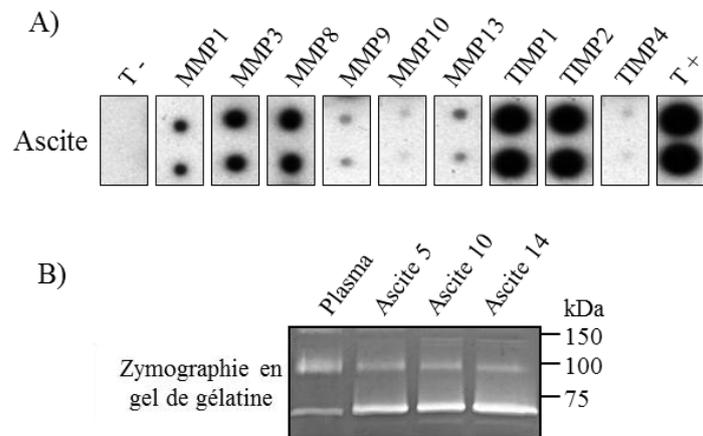


Figure 53 Caractérisation des métalloprotéases ascitiques.

La présence de différentes métalloprotéases et de leurs inhibiteurs (TIMP) est recherchée dans les ascites par immunodétection (A). L'activité gélatinase contenue dans les ascites de différentes patientes et dans le plasma de donneurs sains est analysée par zymographie en gel de gélatine (B).

Tableau 4 Dosage ELISA de la pro-MMP-2, de la Vn et de la Fn dans les ascites de patientes et dans les plasmas de donneurs sains.

	Ascites de patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens	Plasmas de donneurs sains
pro-MMP-2	2,74 µg/mL (± 1,14)	0,86 µg/mL (± 0,29) (Staack et al. 2006)
Vn	176,27 µg/mL (± 21,57)	409,85 µg/mL (± 27,14)
Fn	247,74 µg/mL (± 6,65)	238,92 µg/mL (± 0,85)

2.3. Influence des intégrines α v et de ses partenaires en environnement ascitique

2.3.1. Caractérisation des composants matriciels ascitiques

Des études précédentes menées par notre équipe ont démontré l'importance de la vitronectine et de la fibronectine, deux glycoprotéines de la MEC, et de métalloprotéases (MMP) dans la régulation de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes et dans la formation de sphéroïdes tumoraux (Heyman *et al.*, 2010; Kellouche *et al.*, 2010; Leroy-Dudal *et al.*, 2005b).

Différentes MMP sont retrouvées dans les ascites comme la MMP-1, -3, -8, -9 et -13 (Figure 53A). Des inhibiteurs de ces MMP, tels que le TIMP-1 et le TIMP-2 sont également détectés. De plus, l'analyse par zymographie des activités gélatinolytiques contenues dans les ascites révèle la présence de gélatinases à des poids moléculaires apparents pouvant correspondre à la MMP-2 et à la MMP-9 (Figure 53B). Le dosage ELISA de la pro-MMP2 démontre que sa concentration dans les ascites peut être trois fois supérieure à celle du plasma de patient sain (Tableau 4). La Vn et la Fn sont retrouvées dans les ascites de patientes à des taux respectifs de $176 \pm 21,57 \mu\text{g/mL}$ et de $247,74 \pm 6,65 \mu\text{g/mL}$.

Ces protéines matricielles et ces systèmes protéolytiques contenus dans les ascites constituent un réservoir de molécules susceptible de participer au remodelage du microenvironnement cellulaire et donc de favoriser la dissémination tumorale.

2.3.2. Importance des intégrines α v dans les phénotypes invasifs

Les intégrines α v, exprimées par les cellules cancéreuses ovariennes, sont des récepteurs de la Vn et de la Fn et peuvent interagir avec la MMP-2. Ainsi, l'implication des intégrines dans les modifications des comportements cellulaires induits par l'ascite a été explorée.

Dans un premier temps, nous avons étudié la localisation des intégrines α v exprimées par les cellules IGROV1. En ascite, en plus de la localisation au sein de zones privilégiées dans la transduction du signal appelées les contacts focaux, les intégrines α v se localisent dans des vésicules périnucléaires (Figure 54A). Afin de comprendre les modifications du trafic des intégrines induites par l'ascite, une expérience de « pulse-chase » a été réalisée (Figure 54B). Après une incubation de 30 min des cellules avec l'anticorps anti-intégrines α v, un temps de

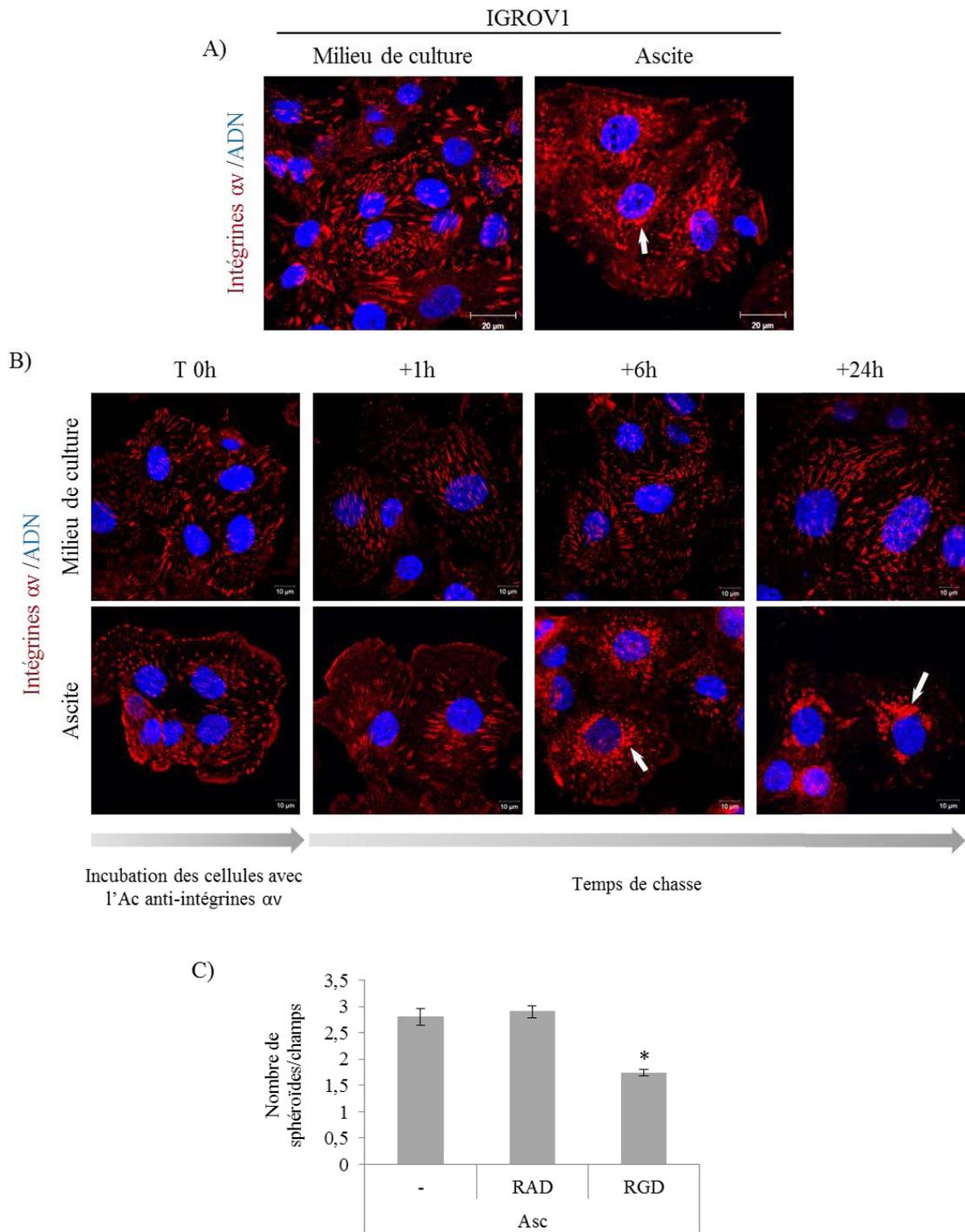


Figure 54 Localisation des intégrines α et détermination de leur influence dans la formation de sphéroïdes de cellules IGROV1.

Les cellules IGROV1 sont incubées en milieu de culture ou en ascite pendant 48h puis un immunomarquage des intégrines α est réalisé (A). Les flèches pointent les vésicules. Le trafic des intégrines α dans les cellules IGROV1 est suivi au cours du temps par une expérience de « pulse-chase » avec l'anticorps primaire anti-intégrine α puis la suite de l'immunomarquage est réalisé (B). Les noyaux cellulaires sont marqués par le DAPI (barre d'échelle= 20 μ m). La formation spontanée des sphéroïdes par les cellules IGROV1 incubées en ascites est estimée en présence de peptide antagoniste des intégrines α (cRGDfC=RGD) ou d'un peptide non spécifique (cRADfK=RAD) (C).

chasse de 0, 1, 6 et 24 heures est réalisé avant d'effectuer la fixation des cellules et de poursuivre l'immunomarquage. En milieu de culture, à $t=0h$, les intégrines αv sont majoritairement localisées en périphérie des cellules au sein des contacts focaux. A partir de $t=1h$, elles sont organisées en structures de types adhésions fibrillaires orientées parallèlement. Les cellules incubées en ascites présentent la même organisation des intégrines αv jusqu'à $t=6h$ où les adhésions fibrillaires deviennent des vésicules péri-nucléaires observées jusqu'à 24h. Cette internalisation des intégrines αv pourrait participer à la formation des sphéroïdes de cellules IGROV1 induite par l'ascite.

Pour vérifier cette hypothèse, la formation de sphéroïdes par les cellules IGROV1 en ascite a été suivie en présence d'un peptide cyclique antagoniste des intégrines αv (RGD) ou d'un peptide non spécifique (RAD) (Figure 54C). Après 70h d'incubation, les sphéroïdes de plus de 5 cellules sont comptés sur un nombre significatif de champs d'observation. En absence de peptide ou avec le peptide RAD, une moyenne de $2,9 \pm 0,1$ sphéroïdes/champs est observée. La présence du peptide RGD inhibe significativement la formation des sphéroïdes induite par l'ascite ($1,7 \pm 0,06$ sphéroïdes/champs). En effet, le nombre de sphéroïdes/champs est diminué de 40% par rapport aux cellules traitées avec le RAD.

Dans un second temps, la localisation des intégrines αv exprimées par les cellules SKOV3 incubées en ascite a été étudiée. Alors que les intégrines αv sont majoritairement localisées au sein des contacts focaux après une incubation en milieu de culture, elles se trouvent organisées de manière punctiforme, évoquant la formation de structures de type *invadopodia*, lors de l'incubation en ascite (Figure 55A). Le rôle des intégrines αv dans la migration des cellules SKOV3 a été déterminé en utilisant les peptides RGD et RAD lors d'un test de blessure. La stimulation des capacités de migration induite par l'ascite est inhibée d'environ 40 % par le peptide RGD ciblant les intégrines αv (Figure 55B).

L'ensemble de ces résultats démontre que l'ascite engendre la relocalisation des intégrines αv dans les deux lignées cellulaires. De plus, lors de l'incubation en ascite, les intégrines αv sont impliquées dans l'induction de la formation des sphéroïdes par les cellules IGROV1 et dans l'augmentation des capacités migratoires des cellules SKOV3.

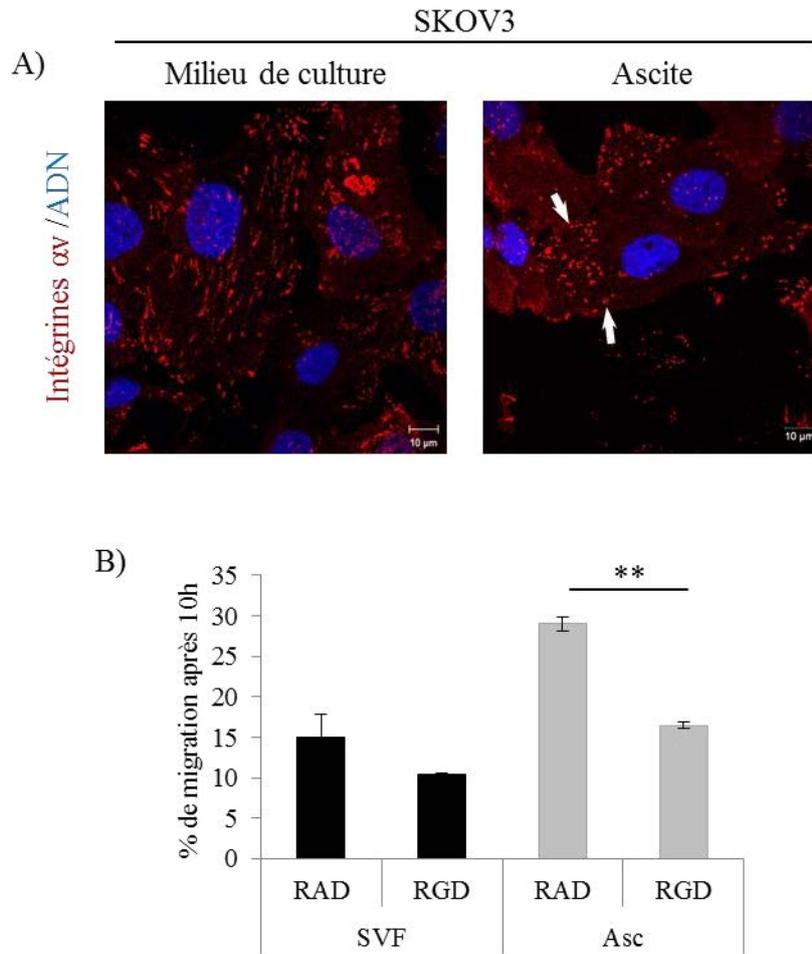


Figure 55 Localisation des intégrines αv et influence sur la migration des cellules SKOV3.

Les cellules SKOV3 sont incubées en milieu de culture ou en ascite pendant 48h puis un immunomarquage des intégrines αv est réalisé (A). Les noyaux cellulaires sont marqués par le DAPI, les flèches indiquent les structures de types *invadopodia* (barre d'échelle= 20 μ m). Le rôle des intégrines αv dans la migration des cellules SKOV3 est estimé en présence de peptide antagoniste de ces intégrines (cRGDfC=RGD) ou d'un peptide non spécifique (cRADfK=RAD) (B).

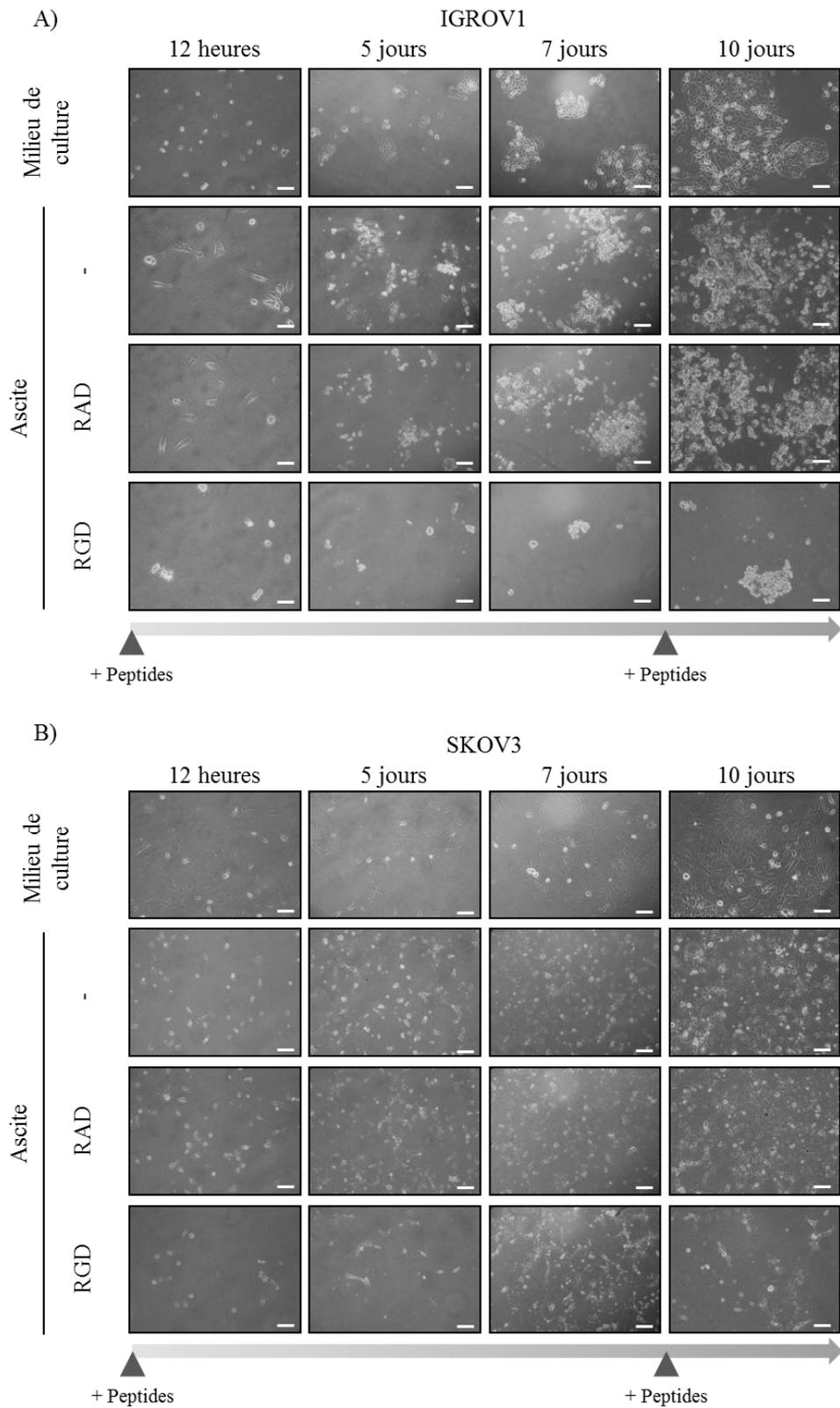


Figure 56 Importance des intégrines α_v dans la formation de colonies par les cellules cancéreuses ovariennes.

La formation de colonies par les cellules IGROV1 (A) et SKOV3 (B) incubées en milieu de culture ou en ascite est suivie par microscopie à contraste de phase pendant 10 jours. Les cellules en ascites sont traitées par le peptide cRGDFC ou cRADfK au début de l'expérience et après 10 jours d'incubation (barre d'échelle= 100 μ m).

2.3.3. Implication des intégrines αv dans la formation de colonies en ascite

Considérant que le liquide ascitique modifie les comportements cellulaires et qu'il représente un microenvironnement « favorable » à la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes, la capacité des cellules IGROV1 et SKOV3 à former des colonies à partir de cellules isolées a été évaluée (Figure 56).

Les cellules IGROV1 incubées en milieu de culture pendant 5 jours forment des colonies bien définies. En revanche dans les mêmes conditions, les cellules SKOV3 sont isolées les unes des autres. En ascites, les cellules IGROV1 forment des larges colonies isolées avec des cellules peu étalées alors que les cellules SKOV3 forment un tapis cellulaire sans organisation en colonies. La contribution des intégrines αv dans la formation des colonies de cellules cancéreuses ovariennes en ascite a donc été évaluée. L'ajout d'un peptide RGD spécifique des intégrines αv dans les premiers temps de culture inhibe la formation de colonie de cellules IGROV1 et semble limiter la dispersion ainsi que la prolifération des cellules SKOV3. Au cours du temps, les cellules SKOV3 semblent moins sensibles au peptide RGD par comparaison avec les cellules IGROV1. Toutefois, l'ajout de l'antagoniste des intégrines αv après 10 jours de culture est suffisant pour déstabiliser les cellules adhérentes.

Ces résultats illustrent l'induction par l'ascite de phénotypes « agressifs ». Cette stimulation est partiellement dépendante des intégrines αv et varie suivant les caractéristiques initiales des cellules cancéreuses.

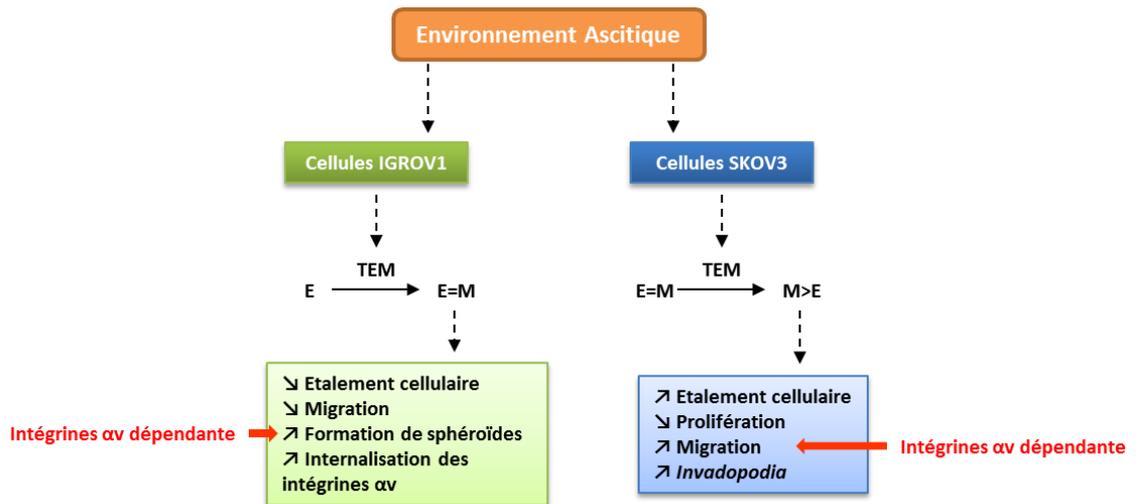


Figure 57 Schéma illustrant l'influence de l'ascite sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes.

L'ascite induit une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) partielle par les cellules IGROV1 et SKOV3 modifiant des comportements cellulaires impliqués dans la dissémination tumorale. La formation spontanée de sphéroïdes par les cellules IGROV1 et l'augmentation des capacités de migration des cellules SKOV3 sont dépendantes des intégrines α.

3. CONCLUSIONS

L'accumulation d'ascite dans la cavité péritonéale accompagne souvent la dissémination tumorale. Toutefois, peu d'informations sont disponibles concernant son influence sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes. Dans ce second chapitre, nous avons pu observer à l'échelle cellulaire et moléculaire les modifications induites par l'ascite.

Selon le phénotype initial des cellules cancéreuses ovariennes, des modifications morphologiques sont observées après une incubation en ascite (Figure 57). Les cellules de types épithéliales deviennent moins adhérentes à la surface de culture et les cellules de type mésenchymateuses sont fortement étalées et isolées les unes des autres. Ces observations sont corrélées avec la réorganisation du cytosquelette d'actine. L'expression et l'organisation des protéines qui composent les interactions cellulaires indiquent que l'ascite pourrait induire une transition épithélio-mésenchymateuse partielle.

La modification de l'organisation cellulaire s'accompagne de modifications du comportement cellulaire. L'ascite peut engendrer une augmentation de la formation de sphéroïdes ou une augmentation des capacités migratoires des cellules cancéreuses ovariennes. De plus, les sphéroïdes de cellules IGROV1 formés en ascite sont moins sensibles à la mort cellulaire induite par la perte d'ancrage.

Ces variations de comportements peuvent être influencées par différentes protéines contenues dans l'ascite comme la metalloprotéase-2, la Vn et la Fn connues pour participer à la dissémination tumorale. Les récepteurs exprimés par les cellules cancéreuses capables d'interagir avec ces molécules sont les intégrines α_v . Leur localisation est modifiée quand les cellules sont incubées en ascite. En effet, elles peuvent être internalisées et participer à la formation des sphéroïdes ou former des *invadopodia* impliqués dans la migration cellulaire.

Ces résultats indiquent que l'ascite est un microenvironnement qui modifie les interactions cellulaires et favorise l'émergence de comportement cellulaire favorable à la dissémination tumorale *via* les intégrines α_v . Dans la troisième partie des résultats, nous avons isolé et caractérisé la Vn et la Fn contenues dans les ascites puis nous avons déterminé leurs influences sur les cellules cancéreuses ovariennes.

**Caractérisation de protéines matricielles contenues dans l'ascite :
purification combinée, caractérisation moléculaire et effet de la
vitronectine et de la fibronectine ascitiques sur le comportement de cellules
cancéreuses ovariennes.**

(Résultats publiés dans le journal *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*,
Carduner *et al.*, Volume 1830, Issue 10, October 2013, Pages 4885-4897, **Annexe 1**)

1. PRESENTATION DE L'ETUDE

L'ascite est un liquide inflammatoire formant un microenvironnement tumoral unique et constitue un réservoir dynamique de molécules pouvant influencer le comportement des cellules cancéreuses. De nombreuses molécules bioactives sont contenues dans les ascites comme des cytokines, des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques, des hormones, des protéases et des protéines de la MEC. L'ensemble de ces facteurs régulent notamment la migration, l'invasion et la survie des cellules cancéreuses. D'autre part, l'accessibilité clinique de l'ascite permet d'envisager ces molécules comme bio-marqueurs potentiels associés à la progression de la pathologie.

La Vitronectine et la Fibronectine ont précédemment été décrites comme des molécules ayant un rôle majeur dans la progression tumorale (Carreiras *et al.*, 2002; Hapke *et al.*, 2003; Heyman *et al.*, 2010; Kenny *et al.*, 2008). Leurs présences ont donc été recherchées dans plusieurs ascites provenant de patientes atteintes de cancer de l'ovaire et qui sont suivies dans les centres de lutte contre le cancer F. Baclesse de Caen et de l'institut Curie de Paris ou du centre hospitalier R. Dubos de Pontoise. Dans un second temps, une méthode de purification a été mise au point afin d'étudier les caractéristiques moléculaires et l'effet de ces deux protéines de la MEC sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes.

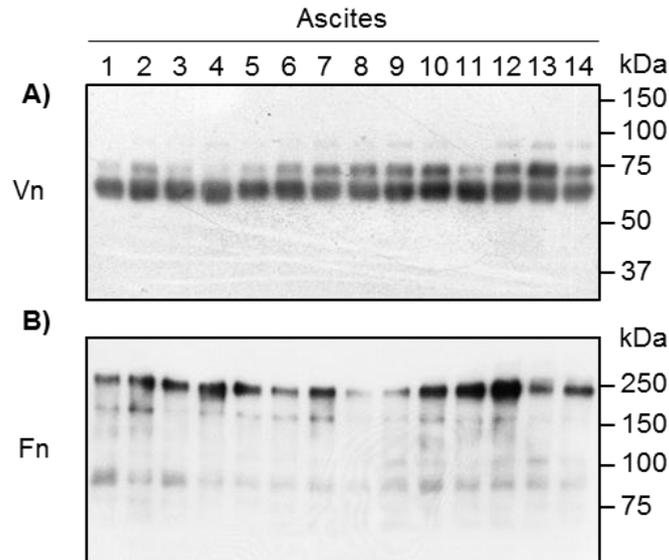


Figure 58 Caractérisation de la vitronectine (Vn) et de la fibronectine (Fn) dans les ascites.

Des quantités équivalentes de protéines ascitiques (1 µg) de différentes patientes sont déposées et séparées par SDS-PAGE en condition réductrice. Puis la Vn (A) et la Fn (B) sont recherchées par des anticorps spécifiques et révélées par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

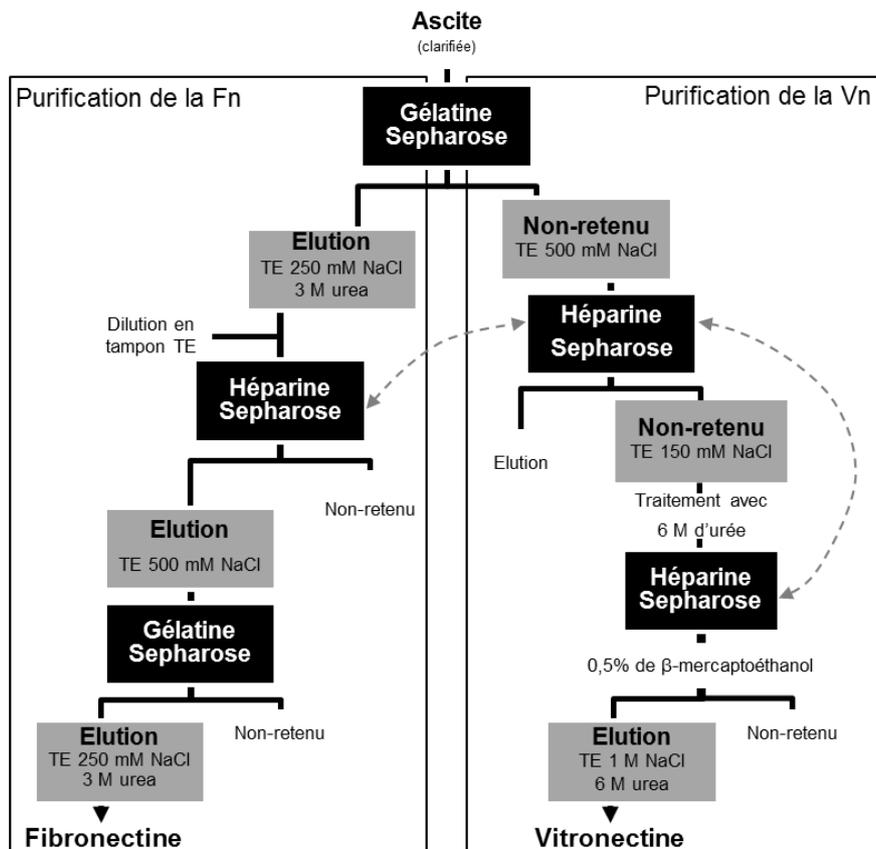


Figure 59 Schéma de purification de la Fn et de la Vn à partir d'un même échantillon d'ascite.

Les carrés noirs indiquent les différentes colonnes de chromatographies d'affinité. Les flèches en pointillées représentent la régénération de la colonne Héparine Sepharose, qui permet l'utilisation de la même colonne pour l'ensemble du protocole.

2. RESULTATS

2.1. Caractérisation de la vitronectine et fibronectine ascitiques

La présence de Vn et de Fn a été recherchée, par Western blot, dans 14 prélèvements ascitiques différents. Comme observé dans la Figure 58, la Vn et la Fn sont détectées dans toutes les ascites testées. Toutefois, différentes isoformes des deux protéines d'intérêt sont observées. Pour la Vn, une bande majoritaire de 65 kDa et une bande de 75 kDa d'une intensité variable sont révélées. Les ascites peuvent être distinguées en trois groupes (faible, intermédiaire et fort) en fonction du niveau d'expression de la forme à 75 kDa. Par ailleurs, une bande de poids moléculaire supérieure à 75 kDa est observée pour certains prélèvements (Figure 58A).

Concernant la Fn, une bande majoritaire d'environ 250 kDa est révélée dans toutes les ascites testées. De plus, deux bandes aux environs de 150 kDa et 90 kDa sont observées dans la majorité des ascites. Il est à noter que le taux de Fn semble varier en fonction des échantillons.

Ces résultats démontrent que les prélèvements d'ascites issus de patientes atteintes de cancer de l'ovaire contiennent de la Vn et de la Fn, deux glycoprotéines de la MEC, et que celles-ci présentent différents poids moléculaires apparents variables en fonction des échantillons.

2.2. Mise au point d'un protocole combiné de purification de la Vn et de la Fn ascitiques.

Afin de poursuivre l'étude de la Vn et de la Fn contenues dans les ascites, un protocole de purification combiné a été mis au point pour obtenir successivement les deux protéines matricielles à partir d'un même échantillon biologique (Figure 59). Pour adapter la méthode aux différents volumes d'ascites pouvant être rencontrés, la Vn et la Fn ont été purifiées à partir des ascites 5, 7 et 10. Ces prélèvements avaient des volumes compris entre 290 mL et 1,5 L et contiennent les différentes isoformes de Vn décrites précédemment.

Pour commencer la purification de la Fn, les échantillons d'ascites sont chargés sur une colonne de chromatographie d'affinité pour la gélatine (Figure 60A). L'élution permet de

Purification de la Fibronectine

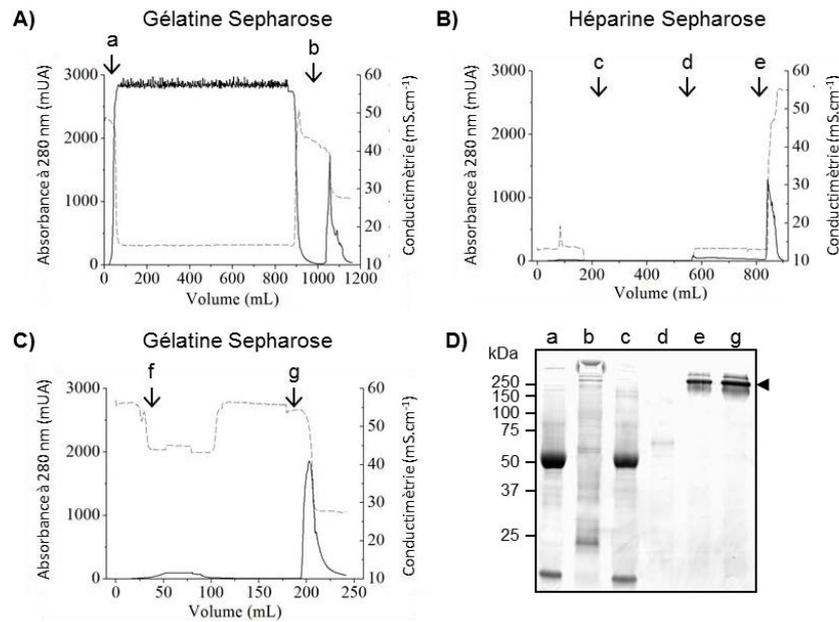


Figure 60 Purification combinée de la Fn et de la Vn ascitiques.

Diagrammes d'élution de la purification de la Fn par les colonnes Gélatine Sepharose (A), Héparine Sepharose (B) et Gélatine Sepharose (C) puis de la purification de la Vn par la colonne Héparine Sepharose (E). La ligne continue représente l'absorbance à 280 nm (mUA) et la ligne en pointillée représente la conductivité (mS.cm⁻¹). Chaque étape de la purification de la Fn et de la Vn est analysée par SDS-PAGE (D et F respectivement) et révélée par coloration au nitrate d'argent. Les pointes de flèches indiquent les protéines purifiées. Les lettres en minuscules indiquent sur les chromatogrammes le début de chaque étape et sur les gels SDS-PAGE la fraction non-retenu. Purification de la Fn (A-D): a), l'ascite est chargée; b) élution avec TE urée 3M NaCl 250mM; c) chargement de la fraction éluee de la gélatine; d) rinçage avec TE NaCl 75 mM; e) élution de la colonne héparine sepharose avec TE NaCl 500 mM; f) chargement de la fraction éluee de l'héparine; g) élution de la seconde colonne gélatine sepharose par TE urée 3M NaCl 250 mM (Fn ascitique). Purification de la Vn (E-F): a) chargement du non-retenu de la première colonne Gélatine sepharose; b) rinçage avec TE NaCl 150 mM et récupération du non-retenu; c) décrochage des contaminants avec TE urée 6 M NaCl 1M et équilibrage avec le TE urée 6 M NaCl 150 mM; d) chargement et rinçage de la fraction traitée à l'urée; e) traitement avec le β -mercaptoéthanol; f) élution avec TE urée 6M NaCl 1 M (Vn ascitique).

décrocher les protéines avec des domaines d'affinité pour la gélatine dont la Fn. Puis une chromatographie d'affinité pour l'héparine est réalisée (Figure 60B). Une augmentation de la conductimétrie permet l'élution de la Fn. La Fn ascitique est ensuite concentrée par une chromatographie d'affinité pour la gélatine d'un volume inférieur à la première colonne (Figure 60C). Comme observé dans la Figure 60D, une bande majoritaire au environ de 250 kDa confirme la purification de la Fn ascitique.

La purification successive de la Fn et de la Vn est permise grâce à l'utilisation du non-retenu issu de la première chromatographie d'affinité à la gélatine. Celui-ci est chargé sur une colonne de chromatographie d'affinité à l'héparine (Figure 60E). Comme la Vn ascitique est en conformation repliée et n'expose pas ses domaines d'interactions à l'héparine, elle est retrouvée dans le volume non-retenu. Cette étape permet d'éliminer les protéines contaminantes présentant une affinité pour l'héparine. Après une incubation avec 6 M d'urée, les domaines d'affinité de l'héparine de la Vn se trouvent exposés et le non-retenu est de-nouveau chargé sur la colonne d'affinité pour l'héparine. Finalement, l'analyse par SDS-PAGE de la fraction éluee par 1 M de NaCl et 6 M d'urée révèle deux bandes majoritaires de poids moléculaires apparents de 65 kDa et 75 kDa (Figure 60F). D'autres bandes à des poids moléculaires supérieures pouvant correspondre à des multimères induits par la dénaturation à l'urée peuvent être observées.

Cette méthode permet donc de purifier deux protéines de la MEC, la Vn et la Fn, à partir d'un même échantillon d'ascite quel que soit le volume initial d'ascite. La quantité de protéine purifiée est de 50 à 98 mg de Fn et de 7 à 19 mg de Vn par litre d'ascite avec un pourcentage de pureté supérieur à 99% pour la Fn et 86% (± 1) pour la Vn. Par comparaison, 137,4 mg/L ($\pm 28,4$) de Fn et 14,9 mg/L ($\pm 4,5$) de Vn sont obtenus par purification d'échantillons de plasma selon le même protocole (Tableau 5). D'après la concentration plasmatique, le protocole de purification combiné conduit à un rendement de 27,5% ($\pm 5,6$) pour la Fn et de 5% ($\pm 1,5$) pour la Vn en accord avec les rendements de purification par des protocoles séparés (Poulouin *et al.*, 1999; Yatohgo *et al.*, 1988). Il est à noter que ce protocole réduit le temps nécessaire pour la purification des deux protéines de 5-6 jours à 3-4 jours.

Tableau 5 Volume, pureté, quantité de protéines purifiées et temps nécessaires pour la purification de la Vn et de la Fn à partir de plasma ou d'ascites.

	Purification	Volume (mL)	Pureté (%)	Quantité de protéine purifiée en mg/L d'échantillon	Temps
Vn	Ascite 10	1500	87	7	1-2 jours
	Ascite 7	880	85	18	1-2 jours
	Ascite 5	290	86	19	1-2 jours
	Plasma	1358 ± 91.8	85	14.9 ± 4.5	1-2 jours
	Plasma d'après Yatohgo <i>et al.</i> 1988	/	/	30-60	2-3 jours
Fn	Ascite 10	1500	> 99	50	2 jours
	Ascite 7	880	> 99	98	2 jours
	Ascite 5	290	> 99	69	2 jours
	Plasma	1358 ± 91.8	> 99	137.4 ± 28.4	2 jours
	Plasma d'après Poulouin <i>et al.</i> 1999	/	99,5	7	3 jours

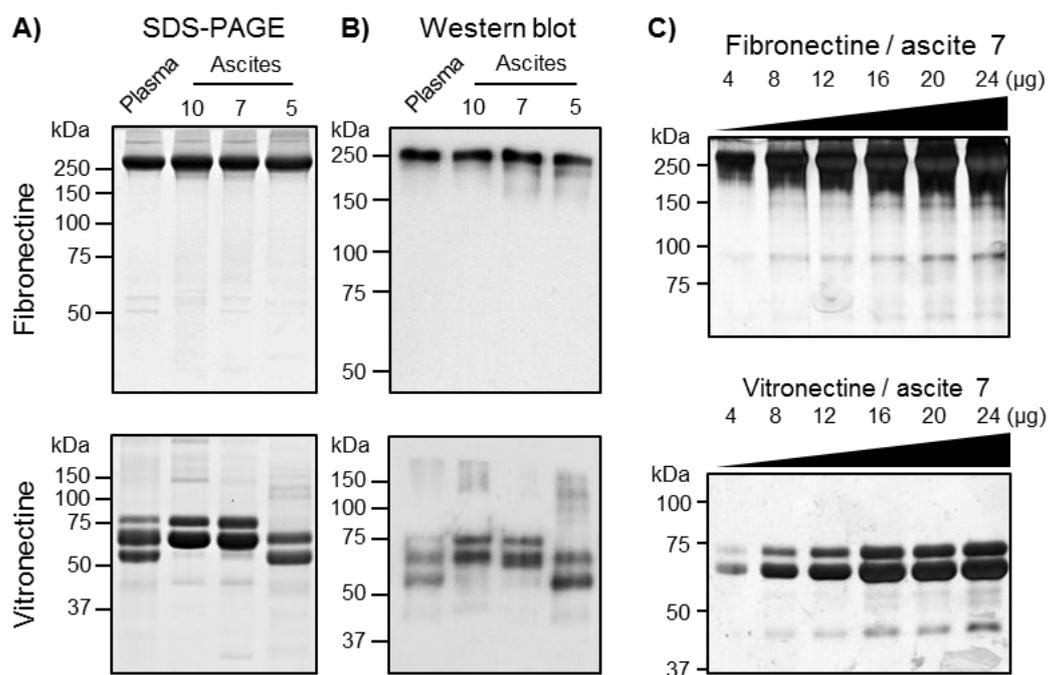


Figure 61 Analyse de la pureté et des fragments de la Fn et de la Vn ascitiques.

La même quantité (10 µg/puits) de Fn ou de Vn purifiée provenant d'ascites de différentes patientes est séparée par SDS-PAGE en condition réductrice et révélée par coloration au bleu de Coomassie (A). Un western blot est réalisé avec les anticorps primaires anti-Fn ou anti-Vn puis révélé avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (0,1 µg de protéines purifiées/puits) (B). Des quantités croissantes (4 à 24 µg/ puits) de protéines purifiées sont séparées par SDS-PAGE en condition réductrice et révélées par coloration au nitrate d'argent (C).

2.3. Caractérisation de la Vn et de la Fn purifiées à partir d'ascites

Après la purification de la Fn et de la Vn à partir des ascites 5, 7 et 10, l'analyse SDS-PAGE révèle des bandes de 250 kDa et de 65 kDa correspondant respectivement au poids moléculaire apparent de la Fn monomérique et de la Vn (Figure 61A). Considérant la quantité importante de protéines purifiées déposée dans les puits du SDS-PAGE (10 µg), il n'y a pas de contaminant protéique en quantité importante détectable. En condition réductrice, la Fn purifiée à partir de plasma (témoin) est retrouvée à un poids moléculaire apparent de 250 kDa et la Vn plasmatique est composée de trois formes qui peuvent correspondre à la protéine entière de 75 kDa, à la forme clivée de 65 kDa et au fragment clivé par la thrombine de 57 kDa. La résolution supérieure du Western blot permet la visualisation d'isoformes de Fn de poids moléculaire inférieur à 250 kDa notamment pour l'ascite 5 (Figure 61B).

Toutefois, ces conditions ne permettent pas d'observer les fragments de 150 kDa et de 90 kDa précédemment identifiés dans les ascites initiales (Figure 58B). Pour la Vn ascitique, en plus de la bande à 65 kDa, des bandes à 75 kDa et 45 kDa sont détectées dans les échantillons 10 et 7, alors qu'une bande intense à 57 kDa est détectée pour l'ascite 5. Les bandes de plus hauts poids moléculaires aux environs de 120 à 150 kDa pourraient correspondre à des dimères de Vn, notamment dans les ascites 10 et 5. La présence de fragments minoritaires dans les échantillons de protéines purifiées a été recherchée en augmentant graduellement la quantité de protéines purifiées par puits et par utilisation d'une révélation au nitrate d'argent (Figure 61C). Ces conditions permettent la détection des fragments de 90 kDa et de 150 kDa pour la Fn et de 45 kDa pour la Vn.

Ces données démontrent la possibilité de distinguer différentes isoformes de Fn et de Vn en fonction des prélèvements ascitiques et que la méthode de purification permet de les isoler.

2.4. Etat conformationnel de la Vn et de la Fn purifiées à partir d'ascites

Sachant que la Fn et la Vn contiennent respectivement 78 et 10 résidus tryptophanes, la structure des protéines ascitiques purifiées a été estimée par spectrométrie de fluorescence des tryptophanes. Après excitation à 295 nm, les spectres d'émission des Fn

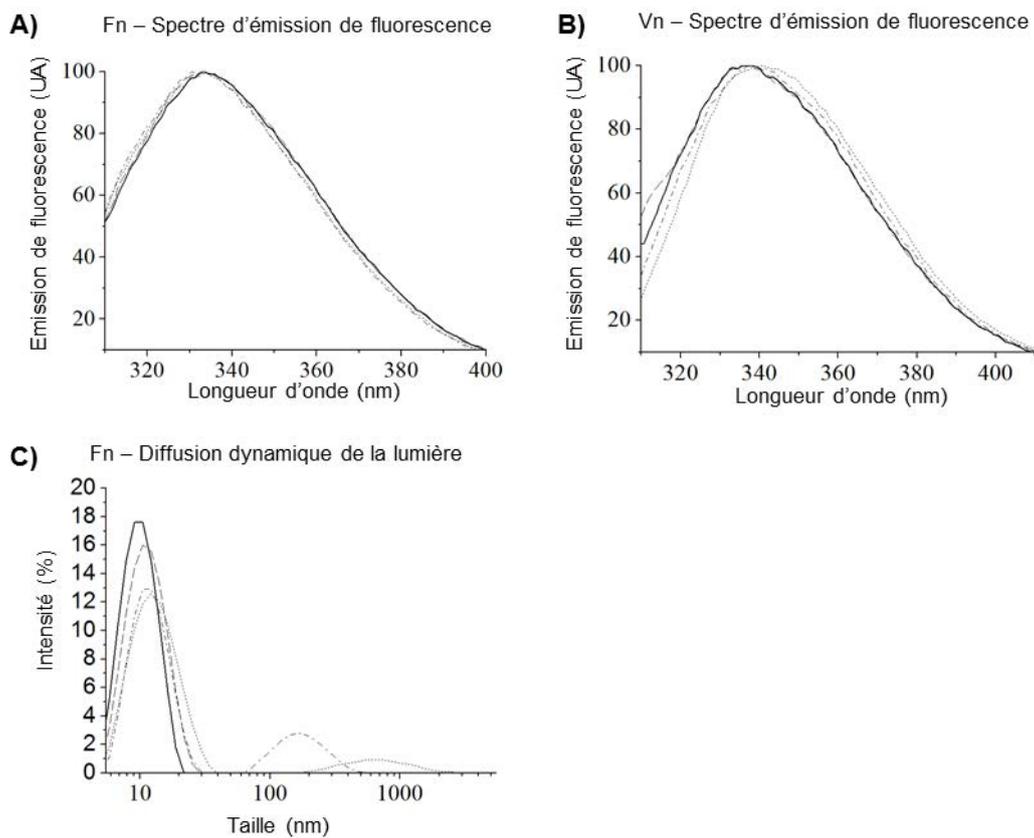


Figure 62 Spectre d'émission de fluorescence des tryptophanes de la Fn et de la Vn ascitiques et distribution des tailles de la Fn ascitique.

Tableau 6 Diffusion dynamique de la lumière de la Fn plasmatisque et ascitique.

	R_H^1 (nm)	Taille moyenne du pic (nm)	PdI^2
Plasma	9.8	11.2	0.13
Ascite 10	13.9	12.4	0.34
Ascite 7	12.9	12.2	0.26
Ascite 5	10.5	11.7	0.10

¹Rayon hydrodynamique

²Index de polydispersité

purifiées à partir de plasma ou d'ascites ne se distinguent pas (Figure 62A). Quelle que soit la source de Fn, le maximum d'émission est centré à 332 nm ($\pm 1,4$). Cette valeur est caractéristique des acides aminés aromatiques enfouis au cœur de la protéine. De la même façon, les spectres d'émission de la Vn plasmatisque et des ascites 10 et 5 ont des maximums centrés à 338 nm ($\pm 0,6$ nm). Le spectre d'émission de fluorescence de la Vn purifiée à partir de l'ascite 7 présente un décalage du maximum d'émission ($\lambda = 340,5$ nm) (Figure 62B). Un tel décalage suggère une exposition plus importante des tryptophanes et une modification de leur environnement local.

Le rayon hydrodynamique (R_H) de chaque Fn ascitique a été étudié et comparé à la Fn plasmatisque en utilisant la diffusion dynamique de la lumière ou Dynamic Light Scattering (DLS). Sachant que la DLS est hautement dépendante de la pureté des protéines, seule la Fn a pu être étudiée car son taux de pureté est supérieur à 99%. La Figure 62C illustre une superposition de la distribution des tailles des Fn ascitiques et plasmatisques. Les valeurs numériques des rayons, la taille moyenne des pics et l'index de polydispersité sont indiqués dans le Tableau 6. Plus l'index de polydispersité est proche de 1, plus l'échantillon a une distribution des tailles des particules très large. Pour la Fn plasmatisque, la taille moyenne du pic majoritaire indique que le rayon hydrodynamique de la majorité des molécules de Fn peut être estimé à 11,2 nm ($\pm 0,2$) avec un R_H de 9,8 nm sur la population totale à pH et force ionique physiologique. Ce résultat est en accord avec des études précédentes qui indiquent une valeur de 10 nm (Rocco *et al.*, 1983). Deux des trois Fn ascitiques présentent un R_H supérieur à la Fn plasmatisque avec une taille moyenne de pic respectivement de 12,9 et 13,9 nm pour les ascites 7 et 10. Les Fn purifiées de ces deux ascites ont donc des R_H supérieurs de 3 à 4 nm comparé à la Fn plasmatisque, suggérant qu'elles contiennent des régions partiellement dépliées.

De plus, la distribution des tailles de la Fn plasmatisque montre un seul pic avec un index de polydispersité (PDI) proche de 0,1 suggérant que la population de Fn plasmatisque est homogène. Il en est de même pour la Fn ascitique 5. A l'inverse, la distribution des tailles pour les Fn des ascites 10 et 7 est davantage dispersée, comme l'indiquent les valeurs supérieures de PDI (0,34 pour l'ascite 10 et 0,26 pour l'ascite 7). Des pics dus à des particules avec un rayon R_H supérieur à 100 nm sont observés, suggérant la propension des Fn ascitiques à former des assemblages.

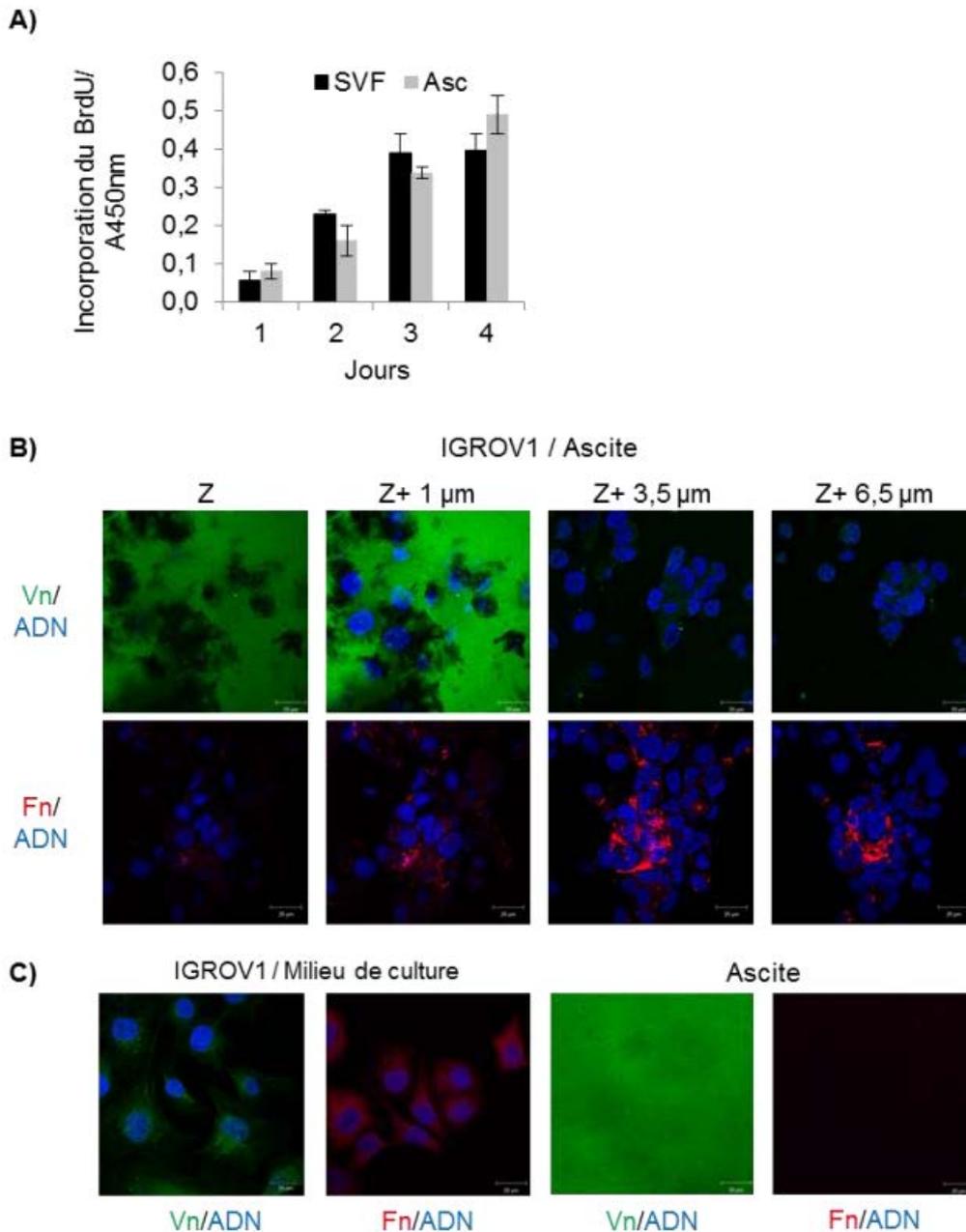


Figure 63 Cellules cancéreuses en environnement ascitique: prolifération et organisation de la Vn et de la Fn ascitiques.

Incorporation du BrdU par les cellules cancéreuses ovariennes (IGROV1) incubées en ascites (Asc) ou en milieu de culture classique (SVF) pendant 4 jours (A). Les cellules IGROV1 sont incubées deux jours en ascites avant d'être immunomarquées pour la Vn et la Fn (B-C). Les noyaux cellulaires sont marqués avec le DAPI. L'analyse est réalisée par microscopie confocale, chaque condition est observée sur une épaisseur de 6,5 μm (depuis la surface de culture ($Z=0$) jusqu'à une épaisseur de 6,5 μm) (B). Les cellules sont incubées en milieu de culture et l'ascite est incubée sans cellules (C).

L'ensemble de ces résultats démontrent que les protéines purifiées à partir d'ascites peuvent présenter de légères différences structurales en fonction des patientes comparé aux protéines purifiées du plasma.

2.5. Organisation *in vitro* de la Vn et Fn ascitiques

Lorsque les cellules IGROV1 sont cultivées en ascites, leur capacité proliférative est comparable à celles obtenues en condition classique de culture (Figure 63A). Néanmoins, leur morphologie est modifiée, les cellules étalées deviennent plus rondes et regroupées en amas rappelant la morphologie des sphéroïdes étudiés dans les premières et deuxièmes parties des résultats.

Afin de visualiser le devenir et le remodelage éventuel de la Vn et de la Fn ascitique, les cellules ont été incubées pendant deux jours en ascite. L'analyse par microscopie confocale des marquages de la Vn et de la Fn, depuis la surface de culture ($Z = 0 \mu\text{m}$) jusqu'à $6,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur, révèle que la Vn se dépose principalement sur le support de culture alors que la Fn est incorporée dans les espaces intercellulaires des agrégats cellulaires (Figure 63B). Le marquage de la Fn souligne également l'organisation de la Fn en fibrilles associées aux cellules.

Ces observations suggèrent fortement que la Fn et la Vn qui sont contenues dans les ascites ont la capacité d'interagir avec les cellules. De plus, il est à noter que le marquage de la Vn et de la Fn en condition de culture classique montre une absence de dépôt de ces protéines de la MEC sur le support de culture validant les résultats obtenus précédemment (Figure 63C). Par ailleurs, lorsque l'ascite est incubée pendant deux jours sur un support de culture en absence de cellule, un dépôt massif et uniforme de Vn ascitique est observé contrairement à la Fn ascitique qui n'est pas détectable dans ces conditions.

Dans le but de confirmer que la Vn et la Fn visualisées sont issues de l'ascite et non pas de la sécrétion cellulaire de protéines de la MEC, les cellules ont été prétraitées avec de la cycloheximide et incubées en ascite ou en milieu de culture (Figure 64). L'efficacité de l'inhibition de la traduction a été vérifiée en suivant l'expression de la protéine Mcl-1 connue pour avoir un court temps de demi-vie (Figure 64A). L'analyse par microscopie confocale révèle qu'après 6h et 24h d'incubation en ascite, les cellules sont positives au marquage de

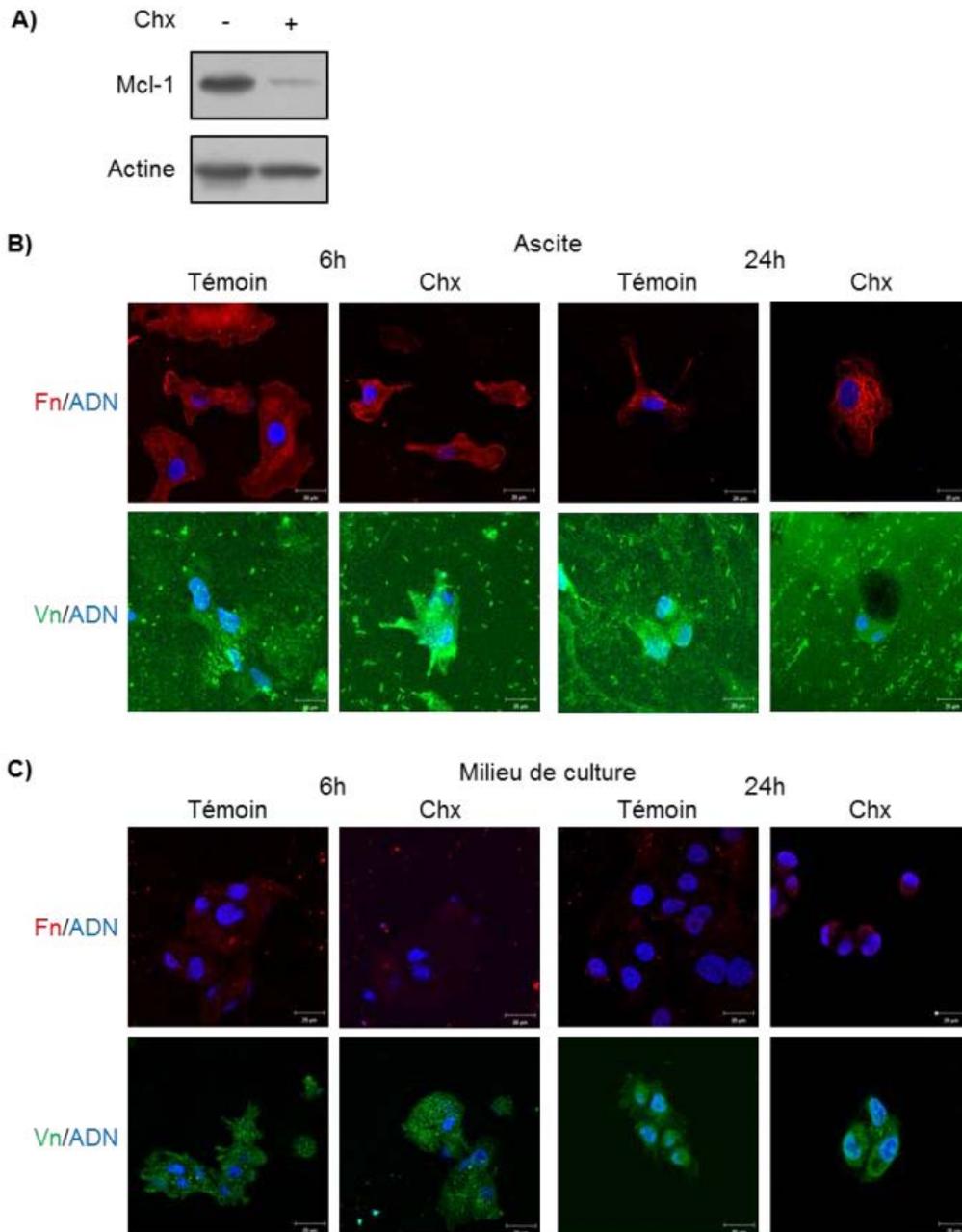


Figure 64 L'ascite constitue un réservoir de Vn et de Fn pour les cellules cancéreuses ovariennes.

Les cellules IGROV1 adhérentes (témoin) sont prétraitées avec 5 µg/mL de cycloheximide (Chx). L'inhibition de la traduction des protéines est suivie par un western blot anti-Mcl-1 (A). Les cellules traitées sont incubées en ascite (B) ou milieu de culture (C) pendant 6h ou 24h. L'organisation de la Vn et de la Fn est suivie par marquage immunofluorescent et les noyaux sont marqués avec le DAPI. L'analyse est réalisée par microscopie confocale en se plaçant au niveau de l'interface entre les cellules et la matrice extracellulaire. Barres d'échelles: 20 µm.

la Fn et le dépôt de Vn est observé avec ou sans l'inhibition de la traduction (Figure 64B). Il est à noter que l'organisation de la Fn observée dans la Figure 63 et dans la Figure 64 est différente. Avec des temps plus longs de culture, la Fn ascitique est organisée en structures fibrillaires qui ont une forte intensité de fluorescence masquant le marquage sous-jacent de la surface cellulaire. Cette distribution de la Vn ou de la Fn n'est pas observée quand les cellules sont cultivées en absence d'ascite (Figure 64C). Ces résultats confirment que la Vn et la Fn exogènes, apportées par l'ascite, sont incorporées dans le microenvironnement cellulaire.

2.6. Capacités de la Vn et de la Fn ascitiques à promouvoir l'adhérence, la migration et

la survie cellulaire

La capacité des cellules cancéreuses ovariennes à adhérer sur les protéines purifiées d'origines ascitique ou plasmatisque a été analysée. Lorsque la Vn et la Fn plasmatisques sont déposées au fond des puits de culture à des concentrations de 0 à 50 $\mu\text{g/mL}$, l'adhérence des cellules IGROV1 et SKOV3 est maximale dès 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 65A). L'adhérence cellulaire a donc été étudiée pour l'ensemble des protéines purifiées à 10 $\mu\text{g/mL}$.

Afin d'estimer la capacité des protéines matricielles ascitique à induire l'activation des voies de signalisation intracellulaire, la phosphorylation de p125 FAK, protéine de transduction du signal recrutée par les intégrines dans les structures d'adhérences comme les contacts focaux, a été suivie par Western blot. Après seulement 30 min d'adhérence des cellules sur les protéines matricielles ascitiques ou plasmatisques, la phosphorylation de p125 FAK est induite, suggérant son activation (Figure 65B).

Comme démontré dans la Figure 65C, les cellules IGROV1, SKOV3 et OVCAR3 présentent des capacités d'adhérence similaire sur un « coating » de Vn et de Fn plasmatisques après 30 min. Lorsque les cellules sont incubées sur les protéines ascitiques purifiées, elles présentent des capacités d'adhérences différentes en fonction de la lignée cellulaire et de la source des protéines ascitiques. La Fn de l'ascite 10, qui a un R_H plus grand que la Fn plasmatisque, et la Vn de l'ascite 5, qui contient le fragment de 57 kDa, modulent significativement l'adhérence des trois lignées cellulaires.

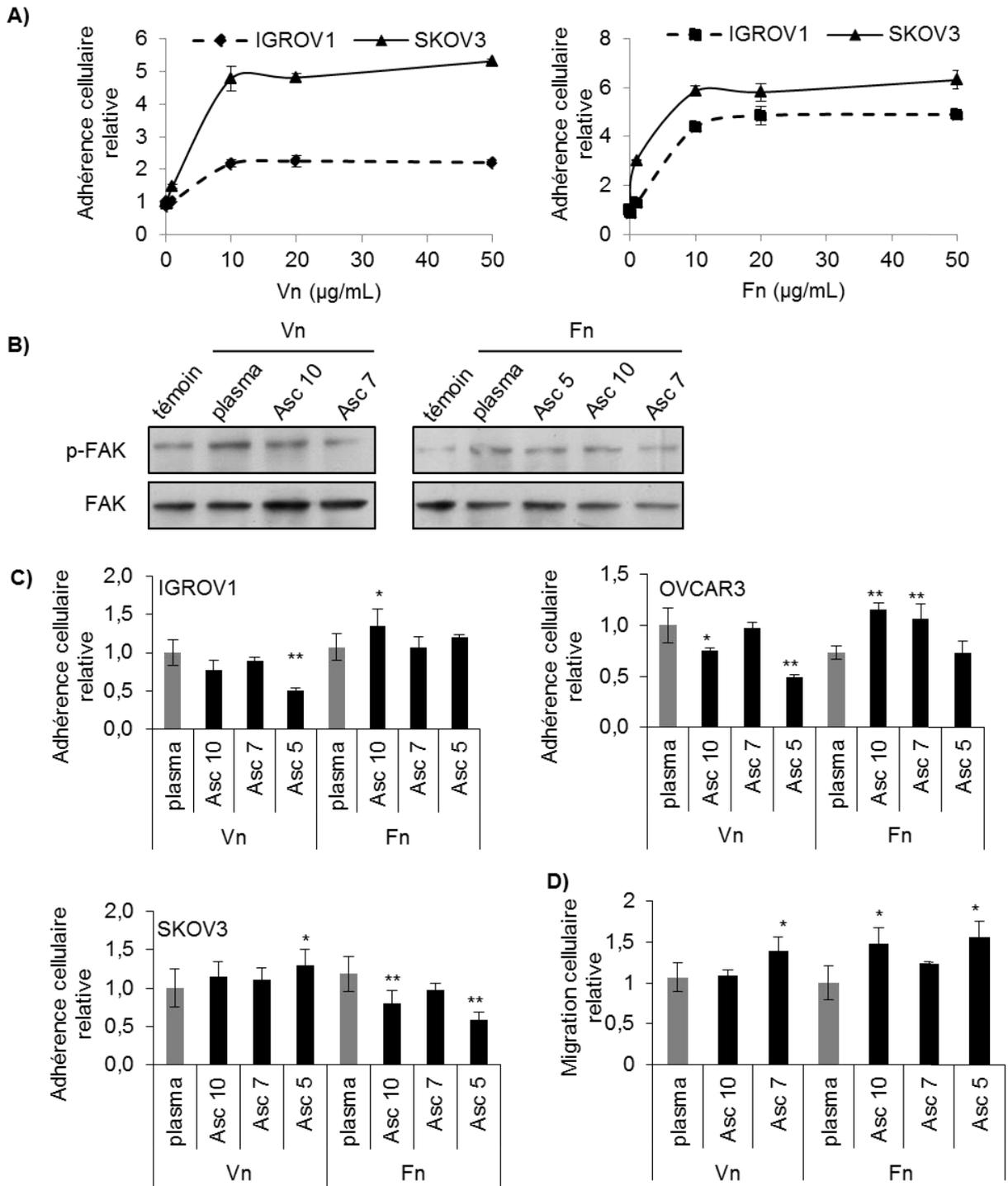


Figure 65 Adhérence et migration des cellules cancéreuses ovariennes avec les protéines ascitiques purifiées.

L'adhérence, après 30 min, des cellules IGROV1 et SKOV3 est estimée sur un coating de Vn et de Fn plasmatique à des concentrations de 0 à 50 $\mu\text{g/mL}$ (A). La phosphorylation de FAK est estimée par western blot après 30 min d'adhérence des cellules IGROV1 sur des coating de Vn et de Fn d'origines plasmatique et ascitiques (B). L'adhérence de trois lignées cellulaires (IGROV1, OVCAR3 et SKOV3) est estimée sur des coating de Vn et de Fn (10 $\mu\text{g/mL}$) plasmatique et ascitiques provenant de trois patientes différentes (C). La migration des cellules IGROV1 est analysée après 20h dans un milieu supplémenté avec de la Vn ou de la Fn (10 $\mu\text{g/mL}$) de différentes origines (D).

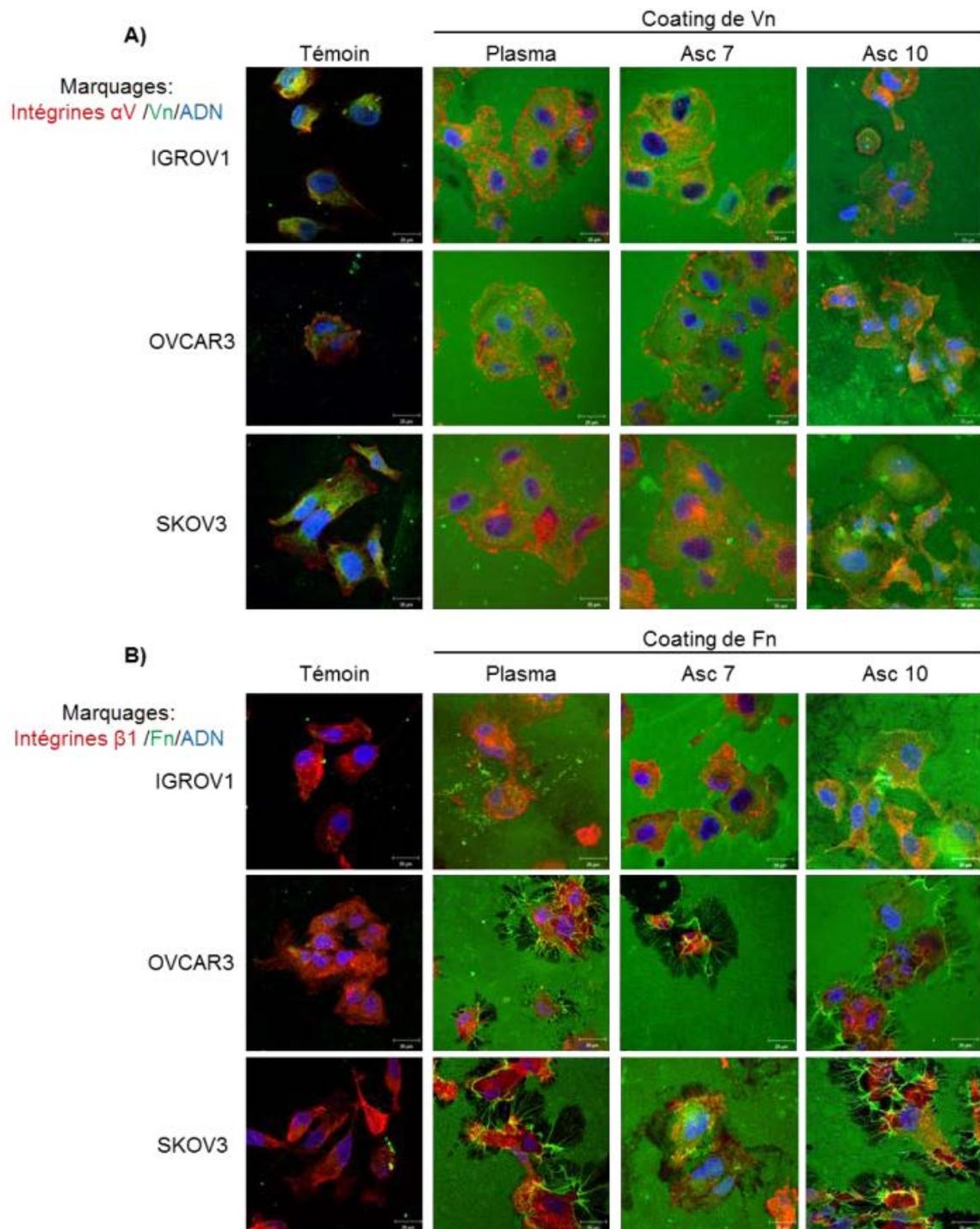


Figure 66 Remodelage des protéines ascitiques purifiées par les cellules cancéreuses ovariennes et localisation des intégrines αv et $\beta 1$ après 6h d'adhérence.

Les cellules IGROV1, OVCAR3 et SKOV3 sont incubées 6h sur des lamelles de verres (témoin) ou sur des coating de Vn (A) ou Fn (B) purifiées à partir de plasma ou d'ascites (ascite 7 et 10). Les intégrines αv et la Vn (A) ou les intégrines $\beta 1$ et la Fn (B) sont co-marquées et les noyaux cellulaires sont marqués avec du DAPI. L'analyse est réalisée par microscopie confocale. Barres d'échelles: 20 μm .

De la même manière, la migration cellulaire en présence de Vn et de Fn ascitiques solubles a été étudiée (Figure 65D). Après 20h, la migration des cellules IGROV1 est équivalente ou supérieure avec la Vn et la Fn ascitiques par comparaison avec les protéines plasmatiques purifiées.

La localisation de récepteurs cellulaires impliqués dans la reconnaissance de la Vn et de la Fn, les intégrines αv et $\beta 1$, a été étudiée sur des cellules cancéreuses ovariennes adhérant sur la Vn et la Fn ascitiques ou plasmatiques (Figure 66). Quel que soit l'origine de la Vn utilisée, après 6h d'incubation, les intégrines αv exprimées par les cellules IGROV1, OVCAR3 et SKOV3 sont localisées aux points de contacts entre les cellules et le « coating » de protéines (contacts focaux). Le marquage des intégrines αv présente également une organisation punctiforme pour les cellules SKOV3. Ce type d'organisation est évocateur de structure de type *invadopodia*. Les contacts focaux semblent être moins nombreux quand les cellules IGROV1 sont incubées sur les Vn ascitiques par comparaison avec la Vn plasmatique (Figure 66A). La présence des intégrines au sein de ces structures révèle la mise en place d'un réseau moléculaire régissant le processus d'adhérence et initiant une signalisation intracellulaire sous-jacente. Ce type de localisation confirme donc la fonctionnalité des protéines matricielles ascitiques.

En fonction de la lignée cellulaire et de l'origine des ascites, la Fn est remodelée par les cellules avec une intensité différente. Par exemple, des cellules s'étalant sur la Fn issue du plasma ou de l'ascite 10 engendrent une organisation de la Fn en fibrilles à la périphérie des cellules SKOV3. En revanche, de telles structures ne sont pas présentes quand la Fn de l'ascite 7 est utilisée pour le « coating ». Il est à noter que les intégrines $\beta 1$ sont colocalisées avec les fibrilles de Fn suggérant leur participation au processus de fibrillogenèse comme déjà démontré dans la littérature (Figure 66B) (Schwarzbauer et DeSimone, 2011).

Après des temps plus long d'adhérence (48h) sur les protéines purifiées, les intégrines sont localisées aux points de contacts entre les cellules et leurs substrats et également dans les zones de contacts cellules-cellules. Les contacts focaux sont plus particulièrement observés aux extrémités des cellules, dans des structures formant des pseudopodes et des lamellipodes, et sont aussi distribués sur le reste de la surface cellulaire. Des zones sombres de dégradation sont visibles sur la Fn et suggèrent fortement la mise en place du remodelage de la Fn ascitique par les cellules cancéreuses (Figure 67).

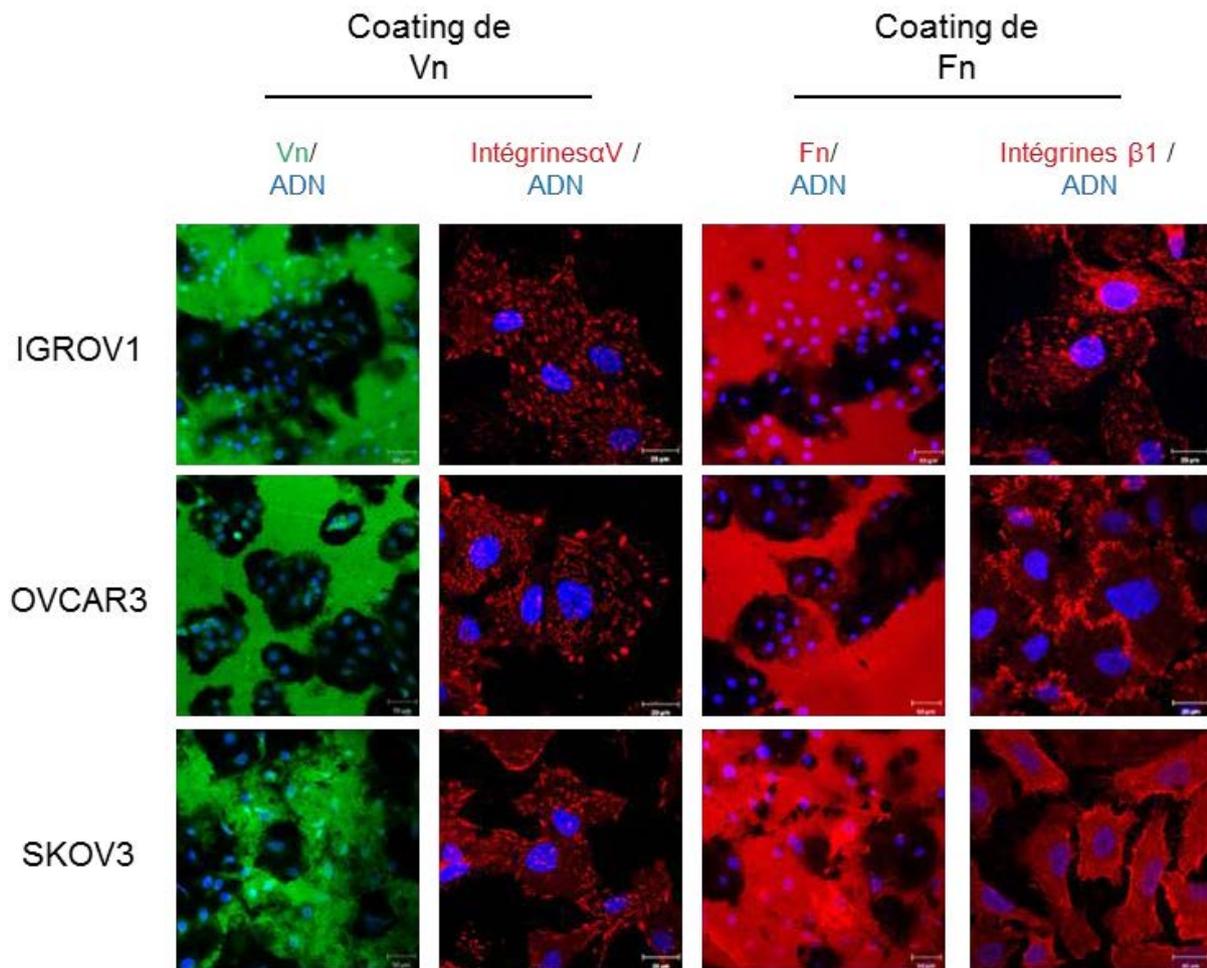


Figure 67 Remodelage des protéines ascitiques purifiées par les cellules cancéreuses ovariennes et localisation des intégrines α V et β 1 après 48h d'adhérence.

Les cellules sont incubées 48h heures sur un « coating » de Vn ou de Fn ascitiques purifiées à partir de l'ascite 10 (50 μ g/mL). Les marquages immunofluorescents de la Vn et de la Fn ainsi que ceux des noyaux cellulaires par le DAPI sont observés par microscopie confocale . Les barres d'échelles sont de 50 μ m pour les marquages de la Vn et de la Fn et de 20 μ m pour les marquages des intégrines α V et β 1.

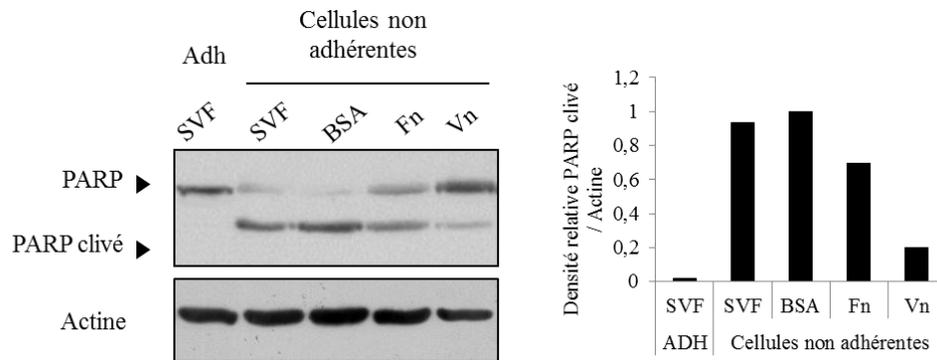


Figure 68 La Fn et la Vn ascitiques induisent une résistance à l'anoïkis par les cellules cancéreuses ovariennes.

Les cellules IGROV1 sont incubées 48h heures en absence d'ancrage à un support dans du milieu RPMI complété par 10 % de sérum de vœu fœtal (SVF) ou par 20 µg/mL de sérum albumine bovine (BSA) ou par 20 µg/mL de Fn ou de Vn purifiée à partir de l'ascite 7. L'induction de l'anoïkis par l'incubation en absence d'ancrage est suivie par un western blot anti-PARP avec l'actine comme témoin de dépôt. Des cellules adhérentes (Adh) sont utilisées comme témoin. Le clivage de PARP est exprimé par normalisation de la densité de la bande de PARP clivée sur l'intensité de la bande d'actine.

Lors de la dissémination intrapéritonéale, les cellules cancéreuses ovariennes se trouvent au contact de l'environnement ascitique contenant la Fn et la Vn. Nous avons pu voir, dans le premier chapitre des résultats, que les intégrines αv participent à la résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis en induisant des signalisations intracellulaires. De plus, dans le second chapitre, il a été démontré que les cellules incubées en absence d'ancrage dans un environnement ascitique présentent une capacité de résistance à l'anoïkis accrue. Ainsi, il nous est apparu intéressant d'étudier l'influence des ligands des intégrines αv , la Fn et la Vn purifiées à partir d'ascite, sur la résistance des cellules cancéreuses à la perte d'ancrage.

Après 48 heures d'incubation en présence de Fn ou de Vn ascitique, le clivage de PARP dans les cellules IGROV1 non adhérentes est inférieur à celui observé en milieu complet (SVF) ou en présence de BSA (Figure 68). Cette observation souligne la capacité de la Fn et surtout de la Vn à induire la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses ovariennes probablement par l'engagement de signalisations *via* les intégrines αv .

Nos résultats démontrent que la fonctionnalité des protéines matricielles ascitiques est maintenue après le processus de purification. De plus, la Vn et la Fn issues des ascites induisent des signalisations *via* leurs récepteurs membranaires de types intégrines et modulent le comportement des cellules cancéreuses ovariennes.

3. CONCLUSIONS

Cette étude a permis de caractériser des protéines matricielles impliquées dans la dissémination des adénocarcinomes ovariens et contenues dans les ascites de patientes.

Ainsi, nous avons observé que toutes les ascites contiennent de la Vn et de la Fn. Toutefois, différentes proportions des isoformes de la Vn sont retrouvées selon les ascites. Pour poursuivre la caractérisation de ces protéines matricielles, des méthodes de purification de la Fn et de la Vn ont été couplées et adaptées à l'ascite. En appliquant ce protocole avec des ascites provenant de différentes patientes et avec des volumes variables, il est possible d'obtenir de la Fn et de la Vn à partir d'une même ascite avec des taux de purification satisfaisants et des quantités de protéines purifiées par litre d'ascite relativement constantes. Cette méthode permet également de réduire le temps de purification.

Après purification, différentes isoformes de Vn et de Fn sont observées en fonction des patientes. Des protéines à des poids moléculaires apparents pouvant correspondre à des fragments de dégradation de la Vn et de la Fn sont également purifiées. Une légère variabilité de conformation des protéines purifiées est observée en fonction de leurs origines.

Lorsque les cellules sont dans un environnement ascitique, elles organisent et remodelent la Vn et la Fn contenues dans l'ascite. Après purification, ces protéines matricielles sont capables d'induire une adhérence et une migration cellulaire variable en fonction des patientes. De plus, la Fn et la Vn ascitiques peuvent favoriser la survie cellulaire lors de la formation des sphéroïdes de cellules cancéreuses.

Il serait nécessaire de poursuivre cette étude avec un nombre plus important d'échantillons pour relier les variations de comportements cellulaires aux différents profils de Fn et de Vn retrouvés dans les ascites des patientes. Ainsi, ces protéines matricielles impliquées de façon récurrente dans la dissémination des cancers de l'ovaire pourraient être envisagées comme cibles diagnostiques. De la même manière, la Vn et la Fn ascitiques participant à la résistance à l'anoïkis des sphéroïdes de cellules cancéreuses pourraient devenir des cibles thérapeutiques afin de déstabiliser ces organisations cellulaires pour les rendre sensibles aux agents thérapeutiques existants.

Discussion et perspectives

L'ascite, un véritable enjeu clinique pour la prise en charge des cancers de l'ovaire

Malgré les traitements des cancers de l'ovaire proposés à ce jour, cette pathologie reste associée à un sombre pronostic (survie à 5 ans inférieure à 30 %) en raison de leur découverte tardive et de l'émergence d'une chimiorésistance (Howladet *et al* 2011). En effet, le développement initial des cancers de l'ovaire est asymptomatique rendant difficile l'identification de la pathologie à des stades précoces (Auersperg *et al.*, 2001). La majorité des patientes sont diagnostiquées à un stade avancé de la pathologie (stades III et IV). Les cellules cancéreuses ont donc souvent colonisé les organes voisins des ovaires et la cavité péritonéale au moment du diagnostic. L'étendue de la dissémination des adénocarcinomes ovariens est directement corrélée au taux de survie des patientes (Howlader *et al.*, 2011). L'émergence d'une chimiorésistance et d'une récurrence sont observées dans 70 % des cas et sont souvent associées au développement d'ascite (Kipps *et al.*, 2013; Ushijima, 2009).

La sécrétion de facteurs pro-angiogéniques accompagnant le développement du foyer tumoral associée à la diminution du drainage lymphatique dû à l'obstruction des vaisseaux par les cellules cancéreuses, conduisent à l'accumulation d'ascite dans la cavité péritonéale. Ce liquide inflammatoire contenu dans la cavité péritonéale constitue un véritable microenvironnement rencontré par les cellules cancéreuses au cours du processus de dissémination. La dissémination des cancers de l'ovaire suit principalement la voie transcœlomique (Tan *et al.*, 2006). Les cellules cancéreuses s'exfoliant de la surface du foyer primaire, de manière isolée ou en sphéroïdes, se retrouvent en suspension dans la cavité péritonéale et peuvent s'implanter sur le mésothélium formant ainsi un foyer secondaire. En plus d'être impliquées dans la dissémination tumorale, les cellules cancéreuses ovariennes organisées en sphéroïdes seraient responsables des récidives suite au traitement en raison de leur capacité à résister aux chimiothérapies (Shield *et al.*, 2009). Les contraintes physiques induites par les courants ascitiques participent à la dissémination des cellules cancéreuses (Rizvi *et al.*, 2013).

Les modifications de comportements cellulaires induites par ce microenvironnement restant peu caractérisées, nous avons cherché à comprendre l'influence de l'ascite sur le comportement des cellules cancéreuses.

L'ascite modifie les comportements des cellules cancéreuses ovariennes

Afin de mimer au mieux le contexte physiopathologique, les cellules cancéreuses ovariennes ont été cultivées dans des ascites issues de patientes. Après deux jours d'incubation, les cellules présentent des modifications morphologiques par comparaison au milieu de culture classique. Certaines forment spontanément des sphéroïdes, d'autres sont très étalées et ont une morphologie de type fibroblastique. Ces résultats soulignent l'hétérogénéité des phénotypes que peuvent adopter les cellules cancéreuses ovariennes. Ces différentes organisations cellulaires sont retrouvées au cours de la dissémination tumorale et s'expliquent par un mécanisme de sélection clonale des cellules. Le développement du foyer tumoral se fait dans un microenvironnement dynamique exerçant une pression de sélection sur des sous-populations de cellules cancéreuses (Greaves et Maley, 2012b). Ainsi, sur une même biopsie de cancer ovarien, plusieurs phénotypes de cellules cancéreuses sont observés simultanément (Strauss *et al.*, 2011).

Les observations de la morphologie des cellules en ascites suggéraient une modification de l'organisation des interactions cellules-cellules. La localisation et l'expression de marqueurs du phénotype épithélial ou mésenchymateux ont été suivies lors de l'incubation des cellules cancéreuses en ascite. Les cellules de type épithéliales sont notamment caractérisées par une organisation importante des interactions cellulaires en jonctions adhérentes, en desmosomes et en jonctions serrées, alors que les cellules mésenchymateuses sont isolées les unes des autres et ont des capacités de migration et d'invasion exacerbées (Thiery *et al.*, 2009). L'incubation des cellules en ascite semble déclencher une transition épithélio-mésenchymateuse conduisant à la modification des comportements des cellules. En effet, les cellules SKOV3 présentent une augmentation de leur capacité de migration et les cellules IGROV1 forment spontanément des sphéroïdes qui semblent survivre en absence d'ancrage à un support. La diminution d'expression des E-cadhérines a précédemment été associée à la formation spontanée de sphéroïdes par les cellules cancéreuses ovariennes et à un pronostic défavorable (Faleiro-Rodrigues *et al.*, 2004; Pease *et al.*, 2012). En environnement ascitique, les jonctions cellulaires sont perturbées et les cellules tendent vers une organisation de type mésenchymateuse. Une étude du profil de cytokines retrouvées dans les ascites a permis d'identifier plusieurs molécules comme le PDGF et l'IL-6 qui sont décrites comme des inducteurs de la TEM (Matte

et al., 2012; Thiery *et al.*, 2009). La chimiorésistance des cellules cancéreuses, responsables des récidives, a été associée avec la TEM (Ahmed *et al.*, 2010; Vergara *et al.*, 2010). D'autres facteurs environnementaux rencontrés *in vivo* tel que l'hypoxie favoriserait le processus de TEM (Forbes *et al.*, 2009). Une analyse avec un nombre important d'échantillons d'ascites a révélé qu'une minorité de ces prélèvements (8 échantillons sur 31) ne stimule pas la migration cellulaire (Meunier *et al.*, 2010b). Ce résultat suggère que les comportements cellulaires observés en ascites dépendent d'un équilibre entre molécules pro- et anti-migratoires.

Au cours de la TEM, il a été décrit qu'un enrichissement de la population cellulaire en cellules souches cancéreuses était observé (Ahmed *et al.*, 2010). Ces cellules ont la capacité d'autorenouveau et sont capables de se différencier pour générer un nouveau foyer tumoral. Les cellules contenues dans l'ascite ainsi que les molécules de la MEC constitueraient une niche pour ces cellules souches cancéreuses. Ces cellules sont également caractérisées par leur capacité de survie en absence d'ancrage en formant des sphéroïdes ainsi que par la mise en place d'un état de quiescence transitoire (Bapat, 2010). La diminution de l'apoptose observée dans cellules IGROV1, lors de la perte d'ancrage, ainsi que leurs capacités à former des colonies en environnement ascitique suggèrent un enrichissement de la population cellulaire en cellules ayant des caractéristiques de cellules souches cancéreuses.

L'ascite est un microenvironnement qui participe à la dissémination tumorale par l'action des courants liquidiens dans la cavité péritonéale, mais aussi en favorisant l'émergence des comportements cellulaires comme la migration cellulaire ou la formation spontanée de sphéroïdes par les cellules cancéreuses ovariennes.

Implication des intégrines α_v dans la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes en ascite

Des études antérieures menées notamment par notre équipe ont permis d'identifier le rôle majeur des intégrines α_v dans la progression tumorale. En effet, ces intégrines sont impliquées dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules cancéreuses (Cruet-Hennequart *et al.*, 2003; Lane *et al.*, 2010). De plus, les intégrines α_v participent à l'adhérence, à la migration cellulaire et à la formation de sphéroïdes, et sont impliquées

dans le remodelage de la MEC (Ahmed *et al.*, 2002; Carreiras *et al.*, 1999c; Kellouche *et al.*, 2010; Leroy-Dudal *et al.*, 2005b). Par ailleurs, l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules cancéreuses est associée à une surexpression des intégrines $\alpha\beta 3$ et une augmentation des capacités de migration trans-endothéliale (Bauer *et al.*, 2007; Mamuya et Duncan, 2012). La migration des cellules cancéreuses est également influencée par les cytokines contenues dans le microenvironnement cellulaire. Les récepteurs tyrosine kinase, comme le récepteur au facteur de croissance de type insuline, peuvent coopérer avec les intégrines $\alpha\beta 5$ pour faciliter la dissémination des cellules cancéreuses (Brooks *et al.*, 1997). Ainsi, une meilleure connaissance du rôle des intégrines αv dans les comportements cellulaires en environnement ascitique nous est apparue essentielle.

La présente étude démontre que l'ascite accentue le caractère mésenchymateux des cellules cancéreuses SKOV3 et stimule en particulier leur capacité migratoire. L'utilisation d'un peptide RGD cyclique ciblant les intégrines αv permet d'inhiber la migration des cellules SKOV3.

Ainsi, l'implication des intégrines αv dans la modulation des capacités de migration cellulaire est démontrée en environnement ascitique. De plus, les comportements cellulaires tels que la migration cellulaire sont des processus clés participant à la dissémination tumorale des adénocarcinomes ovariens.

L'implication des ligands privilégiés des intégrines αv , la vitronectine et la fibronectine, dans des comportements cellulaires responsables de la dissémination tumorale a également été mise en évidence (Carreiras *et al.*, 1999b; Heyman *et al.*, 2010, 2008; Kenny *et al.*, 2008). L'interaction des intégrines αv avec la Vn participe à la formation initiale des sphéroïdes. La Vn a pu être localisée au cœur des sphéroïdes de cellules IGROV1 (Kellouche *et al.*, 2010). Lors de l'incubation des cellules IGROV1 en ascite, la formation spontanée des sphéroïdes est inhibée par un traitement avec le peptide RGD ciblant les intégrines αv . Ce résultat confirme le rôle majeur des intégrines αv dans la formation des sphéroïdes de cellules cancéreuses ovariennes. L'incubation des cellules en ascite entraîne une délocalisation de ces intégrines des contacts focaux vers des vésicules périnucléaires. Cette modification du trafic des intégrines αv entraînant leur relocalisation est classiquement caractéristique d'une augmentation des capacités de migration (Roberts *et al.*, 2004); or la migration des cellules IGROV1 est inhibée en environnement ascitique. L'internalisation des

intégrines peut être également causée par le recyclage des récepteurs aux facteurs de croissance (Weis et Cheresh, 2011).

La déstabilisation des structures d'adhérence engendrée par l'internalisation des intégrines αv pourrait participer à la diminution de l'ancrage des cellules nécessaire pour la formation des sphéroïdes.

Les signalisations de survie dépendantes des intégrines αv favorisent la résistance à l'anoïkis

La formation des sphéroïdes est un évènement majeur de la dissémination des cellules cancéreuses dans la cavité péritonéale. La formation de ces amas multicellulaires s'accompagne du développement de chimiorésistance. Dans un contexte physiologique, la perte des interactions cellules-MEC entraîne l'arrêt de signalisation favorable à la survie et conduit à la mort cellulaire par l'anoïkis (Stupack et Cheresh, 2002). Les cellules cancéreuses ovariennes sont capables de résister à la perte d'ancrage et de survivre en suspension dans la cavité péritonéale.

L'élucidation des mécanismes permettant la survie des cellules en absence d'ancrage paraît donc essentielle afin d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques sensibilisant les cellules à l'anoïkis.

Les cellules IGROV1 et SKOV3 utilisées pour cette étude ont été établies respectivement à partir de prélèvements sur une tumeur primaire au niveau de l'épithélium ovarien de surface et au sein de l'ascite d'une patiente atteinte de cancer de l'ovaire (Bénard *et al.*, 1985; Fogh *et al.*, 1977). Lors de l'incubation de ces cellules en absence d'ancrage selon une méthode précédemment décrite (Casey *et al.*, 2001; Kellouche *et al.*, 2010), les cellules forment des sphéroïdes similaires à ceux observés *in vivo* dans l'ascite (Burlison *et al.*, 2004). Toutefois, la taille et l'organisation des sphéroïdes diffèrent entre les deux lignées cellulaires. Les agrégats multicellulaires de cellules SKOV3 sont de plus grandes tailles et moins compactes que les sphéroïdes de cellules IGROV1. Néanmoins, au cours de l'incubation des cellules IGROV1 en absence d'ancrage, quelques cellules ne s'organisent pas en sphéroïdes et restent isolées.

Un processus apoptotique est activé de manière transitoire lors de la perte d'ancrage par les cellules IGROV1. La sur-expression de Mcl-1, une molécule anti-apoptotique de la

famille des Bcl-2, leur permettrait de compenser les signalisations apoptotiques (Simonin *et al.*, 2009). Après 4 jours en absence d'ancrage, l'activation des signaux de mort diminue et l'expression de P130/Rb est augmentée. Les cellules IGROV1 organisées en sphéroïdes instaurent progressivement un état de quiescence qui leur permettraient de survivre dans des conditions hostiles (Guadamillas *et al.*, 2011).

L'incubation des cellules SKOV3 en conditions non adhérentes n'entraîne pas le déclenchement de signalisation apoptotique. La proportion de cellules dans la phase G0/G1 augmente fortement dès le premier jour d'incubation par comparaison aux cellules adhérentes. L'expression de P130/Rb augmente dès la perte d'ancrage puis est maintenue au cours du temps. Les cellules SKOV3 sont donc capables de résister à l'anoïkis par l'induction rapide de la quiescence. Cette capacité de résistance à la perte d'ancrage par la mise en place d'un état de dormance est une caractéristique des cellules souches cancéreuses et ce phénotype cellulaire est retrouvé dans les sphéroïdes isolés à partir d'ascites de patientes (Correa *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2012; Weis et Cheresch, 2013).

Avec ces deux lignées de cellules cancéreuses ovariennes, nous pouvons observer différents comportements face à la perte d'ancrage. Les cellules SKOV3, isolées à partir d'ascite, semblent être capables de mettre en place des signalisations rapides pour résister à la perte d'ancrage alors que les cellules IGROV1, isolées à partir d'une tumeur primaire au niveau de l'EOS, ont besoin d'un temps d'adaptation. En effet, l'apoptose observée pendant les premiers jours suggère une sélection des cellules capables de s'organiser entre elles pour rétablir des signalisations de survie. Ainsi, les cellules IGROV1 constituent un bon modèle d'étude pour comprendre la mise en place de la résistance à l'anoïkis.

Nous avons ensuite suivi les variations d'activation de MAPK impliquées dans la survie cellulaire et cherché à déterminer comment sont-elles activées lors de la perte d'ancrage (Wada et Penninger, 2004). Dans les cellules IGROV1, la phosphorylation d'ERK 1/2 diminue lors de la perte d'ancrage et cette diminution est corrélée avec l'augmentation de la signalisation apoptotique. Après quelques jours d'incubation, une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 est observée parallèlement à la diminution de la signalisation apoptotique. Dans les cellules SKOV3, l'activation d'ERK 1/2 est maintenue constante dans les cellules non adhérentes et adhérentes. L'augmentation importante de la

phosphorylation de p38 lors de l'incubation des cellules SKOV3 en condition non adhérente pourrait participer à l'induction rapide d'un état de quiescence (Adam *et al.*, 2009).

Le rôle d'ERK 1/2 dans la résistance à l'anoïkis des cellules IGROV1 a été étudié en inhibant son activation. Ainsi, nous avons constaté une augmentation de l'apoptose confirmant l'implication de cette signalisation dans la survie des cellules à la perte d'ancrage comme précédemment suggéré (Tang *et al.*, 2010). Les interactions entre la Vn et intégrines α v peuvent engendrer une activation rapide et transitoire d'ERK 1/2 (Hapke *et al.*, 2003). Ces mêmes intégrines sont impliquées dans la formation des sphéroïdes, (Kellouche *et al.*, 2010). D'autre part, dans d'autres contextes, une interconnexion entre la voie PI3K/AKT et la voie des MAPK par les PKC peut conduire à l'activation d'ERK 1/2 (Aksamitiene *et al.*, 2012; Rucci *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2010). Les rôles des intégrines α v et des PKC dans la mise en place d'une résistance à la perte d'ancrage ont été déterminés. Ainsi, nous avons pu observer que la diminution d'expression des intégrines α v et de l'activité de la PKC entraînent une diminution de l'activation d'ERK 1/2, corrélée à une diminution de la survie cellulaire. A l'inverse, l'activation des PKC par un traitement des cellules au PMA conduit à une augmentation de la phosphorylation d'ERK 1/2 et de la survie cellulaire. L'activation d'autres kinases comme Src par les intégrines α v β 3 est impliquée dans la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses ovariennes et dans la progression tumorale (Desgrosellier *et al.*, 2009).

Les cellules cancéreuses ovariennes de type épithélial pourraient donc résister à la perte d'ancrage en se regroupant en sphéroïdes et en restituant des signalisations de survie par les intégrines α v et les PKC. La phosphorylation d'ERK1/2 impliquée dans la survie cellulaire peut être ainsi retrouvée (Goncharenko-Khaider *et al.*, 2012). La survie des cellules de type mésenchymateux dépendraient moins des signalisations induites par les interactions cellules-MEC. Les signalisations de survie pourraient être assurées par les récepteurs tyrosine kinases et les nombreux facteurs de croissances contenus dans l'ascite (Lemmon et Schlessinger, 2010; Takeuchi et Ito, 2011).

L'ascite, un réservoir unique de biomolécules matricielles propices à la dissémination : la Vn et la Fn cibles diagnostiques potentielles ?

La présente étude révèle que la formation des sphéroïdes, la survie et la migration cellulaire sont des comportements modifiés en environnement ascitique. Il est généralement admis que le microenvironnement cellulaire constitue un élément majeur du développement tumoral (Roskelley et Bissell, 2002). Cependant, la caractérisation des molécules contenues dans l'ascite et pouvant modifier le comportement des cellules cancéreuses reste à ce jour peu étudié. Plus particulièrement, il y a très peu de données bibliographiques concernant le contenu matriciel de ces ascites.

Compte tenu de nos résultats mais aussi des études précédentes concernant l'importance des intégrines α_v , de la Vn et de la Fn dans la « biologie des cancers de l'ovaire », nous avons focalisé nos investigations sur la Vn et la Fn ascitiques. Nous avons identifiés ces deux protéines matricielles dans toutes les ascites de patientes testées. Les rôles de ces protéines dans la dissémination des adénocarcinomes ovariens ont précédemment été décrits mais elles n'ont pas été caractérisées au sein du microenvironnement ascitique (Carreiras *et al.*, 1999c; Heyman *et al.*, 2008; Kenny *et al.*, 2008; Reuning, 2011). Sachant que la Vn et la Fn sont des glycoprotéines abondantes dans le plasma, leur présence dans l'ascite pourrait être due à l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par les cellules tumorales (Herr *et al.*, 2012; Preissner, 1991; Ruoslahti, 1984). D'autre part, la Vn peut être synthétisée par les cellules cancéreuses ovariennes et par les cellules mésothéliales bordant la cavité péritonéale (Heyman *et al.*, 2008; Reuning, 2011). La Vn et la Fn retrouvées dans les échantillons d'ascite testés ont un profil d'expression similaire, avec deux formes majoritaires pour la Vn à des poids moléculaires apparents de 75 et 65 kDa et une forme à 250 kDa pour la Fn. Les concentrations ascitiques moyennes de la Vn et de la Fn sont respectivement de 176,27 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm 21,57$) et de 247,74 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm 6,65$). Ces poids moléculaires apparents et ces concentrations sont en accord avec les données bibliographiques existants pour la Vn et la Fn plasmatiques (Pankov et Yamada, 2002; Schwartz *et al.*, 1999).

Pour réguler le comportement cellulaire, les protéines de la MEC solubles doivent être incorporées dans le microenvironnement des cellules (Schwarzbauer et DeSimone, 2011). Quand les cellules cancéreuses ovariennes sont incubées en ascite, la Vn ascitique

recouvre uniformément le support de culture alors que la Fn ascitique est observée en fibrilles associées aux cellules (Schwarzbauer et DeSimone, 2011). Des zones de remodelage de la Vn sont co-localisées avec les cellules cancéreuses. Ces observations illustrent que ces deux protéines n'ont pas les mêmes mécanismes d'incorporation dans la matrice cellulaire.

Afin de poursuivre la caractérisation de la Vn et de la Fn contenues dans l'ascite, un protocole combiné de purification basé sur les propriétés d'affinité de ces protéines a été mis au point. Cette méthode permet d'isoler des protéines matricielles de haut poids moléculaire à partir de fluides pathologiques complexes qui présentent une très large diversité de molécules. Malgré la perte de protéines d'intérêt inhérent à toute méthode de purification, les taux de purification sont comparables à ceux obtenus par des protocoles de purification séparés (Poulouin *et al.*, 1999; Yatohgo *et al.*, 1988). A partir de ces protéines purifiées, il est ainsi possible d'étudier leurs propriétés moléculaires et les réponses cellulaires induites en fonction des patientes à l'origine du prélèvement.

Après la purification, différentes isoformes de Vn et de Fn sont retrouvées. En plus de la Vn à 75 et 65 kDa, des isoformes de Vn à des poids moléculaires apparents de 57 et 45 kDa sont observées. Le clivage protéolytique par la plasmine ou la thrombine ainsi que des modifications du profil de glycosylation pourraient être à l'origine de ces isoformes (Chain *et al.*, 1991; Gechtman *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1999). Concernant la Fn, le profil retrouvé dans les protéines purifiées et dans l'ascite est composé d'une bande majoritaire de 250 kDa et de bandes minoritaires de 150 et 90 kDa également retrouvées dans le sérum de patients atteints de cancer de la prostate (Janković et Kosanović, 2008). La Fn plasmatique de donneurs sains présente une seule bande de 250 kDa. Les fragments pourraient être générés par des protéases ascitiques telles que les métalloprotéases. De plus, l'épissage alternatif de la Fn pourrait expliquer les fines bandes inférieures à 250 kDa observées en ascite (French-Constant, 1995). La fibronectine oncofœtale a été identifiée dans des ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire (Menzin *et al.*, 1998). D'autre part, l'analyse de la conformation des Fn ascitiques, après l'application du même protocole de purification, révèle quelques différences structurales en fonction des patientes. L'augmentation du rayon hydrodynamique et l'absence de modification de l'exposition des tryptophanes suggèrent un dépliement partiel de la Fn. En effet, la conformation globale de la protéine peut être modifiée alors que les domaines restent repliés (Patel *et al.*, 2004).

Il pourrait être intéressant de considérer les propriétés moléculaires de la Vn et de la Fn ascitiques comme potentiels néo-épitopes caractérisés par les modifications post-traductionnelles telles que les clivages des protéases, les glycosylations et les multimérisations. Le développement tumoral se caractérise par la génération de néo-épitopes, notamment impliqués dans la MEC, pouvant servir de biomarqueurs potentiels (Leeming *et al.*, 2011). La méthode de purification que nous avons développée permettra, avec un plus grand nombre d'échantillon, de relier les différents profils de Vn et de Fn aux données cliniques. De manière similaire, la purification d'autres protéines ascitiques comme la kallikreine-6 est réalisée dans le but de caractériser les profils de glycosylations retrouvés lors des cancers de l'ovaire (Kuzmanov *et al.*, 2012).

Un intérêt majeur de cette méthode de purification est de pouvoir obtenir des quantités suffisamment importantes de Vn et de Fn ascitiques à partir d'une même ascite pour déterminer leurs influences sur le comportement cellulaire. Selon l'origine de ces protéines matricielles, une modulation des capacités d'adhérence et de migration des cellules cancéreuses ovariennes est observée. L'organisation des intégrines en contact focaux quand les cellules s'étalent sur les protéines ascitiques suggèrent l'engagement d'un processus de signalisation cellulaire. La Vn et la Fn ainsi que leurs récepteurs respectif, les intégrines αv et $\beta 1$ ont précédemment été décrits comme des régulateurs de l'adhérence (Burleson *et al.*, 2004; Casey *et al.*, 2001; Leroy-Dudal *et al.*, 2005c), de la prolifération (Hapke *et al.*, 2003), de l'invasion (Burleson *et al.*, 2006) et de la formation des sphéroïdes (Kellouche *et al.*, 2010), et elles contribuent à l'émergence de chimiorésistance par les cellules cancéreuses (Uhm *et al.*, 1999; Xing *et al.*, 2008).

L'implication des intégrines αv dans la mise en place de résistance à l'anoïkis, par l'activation de signalisation dépendante d'ERK 1/2, a précédemment été démontrée ; or la Fn et surtout la Vn ascitique, interagissant avec ces intégrines, favorisent la survie des cellules cancéreuses lors de la perte d'ancrage. Par ailleurs, une étude a mis en évidence que l'activation des intégrines $\alpha v \beta 5$ protégeait les cellules cancéreuses ovariennes de la mort cellulaire induite par TRAIL en environnement ascitique. Toutefois, malgré que les intégrines $\alpha v \beta 5$ soit connues pour lier la Vn, les auteurs ont montré que la Vn n'est pas impliquée dans la résistance à la mort induite par TRAIL (Lane *et al.*, 2012, 2010). Néanmoins, la Vn et la Fn favorisent l'implantation des cellules cancéreuses ovariennes sur le péritoine et l'expression

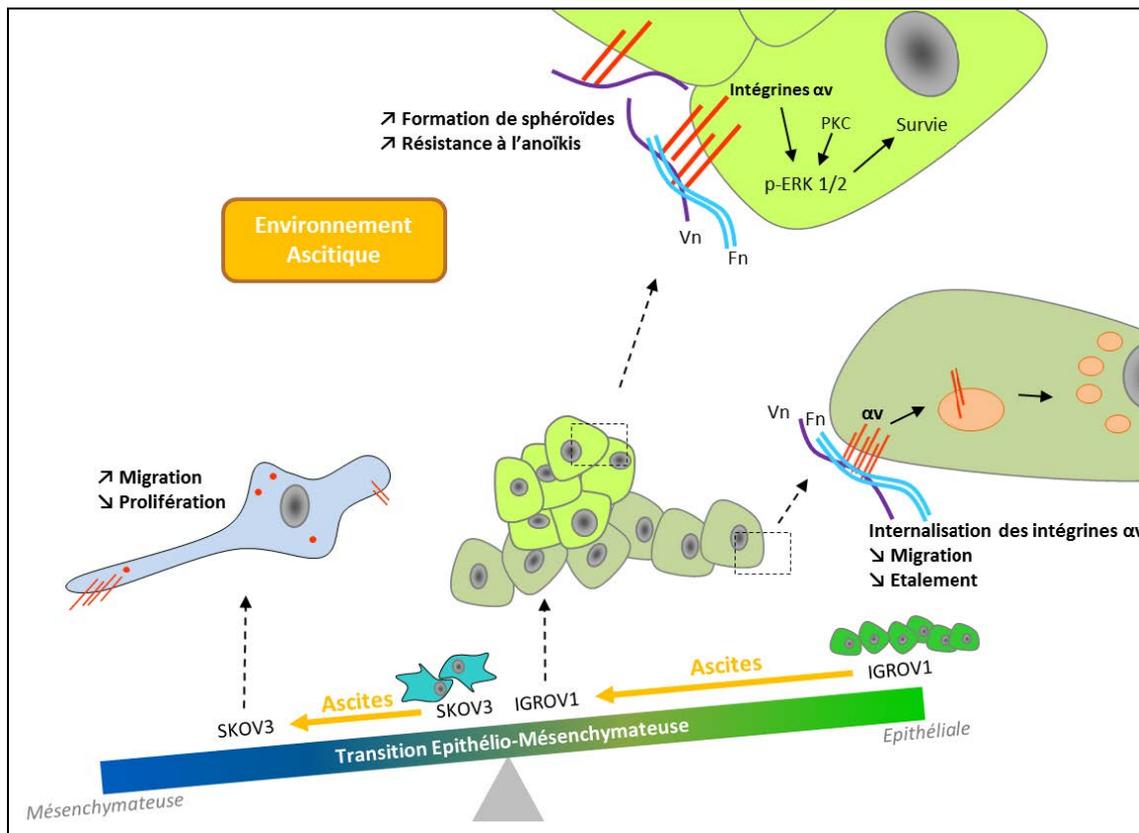


Figure 69 Schéma de conclusion.

des intégrines α_v par ces cellules a été mise en évidence dans les ascites (Davidson *et al.*, 2003; Heyman *et al.*, 2008; Kenny *et al.*, 2008).

Considérant que l'ascite est le principal microenvironnement rencontré par les cellules cancéreuses au cours de leur dissémination, il est pertinent de suggérer que la Vn et la Fn sont des facteurs ascitiques qui favoriseraient la progression tumorale, la survie des sphéroïdes et la chimiorésistance dans un environnement en absence d'ancrage. De plus, l'étude des différentes isoformes de ces deux molécules sur un nombre d'échantillons plus important permettraient d'évaluer leur pertinence en tant que marqueurs diagnostiques.

Conclusions et perspectives

L'ascite s'accumulant dans la cavité péritonéale est un microenvironnement constitué à partir d'épanchement plasmatique et de sécrétions par les différentes populations cellulaires saines et pathologiques. Ainsi, la présence fréquente d'ascite au moment de l'identification de la maladie et lors des récives constitue un réservoir accessible d'échantillons tumoraux qui pourraient permettre de déterminer les caractéristiques des cellules cancéreuses en suivant l'expression de marqueurs moléculaires liée à l'évolution de la pathologie (Ahmed et Stenvers, 2013).

Les cellules cancéreuses sont exposées à une diversité importante de molécules pouvant modifier leur comportement. Nous avons mis en évidence que l'ascite induit une transition épithélio-mésenchymateuse partielle associée à l'émergence de comportements cellulaires impliqués dans la dissémination tumorale (Figure 69). L'état de différenciation des cellules après l'incubation des cellules en ascite varie en fonction de l'origine des cellules cancéreuses. La formation spontanée de sphéroïdes peut être observée lors de l'incubation des cellules cancéreuses ovariennes en environnement ascitique. La résistance à la perte d'ancrage de ces cellules nécessite le maintien de signalisations de survie notamment assurées par les intégrines α_v et les PKC. La Vn et la Fn contenues dans l'ascite pourraient activer ces signalisations car ces protéines matricielles favorisent la survie des cellules organisées en sphéroïdes. Il serait intéressant d'approfondir l'étude des signalisations mises en jeu lors de la perte d'ancrage afin d'identifier des cibles thérapeutiques. La caractérisation et la purification de la Vn et de la Fn ascitiques a permis de mettre en évidence différentes propriétés de ces molécules en fonction des ascites de patientes.

L'influence de ces modifications sur la signalisation cellulaire pourrait également être appréhendée.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses permettrait d'améliorer l'efficacité des thérapies. Ainsi, déterminer le rôle de l'ascite et plus particulièrement de la Vn et de la Fn ascitiques dans le développement de ces chimiorésistances serait une étape importante pour limiter les risques de récives. De plus, l'étude d'un plus grand nombre de prélèvements ascitiques pourrait permettre d'associer des profils d'expression de Vn et de Fn ascitiques avec les données cliniques des patientes. Nous avons vu qu'en environnement ascitique des sous populations cellulaires peuvent être distinguées par leur comportement. Il serait intéressant d'isoler ces cellules pour les caractériser et les comparer avec les cellules cancéreuses isolées à partir d'ascite de patientes. Par ailleurs, le rôle des intégrines α v dans la résistance à l'anoïkis et aux chimiothérapies pourrait être étudié sur des modèles de dissémination *in vitro* en co-culture et *in vivo* permettant de se rapprocher au plus près du microenvironnement physiopathologique.

Matériel et méthodes

Culture Cellulaire

Caractéristique des lignées cellulaire

La lignée cellulaire épithéliale IGROV1 est issue de l'ovaire d'une patiente atteinte d'un cancer de l'ovaire de stade III, et nous a été généreusement fournie par le Dr. J Bénard (Bénard *et al.*, 1985). Les lignées cellulaires épithéliales SKOV3 (ATCC® HTB-77™) et OVCAR3 (ATCC® HTB-161™) sont isolées à partir d'ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire et nous ont été généreusement fournies par le Dr. L. Poulain (Unité de Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Aggressifs, Caen). Les cellules IGROV1 ont un aspect polygonal et ont un temps de doublement d'environ 20 h (Figure 70). Elles ont la particularité de former des populations hétérogènes de cellules adhérentes en monocouche et de cellules en suspension regroupées en amas multicellulaires. Les cellules SKOV3 ont une morphologie de type fibroblastique. Les cellules OVCAR3 forment des îlots cellulaires à faible densité. Ces deux dernières lignées cellulaires forment uniquement des monocouches en condition adhérente et leur temps de doublement est d'environ 30 h. Ces trois lignées sont des modèles d'étude des tumeurs ovariennes *in vitro* et *in vivo*.

Condition de culture

Culture des cellules en condition adhérente.

Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les 2 à 3 jours, et les cellules sont repiquées deux fois par semaine. Les différents travaux sont effectués à partir de cellules subconfluentes cultivées dans des boîtes de 25 à 175 cm². Le milieu de culture des cellules est du RPMI-1640 glutaMAX contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 7,5 % de bicarbonate de sodium (milieu complet). L'ensemble des réactifs de biologie cellulaire est fourni par Invitrogen.

Culture des cellules en non-adhérente.

Afin de générer des sphéroïdes, les cellules ont été cultivées dans les boîtes de culture de 25 cm² sont recouvertes par 7 mL d'agarose 1 % (dissout dans l'eau distillé). Après solidification de l'agarose, les cellules sontensemencées dans du milieu complet à une densité de 150000 cellules/mL.

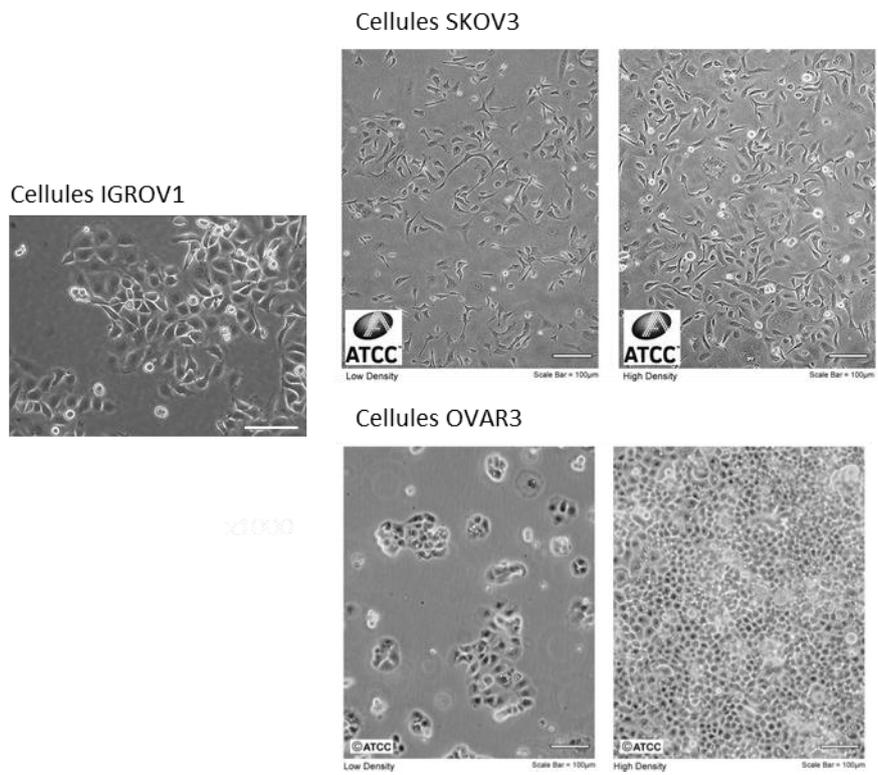


Figure 70 Lignées cellulaires d'adénocarcinome ovarien cultivées en condition adhérente.

(Barres d'échelles : 100 µm)

Traitements des cellules

Selon le type d'expériences les molécules suivantes sont ajoutées au le milieu de culture ou a l'ascite : l'inhibiteur d'ERK 1/2 (U0126 ; 662005), l'activateur des PKC, (PMA ; 524400) et l'inhibiteur des PKC (calphostine C ; 208725) fournis par Millipore ; l'inducteur d'apoptose (Staurosporine ; S4400) et l'inhibiteur de la traduction protéique (cycloheximide ; C7698) par Sigma-Aldrich ; les peptides ciblant les intégrines αv (cRGDfC ; 63785-1) ou les peptides non spécifique (cRADfK ; 62351) par Anaspec et le DMSO comme contrôle (UD8050-05-A) par Euromedex.

Préparation des échantillons d'ascites

Les échantillons d'ascites sont collectés après avoir obtenu le consentement approprié des patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien. Trois centres hospitaliers ont participé à l'obtention des prélèvements : le Centre de lutte contre le cancer François Baclesse (Caen), l'institut Curie (Paris) et l'Hôpital René Dubos (Pontoise). Les ascites sont prélevées dans des flacons ne contenant ni EDTA, ni héparine. Ensuite, les ascites sont centrifugées à 400 g pendant 5 min et le surnageant est stocké à -20°C. Les ascites utilisées en culture cellulaire sont filtrées et complétées avec de la pénicilline (200 UI/mL)/streptomycine (200 µg/mL) et de la fungizone (Amphotéricine B 2,50 µg/mL).

Pour la purification des protéines matricielles, les ascites sont décongelées à 4°C, centrifugées à 5000 g pendant 10 min à 10°C pour éliminer les éventuels agrégats ou débris et les protéines totales sont dosées par la technique de l'acide bicinchoninique (BCA, B9643/C2284, Sigma Aldrich) basée sur la complexation de Cu^{2+} avec les liaisons peptidiques. L'activité des protéases est inhibée par l'addition de 5 mM d'EDTA (E5134, Sigma Aldrich) et 50 µM de PMSF (P7626, Sigma Aldrich).

Analyse du comportement cellulaire

Croissance et viabilité

Comptage des cellules viables

Après incubation pendant le temps désiré, les cellules sont décrochées de leur support ou les agrégats sont dissociées par action de la trypsine-EDTA (5 a 10 min à 37°C) et

les cellules viables sont dénombrées en cellule de Malassez en utilisant le test d'exclusion au bleu trypan.

Test de prolifération cellulaire

La prolifération des cellules adhérentes peut être estimée par mesure de l'incorporation de BrdU, un agent intercalant de l'ADN, pendant la phase S du cycle cellulaire (kit 11647229001, Roche). L'incorporation du BrdU dans les cellules prolifératives est détectée par un anticorps dirigé contre le brdU et couplé à la peroxydase. La révélation est réalisée par l'ajout de TMB. L'absorbance qui est proportionnelle au taux d'incorporation du BrdU est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 370 nm.

Pour certaines expériences, le suivi de la prolifération cellulaire est effectué par coloration des cellules au cristal violet. Les cellules adhérentes dans des puits de culture sont rincées avec du PBS, fixées par 1 % de glutaraldéhyde. Après 3 rinçages au PBS, les cellules sont marquées par du cristal violet à 0,1 % pendant 30 min, rincées 3 fois à l'eau et solubilisées par 0,1 % de SDS. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm. L'absorbance est proportionnelle au nombre de cellules.

Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux

Les cellules sont dissociées par action de la trypsine, rincées au PBS, fixées dans de l'éthanol à 70 % et conservé à -20°C jusqu'à leur analyse. Les cellules sont centrifugées et re-suspendues dans du PBS pendant 30 min à 37°C. Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont reprises dans une solution d'iodure de propidium (Kit DNA Prep Coulter Reagent, Beckman Coulter) et incubées pendant 20 min. Les échantillons sont ensuite passés au cytomètre de flux (EPICS XL, Beckman Coulter) et la distribution des cellules dans le cycle cellulaire est analysée par le logiciel Expo32 (Beckman Coulter). Les résultats sont représentés en pourcentage de cellules présentes dans chaque phase du cycle.

Mesure de l'activité caspase-3

L'activité de la caspase-3 est déterminée en utilisant un kit colorimétrique de mesure de l'activité caspase-3 selon les instructions du fabricant (K106-100, Biovision). Brièvement, les cellules sont collectées et centrifugées pendant 10 min à 300 g à 4°C, rincées par du PBS froid et incubées avec le tampon de lyse commercial. L'activité caspase-3 dans le lysat

cellulaire est estimée par la dégradation d'un substrat spécifique conjugué à un agent chromogène (le p-nitroaniline). Le p-nitroaniline est quantifié par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 405 nm. L'activité enzymatique de la caspase-3 est directement proportionnelle à la réaction colorée. Les résultats sont exprimés en activité relative par comparaison aux cellules adhérentes ou aux cellules non traitées.

Test d'adhérence cellulaire

Les tests d'adhérence sont réalisés dans des plaques 96 puits. Les puits sont incubés pendant 2h à 37°C avec des protéines matricielles purifiées à partir de plasmas ou d'ascites à des concentrations de 0 à 50 µg/mL (coating). Les puits sont ensuite incubés avec du PBS-BSA (Bovin Serum Albumin) 1 % à 37°C pendant 1 h et rincés avec du RPMI glutamax complété de 0,2 % de BSA (tampon d'adhérence). Les cellules décrochées sont reprises dans du tampon d'adhérence etensemencées à 4×10^5 cellules/cm². Après 30 min d'adhérence à 37°C et 5 % de CO₂, les cellules non adhérentes sont éliminées. Les cellules restantes sont fixées par 1 % de glutaraldéhyde. Après 3 rinçages au PBS, les cellules sont marquées par du cristal violet à 0,1 % pendant 30 min, rincées 3 fois à l'eau et solubilisées par 0,1 % de SDS. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm.

Test de blessure

Les cellules cancéreuses sontensemencées dans des plaques 48 puits et cultivées afin d'obtenir une monocouche confluente. Le tapis cellulaire est « blessé » à l'aide d'un cône de pipette de 200 µL. Les puits sont rincés trois fois avec du PBS pour éliminer les cellules non adhérentes et les cellules sont incubées dans du milieu de culture complet, de l'ascite ou du milieu à 2,5 % de SVF complété avec des protéines matricielles (10 µg/mL). Un traitement avec les peptides cRGDFC ou cRADfK peut être ajouté à des concentrations respectives de 2,5 µM et 12,5 µM pour les cellules IGROV1 et SKOV3. Ces concentrations de peptides cRGDFC permettent une inhibition de 50 % des capacités de migration en milieu de culture classique. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C avec 5 % de CO₂ et le comblement de la blessure du tapis cellulaire est suivi par vidéomicroscopie. La migration cellulaire est quantifiée par mesure des surfaces de comblement pendant des intervalles de temps réguliers grâce au logiciel Image J (Schneider *et al.*, 2012).

Tableau 7 Anticorps utilisés pour la réalisation des marquages immunofluorescents.

Anticorps Primaires		
Cible de l'anticorps	Référence	Fournisseur
Vitronectine	V7881	Sigma Aldrich
Fibronectine	F3648	
intégrines α v	sc-9969	Santa-Cruz
intégrines β 1	mab1965	Millipore
E-cadhérine	610181	BD biosciences
ZO-1	610966	
γ -caténine	610254	
β -caténine	sc-7119	Santa-Cruz
N-cadhérine	610920	BD biosciences
Vimentine	3932	Cell Signaling

Anticorps Secondaires			
Cible de l'anticorps	Référence	Fournisseur	Couplage
Ac anti-mouse	F9259	Sigma Aldrich	FITC
Ac anti-rabbit	F0382		FITC
Ac anti-mouse	A21424	Invitrogen	Alexa 555

Test de clonogénicité

Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits à une densité de 500 cellules / puits, de sorte à obtenir des cellules isolées. Le suivi de la clonogénicité (1 cellule donne 1 colonie) est alors évalué tous les jours par prise de photos au microscope optique inversé. Un traitement avec les peptides cRGDFc ou cRADfK peut être ajouté à des concentrations respectives de 2,5 μ M et 12,5 μ M pour les cellules IGROV1 et SKOV3.

Diminution de l'expression des intégrines α v

Pour estimer l'influence des intégrines α v sur le comportement cellulaire, l'expression de ces intégrines a été diminuée par transfection transitoire d'un siRNA α v (sc-29373, Santa Cruz) ciblant l'ARNm des intégrines α v ou par un siRNA « scramble » (sc-37007 Santa Cruz) témoin. Le siRNA dilué à 11 nM en RPMI est mélangé avec 50 % de réactif de transfection (INTERFERRin, Ozyme) préalablement diluée dans 10 % de RPMI. Ce mix de transfection est incubé 30 min à température ambiante. Les cellules à 70 % de confluence sont incubées en RPMI seul contenant 10 % du mélange siRNA/Interferrin pendant 24 h. Ensuite, les cellules sont décrochées et incubées en condition non adhérente jusqu'à 2 jours de culture. La diminution d'expression des intégrines α v est vérifiée par Western blot

Localisation moléculaire / Immunofluorescence

Les cellules cultivées sur des lamelles de verres sont rincées au PBS, fixées avec du paraformaldéhyde 3 % dans du PBS (10 min) puis rincées avec du PBS contenant 0,5 % de BSA (PBS-BSA). Elles sont ensuite perméabilisées avec du Triton X100 0,1 % dans du PBS (4 min) à 4°C, rincées 3 fois au PBS-BSA et incubées 1 h à température ambiante avec un anticorps primaire (Tableau 7). Après plusieurs lavages dans du PBS-BSA, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire approprié couplé à un fluorochrome (FITC ou Alexa 555). Les anticorps sont dilués dans le PBS-BSA. L'ADN des noyaux cellulaires est marqué avec le DAPI (4,6-diamino-2-phenyliindol dihydrochloride, D9542, Sigma Aldrich). Pour certaines expériences, le cytosquelette d'actine est marqué par de la phalloïdine couplée au FITC (P5282, Sigma Aldrich). Les lamelles sont montées avec du Prolong Gold Antifade

Reagent (P36930, Invitrogen) et analysées par microscopie confocale. Des témoins de spécificité sont réalisés en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul.

Pour l'expérience de « Pulse Chase », les cellules en culture sont incubées pendant 30 min avec l'anticorps primaire dilué dans du RPMI sans SVF. Puis après 3 rinçages au PBS, les cellules sont ré-incubées dans leur milieu d'origine. Les cellules sont fixées à différent temps comme décrit précédemment et le marquage immunofluorescent est poursuivi et analysé par microscopie confocale.

Caractéristiques des microscopes utilisés

Les observations des marquages immunofluorescents sont réalisées par un microscope confocal (LSM710, Zeiss) équipé d'une diode 405 nm, de lasers 458, 488, 514, 561 et 633 nm et d'objectifs x20 Plan Apo, ouverture numérique 0,8 et x63 à immersion à Huile Plan Apo, ouverture numérique 1,4.

La migration cellulaire est suivie par un vidéomicroscope (Leica DMI6000B) équipé d'une platine motorisée (CTR6500), d'une caméra CoolSnapES2 (Photometrics), d'un objectif x10 et du logiciel de contrôle Metamorph (Roper Scientific).

Caractérisation des protéines

SDS-PAGE et Western Blot

Avant d'être analysées par SDS-PAGE ou Western blot, les protéines purifiées sont dosées par la méthode au BCA (B9643/C2284, Sigma Aldrich) puis diluées dans un tampon de charge de Laemmli réducteur (Glycérol 22% ; SDS 4,3% ; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; bleu de bromophénol 1% ; 2-mercaptoéthanol 1%). Dans le cas de l'analyse de l'expression des protéines, les cellules sont rincées au PBS froid et lysées pendant 10 min à 4°C avec le tampon de lyse (9803 Cell Signaling). Puis les échantillons sont centrifugés à 10000 g pendant 15 min à 4°C et les protéines, contenues dans le surnageant, sont dosées par la méthode au BCA, diluées dans du tampon de charge de Laemmli et incubées 10 min à 90°C.

Les échantillons sont ensuite soumis à un SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Des quantités équivalentes de protéines (30 µg/puits pour les lysats cellulaires) sont séparées dans des gels de polyacrylamide (de 6 à 12 %) sous un courant électrique (20 mA/gel) selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Ensuite,

Tableau 8 Anticorps utilisés pour la réalisation des western blots.

Anticorps Primaires		
Cible de l'anticorps	Référence	Fournisseur
Intégrines αv	sc-376156	Santa-Cruz
Vitronectine	681125	Millipore
Fibronectine	F3648	Sigma Aldrich
P130/Rb	sc-317	Santa-Cruz
Mcl-1	sc-819	
PARP	9542	Cell Signaling
Bax	5023	
ERK 1/2 phosphorylé	4370	
ERK 1/2	9102	
p38 phosphorylé	9211	
p38	9212	
Actine	A5441	Sigma Aldrich
FAK phosphorylé	8556	Cell Signaling
FAK	3285	

Anticorps Secondaires			
Cible de l'anticorps	Référence	Fournisseur	Couplage
Anti-mouse	na931	GE Healthcare	Peroxydase
Anti-rabbit	na934		Peroxydase

les protéines peuvent être révélées par une coloration au bleu de Coomassie R250 ou au nitrate d'argent. Après avoir scanné les gels sur un densitomètre (GS-800, Biorad), le poids moléculaire apparent des protéines est déterminé par comparaison avec la migration d'un témoin constitué de poids moléculaires connus (161-0373, Biorad). Dans le cas d'un Western blot, les protéines contenues dans le gel sont électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (110V) pendant 1 h à 4°C dans du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM ; éthanol 20%). Les membranes sont ensuite saturées pendant une incubation de 3 h en tampon T-TBS lait ou T-TBS BSA (T-TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM ; Tween-20 0,1 %) ; Lait écrémé 5 % ou BSA 5 %) puis incubées pendant 1 nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de saturation (Tableau 8). Après 3 rinçages successifs au T-TBS pendant de 10 min, les membranes sont incubées pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans du T-TBS. Enfin, les membranes sont rincées 3 fois au T-TBS et les protéines immunomarquées sont révélées en utilisant le Kit Immobilon (WBKLS0500, Millipore). L'activité peroxydase couplé aux anticorps secondaires catalyse l'oxydation du luminole conduisant à l'émission de lumière. La chimioluminescence est détectée par des films photographiques sensibles (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

Zymographie en gel de gélatine

Pour détecter l'activité des gélatinases, un gel de polyacrylamide de 9% est copolymérisé avec de la gélatine à la concentration finale de 0,1 %. 60 µL d'ascite ou de plasma sont dilués au 1/100 et déposés dans chaque puits (environ 30 µg de protéines/puits). Après migration à 20 mA/gel à +10°C dans du tampon de migration, les gels sont rincés 3 fois 20 min dans du tampon Triton X100 2,5 % afin d'éliminer le SDS. Les gels sont ensuite incubés dans du tampon d'activation (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; CaCl₂ 5 mM ; ZnCl₂ 1 µM ; Brij-35 0,03 % ; NaN₃ 0,02%) pendant 1 nuit à 37 °C. La présence de protéine est révélée par une coloration de 30 min dans une solution de bleu de Coomassie R250 0,25 % ; acide acétique 7 % ; éthanol 40 %. Les activités gélatinolytiques sont révélées par les zones de lyse grâce à la décoloration dans une solution d'acide acétique 10 % ; éthanol 20 %.

Immunodétection des métalloprotéases et de leurs inhibiteurs

Pour la détection des métalloprotéases (MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13) et de leurs inhibiteurs, les TIMPs (TIMP-1, -2, -4), une puce à anticorps a été utilisée (Human MMP array, Ray Biotech). Des anticorps de captures spécifiques des différentes cibles d'intérêt sont déposés sur une membrane de nitrocellulose. L'ascite diluée au dixième dans du PBS est incubée avec la membrane pendant 1 h à température ambiante. Les MMP et les TIMP fixés par les anticorps de capture sont révélés par un immunomarquage et la détection se fait par chimioluminescence comme pour les Western blots.

Dosage ELISA

Pro-MMP-2

La pro-MMP-2 est dosée par un kit commercial (Human MMP-2 Immunoassay Kit, ECM492 Millipore). Ce kit permet également la détection des pro-MMP-2 complexées avec le TIMP-2. Des anticorps anti-pro-MMP-2 immobilisés sur des billes sont incubés avec les prélèvements ascitiques ou plasmatiques. Les billes sont rincées puis la pro-MMP-2 retenue sur les billes est révélée par un anticorps anti-pro-MMP-2 couplé à une enzyme. Un substrat chromogène (o-phénylènediamine) est incubé avec les billes. Après arrêt de la réaction et l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 492 nm. Par comparaison avec la gamme étalon, la concentration en pro-MMP-2 dans l'échantillon peut être déterminée.

Vitronectine

La Vn est dosée par un kit commercial (TC12120, Technoclone). Un anticorps monoclonal anti-vitronectine est déposé au fond des puits d'une plaque 96 puits. L'ascite ou le plasma sont dilués et incubés 2h à 37°C avec l'anticorps de capture. La révélation est réalisée par un anticorps polyclonal anti-vitronectine couplé à la peroxydase capable de dégrader un substrat chromogène, le tétraméthylbenzidine (TMB). La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique et l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm. Par comparaison avec la gamme étalon, la concentration en Vn dans les échantillons peut être déterminée.

Fibronectine

Pour le dosage de la Fn, l'anticorps polyclonal anti-Fn (F3648 Sigma Aldrich) a été utilisé comme anticorps de capture. Il a été dilué dans du tampon sodium bicarbonate 0,1 M; sodium carbonate 0,1 M pH 9.6; et coaté 1 nuit à 4°C. Trois rinçages en PBS ; Tween-20 0,1% pendant 5 min sont effectués entre chaque étapes. La saturation est réalisée en PBS ; BSA 1 % pendant 1h à température ambiante. Les échantillons dilués dans le tampon de saturation sont incubés 2h à température ambiante. Après les rinçages, l'anticorps primaire anti-cell binding domain de la Fn (mab 1926, Millipore) est dilué dans du tampon de saturation et incubé 2h à température ambiante. Puis l'anticorps secondaire anti-mouse IgG couplé à la phosphatase alcaline est dilué dans du tampon de saturation et incubé 1 heure à température ambiante (A5324, Sigma Aldrich). La révélation se fait par ajout de Para-nitrophénylphosphate (PNPP) et une incubation à 37°C. La réaction est arrêtée par du NaOH 3 M et l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 405 nm. Par comparaison avec la gamme étalon, la concentration en Fn dans les échantillons peut être déterminée.

Purification simultanée de la Fn et de la Vn ascitiques

Toutes les étapes de purification sont réalisées à 8°C avec un AKTA Purifier 10 UPC (GE Healthcare). Les colonnes de chromatographies d'affinités de Gélatine Sepharose 6B et d'Héparine Sepharose Fast Flow Medium sont obtenues auprès de GE Healthcare.

La fibronectine est purifiée par un protocole en trois étapes adapté d'après Poulouin *et al.* (Poulouin *et al.*, 1999). Les échantillons d'ascites sont chargés sur une colonne Gélatine Sepharose (C16/40, 40 mL) équilibrée en tampon TE (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; EDTA 1 mM) contenant du NaCl à 500 mM avec un débit de 30 cm/h). La colonne est rincée 3 fois avec du tampon TE/NaCl 500 mM. Les protéines contenues dans le non-retenu sont conservées pour la purification de la vitronectine. Les protéines retenues sont éluées par du tampon TE contenant de l'urée à 3 M et du NaCl à 250 mM. Les protéines éluées sont diluées avec du TE dans le but de diminuer la conductivité en dessous de 15 ms/cm, puis les échantillons sont chargés avec un flux de 60 cm/h sur la colonne héparine Sepharose (C16/70, 60 mL) équilibrée avec du tampon TE/NaCl 75 mM. Les protéines retenues sont éluées avec du tampon TE/NaCl 500 mM. Une seconde colonne de gélatine Sepharose (C16/20, 10 mL) d'un

plus petit volume est réalisée selon le même protocole que la première, dans le but de concentrer la Fn purifiée.

Pour purifier la vitronectine, le non-retenu de la première colonne de gélatine Sepharose est chargé sur une colonne d'héparine sepharose (C16/70, 60 mL) qui a été équilibrée avec du tampon TE/NaCl 150 mM. Après rinçage avec le TE/NaCl 150 mM, le non-retenu est complété avec 6 M d'urée et agité pendant 3 h. Avant de charger ce mélange, la colonne d'héparine Sepharose est régénérée avec du TE/Urée 6M/NaCl 1 M puis équilibrée avec du TE/NaCl 150 mM/Urée 6 M. Finalement, la colonne est traitée avec 0,5 % de 2-mercaptoéthanol pour décrocher les éventuels contaminants liés par des ponts disulfures comme décrit par Yatohgo *et al* (Yatohgo *et al.*, 1988). La Vn ascitique est éluée avec du tampon TE/NaCl 1 M/Urée 6M. Pour optimiser le protocole, la colonne d'héparine Sepharose est régénérée entre chaque étapes avec du TE/Urée 6M/NaCl 1 M pour permettre l'utilisation de la même colonne pour l'ensemble du protocole.

La Fn et la Vn sont également purifiées selon ce protocole à partir de plasma de donneurs sains pour servir de référence. Le plasma est fourni par l'Etablissement Français du Sang (EFS).

Spectroscopie fluorescence

Les spectres d'émission de fluorescence sont obtenus avec un spectrofluorimètre (Perkin Elmer LS 50B) équipé d'un porte cuve thermostaté. La concentration des protéines étudiée (Vn et Fn) est ajustée avant la mesure à 12 μ M. Les spectres d'émission de fluorescence sont mesurés avec une cuve d'une largeur de 1 cm à une température constante de 25°C. La fluorescence intrinsèque est enregistrée de 310 à 410 nm à 100 nm/min et une excitation à 295 nm. Le blanc est effectué avec le tampon seul.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS peut être utilisée pour mesurer la taille des particules et des molécules. Cette technique mesure la diffusion des particules qui se déplacent dans un fluide selon un mouvement Brownien, et la convertit en taille et en distribution de taille des particules.

Les protéines purifiées sont dialysées avant l'expérience dans du tampon Hepes 10 mM pH 7,4 et leurs concentrations sont ajustées à 0,1 g/L. Dans le but de conserver les

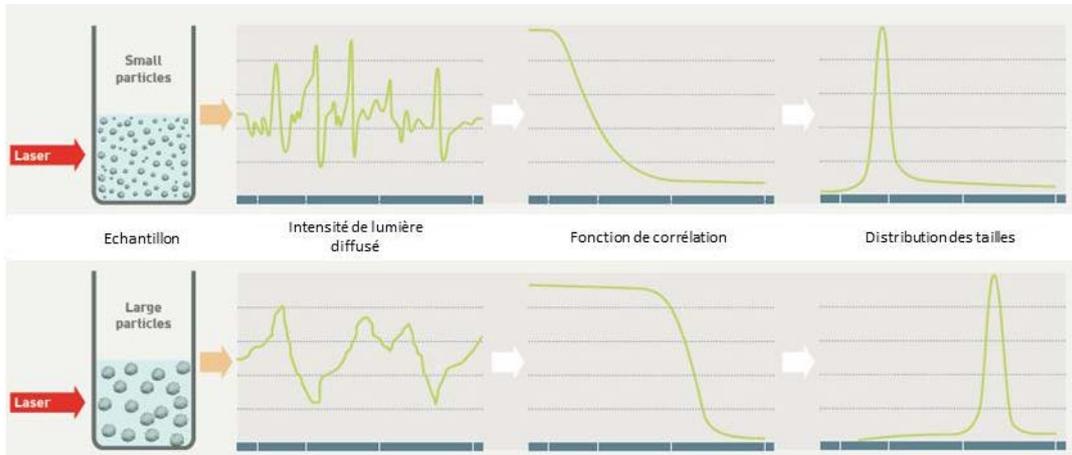


Figure 71 Principe de l'analyse par diffusion dynamique de la lumière

D'après la documentation du Zetasizer NanoZS (Malvern).

éventuels agrégats de protéines, les échantillons ne sont pas filtrés. La distribution des tailles (rayon hydrodynamique) des protéines est mesurée par diffusion dynamique de la lumière avec un Zetasizer NanoZS (Malvern) contenant un laser à 633 nm (He-Ne). Les diamètres des particules mesurés doivent être compris entre 0,3 nm et 10 μm . La précision de la mesure est de $\pm 2\%$. La lumière diffusée est détectée avec un angle de 173° à une température constante de 25°C . L'expérience est réalisée après un temps d'équilibration de 60 s dans une cuve en quartz de 1,4 mL. Une moyenne de 10 mesures de 10 s est réalisée par échantillon. La distribution des tailles est dérivée de la déconvolution de l'intensité mesurée par la fonction d'autocorrélation en utilisant les algorithmes fournis par le logiciel Zetasizer. La distribution des tailles est exprimée comme une intensité de distribution dans le but d'analyser le rayon hydrodynamique des protéines et d'évaluer la présence de complexes supramoléculaires (Figure 71).

Analyses statistiques

Les données sont exprimées par la moyenne \pm l'écart type d'au moins trois expériences indépendantes. Le test de Student est utilisé pour déterminer les différences significatives entre les résultats. La significativité des résultats est indiquée par *, ** et *** si les probabilités sont respectivement de $<0,05$; $<0,01$ ou $<0,001$.

Références bibliographiques

- A** Adam, A.P., George, A., Schewe, D., Bragado, P., Iglesias, B.V., Ranganathan, A.C., Kourtidis, A., Conklin, D.S., Aguirre-Ghiso, J.A., 2009. Computational Identification of a p38SAPK-Regulated Transcription Factor Network Required for Tumor Cell Quiescence. *Cancer Res.* 69, 5664–5672.
- Adamsen, S., Jönsson, P., Brodin, B., Lindberg, B., Jorpes, P., 1991. Measurement of fibronectin concentration in benign and malignant ascites. *Eur. J. Surg. Acta Chir.* 157, 325–328.
- Ahmed, N., Abubaker, K., Findlay, J., Quinn, M., 2010. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 10, 268–278.
- Ahmed, N., Pansino, F., Clyde, R., Murthi, P., Quinn, M.A., Rice, G.E., Agrez, M.V., Mok, S., Baker, M.S., 2002. Overexpression of $\alpha\beta 6$ integrin in serous epithelial ovarian cancer regulates extracellular matrix degradation via the plasminogen activation cascade. *Carcinogenesis* 23, 237–244.
- Ahmed, N., Riley, C., Oliva, K., Rice, G., Quinn, M., 2005. Ascites induces modulation of $\alpha 6\beta 1$ integrin and urokinase plasminogen activator receptor expression and associated functions in ovarian carcinoma. *Br. J. Cancer* 92, 1475–1485.
- Ahmed, N., Riley, C., Rice, G., Quinn, M., 2005. Role of Integrin Receptors for Fibronectin, Collagen and Laminin in the Regulation of Ovarian Carcinoma Functions in Response to a Matrix Microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis* 22, 391–402.
- Ahmed, N., Stenvers, K.L., 2013. Getting to Know Ovarian Cancer Ascites: Opportunities for Targeted Therapy-Based Translational Research. *Front. Oncol.* 3, 256.
- Ahmed, N., Thompson, E.W., Quinn, M.A., 2007. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J. Cell. Physiol.* 213, 581–588.
- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., Kholodenko, B.N., 2012. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 139–146.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. The Extracellular Matrix of Animals [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/> (accessed 4.22.13).
- Altomare, D.A., Testa, J.R., 2005. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455–7464.
- Aoudjit, F., Vuori, K., 2012. Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance. *Chemother. Res. Pract.* 2012, 1–16.
- Auersperg, N., 2013. The origin of ovarian cancers - hypotheses and controversies. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 5, 709–719.
- Auersperg, N., Wong, A.S., Choi, K.C., Kang, S.K., Leung, P.C., 2001. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr. Rev.* 22, 255–288.
- B** anerjee, S., Kaye, S.B., 2013. New Strategies in the treatment of ovarian cancer - current clinical perspectives and future potential. *Clin. Cancer Res.*
- Bapat, S.A., 2010. Human ovarian cancer stem cells. *Reprod. Camb. Engl.* 140, 33–41.
- Basu, A., Tu, H., 2005. Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase Cdelta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1068–1073.

- Bauer, K., Mierke, C., Behrens, J., 2007. Expression profiling reveals genes associated with transendothelial migration of tumor cells: A functional role for $\alpha\beta 3$ integrin. *Int. J. Cancer* 121, 1910–1918.
- Bénard, J., Da Silva, J., De Blois, M.C., Boyer, P., Duvillard, P., Chiric, E., Riou, G., 1985. Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res.* 45, 4970–4979.
- Benoit, Y.D., Groulx, J.-F., Gagne, D., Beaulieu, J.-F., 2012. RGD-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt. *J. Signal Transduct.* 2012.
- Bergmeier, W., Hynes, R.O., 2012. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Bowen, N.J., Walker, L.D., Matyunina, L.V., Logani, S., Totten, K.A., Benigno, B.B., McDonald, J.F., 2009. Gene expression profiling supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotent and capable of serving as ovarian cancer initiating cells. *BMC Med. Genomics* 2, 71.
- Braicu, E.-I., Sehouli, J., Richter, R., Pietzner, K., Denkert, C., Fotopoulou, C., 2011. Role of histological type on surgical outcome and survival following radical primary tumour debulking of epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancers. *Br. J. Cancer* 105, 1818–1824.
- Brooks, P.C., Klemke, R.L., Schon, S., Lewis, J.M., Schwartz, M.A., Cheresch, D.A., 1997. Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin alpha v beta 5 to promote tumor cell dissemination in vivo. *J. Clin. Invest.* 99, 1390–1398.
- Burleson, K.M., Boente, M.P., Pambuccian, S.E., Skubitz, A.P.N., 2006. Disaggregation and invasion of ovarian carcinoma ascites spheroids. *J. Transl. Med.* 4, 6.
- Burleson, K.M., Casey, R.C., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema Jr., T.R., Skubitz, A.P., 2004. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol. Oncol.* 93, 170–181.
- Byers, L.J., Osborne, J.L., Carson, L.F., Carter, J.R., Haney, A.F., Weinberg, J.B., Ramakrishnan, S., 1995. Increased levels of laminin in ascitic fluid of patients with ovarian cancer. *Cancer Lett.* 88, 67–72.
- C**ampbell, I.D., Humphries, M.J., 2011. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Cannistra, S.A., 2004. Cancer of the Ovary. *N. Engl. J. Med.* 351, 2519–2529.
- Cannistra, S.A., Ottensmeier, C., Niloff, J., Orta, B., DiCarlo, J., 1995. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 58, 216–225.
- Carracedo, A., Pandolfi, P.P., 2008. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27, 5527–5541.
- Carreiras, F., Cruet, S., Staedel, C., Sichel, F., Gauduchon, P., 1999a. Human ovarian adenocarcinoma cells synthesize vitronectin and use It to organize their adhesion. *Gynecol. Oncol.* 72, 312–322.
- Carreiras, F., Cruet, S., Staedel, C., Sichel, F., Gauduchon, P., 1999b. Human ovarian adenocarcinoma cells synthesize vitronectin and use It to organize their adhesion. *Gynecol. Oncol.* 72, 312–322.
- Carreiras, F., Denoux, Y., Staedel, C., Lehmann, M., Sichel, F., Gauduchon, P., 1996. Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 62, 260–267.

- Carreiras, F., Rigot, V., Cruet, S., Andre, F., Gauduchon, P., Marvaldi, J., 1999c. Migration properties of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1: importance of alpha(v)beta3 integrins and vitronectin. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 80, 285–294.
- Carreiras, F., Thiébot, B., Leroy-Dudal, J., Maubant, S., Breton, M.-F., Darbeida, H., 2002. Involvement of alphavbeta 3 integrin and disruption of endothelial fibronectin network during the adhesion of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1 on the human umbilical vein cell extracellular matrix. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 99, 800–808.
- Casey, R.C., Burlison, K.M., Skubitz, K.M., Pambuccian, S.E., Oegema, T.R., Jr, Ruff, L.E., Skubitz, A.P., 2001. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am. J. Pathol.* 159, 2071–2080.
- Castells, M., Thibault, B., Mery, E., Golzio, M., Pasquet, M., Hennebelle, I., Bourin, P., Mirshahi, M., Delord, J.P., Querleu, D., Couderc, B., 2012. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* 326, 59–68.
- Chain, D., Kreizman, T., Shapira, H., Shaltiel, S., 1991. Plasmin cleavage of vitronectin. Identification of the site and consequent attenuation in binding plasminogen activator inhibitor-1. *FEBS Lett.* 285, 251–256.
- Cho, J., Mosher, D.F., 2006. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* 4, 1461–1469.
- Christie, D.R., Shaikh, F.M., Lucas, J.A., 4th, Lucas, J.A., 3rd, Bellis, S.L., 2008. ST6Gal-I expression in ovarian cancer cells promotes an invasive phenotype by altering integrin glycosylation and function. *J. Ovarian Res.* 1, 3.
- Chu, Y., Yang, Y., Lin, M., Wang, Z., 2002. Detection of laminin in serum and ascites from patients with epithelial ovarian tumor. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 22, 58–59, 68.
- Chua, K.-N., Poon, K.L., Lim, J., Sim, W.-J., Huang, R.Y.-J., Thiery, J.P., 2011. Target cell movement in tumor and cardiovascular diseases based on the epithelial–mesenchymal transition concept. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 558–567.
- Coombe, D., Dye, D., 2010. Feature, Structure and Classification of Adhesion Molecules: An Overview.
- Correa, R.J.M., Peart, T., Valdes, Y.R., DiMattia, G.E., Shepherd, T.G., 2012. Modulation of AKT activity is associated with reversible dormancy in ascites-derived epithelial ovarian cancer spheroids. *Carcinogenesis* 33, 49–58.
- Cruet-Hennequart, S., Maubant, S., Luis, J., Gauduchon, P., Staedel, C., Dedhar, S., 2003. alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene* 22, 1688–1702.
- Cully, M., You, H., Levine, A.J., Mak, T.W., 2006. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6, 184–192.
- D**avidson, B., Goldberg, I., Reich, R., Tell, L., Dong, H.P., Trope', C.G., Risberg, B., Kopolovic, J., 2003. α V- and β 1-integrin subunits are commonly expressed in malignant effusions from ovarian carcinoma patients. *Gynecol. Oncol.* 90, 248–257.
- Davis, G.E., Bayless, K.J., Davis, M.J., Meininger, G.A., 2000. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. Pathol.* 156, 1489–1498.

- Desgrosellier, J.S., Barnes, L.A., Shields, D.J., Huang, M., Lau, S.K., Prévost, N., Tarin, D., Shattil, S.J., Cheresch, D.A., 2009. An integrin alpha(v)beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. *Nat. Med.* 15, 1163–1169.
- Desgrosellier, J.S., Cheresch, D.A., 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10, 9–22.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–3290.
- E**ngel, J., Chiquet, M., 2011. An Overview of Extracellular Matrix Structure and Function. In: Mecham, R.P. (Ed.), *The Extracellular Matrix: An Overview, Biology of Extracellular Matrix*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–39.
- Esko, J.D., Kimata, K., Lindahl, U., 2009. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- F**aleiro-Rodrigues, C., Macedo-Pinto, I., Pereira, D., Lopes, C.S., 2004. Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 15, 1535–1542.
- Fathalla, M.F., 1971. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2, 163.
- Feki, A., Berardi, P., Bellingan, G., Major, A., Krause, K.-H., Petignat, P., Zehra, R., Pervaiz, S., Irminger-Finger, I., 2009. Dissemination of intraperitoneal ovarian cancer: Discussion of mechanisms and demonstration of lymphatic spreading in ovarian cancer model. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 72, 1–9.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917.
- French-Constant, C., 1995. Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions. *Exp. Cell Res.* 221, 261–271.
- Flessner, M.F., 2005. The transport barrier in intraperitoneal therapy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288, F433–442.
- Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T., 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221–226.
- Folkens, A.K., Longacre, T.A., 2013. Hereditary gynaecological malignancies: advances in screening and treatment. *Histopathology* 62, 2–30.
- Forbes, S.A., Tang, G., Bindal, N., Bamford, S., Dawson, E., Cole, C., Kok, C.Y., Jia, M., Ewing, R., Menzies, A., Teague, J.W., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2009. COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 38, D652–D657.
- Frankel, A., Buckman, R., Kerbel, R.S., 1997. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 57, 2388–2393.
- Frisch, S.M., Schaller, M., Cieply, B., 2013. Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J. Cell Sci.* 126, 21–29.
- G**echtman, Z., Belleli, A., Lechpammer, S., Shaltiel, S., 1997. The cluster of basic amino acids in vitronectin contributes to its binding of plasminogen activator inhibitor-1: evidence from thrombin-, elastase- and plasmin-cleaved vitronectins and anti-peptide antibodies. *Biochem. J.* 325 (Pt 2), 339–349.

- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M., 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 793–805.
- Geiger, B., Yamada, K.M., 2011. Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005033–a005033.
- Geiger, T., Zaidel-Bar, R., 2012. Opening the floodgates: proteomics and the integrin adhesome. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 562–568.
- Gershon, E., Plaks, V., Dekel, N., 2008. Gap junctions in the ovary: Expression, localization and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 282, 18–25.
- Goncharenko-Khaider, N., Matte, I., Lane, D., Rancourt, C., Piché, A., 2012. Ovarian cancer ascites increase Mcl-1 expression in tumor cells through ERK1/2-Elk-1 signaling to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Cancer* 11, 84.
- Graves, L.E., Ariztia, E.V., Navari, J.R., Matzel, H.J., Stack, M.S., Fishman, D.A., 2004. Proinvasive Properties of Ovarian Cancer Ascites-Derived Membrane Vesicles. *Cancer Res.* 64, 7045–7049.
- Greaves, M., Maley, C.C., 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.
- Greciano, P.G., Moyano, J.V., Buschmann, M.M., Tang, J., Lu, Y., Rudnicki, J., Manninen, A., Matlin, K.S., 2012. Laminin 511 partners with laminin 332 to mediate directional migration of Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 23, 121–136.
- Guadamillas, M.C., Cerezo, A., Pozo, M.A. del, 2011. Overcoming anoikis – pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J. Cell Sci.* 124, 3189–3197.
- Guo, W., Giancotti, F.G., 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 816–826.
- Guo, Y., Nemeth, J., O'Brien, C., Susa, M., Liu, X., Zhang, Z., Choy, E., Mankin, H., Hornicek, F., Duan, Z., 2010. Effects of siltuximab on the IL-6-induced signaling pathway in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 5759–5769.
- Gupta, G.P., Massagué, J., 2006. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 127, 679–695.
- H**apke, S., Kessler, H., Lubber, B., Bengel, A., Hutzler, P., Höfler, H., Schmitt, M., Reuning, U., 2003. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin $\alpha(v)\beta3$ /Vitronectin interaction. *Biol. Chem.* 384, 1073–1083.
- Hemmings, B.A., Restuccia, D.F., 2012. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011189.
- Herr, D., Sallmann, A., Bekes, I., Konrad, R., Holzheu, I., Kreienberg, R., Wulff, C., 2012. VEGF induces ascites in ovarian cancer patients via increasing peritoneal permeability by downregulation of Claudin 5. *Gynecol. Oncol.* 127, 210–216.
- Heyman, L., Kellouche, S., Fernandes, J., Dutoit, S., Poulain, L., Carreiras, F., 2008. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 29, 231–244.
- Heyman, L., Leroy-Dudal, J., Fernandes, J., Seyer, D., Dutoit, S., Carreiras, F., 2010. Mesothelial vitronectin stimulates migration of ovarian cancer cells. *Cell Biol. Int.* 34, 493–502.
- Hillen, F., Griffioen, A.W., 2007. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 489–502.

- Ho, C.-M., Chang, S.-F., Hsiao, C.-C., Chien, T.-Y., Shih, D., 2012. Isolation and characterization of stromal progenitor cells from ascites of patients with epithelial ovarian adenocarcinoma. *J. Biomed. Sci.* 19, 23.
- Hohenester, E., Yurchenco, P.D., 2013. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhes. Migr.* 7, 56–63.
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Altekruse, S., Kosary, C., Ruhl, J., Talaovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Eisner, M., Lewis, D., Chen, H., Feuer, E., Cronin KA, 2011. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations). Natl. Cancer Inst. Bethesda MD posted to the SEER web site.
- Huang, R.-L., Gu, F., Kirma, N.B., Ruan, J., Chen, C.-L., Wang, H.-C., Liao, Y.-P., Chang, C.-C., Yu, M.-H., Pilrose, J.M., Thompson, I.M., Huang, H.-C., Huang, T.H.-M., Nephew, H.-C.L. and K.P., 2013. Comprehensive methylome analysis of ovarian tumors reveals hedgehog signaling pathway regulators as prognostic DNA methylation biomarkers. *Epigenetics* 8, 624–634.
- Hulpiau, P., Gul, I.S., van Roy, F., 2013. Chapter Four - New Insights into the Evolution of Metazoan Cadherins and Catenins. In: Frans van Roy (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science, The Molecular Biology of Cadherins*. Academic Press, pp. 71–94.
- Humphries, J.D., Byron, A., Humphries, M.J., 2006. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* 119, 3901–3903.
- Hynes, R., 1985. Molecular biology of fibronectin. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 67–90.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.
- Hynes, R.O., Naba, A., 2012. Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Imai, K., Shikata, H., Okada, Y., 1995. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett.* 369, 249–251.
- INCA, HAS, 2010. Guide - Affection longue durée - Cancer de l'ovaire.
- Iozzo, R.V., Sanderson, R.D., 2011. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1013–1031.
- Iwanicki, M.P., Davidowitz, R.A., Ng, M.R., Besser, A., Muranen, T., Merritt, M., Danuser, G., Ince, T.A., Ince, T., Brugge, J.S., 2011. Ovarian cancer spheroids use myosin-generated force to clear the mesothelium. *Cancer Discov.* 1, 144–157.
- Jain, R.K., Carmeliet, P., 2012. SnapShot: Tumor Angiogenesis. *Cell* 149, 1408–1408.e1.
- Janković, M.M., Kosanović, M.M., 2008. Fibronectin pattern in benign hyperplasia and cancer of the prostate. *Dis. Markers* 25, 49–58.
- Jones, G.E., Arumugham, R.G., Tanzer, M.L., 1986. Fibronectin glycosylation modulates fibroblast adhesion and spreading. *J. Cell Biol.* 103, 1663–1670.
- Kamarajan, P., Garcia-Pardo, A., D'Silva, N.J., Kapila, Y.L., 2010. The CS1 segment of fibronectin is involved in human OSCC pathogenesis by mediating OSCC cell spreading, migration, and invasion. *BMC Cancer* 10, 330.
- Kang, H.-G., Jenabi, J.M., Zhang, J., Keshelava, N., Shimada, H., May, W.A., Ng, T., Reynolds, C.P., Triche, T.J., Sorensen, P.H.B., 2007. E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer Res.* 67, 3094–3105.
- Karst, A.M., Drapkin, R., 2010. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution. *J. Oncol.* 2010, 1–13.

- Kellouche, S., Fernandes, J., Leroy-Dudal, J., Gallet, O., Dutoit, S., Poulain, L., Carreiras, F., 2010. Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 31, 129–139.
- Kenny, H.A., Kaur, S., Coussens, L.M., Lengyel, E., 2008. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J. Clin. Invest.* 118, 1367–1379.
- Kipps, E., Tan, D.S.P., Kaye, S.B., 2013. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat. Rev. Cancer* 13, 273–282.
- Kohn, E. c., Travers, L. a., Kassis, J., Broome, U., Klominek, J., 2005. Malignant effusions are sources of fibronectin and other promigratory and proinvasive components. *Diagn. Cytopathol.* 33, 300–308.
- Koizumi, K., Takano, K., Kaneyasu, A., Watanabe-Takano, H., Tokuda, E., Abe, T., Watanabe, N., Takenawa, T., Endo, T., 2012. RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. *Mol. Biol. Cell* 23, 4647–4661.
- Kolset, S.O., Prydz, K., Pejler, G., 2004. Intracellular proteoglycans. *Biochem. J.* 379, 217–227.
- Kurman, R.J., Shih, I.-M., 2011. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer—Shifting the paradigm. *Hum. Pathol.* 42, 918–931.
- Kuzmanov, U., Jiang, N., Smith, C.R., Soosaipillai, A., Diamandis, E.P., 2008. Differential N-glycosylation of Kallikrein 6 Derived from Ovarian Cancer Cells or the Central Nervous System. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 791–798.
- Kuzmanov, U., Smith, C.R., Batruch, I., Soosaipillai, A., Diamandis, A., Diamandis, E.P., 2012. Separation of kallikrein 6 glycoprotein subpopulations in biological fluids by anion-exchange chromatography coupled to ELISA and identification by mass spectrometry. *Proteomics* 12, 799–809.
- Labat-Robert, J., 2012. Cell-Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. *Pathol. Biol. (Paris)* 60, 15–19.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Landen, C.N., Birrer, M.J., Sood, A.K., 2008. Early Events in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 995–1005.
- Lane, D., Goncharenko-Khaider, N., Rancourt, C., Piché, A., 2010. Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through alphavbeta5 integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation. *Oncogene* 29, 3519–3531.
- Lane, D., Matte, I., Rancourt, C., Piché, A., 2012. Osteoprotegerin (OPG) protects ovarian cancer cells from TRAIL-induced apoptosis but does not contribute to malignant ascites-mediated attenuation of TRAIL-induced apoptosis. *J. Ovarian Res.* 5, 34.
- Latifi, A., Luwor, R.B., Bilandzic, M., Nazaretian, S., Stenvers, K., Pyman, J., Zhu, H., Thompson, E.W., Quinn, M.A., Findlay, J.K., Ahmed, N., 2012. Isolation and characterization of tumor cells from the ascites of ovarian cancer patients: molecular phenotype of chemoresistant ovarian tumors. *PLoS One* 7, e46858.
- Leeming, D.J., Bay-Jensen, A.C., Vassiliadis, E., Larsen, M.R., Henriksen, K., Karsdal, M.A., 2011. Post-translational modifications of the extracellular matrix are key events in cancer progression: opportunities for biochemical marker development. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 16, 193–205.
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J., 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.

- Leroy-Dudal, J., Demeilliers, C., Gallet, O., Pauthe, E., Dutoit, S., Agniel, R., Gauduchon, P., Carreiras, F., 2005a. Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves α v integrins and the participation of MMP2. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 114, 531–543.
- Leroy-Dudal, J., Demeilliers, C., Gallet, O., Pauthe, E., Dutoit, S., Agniel, R., Gauduchon, P., Carreiras, F., 2005b. Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves α v integrins and the participation of MMP2. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 114, 531–543.
- Leroy-Dudal, J., Heyman, L., Gauduchon, P., Carreiras, F., 2005c. Adhesion of human ovarian adenocarcinoma IGROV1 cells to endothelial cells is partly mediated by the α v integrins-vitronectin adhesive system and induces an alteration of endothelial integrity. *Cell Biol. Int.* 29, 482–488.
- Leroy-Dudal, J., Kellouche, S., Gauduchon, P., Carreiras, F., 2008. [Epithelial ovarian tumor microecology]. *Bull. Cancer (Paris)* 95, 829–839.
- Lou, E., Fujisawa, S., Barlas, A., Romin, Y., Manova-Todorova, K., Moore, M.A.S., Subramanian, S., 2012. Tunneling Nanotubes: A new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer. *Commun. Integr. Biol.* 5, 399–403.
- M**acciò, A., Madeddu, C., 2012. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine* 58, 133–147.
- Madsen, C.D., Sidenius, N., 2008. The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 617–629.
- Mamuya, F.A., Duncan, M.K., 2012. α v integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 445–455.
- Masoumi Moghaddam, S., Amini, A., Morris, D.L., Pourgholami, M.H., 2011. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 143–162.
- Matte, I., Lane, D., Laplante, C., Rancourt, C., Piché, A., 2012. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am. J. Cancer Res.* 2, 566–580.
- Maubant, S., Cruet-Hennequart, S., Dutoit, S., Denoux, Y., Crouet, H., Henry-Amar, M., Gauduchon, P., 2005. Expression of α v-associated integrin beta subunits in epithelial ovarian cancer and its relation to prognosis in patients treated with platinum-based regimens. *J. Mol. Histol.* 36, 119–129.
- Menzin, A.W., Loret de Mola, J.R., Bilker, W.B., Wheeler, J.E., Rubin, S.C., Feinberg, R.F., 1998. Identification of oncofetal fibronectin in patients with advanced epithelial ovarian cancer: detection in ascitic fluid and localization to primary sites and metastatic implants. *Cancer* 82, 152–158.
- Mertens-Walker, I., Baxter, R.C., Marsh, D.J., 2012. Gonadotropin signalling in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett.* 324, 152–159.
- Meunier, L., Puiffe, M.-L., Le Page, C., Filali-Mouhim, A., Chevrette, M., Tonin, P.N., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.-M., 2010a. Effect of ovarian cancer ascites on cell migration and gene expression in an epithelial ovarian cancer in vitro model. *Transl. Oncol.* 3, 230–238.
- Meunier, L., Puiffe, M.-L., Le Page, C., Filali-Mouhim, A., Chevrette, M., Tonin, P.N., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.-M., 2010b. Effect of ovarian cancer ascites on cell migration and gene expression in an epithelial ovarian cancer in vitro model. *Transl. Oncol.* 3, 230–238.

- Meyer, N., Penn, L.Z., 2008. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* 8, 976–990.
- Mezzanzanica, D., Bagnoli, M., De Cecco, L., Valeri, B., Canevari, S., 2010. Role of microRNAs in ovarian cancer pathogenesis and potential clinical implications. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1262–1272.
- Milis, L., Morris, C.A., Sheehan, M.C., Charlesworth, J.A., Pussell, B.A., 1993. Vitronectin-mediated inhibition of complement: evidence for different binding sites for C5b-7 and C9. *Clin. Exp. Immunol.* 92, 114–119.
- Mitra, A.K., Zillhardt, M., Hua, Y., Tiwari, P., Murmann, A.E., Peter, M.E., Lengyel, E., 2012. MicroRNAs Reprogram Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts in Ovarian Cancer. *Cancer Discov.* 2, 1100–1108.
- Moreno-Bueno, G., Peinado, H., Molina, P., Olmeda, D., Cubillo, E., Santos, V., Palacios, J., Portillo, F., Cano, A., 2009. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat. Protoc.* 4, 1591–1613.
- Morin, P.J., 2007. Claudin proteins in ovarian cancer. *Dis. Markers* 23, 453–457.
- Morrison, D.K., 2012. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Mosesson, M.W., Umfleet, R.A., 1970. The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. *J. Biol. Chem.* 245, 5728–5736.
- Mostafavi-Pour, Z., Askari, J.A., Whittard, J.D., Humphries, M.J., 2001. Identification of a novel heparin-binding site in the alternatively spliced IIICS region of fibronectin: roles of integrins and proteoglycans in cell adhesion to fibronectin splice variants. *Matrix Biol.* 20, 63–73.
- Moyano, J.V., Carnemolla, B., Albar, J.P., Leprini, A., Gaggero, B., Zardi, L., Garcia-Pardo, A., 1999. Cooperative role for activated alpha4 beta1 integrin and chondroitin sulfate proteoglycans in cell adhesion to the heparin III domain of fibronectin. Identification of a novel heparin and cell binding sequence in repeat III5. *J. Biol. Chem.* 274, 135–142.
- Mutsaers, S.E., 2004. The mesothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 9–16.
- N**aba, A., Clauser, K.R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S.A., Hynes, R.O., 2012. The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11, M111.014647.
- Nam, E., Lee, M., Yim, G., Kim, J., Kim, Sunghoon, Kim, Sang, Kim, Y., 2012. MicroRNA profiling of a CD133+ spheroid-forming subpopulation of the OVCAR3 human ovarian cancer cell line. *BMC Med. Genomics* 5, 18.
- Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C.V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M.R., Romero, I.L., Carey, M.S., Mills, G.B., Hotamisligil, G.S., Yamada, S.D., Peter, M.E., Gwin, K., Lengyel, E., 2011. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* 17, 1498–1503.
- O**kamura, H., Katabuchi, H., 2005. Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian carcinogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 242, 1–54.
- Oza, A.M., Castonguay, V., Tsoref, D., Diaz-Padilla, I., Karakasis, K., Mackay, H., Welch, S., Weberpals, J., Hoskins, P., Plante, M., Provencher, D., Tonkin, K., Covens, A., Ghatage, P., Gregoire, J., Hirte, H., Miller, D., Rosen, B., Maroun, J., Buyse, M., Coens, C., Brady, M.F., Stuart, G.C.E., 2011. Progression-free survival in advanced ovarian cancer: a Canadian review and expert panel perspective. *Curr. Oncol.* 18, S20–S27.
- Ozols, R.F., 2006. Challenges for chemotherapy in ovarian cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 17 Suppl 5, v181–187.

- P**ankov, R., Cukierman, E., Katz, B.-Z., Matsumoto, K., Lin, D.C., Lin, S., Hahn, C., Yamada, K.M., 2000. Integrin Dynamics and Matrix Assembly Tensin-Dependent Translocation of $\alpha 5 \beta 1$ Integrins Promotes Early Fibronectin Fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 148, 1075–1090.
- Pankov, R., Yamada, K.M., 2002. Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3861–3863.
- Pasquet, M., Golzio, M., Mery, E., Rafii, A., Benabbou, N., Mirshahi, P., Hennebelle, I., Bourin, P., Allal, B., Teissie, J., Mirshahi, M., Couderc, B., 2010. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int. J. Cancer* 126, 2090–2101.
- Patel, S., Chaffotte, A.F., Goubard, F., Pauthe, E., 2004. Urea-induced sequential unfolding of fibronectin: a fluorescence spectroscopy and circular dichroism study. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 1724–1735.
- Paul, J.I., Hynes, R.O., 1984. Multiple fibronectin subunits and their post-translational modifications. *J. Biol. Chem.* 259, 13477–13487.
- Pease, J.C., Brewer, M., Tirnauer, J.S., 2012. Spontaneous spheroid budding from monolayers: a potential contribution to ovarian cancer dissemination. *Biol. Open* 1, 622–628.
- Poulouin, L., 2002. Caractérisation de la fibronectine du plasma sanguin et de son fragment de 60kDa : Purification, stabilité et analyse qualitative des glycosylations. Cergy-Pontoise.
- Poulouin, L., Gallet, O., Rouahi, M., Imhoff, J.-M., 1999. Plasma Fibronectin: Three Steps to Purification and Stability. *Protein Expr. Purif.* 17, 146–152.
- Preissner, K.T., 1991. Structure and biological role of vitronectin. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 275–310.
- Preissner, K.T., Reuning, U., 2011. Vitronectin in vascular context: facets of a multitaled matricellular protein. *Semin. Thromb. Hemost.* 37, 408–424.
- Preston, C.C., Goode, E.L., Hartmann, L.C., Kalli, K.R., Knutson, K.L., 2011. Immunity and immune suppression in human ovarian cancer. *Immunotherapy* 3, 539–556.
- R**afii, A., Mirshahi, P., Poupot, M., Faussat, A.-M., Simon, A., Ducros, E., Mery, E., Couderc, B., Lis, R., Capdet, J., Bergalet, J., Querleu, D., Dagonnet, F., Fournié, J.-J., Marie, J.-P., Pujade-Lauraine, E., Favre, G., Soria, J., Mirshahi, M., 2008. Oncologic Trogocytosis of an Original Stromal Cells Induces Chemoresistance of Ovarian Tumours. *PLoS ONE* 3, e3894.
- Reuning, U., 2011. Integrin $\alpha v \beta 3$ promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors. *J. Cell. Biochem.* 112, 1909–1919.
- Ricard-Blum, S., 2011. The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Ricciardelli, C., Rodgers, R.J., 2006. Extracellular matrix of ovarian tumors. *Semin. Reprod. Med.* 24, 270–282.
- Rizvi, I., Gurkan, U.A., Tasoglu, S., Alagic, N., Celli, J.P., Mensah, L.B., Mai, Z., Demirci, U., Hasan, T., 2013. Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E1974–E1983.
- Roberts, M.S., Woods, A.J., Dale, T.C., van der Sluijs, P., Norman, J.C., 2004. Protein Kinase B/Akt Acts via Glycogen Synthase Kinase 3 To Regulate Recycling of $\alpha 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ Integrins. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1505–1515.

- Rocco, M., Carson, M., Hantgan, R., McDonagh, J., Hermans, J., 1983. Dependence of the shape of the plasma fibronectin molecule on solvent composition. Ionic strength and glycerol content. *J. Biol. Chem.* 258, 14545–14549.
- Rodriguez, F.J., Lewis-Tuffin, L.J., Anastasiadis, P.Z., 2012. E-cadherin's dark side: Possible role in tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1826, 23–31.
- Roskelley, C.D., Bissell, M.J., 2002. The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Semin. Cancer Biol.* 12, 97–104.
- Rucci, N., DiGiacinto, C., Orrù, L., Millimaggi, D., Baron, R., Teti, A., 2005. A novel protein kinase C α -dependent signal to ERK1/2 activated by α V β 3 integrin in osteoclasts and in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *J. Cell Sci.* 118, 3263–3275.
- Ruoslahti, E., 1984. Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 3, 43–51.
- Saito, M., Tucker, D.K., Kohlhorst, D., Niessen, C.M., Kowalczyk, A.P., 2012. Classical and desmosomal cadherins at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 2547–2552.
- Sano, K., Asahi, M., Yanagibashi, M., Hashii, N., Itoh, S., Kawasaki, N., Ogawa, H., 2008. Glycosylation and ligand-binding activities of rat plasma fibronectin during liver regeneration after partial hepatectomy. *Carbohydr. Res.* 343, 2329–2335.
- Sano, K., Asanuma-Date, K., Arisaka, F., Hattori, S., Ogawa, H., 2007. Changes in glycosylation of vitronectin modulate multimerization and collagen binding during liver regeneration. *Glycobiology* 17, 784–794.
- Schauer, I.G., Sood, A.K., Mok, S., Liu, J., 2011. Cancer-Associated Fibroblasts and Their Putative Role in Potentiating the Initiation and Development of Epithelial Ovarian Cancer. *Neoplasia N. Y. N* 13, 393–405.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Schwartz, I., Kreizman, T., Brumfeld, V., Gechtman, Z., Seger, D., Shaltiel, S., 2002. The PKA phosphorylation of vitronectin: effect on conformation and function. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 246–252.
- Schwartz, I., Seger, D., Shaltiel, S., 1999. Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 539–544.
- Schwarzbauer, J.E., DeSimone, D.W., 2011. Fibronectins, Their Fibrillogenesis, and In Vivo Functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005041–a005041.
- Sehdev, A.S., Kurman, R.J., Kuhn, E., Shih, I.-M., 2010. Serous tubal intraepithelial carcinoma upregulates markers associated with high-grade serous carcinomas including Rsf-1 (HBXAP), cyclin E and fatty acid synthase. *Mod. Pathol.* 23, 844–855.
- Shattil, S.J., Kim, C., Ginsberg, M.H., 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 288–300.
- Shield, K., Ackland, M.L., Ahmed, N., Rice, G.E., 2009. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol. Oncol.* 113, 143–148.
- Shimoda, M., Mellody, K.T., Orimo, A., 2010. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 19–25.
- Siddiqui, R.A., Kochhar, R., Singh, V., Rajwanshi, A., Goenka, M.K., Mehta, S.K., 1992. Evaluation of fibronectin as a marker of malignant ascites. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 161–164.
- Simonin, K., Brotin, E., Dufort, S., Dutoit, S., Goux, D., N'diaye, M., Denoyelle, C., Gauduchon, P., Poulain, L., 2009. Mcl-1 is an important determinant of the apoptotic response to the BH3-mimetic molecule HA14-1 in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 8, 3162–3170.

- Singh, P., Carraher, C., Schwarzbauer, J.E., 2010. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 397–419.
- Skliris, A., Labropoulou, V.T., Papachristou, D.J., Aletras, A., Karamanos, N.K., Theocharis, A.D., 2013. Cell-surface serglycin promotes adhesion of myeloma cells to collagen type I and affects the expression of matrix metalloproteinases. *FEBS J.* 280, 2342–2352.
- Sodek, K.L., Murphy, K.J., Brown, T.J., Ringuette, M.J., 2012. Cell-cell and cell-matrix dynamics in intraperitoneal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 397–414.
- Somanath, P.R., Ciocea, A., Byzova, T.V., 2009. Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis. *Cell Biochem. Biophys.* 53, 53–64.
- Song, T., Choi, C.H., Cho, Y.J., Sung, C.O., Song, S.Y., Kim, T.-J., Bae, D.-S., Lee, J.-W., Kim, B.-G., 2012. Expression of 67-kDa laminin receptor was associated with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 125, 427–432.
- Spannuth, W.A., Sood, A.K., Coleman, R.L., 2008. Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5, 194–204.
- Steffensen, B., Chen, Z., Pal, S., Mikhailova, M., Su, J., Wang, Y., Xu, X., 2011. Fragmentation of fibronectin by inherent autolytic and matrix metalloproteinase activities. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 30, 34–42.
- Strauss, R., Li, Z.-Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Möller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P., Drescher, C., Urban, N., Bartek, J., Lieber, A., 2011. Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity. *PLoS ONE* 6, e16186.
- Stupack, D.G., Cheresch, D.A., 2002. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* 115, 3729–3738.
- T**akeuchi, K., Ito, F., 2011. Receptor Tyrosine Kinases and Targeted Cancer Therapeutics. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1774–1780.
- Tan, D.S.P., Agarwal, R., Kaye, S.B., 2006. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol.* 7, 925–934.
- Tang, M.K.S., Zhou, H.Y., Yam, J.W.P., Wong, A.S.T., 2010. c-Met overexpression contributes to the acquired apoptotic resistance of nonadherent ovarian cancer cells through a cross talk mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Neoplasia N. Y. N* 12, 128–138.
- Tewari, K., Eskander, R.N., 2012. Emerging treatment options for management of malignant ascites in patients with ovarian cancer. *Int. J. Womens Health* 395.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
- Thiery, J.-P., Chua, K., Sim, W.J., Huang, R., 2010. [Epithelial mesenchymal transition during development in fibrosis and in the progression of carcinoma]. *Bull. Cancer (Paris)* 97, 1285–1295.
- Tomasina, J., Malzert-Freon, A., Giffard, F., Brotin, E., Louis, M.-H., Abeilard, E., Rault, S., Gauduchon, P., Poulain, L., 2013. Sensitization of ovarian carcinoma cells to Bcl-xL-targeting strategies through indirect modulation of Mcl-1 activity by MR22388, a molecule of the tripentone family. *J. Ovarian Res.* 6, 38.
- U**hm, J.H., Dooley, N.P., Kyritsis, A.P., Rao, J.S., Gladson, C.L., 1999. Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 1587–1594.

- Unger, J., Tschesche, H., 1999. The proteolytic activity and cleavage specificity of fibronectin-gelatinase and fibronectin-lamininase. *J. Protein Chem.* 18, 403–411.
- Ushijima, K., 2009. Treatment for Recurrent Ovarian Cancer At First Relapse. *J. Oncol.* 2010.
- V**elasco-Velázquez, M.A., Homsí, N., De La Fuente, M., Pestell, R.G., 2012. Breast cancer stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 573–577.
- Vergara, D., Merlot, B., Lucot, J.-P., Collinet, P., Vinatier, D., Fournier, I., Salzet, M., 2010. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 291, 59–66.
- Vlodavsky, I., Ilan, N., Naggi, A., Casu, B., 2007. Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. *Curr. Pharm. Des.* 13, 2057–2073.
- W**ada, T., Penninger, J.M., 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838–2849.
- Wang, P.-H., Lee, W.-L., Juang, C.-M., Yang, Y.-H., Lo, W.-H., Lai, C.-R., Hsieh, S.-L., Yuan, C.-C., 2005. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. *Gynecol. Oncol.* 99, 631–639.
- Weaver, A.M., 2006. Invadopodia: Specialized Cell Structures for Cancer Invasion. *Clin. Exp. Metastasis* 23, 97–105.
- Ween, M.P., Oehler, M.K., Ricciardelli, C., 2011. Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 1009–1029.
- Weis, S.M., Cheresh, D.A., 2011. α v integrins in angiogenesis and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006478.
- Weis, S.M., Cheresh, D.A., 2013. A wake-up call for hibernating tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 15, 721–723.
- White, E.S., Muro, A.F., 2011. Fibronectin splice variants: Understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life* 63, 538–546.
- Witz, C.A., Montoya-Rodriguez, I.A., Cho, S., Centonze, V.E., Bonewald, L.F., Schenken, R.S., 2001. Composition of the extracellular matrix of the peritoneum. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8, 299–304.
- X**ing, H., Cao, Y., Weng, D., Tao, W., Song, X., Wang, W., Meng, L., Xu, G., Zhou, J., Wang, S., Ma, D., 2008. Fibronectin-mediated activation of Akt2 protects human ovarian and breast cancer cells from docetaxel-induced apoptosis via inhibition of the p38 pathway. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 13, 213–223.
- Y**aqoob, U., Cao, S., Shergill, U., Jagavelu, K., Geng, Z., Yin, M., de Assuncao, T.M., Cao, Y., Szabolcs, A., Thorgeirsson, S., Schwartz, M., Yang, J.D., Ehman, R., Roberts, L., Mukhopadhyay, D., Shah, V.H., 2012. Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 72, 4047–4059.
- Yates, L.R., Campbell, P.J., 2012. Evolution of the cancer genome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 795–806.
- Yatohgo, T., Izumi, M., Kashiwagi, H., Hayashi, M., 1988. Novel Purification of Vitronectin from Human Plasma by Heparin Affinity Chromatography. *Cell Struct. Funct.* 13, 281–292.
- Yoshida, Y., Kurokawa, T., Nishikawa, Y., Orisa, M., Kleinman, H.K., Kotsuji, F., 2008. Laminin-1-derived scrambled peptide AG73T disaggregates laminin-1-induced ovarian cancer cell spheroids and improves the efficacy of cisplatin. *Int. J. Oncol.* 32, 673–681.

- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., Concannon, K.F., Donaldson, M.C., Sequist, L.V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D.A., Maheswaran, S., 2013. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* 339, 580–584.
- Z**aidel-Bar, R., 2013. Cadherin adhesome at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 373–378.
- Zhang, K., Chen, J., 2012. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adhes. Migr.* 6, 20–29.
- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J., Rishi, A.K., 2011. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1978–1986.
- Zhang, Y., Tang, H., Cai, J., Zhang, T., Guo, J., Feng, D., Wang, Z., 2011. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett.* 303, 47–55.
- Zheng, M., Hakomori, S. i, 2000. Soluble fibronectin interaction with cell surface and extracellular matrix is mediated by carbohydrate-to-carbohydrate interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 374, 93–99.
- Zou, W., 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 263–274.

Annexes

Annexe 1: Ovarian cancer ascites-derived vitronectin and fibronectin: Combined purification, molecular features and effects on cell response.

L. Carduner, R. Agniel, S. Kellouche, C.R. Picot, C. Blanc-Fournier, J. Leroy-Dudal, F. Carreiras
BBA - General Subjects, October 2013.



Ovarian cancer ascites-derived vitronectin and fibronectin: Combined purification, molecular features and effects on cell response



Ludovic Carduner^a, Rémy Agniel^a, Sabrina Kellouche^a, Cédric R. Picot^a, Cécile Blanc-Fournier^b, Johanne Leroy-Dudal^{a,1}, Franck Carreiras^{a,*,1}

^a Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules, ERRMECe (EA 1391), Institut des Matériaux, Université de Cergy-Pontoise, F-95000 Cergy-Pontoise, 2 avenue Adolphe Chauvin, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France

^b Unité "Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Aggressifs", BioTICLA (EA 4656) et service de Pathologie, Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, Avenue du général Harris, BP5026, Université de Caen Basse-Normandie, 14076 Caen Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2012
Received in revised form 11 June 2013
Accepted 17 June 2013
Available online 26 June 2013

Keywords:

Ascites
Microenvironment
Vitronectin
Fibronectin
Affinity chromatography

ABSTRACT

Background: Intra-abdominal ascites is a complication of ovarian cancers and constitutes a permissive microenvironment for metastasis. Since fibronectin and vitronectin are key actors in ovarian cancer progression, we investigated their occurrence and molecular characteristics in various ascites fluids and the influence of these ascites-derived proteins on cell behavior.

Methods: Fibronectin and vitronectin were investigated by immunoblotting within various ascites fluids. A combined affinity-based protocol was developed to purify both proteins from the same sample. Each purified protein was characterized with regard to its molecular features (molecular mass of isoforms, tryptophan intramolecular environment, hydrodynamic radii), and its influence on cell adhesion.

Results: Fibronectin and vitronectin were found in all tested ascites. Several milligrams of purified proteins were obtained from ascites of varying initial volumes. Molecular mass isoforms and conformational lability of proteins differed according to the ascites of origin. When incorporated into the cancer cell environment, ascites-derived fibronectin and vitronectin supported cell adhesion and migration with various degrees of efficiency, and induced the recruitment of integrins into focal contacts.

Conclusions: To our knowledge, this is the first combined purification of two extracellular matrix proteins from a single pathological sample containing a great variety of bioactive molecules. This study highlights that ascites-derived fibronectin and vitronectin exhibit different properties depending on the ascites.

General significance: Investigating the relationships between the molecular properties of ascites components and ovarian cancer cell phenotype according to the ascites may be critical for a better understanding of the recurrence of this lethal disease and for further biomarker identification.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ovarian cancers are the fifth leading cause of cancer-related death in the Western world. Seventy percent of cases are initially diagnosed at advanced stages, and the overall 5-year survival remains less than 30% [1,2]. Complications of advanced ovarian cancers include the production of large amounts of ascites, an exudative fluid that accumulates intra-abdominally [1]. The influence of ascites on disease progression is still a matter of debate. Nonetheless, its clinical assessment is associated with a poor prognosis [3]. Ascites is also correlated with intraperitoneal and retroperitoneal spread of the tumor, suggesting that it may facilitate metastasis [4]. Indeed, cancer cells exfoliate from the surface of the ovary into ascites as single cells or as spheroids and

can use the fluid to seed the peritoneal cavity [1]. These floating malignant cells have acquired the ability to survive and to proliferate within an environment that lacks the normal solid-phase scaffolding of extracellular matrix (ECM). Therefore, ascites constitutes a dynamic reservoir of survival factors and represents a unique tumor microenvironment. Ascites contains a great variety of bioactive molecules such as cytokines, growth factors, angiogenic factors, hormones, proteases and ECM proteins. All of these can be involved in the regulation of cancer cell migration, invasion, survival and spheroid formation [5–7]. In addition, this clinically-accessible fluid could be a source of tumor-associated molecules potentially useful as biomarkers [8].

Among the secreted factors in ascites fluid, ECM proteins such as procollagen III have been considered as indicators of tumor virulence [9] while fibronectin (Fn) promotes cell migration [5]. Despite their effect on cancer cells within a solid tumor microenvironment, both the presence and the molecular and cellular properties of ECM proteins within ascites remain poorly documented. In particular, vitronectin

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; Vn, vitronectin; Fn, fibronectin; kDa, kilodaltons

* Corresponding author. Tel.: +33 1 34 25 66 75; fax: +33 1 34 25 66 94.

E-mail address: franck.carreiras@u-cergy.fr (F. Carreiras).

¹ Contributed equally to this work.

(Vn), a multifunctional 75 kDa glycoprotein with a nicked 65 + 10 kDa form [10,11], and Fn, a 450–500 kDa dimer consisting of two similar disulfide-bonded chains [12,13], have been reported as key actors within the microenvironment of ovarian tumors. Vn has been detected in ovarian tumor tissues [14,15] and is considered important for ovarian cancer cell adhesion, proliferation and migration, and it has been suggested that it acts as a molecular bridge between cancer and mesothelial cells [15–18]. Fn has been shown to favor ovarian cancer spheroid formation, anchorage and disaggregation [19,20]. Moreover, MMP2 cleavage of Fn and Vn into small fragments enhances the peritoneal adhesion of ovarian cancer cells and is an important initial step in metastasis [21]. Soluble Fn and Vn are present in plasma at 500 µg/mL and 300 µg/mL, respectively, from where both can be purified [22,23]. Since plasma Vn and Fn occur mainly as monomeric or dimeric soluble forms while their ECM-incorporated forms are mainly multimeric, many of their biological functions may be controlled by their structural conformation [10,12].

The first aim of this work was to investigate the presence of Fn and Vn within various ovarian cancer ascites and to implement an original combined purification procedure for both ECM proteins from the same single ascites sample. The second aim was to obtain these ascites matrix proteins in high quantity and quality to study their molecular properties and their influence on cell behavior.

2. Material and methods

2.1. Ascites samples

Human ascites samples were collected following appropriate consent from patients with ovarian cancer within the comprehensive centers François Baclesse (Caen, France), Institut Curie (Paris, France) or René Dubos Hospital (Pontoise, France). Immediately after collection, the samples were centrifuged at 400 g for 5 min and the supernatants were stored at –20 °C. Total protein was quantified by the bicinchoninic acid (BCA) assay (B9643/C2284, Sigma Aldrich). For cell culture experiments, ascites samples were sterilized by filtration (cut-off 0.2 µm, low binding) and supplemented with penicillin (200 IU/mL)/streptomycin (200 µg/mL) and fungizone (Amphotericin B, 2.50 µg/mL). For protein purification, frozen ascites samples were thawed and centrifuged at 5000 g for 10 min at 10 °C to remove aggregates and debris. Protease activity was inhibited by the addition of 5 mM EDTA (E5134, Sigma Aldrich) and 50 µM PMSF (P7626, Sigma Aldrich).

2.2. SDS-PAGE and western blotting

Equal amounts of proteins were treated with 1% (v/v) 2-mercaptoethanol (M6250, Sigma Aldrich) and separated by SDS-PAGE using 8 or 11% resolving gels (45 min at 150 V). Total proteins were revealed by Coomassie blue R250 or silver staining. Molecular masses were calculated from the relative migration of standard proteins (161-0373, BioRad) after a capture with a densitometer (GS-800, BioRad). For western blotting, proteins were electro-transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare) for 1 h at 120 V at 4 °C. The membrane was blocked for 1 h at room temperature with T-TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.1% Tween 20) supplemented with 5% (w/v) non-fat dry milk. The membrane was incubated overnight at 4 °C in T-TBS-milk with anti-Vn (681125, Millipore) or anti-Fn (F3648, Sigma Aldrich) or anti-Mcl-1 (sc-819, Santa Cruz), anti-pFAK Tyr 397 (8556, Cell Signaling) or anti-FAK (3285, Cell Signaling) antibodies. After three washes with T-TBS, the membrane was incubated for 1 h at room temperature in T-TBS-milk with anti-rabbit IgG horseradish peroxidase antibody (NA934, GE Healthcare). After three washes with T-TBS, the immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence (WBKLS0500, Millipore).

2.3. Purification of ascitic Fn and Vn

All purification steps (Fig. 2) were carried out at 8 °C through an AKTA purifier 10 UPC (GE Healthcare). The columns, Gelatin Sepharose 6B and Heparin Sepharose Fast Flow medium, were from GE Healthcare. Tris base, sodium chloride, EDTA and urea (extra pure analytical reagents grade) were obtained from Merck. All buffer solutions were prepared from double deionized water purified through a Direct-Q system (Millipore) to 18.2 MΩ resistance and filtered through a 0.4 µm PES membrane prior to use.

Ascitic Fn was purified by a three-step protocol adapted from Poulouin et al. [22]. Ascites samples were applied to a gelatin column (C16/40, 40 mL) equilibrated with TE buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) containing 500 mM NaCl at a flow rate of 30 cm/h. The column was washed with seven column volumes of TE buffer/500 mM NaCl. Proteins in the flow through were collected and kept for purification of Vn. Bound proteins were then eluted with TE buffer containing 3 M urea and 250 mM NaCl. The eluted proteins were diluted with TE buffer in order to decrease the sample conductivity below 15 mS/cm, then the sample was loaded at 60 cm/h constant flow rate onto a heparin column (C16/70 column, 60 mL) stabilized with TE buffer/75 mM NaCl. The column was washed with eight column volumes of TE buffer/75 mM NaCl. The bound proteins were eluted using TE buffer/500 mM NaCl. A second Gelatin Sepharose 6B column (C16/20, 10 mL) was used in the final step to concentrate ascitic Fn and to remove remaining impurities. The loading, washing and elution steps were carried out according to first gelatin protocol described above.

To purify ascitic Vn, the flow through from the first gelatin column used to purify ascitic Fn was applied to a heparin column (C16/70 column, 60 mL) that had been equilibrated with TE buffer/150 mM NaCl. After washing with TE buffer/150 mM NaCl, the flow through was supplemented with 6 M urea and stirred gently for 3 h. Prior to loading the preparation, heparin-binding contaminants were removed with TE buffer/1 M NaCl containing 6 M urea and the column was stabilized with TE buffer/150 mM NaCl/6 M urea. The heparin column was finally treated with TE buffer/150 mM NaCl/6 M urea supplemented with 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol to remove disulfide-bound contaminants as described by Yatohgo et al. [23]. Ascitic Vn was eluted with TE buffer/1 M NaCl/6 M urea. To optimize the procedure, Heparin Sepharose was regenerated at each step with TE buffer/1 M NaCl/6 M urea to allow the same column to be utilized throughout the procedure (Fig. 2).

As control, Fn and Vn were purified according to the above-described procedure from human plasma from a healthy donor provided by the “établissement français du sang (EFS)” and were called plasma Fn and plasma Vn, respectively.

2.4. Dialysis, measurement of protein concentration and determination of purification yield and purity

Purified Fn and Vn were dialyzed twice at +8 °C against 500 mL 10 mM Hepes buffer, pH 7.4, per mL of purified protein. All dialysis procedures were performed in regenerated cellulose tubular membranes (6–8 kDa cutoff, Cellulose T2). The dialyzed proteins were filtered under sterile conditions through a 0.22 µm polyethersulfone membrane, which provides efficient recovery. The concentration of protein was measured using the Bio-Rad Protein Assay (500-0006, Biorad) with BSA as standard. Purification yield and sample purity were checked by concentration measurement and SDS-PAGE densitometry using a GS-800 densitometer and Quantity One software (Biorad).

2.5. Cell culture

The human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1 was kindly provided by Dr. J. Bénard, and both OVCAR3 and SKOV3 cell lines

were kindly supplied by Dr. L. Poulain from the BioTICLA unit (Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Aggressifs, Caen, France). The cells were grown in RPMI-1640 glutaMAX containing 0.07% (v/v) sodium bicarbonate supplemented with 10% fetal calf serum in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. For experiments, cells were harvested with 0.5% trypsin-EDTA then seeded onto glass coverslips at a density of 25,000 cells/cm² and incubated in culture medium or in filtered ascites fluid for 6, 24 or 48 h. When appropriate, the translation inhibitor cycloheximide (C7698, Sigma Aldrich) was used at 5 µg/mL and the efficiency of inhibition was analyzed through the expression of Mcl-1 protein. In some cases, cells were seeded onto a coating of purified plasma or ascitic Vn or Fn at 50 µg/mL in cell culture medium for 6 or 48 h. Reagents for cell culture were purchased from Invitrogen.

2.6. Cell proliferation

Cells were seeded at 15,500 cells/cm² and were incubated in ascites or in classical culture medium. Cell proliferation was estimated by BrdU incorporation kit. The experiment was done according to manufacturer instructions (1164722900, Roche, Boulogne-Billancourt). Assays were performed in triplicate and repeated in 2 separate experiments.

2.7. Immunofluorescence

Cells were grown on glass coverslips, fixed with 3% paraformaldehyde in PBS and washed with PBS containing 0.5% BSA. They were permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS and incubated for 1 h at room temperature with anti-Vn (V7881, Sigma Aldrich or 681125, Millipore), anti-Fn (F3648, Sigma Aldrich), anti-αv integrins (sc-9969, Santa Cruz) or anti-β1 integrins (mab1965, Millipore). After washing, the coverslips were incubated with appropriate fluorescent secondary antibodies, Alexa Fluor® 555-conjugated anti-mouse antibody (A21424, Invitrogen) or FITC-conjugated anti-mouse IgM (F9259, Sigma Aldrich) or FITC-conjugated anti-rabbit IgG (F0382, Sigma Aldrich). Cell nuclei were stained using DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542, Sigma Aldrich). Coverslips were mounted in Prolong® Gold Antifade Reagent (P36930, Invitrogen) and examined with laser scanning confocal microscopy (LSM710, Zeiss) with a focal depth of 1 to 6.5 µm, the Z meaning “0” position near of the support of cells. Controls, in which primary antibodies were replaced with PBS, were negative.

2.8. Cell adhesion and migration

Flat-bottomed 96-well plates were coated for 2 h at 37 °C with different samples of plasma Vn or Fn (0–50 µg/mL) for dose curve assay and with 10 µg/mL of plasma or ascitic Vn or Fn for adhesion assay or with BSA as control. The coated wells were incubated with 1% PBS-BSA at 37 °C for 1 h and with RPMI glutaMAX, 0.07% sodium bicarbonate, 0.2% BSA (adhesion buffer). Adherent cells were detached, re-suspended in adhesion buffer and seeded at 4×10^5 cells/cm². After 30 min of adhesion at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, non-adherent cells were removed. The remaining adherent cells were fixed with 1% glutaraldehyde (G4004, Sigma Aldrich). After three washes in PBS, the cells were stained for 30 min in 0.1% crystal violet (C0775, Sigma Aldrich) in H₂O, rinsed three times with water, and solubilized in 0.1% SDS. Absorbance was measured with a microplate reader at 595 nm. Assays were performed three times in triplicate. For FAK phosphorylation analysis, IGROV1 cells were incubated on coated ascitic and plasma ECM proteins during 30 min and pFAK was estimated on cell lysates by western blot. For migration assay, cell monolayer was scratched. Then, wells were washed 3 times with PBS to remove non-adherent cells. Adherent cells were incubated in culture medium containing 2.5% SVF supplemented or not with purified Vn or Fn at 10 µg/mL. Cell migration was followed by time-lapse microscopy (inverted microscope Leica DMI6000 B) at least during 20 h. Cell migration, from at least three

repeated experiments, was quantified with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

2.9. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectra were obtained with a Perkin Elmer LS 50B spectrofluorimeter equipped with a temperature-controlled cell holder. Ascitic Fn and Vn concentrations were adjusted to 0.055 mg/mL and 0.01 mg/mL respectively to yield an equivalent protein molarity of 12 µM. The fluorescence emission spectra were measured with a 1 cm path length cell at constant temperature (25 °C). Intrinsic fluorescence was monitored in a 100 nm bandpass between 310 and 410 nm with 295 nm excitation at 100 nm/min. At least three replicate spectra were averaged and blanked against a buffer-only control.

2.10. Size distribution

Samples were dialyzed into 10 mM Hepes pH 7.4 prior to the experiment and diluted with dialysis buffer to 0.1 g/L. In order to allow putative aggregated proteins to recover, there was no filtration step. Size (hydrodynamic radius) distributions of plasma and ascitic Fn forms were measured by dynamic light scattering (DLS) with a Zetasizer NanoZS (Malvern) containing a 633 nm laser (He-Ne) and an avalanche photodiode detector. The scattered light was detected at an angle of 173° (backscattering) at a constant temperature of 25 °C controlled by Pelletier. Experiments were carried out after an equilibration step of 60 s in a semi-micro 1.4 mL quartz cuvette. Ten averaged measurements of 10 s duration were performed per sample. Size distributions were derived by deconvolution of the measured intensity autocorrelation function of the sample, using the general purpose fitting algorithm provided in the Zetasizer software. The size distribution of Fn was plotted and expressed as an intensity distribution in order to analyze the hydrodynamic radius of the protein and potential presence of supramolecular complexes or aggregates.

2.11. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Student's *t*-test was used for statistical analyses of cell adhesion and migration data. A probability level of *P* < 0.05 was used as the criterion of statistical significance.

3. Results

3.1. Characterization of vitronectin and fibronectin in ascites

The presence of vitronectin (Vn) and fibronectin (Fn) was investigated in a panel of 14 ascites samples. As shown in a representative western blot, both Vn and Fn were detected in all the samples tested (Fig. 1). Interestingly, there was evidence for different isoforms. Whatever the source of the ascites examined, Vn appeared as a major 65 kDa form while an additional band of weak, intermediate or high intensity at 75 kDa was also detected. Thus, three groups of Vn isoforms appeared, distinguished by the level of expression of the 75 kDa form. In addition, bands of various intensities were distinguished at higher molecular masses in some samples (Fig. 1A). Concerning Fn, a major band around 250 kDa appeared in all samples tested while bands around 150 and 90 kDa were also observed in most ascites samples. Moreover the level of ascitic Fn seemed to fluctuate across samples (Fig. 1B). These results demonstrate that ascites samples from ovarian cancer patients contain the two extracellular matrix (ECM) glycoproteins Vn and Fn and that both can exhibit different molecular mass isoforms according to the source of the sample.

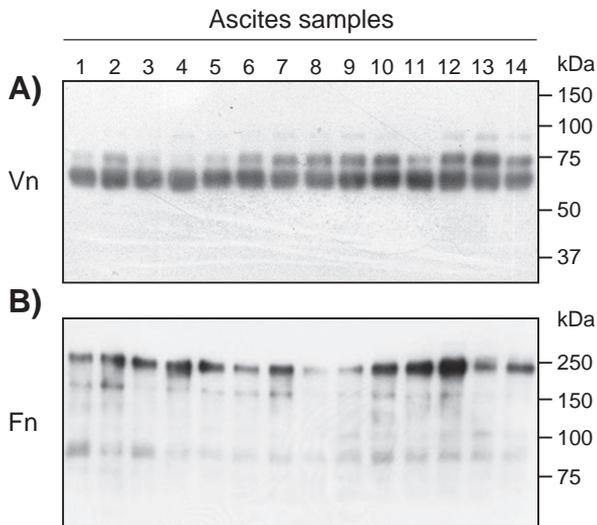


Fig. 1. Characterization of vitronectin and fibronectin in ascites. Equal quantities (1 μ g) of total ascitic proteins from different samples were separated on SDS-PAGE under reducing conditions. Western blots were performed using anti-vitronectin (A) or anti-fibronectin (B) antibodies and revealed by peroxidase-coupled secondary antibodies. Data are representative of three independent experiments.

3.2. Purification of ascitic fibronectin and vitronectin

To study ascitic Fn and Vn further, a combined purification protocol that allows both ECM proteins to be separated successively from the same single ascites sample was developed (Fig. 2). To ensure that this procedure was feasible irrespective of initial ascites volume and would allow protein isoforms to be retrieved, we chose to purify Fn and Vn from ascites samples 5, 7 and 10. These samples ranged in volume from 290 mL to 1.5 L and contained the different Vn isoform groups previously identified.

First, ascitic Fn was purified (see [Material and methods](#) and [Fig. 3A–D](#)). The ascites samples were loaded onto a gelatin affinity chromatography column (Fig. 3A). After elution of bound proteins, Fn and several other proteins were recovered (Fig. 3A, b and D, b). Then heparin affinity chromatography was performed (Fig. 3B). An increase of conductivity under isocratic conditions allowed Fn to be eluted (Fig. 3B, e and D, e). Ascitic Fn was concentrated by gelatin affinity chromatography using a smaller-volume column than the first gelatin column (Fig. 3C). To improve the recovery of ascitic Fn, 3 M urea was added to the elution buffer. As shown in [Fig. 3D](#) lane g, a major band at 250 kDa was revealed, attesting to the purification of ascitic Fn.

To combine the purification of Vn with that of Fn from ascites, the flow through of the first gelatin column was loaded onto a heparin

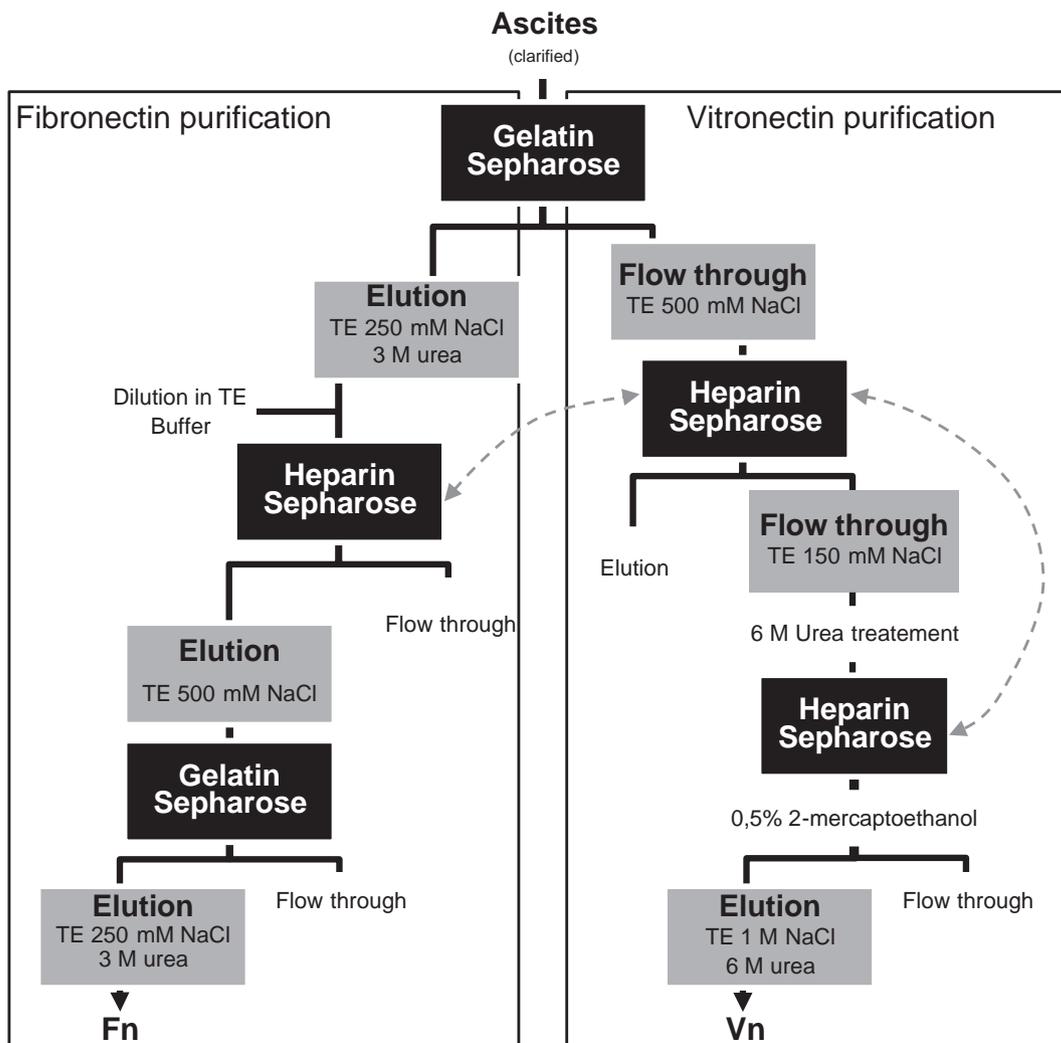


Fig. 2. Purification flow chart of fibronectin and vitronectin from the same single ascites sample. The black squares indicate the different affinity chromatography columns. The dotted line represents the regeneration of Heparin Sepharose, which allowed the same column to be utilized throughout the procedure.

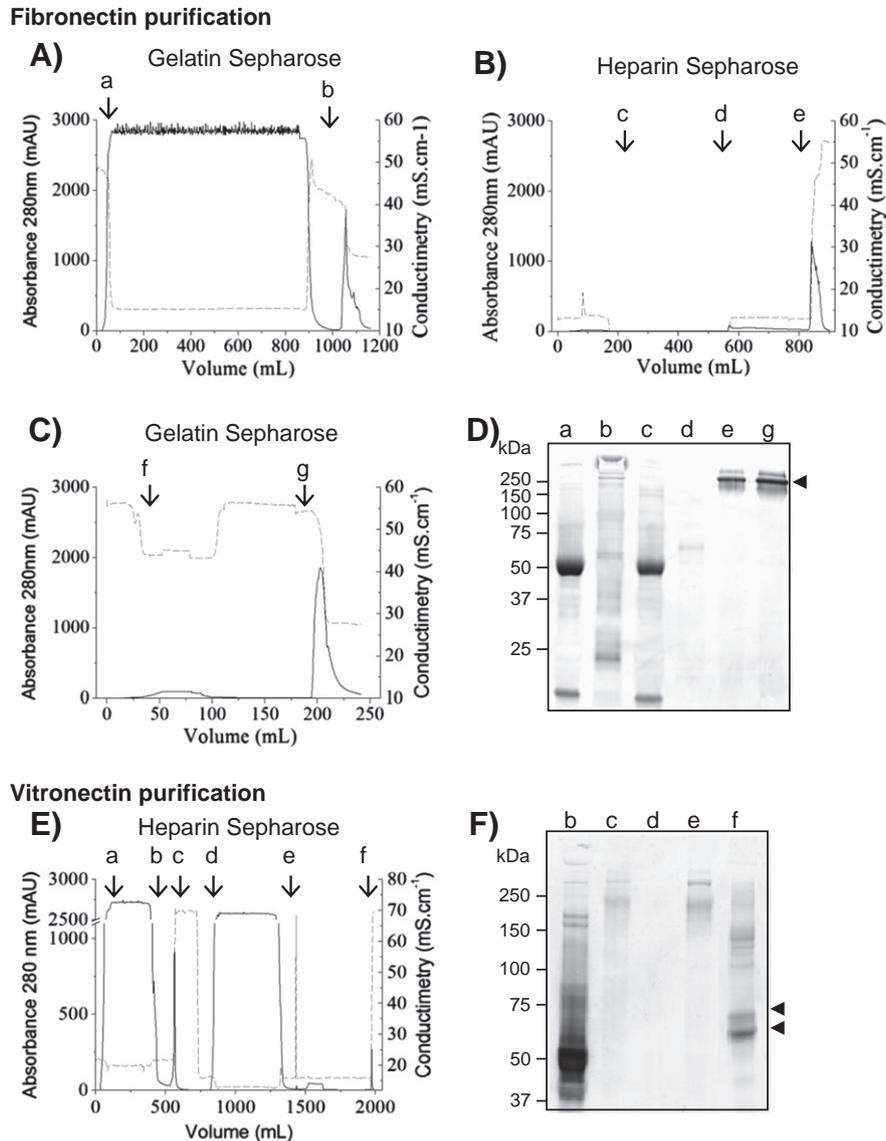


Fig. 3. Combined purification of ascitic fibronectin and vitronectin. Fibronectin (A–D) and vitronectin (E,F) purification: Elution diagrams of ascitic Fn purification on Gelatin Sepharose (A), Heparin Sepharose (B) and Gelatin Sepharose (C) and of ascitic Vn purification on Heparin-Sepharose (E). The solid line represents the 280 nm absorbance (mAU) and the dotted line corresponds to conductivity (mS/cm). Each step in the purification of ascitic Fn and Vn was analyzed by SDS-PAGE (D and F respectively). Proteins were revealed by silver staining. Arrowheads indicate purified forms. Lower-case letters and arrows indicate respectively the start of each step for chromatograms and flow-through analysis for SDS-PAGE. Fn purification (A–D): Step a, total ascites loading; Step b, elution with TE 3 M Urea 250 mM NaCl; Step c, loading of gelatin eluted fraction; Step d, washing with TE 75 mM NaCl; Step e, heparin elution with TE 500 mM NaCl; Step f, loading of heparin eluted fraction; Step g, second gelatin elution with TE 3 M Urea 250 mM NaCl (ascitic Fn). Vitronectin purification (E–F): Step a, flow through of first Gelatin-Sepharose loading; Step b, washing with TE 150 mM NaCl and flow-through collection; Step c, removal of contaminants with TE 6 M Urea 1 M NaCl and equilibration with TE 6 M Urea 150 mM NaCl; Step d, loading and washing of urea-treated fraction; Step e, 2-mercaptoethanol treatment; Step f, elution with 6 M Urea 1 M NaCl (ascitic vitronectin).

affinity column (Fig. 3E). As ascitic Vn was folded and its domain for heparin affinity was not exposed [23], it was recovered in the flow through (Fig. 3E, b and F, b). This step allowed contaminant proteins with affinity for heparin to be removed (Fig. 3E, c and F, c). After incubation with 6 M urea, exposing the heparin binding domains in Vn, the flow through was loaded on the heparin column again (Fig. 3E, d). Finally, analysis of the fraction eluted with 1 M NaCl, 6 M urea revealed bands at the expected molecular masses of 65 kDa and 75 kDa (Fig. 3E, f and F, f). Additional bands that could correspond to multimers induced by urea denaturation were also detected at higher molecular mass.

Thus, we developed a combined protocol that allowed both the ECM proteins Fn and Vn to be purified from single samples of ascites irrespective of their different initial volumes. The implemented procedure yielded to the recovery of 50 to 98 mg of Fn and from 7 to 19 mg of Vn per liter of initial ascites samples, with percentage

purities respectively > 99%, and 86% (± 1) (Table 1). In comparison, about 137.4 ± 28.4 mg/L of Fn and 14.9 ± 4.5 mg/L of Vn were obtained from plasma samples after sequential purification that we developed. Such quantities are comparable to those obtained using a separate procedure (Table 1). According to the plasma concentrations, the combined purification led to a reproducible yield ($n > 3$) of about $27.5 \pm 5.6\%$ for Fn and $5 \pm 1.5\%$ for Vn, in accordance with (or slightly more lower than) the yield of separate purification [22–24]. In addition, our protocol reduced the overall time required for purification of both proteins from 5–6 days (previous protocols) to 3–4 days (Table 1).

3.3. Characterization of ascites-derived fibronectin and vitronectin

After purification of Fn and Vn from ascites 5, 7 and 10, bands around 250 kDa and 65 kDa corresponding respectively to the

Table 1

Volume, purity, amount of purified protein and duration for purification of plasma and ascites vitronectin or fibronectin.

Purification	Volume (mL)	Purity (%)	Protein recovery in mg/L of initial sample	Duration	
Vn	Ascites 10	1500	87	7	1–2 days
	Ascites 7	880	85	18	1–2 days
	Ascites 5	290	86	19	1–2 days
	Plasma according to current combined protocol	1358 ± 91.8	85	14.9 ± 4.5	1–2 days
Fn	Plasma according to Yatohgo [23]	/	/	30–60	2–3 days
	Ascites 10	1500	>99	50	2 days
	Ascites 7	880	>99	98	2 days
	Ascites 5	290	>99	69	2 days
	Plasma according to current combined protocol	1358 ± 91.8	>99	137.4 ± 28.4	2 days
	Plasma according to Poulouin [22]	/	99.5	7	3 days

expected molecular masses of the Fn single chain and of Vn were observed in SDS-PAGE (Fig. 4A) and in western blotting profiles (Fig. 4B). Considering that large amounts of purified proteins (10 µg) were loaded on the lanes for SDS-PAGE, no significant contamination was evident. Under reducing conditions, purified Fn from plasma (control) was found at 250 kDa while plasma Vn gave three bands that could correspond respectively to the 75 kDa single polypeptide, the 65 kDa cleaved two-chains form and the thrombin-cleaved 57 kDa form [25] (Fig. 4A). The higher resolution of western blotting allowed different ascitic protein isoforms to be observed, such as the faint Fn band at less than 250 kDa in sample 5 (Fig. 4B). Nevertheless, the analysis conditions did not allow the Fn fragments at 150 kDa and 90 kDa, previously identified within whole ascites, to be observed (Fig. 2). For ascitic Vn, in addition to the 65 kDa band, 75 kDa forms and fragments around 45 kDa were detected in samples 10 and 7, while an intense 57 kDa band was evident in sample 5 (Fig. 4B). Bands of higher apparent molecular mass around 120–150 kDa that could correspond to Vn dimers were especially detected in samples 10 and 5. The presence of minor fragments within the eluted fractions was investigated by gradually increasing the quantities of purified ascitic Fn and Vn and by using silver staining (Fig. 4C). These conditions allowed the fragments of interest to be detected, i.e. the 150 and 90 kDa bands for Fn and the 45 kDa fragment for Vn. Additional fragments at intermediate molecular masses could also be observed when greater quantities of ascitic proteins were examined. These data demonstrate that different molecular mass isoforms of Fn and

Vn could be distinguished in different ascites samples and that combined purification allowed them to be recovered.

3.4. Conformational state of ascites-derived fibronectin and vitronectin

Since Fn and Vn contain 78 and 10 tryptophans respectively [Accession numbers: P02751 and EAW51082, respectively], the structures of purified ascitic proteins were probed by tryptophan fluorescence spectroscopy. After excitation at 295 nm, emission spectra of Fn from ascitic or plasma protein samples cannot be distinguished (Fig. 5A). Irrespective of the source of Fn, the emission maximum is centered at 332 nm (±1.4), a value characteristic of buried aromatic residues [26]. Similarly, the emission spectra for plasma and ascitic Vn from samples 10 and 5 gave a maximum centered at 338 nm (±0.6). The intrinsic fluorescence of ascitic Vn from sample 7 presented a shift in emission maximum ($\lambda = 340.5$ nm) (Fig. 5B). Such a shift suggests the exposure of buried tryptophan residues and modification of their local environment as previously described [27].

The hydrodynamic radius (R_H) of each ascitic Fn was then studied and compared to that of the plasma form using Dynamic Light Scattering (DLS). Since DLS is highly dependent on protein purity it was only applied to ascitic Fn with purity above 99%. Fig. 5C illustrates an overlay of the size distribution of ascitic Fn with plasma reference. Numerical values of radii, mean peak size and polydispersity index (PDI) are summarized in Table 2. The mean peak size measurement indicated that the Stokes radii of most of the plasma Fn population

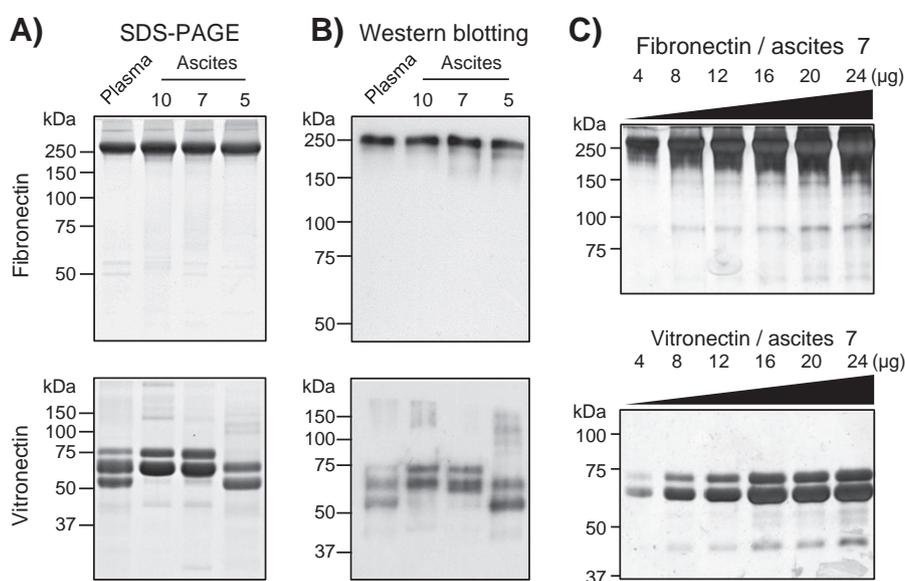


Fig. 4. Ascitic vitronectin and fibronectin purity and fragments. Equal quantities (10 µg/well) of purified ascitic fibronectin and vitronectin from different samples were separated on SDS-PAGE under reducing conditions and revealed by Coomassie blue staining (A). Western blotting was performed using anti-fibronectin or anti-vitronectin antibodies and revealed by peroxidase-coupled secondary antibodies (0.1 µg of purified proteins/well) (B). Increasing quantities (4–24 µg) of purified ascitic fibronectin or vitronectin were separated on SDS-PAGE under reducing conditions and revealed by silver staining (C).

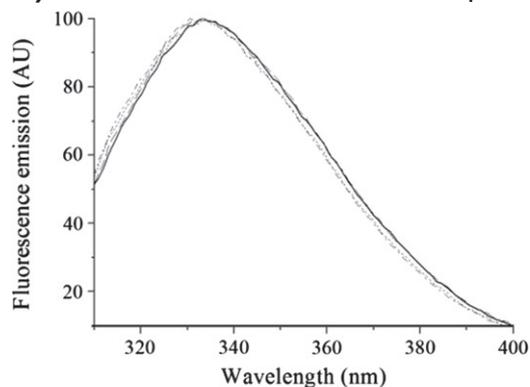
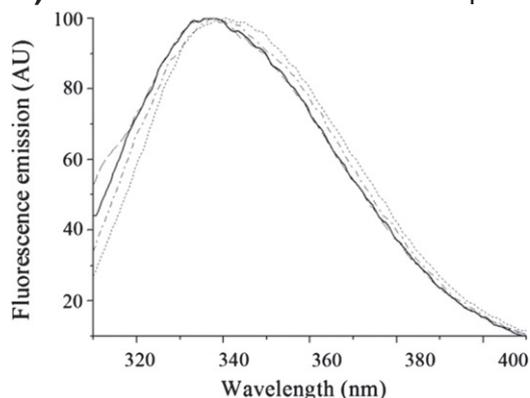
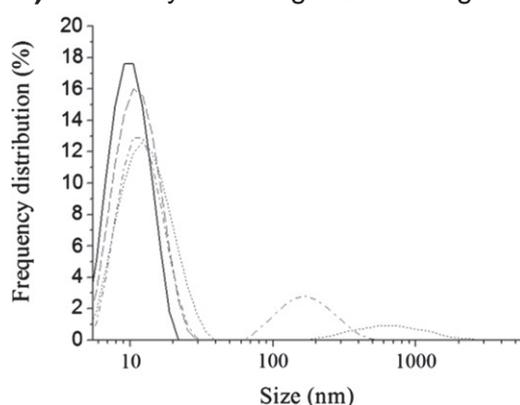
A) Fn – Fluorescence emission spectra**B) Vn – Fluorescence emission spectra****C) Fn – Dynamic Light Scattering**

Fig. 5. Tryptophan fluorescence emission spectra of purified ascitic fibronectin and vitronectin and size distribution by intensities of ascitic fibronectins. Normalized tryptophan fluorescence of purified fibronectin (A), vitronectin (B) from ascites 10 (dash-dotted line), ascites 7 (dotted line) and ascites 5 (dashed line) or from plasma (solid line). Protein concentration was adjusted to a final concentration of 12 μM and samples were excited at 295 nm with emission spectra recorded between 310 and 410 nm. Dynamic Light Scattering analysis (C) of ascitic fibronectin purified from ascites 10 (dash-dotted line), ascites 7 (dotted line) and ascites 5 (dashed line) in comparison to plasma purification (solid line).

could be estimated at 11.2 nm (± 0.2) with an average R_H of 9.8 nm (± 0.2) for the complete population at physiological pH and ionic strength. This is in good agreement with the 10 nm value previously determined by Rocco et al. [28]. Two out of three ascitic Fn had larger R_H than plasma Fn with z-averages of respectively 12.9 nm and 13.9 nm for Fn from ascites samples 7 and 10. Thus, ascitic Fn has a Stokes radius 3–4 nm greater than that of plasma Fn, suggesting that it could contain a partially unfolded region. Also, the plasma

Table 2

DLS data of plasma and ascites Fn.

	Z-average ^a (nm)	Mean peak size (nm)	PDI ^b
Plasma	9.8	11.2	0.13
Ascites 10	13.9	12.4	0.34
Ascites 7	12.9	12.2	0.26
Ascites 5	10.5	11.7	0.10

^a Hydrodynamic radii.^b Polydispersity index.

Fn size distribution showed a single peak with a polydispersity index (PDI) around 0.1, suggesting that the plasma Fn population is homogeneous while the ascitic Fn size distributions were multimodal with higher PDI (0.34 and 0.26 for samples 10 and 7 respectively) except for sample 5 (PDI of 0.13). Peaks due to particles with R_H higher than 100 nm were observed, suggesting the propensity of ascitic Fn to form assemblies. Taken together, these data demonstrate that purified ascitic proteins could exhibit slight structural differences from their plasma counterparts according to the ascites sample.

3.5. Organization of vitronectin and fibronectin from ascites in cell culture

When cells were grown in ascites they proliferated at a rate comparable to that in standard conditions (Fig. 6A), but their morphology shifted from spread cells to clusters of more rounded ones, forming small cell aggregates of different thicknesses (Fig. 6B). Cancer cells were incubated for two days in whole ascites or in culture medium in order to visualize the source of ascitic Fn and Vn (Fig. 6B,C). Analysis by confocal scanning laser microscopy from the cell culture support ($Z = 0$ position) to focal depth of 6.5 μm revealed that Vn is deposited at the bottom and surrounding the cells and that Fn was incorporated at intercellular sites throughout the thickness of the cancer cell clusters (Fig. 6B). Immunostaining analysis also highlighted the organization of Fn into cell-associated fibrils. These observations suggest that Fn and Vn, which are contained in the ascites, can interact with cells. In addition, it is to be noted that staining of Vn and Fn in standard culture conditions (Fig. 6C left) showed no deposition of ECM protein on the support. Contrary to ascitic Fn, a massive and uniform deposit of ascitic Vn was observed when ascites was incubated without cells during two days (Fig. 6C right). In order to ascertain that visualized Vn and Fn came mainly from ascites and were not cellular secreted ECM proteins, cells were pre-treated with cycloheximide and incubated in ascites or in culture medium (Fig. 7). The efficiency of the translation inhibition by cycloheximide was confirmed toward the expression of the Mcl-1 protein, which is known to have a short half-life [29] (Fig. 7A). Confocal analysis of cell–ECM contacts revealed that after 6 and 24 h in ascites, cells were positive for Fn staining and that Vn deposition was observed, both independently of translation inhibition (Fig. 7B). It has to be noted that the pattern of Fn deposition depicted in Figs. 6 and 7 is quite different. At higher culture times (Fig. 6), ascitic Fn was organized as fibrillar structures whose fluorescent intensity masks the underlying cell surface staining. These Vn and Fn distribution patterns were not revealed when the cells were grown in the absence of ascites (Fig. 7C), arguing in favor of the incorporation of exogenous ascitic Vn and Fn within the cell microenvironment.

3.6. Ascites-derived vitronectin and fibronectin support cancer cell adhesion and migration

The ability of cancer cells to adhere to purified ascitic Vn and Fn or their plasma counterparts was investigated. When purified proteins from plasma were coated at different concentrations ranging from 0 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cell adhesion reached a maximum since 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 8A). Thus, cell adhesion was then studied on 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of

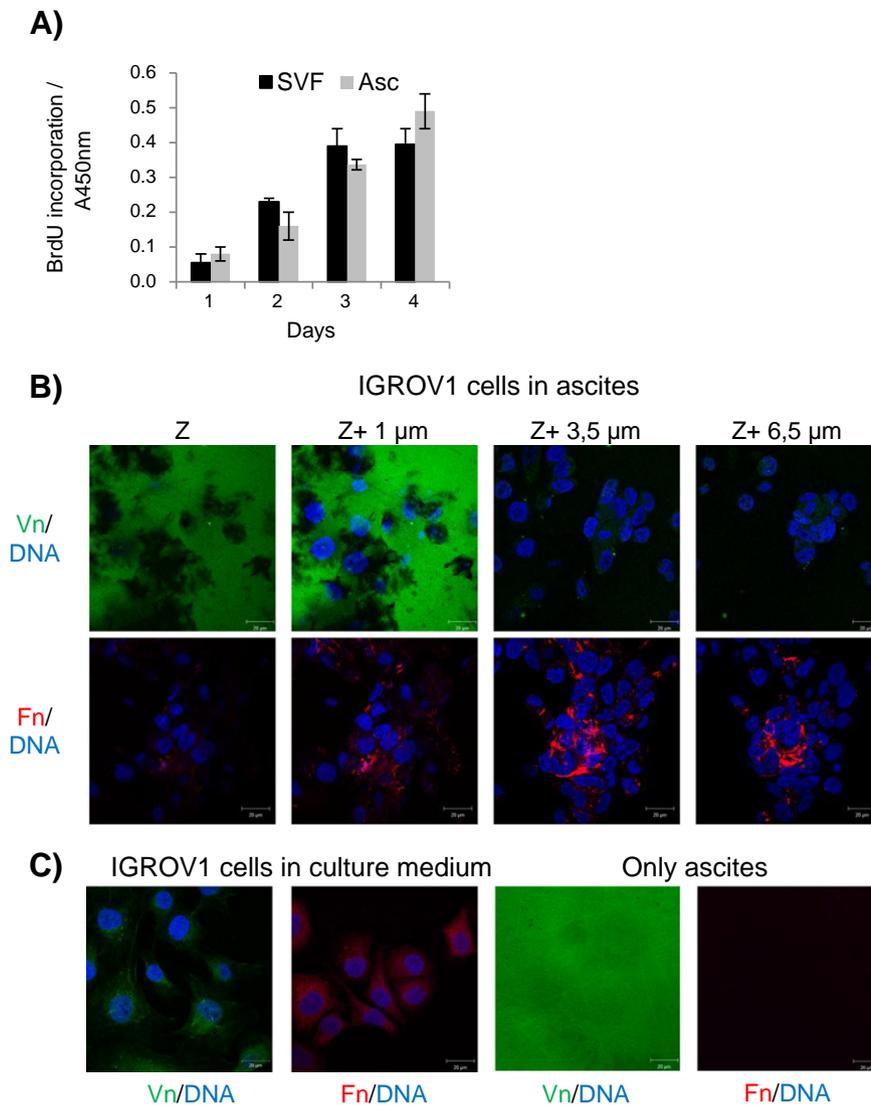


Fig. 6. Cells in ascitic environment: proliferation and ascites-contained vitronectin and fibronectin organization. BrdU incorporation in ovarian cancer cells (IGROV1) incubated for four days in ascites (A). IGROV1 cancer cells were incubated two days in ascites prior immunostainings of Fn and Vn were done. Analysis was performed by confocal scanning laser microscopy: each condition was performed with Z focal depth of 6.5 μm (from cell culture surface ($Z = 0$) to focal depth of 6.5 μm) (B). Cells were incubated in culture medium and ascites was incubated without cells (C). Immunofluorescence staining for vitronectin or fibronectin was performed and nuclei were stained with DAPI. Scale bars: 20 μm .

purified proteins from plasma or ascites. Only 30 min after cell adhesion on ascitic ECM or on plasma ECM, phosphorylation of p125 FAK was induced, suggesting its activation (Fig. 8B). As demonstrated in Fig. 8C, whatever the cancer cell line, similar adhesion was observed onto 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of plasma Fn and Vn at 30 min. When cancer cells were seeded onto 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of purified ascitic proteins, they exhibited different adhesion efficiencies depending upon the cell line and the source of the ascitic protein. In particular, ascitic Fn from sample 10, which has a greater R_H than plasma Fn, and ascitic Vn from sample 5, which contains a 57 kDa component, significantly modulated adhesion of the three cancer cell lines. In the same way, cell migration in the presence of soluble ascitic Vn or Fn was investigated (Fig. 8D). After 20 h, IGROV1 cell migration was equivalent or higher with Vn and Fn from ascites than with purified proteins from plasma.

Furthermore, the localization of the cellular receptors especially activated in the presence of Vn and Fn, respectively the α_v and β_1 integrin families [16] was investigated after ovarian cancer cells were spread on purified ascitic or plasmatic Fn and Vn (Fig. 9). Whichever the origin of Vn used, α_v integrins of the IGROV1, OVCAR3 and SKOV3 cells were localized at points of cell–substratum contact (focal contacts) after 6 h of incubation. Moreover, α_v integrins presented a punctiform

organization in SKOV3 cell line. Such localization is evocative of invadopodia-like structures. Also, focal contacts appeared to be less numerous when IGROV1 cells were plated on ascitic Vn compared to plasmatic Vn (Fig. 9A). Depending on the cell lines and fluid of origin, Fn was remodeled with various efficiencies. For example, when cells spread on plasma-derived or ascites 10-derived Fn, fibrils that shrink at the periphery of SKOV3 cells were visualized whereas such fibrillar structures were not present when ascites 7 was used for the coating. β_1 integrins co-localized with fibrils of Fn and could participate to the fibrillation process (Fig. 9B). In addition, the localization of the integrins at point of cell–substratum contact and also at sites of cell–cell contact was observed after 48 h of culture on purified ascitic or plasmatic Fn and Vn. In particular, focal contacts were observed at the leading edges of spreading cells, underlining the lamellipodia-like and pseudopodia-like protrusions, and were also randomly distributed all over the cell surface. In addition, black zones of clearance were visible on Fn and gave an evidence of the remodeling of ascitic Fn by ovarian cancer cells (Fig. 10).

Together, these data show that the biological activity of ascites-derived ECM proteins is maintained after purification and illustrate that both ascites-derived Fn and Vn interact with cells enabling

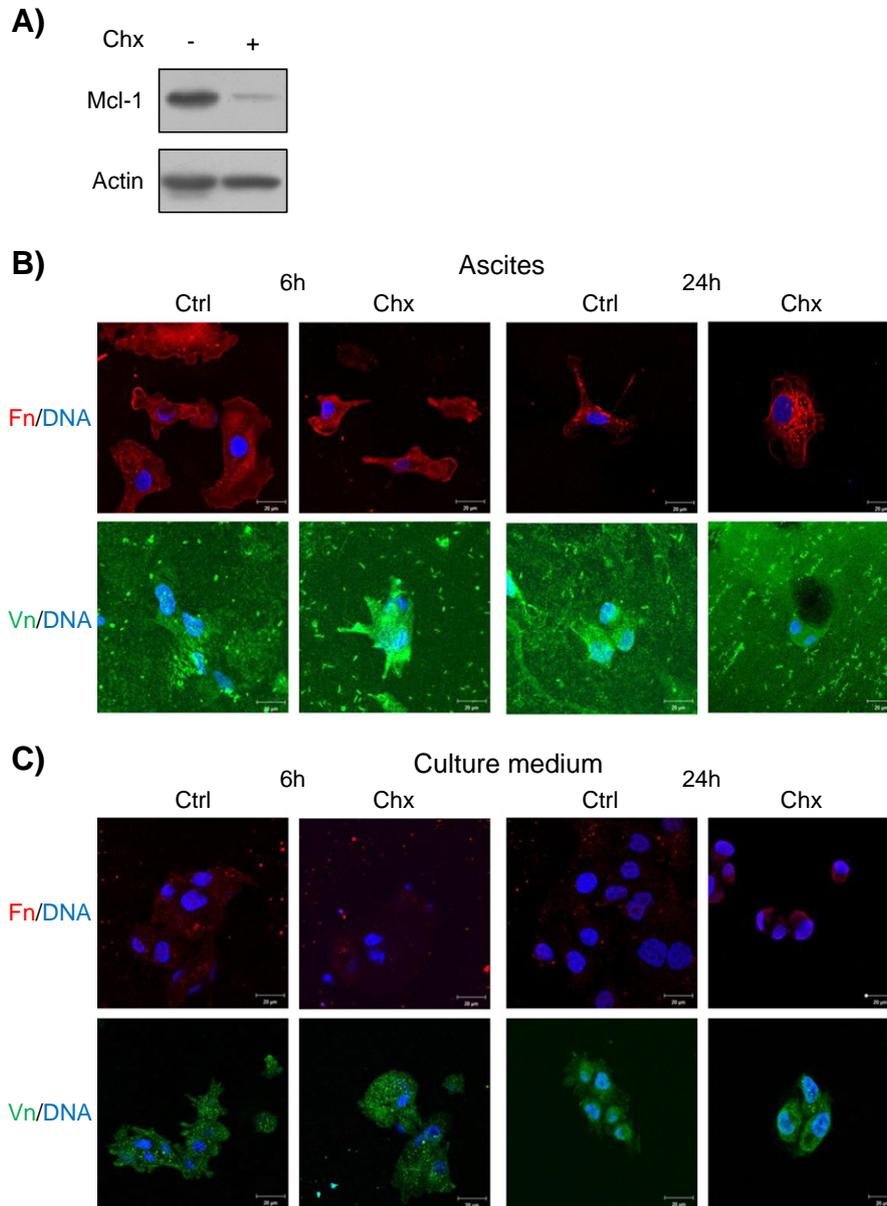


Fig. 7. Ascites constitutes a reservoir of vitronectin and fibronectin for ovarian cancer cells. Adherent IGROV1 cells (ctrl) were pre-treated with 5 μg/mL of cycloheximide (Chx). Protein translation inhibition is monitored through western blot analysis of Mcl-1 expression (A). Cycloheximide treated cells were incubated in ascites (B) or in culture medium (C) during 6 h or 24 h. Organization of vitronectin and fibronectin was followed by immunofluorescence staining and nuclei were stained with DAPI. Analyses were performed by confocal scanning laser microscopy at cell–ECM contact focal plane. Scale bars: 20 μm.

them to adhere, spread and migrate and suggest that these interactions could trigger integrin-dependent signaling leading to subsequent regulation of important aspects of cell behavior.

4. Discussion

Ascites accumulation within the abdominal cavity is a frequent complication in ovarian cancer. Ascites constitutes a permissive microenvironment for cancer cells especially for metastasis. It is generally accepted that the tumor microenvironment has a profound influence on the disease [30], but this clinically accessible fluid remains under-studied. Our results clearly indicate that ascites fluid contains Fn and Vn and demonstrate the feasibility of extracting these two matrix molecules from the same single sample of ascites from an ovarian cancer patient using a combined purification protocol. Finally, our data illustrate the opportunity to study purified ascitic Fn and Vn as single proteins in terms of conformation and of influence on cell behavior, according to the ascites.

In ovarian cancer, it is thought that ascites accumulation results from blockage of the lymphatic drainage and/or secretion of vascular permeability factors by the tumor, leading to extravasation of serum proteins [1]. Since Fn and Vn are abundant glycoproteins within the plasma [10,13], their presence in ascites could be attributed to extravasation from leaking vessels. However, it was previously demonstrated that ovarian cancer cells synthesize Vn and that mesothelial cells lining the peritoneal cavity also secrete it [15,18]. Thus, the sources of ascitic Fn and Vn production could be diverse. Here, the comparable quantities of plasma and ascites proteins per liter of initial sample that were obtained with a reproducible yield, led to estimate that the ascites concentration of Fn and Vn ranges between 181–356 mg/L and 140–380 mg/L, respectively. Within ascites, Vn and Fn exhibit similar global profiles in all samples tested, with major bands at molecular masses of 75/65 kDa for Vn and at 250 kDa for Fn. These apparent molecular masses were compatible with those expected from the literature. Indeed, circulating plasma Vn exists in two forms, a single-chain polypeptide (75 kDa) and a

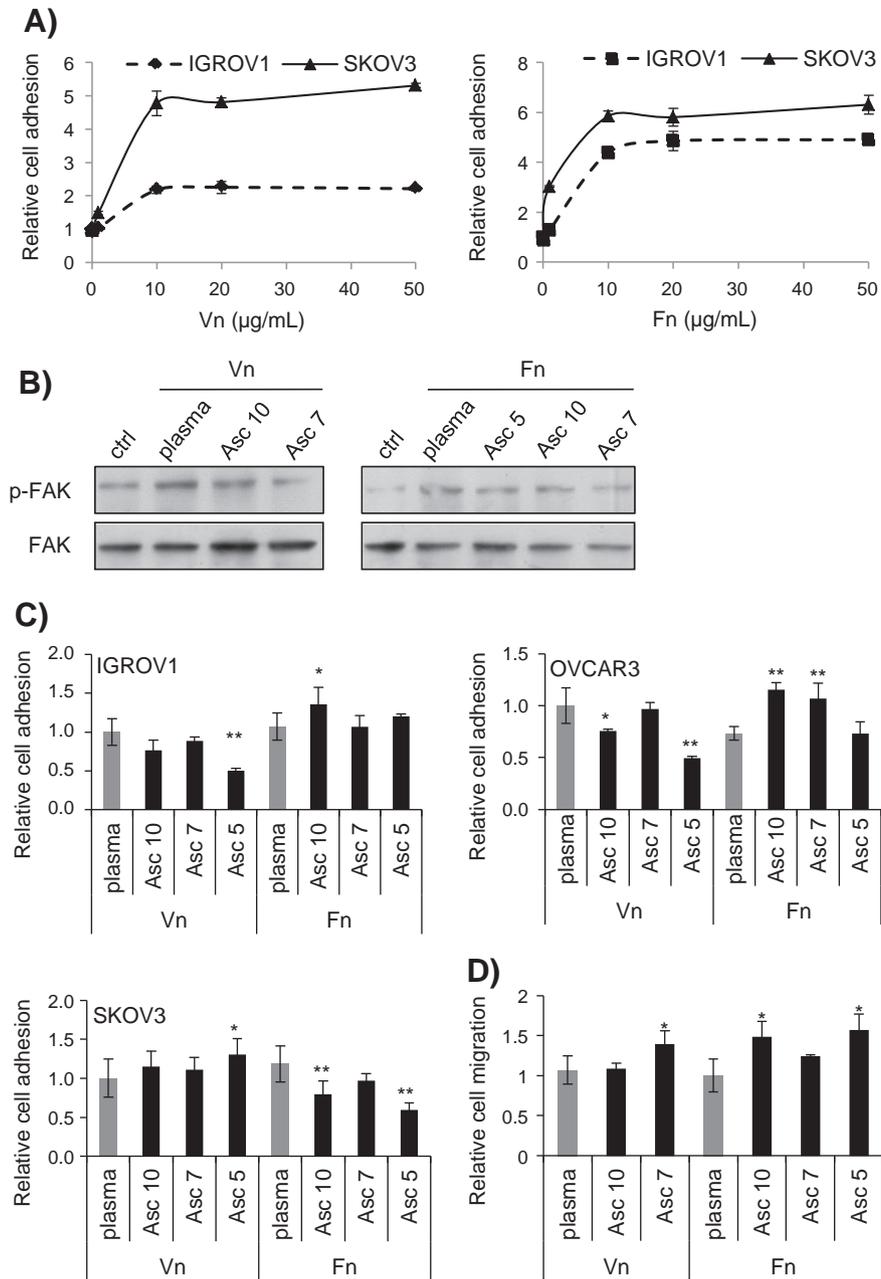


Fig. 8. Ovarian cancer cell adhesion and migration with purified ascitic proteins. 30 min adhesion of ovarian cancer cells (IGROV1, SKOV3) was examined on a coating of 0 to 50 $\mu\text{g/mL}$ of plasma-derived proteins (A). p125 FAK phosphorylation after 30 min of cell adhesion on purified ascites- or plasma-derived proteins was estimated by western blot (B). Adhesion of ovarian cancer cells (IGROV1, OVCAR3, SKOV3) was examined on a coating of 3 ascites- or plasma-derived proteins (10 $\mu\text{g/mL}$) (C). Adherent cells were revealed by crystal violet coloration and absorbance was read at 595 nm. Data represent means of three triplicate experiments. Cell migration of IGROV1 cancer cells was estimated after 20 h in medium supplemented with plasma- or 2 ascites-derived vitronectin and plasma- or 3 ascites-derived fibronectin (D). Significant differences were estimated by comparison with the plasma condition (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

nicked polypeptide (65 + 10 kDa) [10,31]. It was previously reported that plasma can contain similar amounts of single chain and two-chain Vn or one of the two forms can predominate, depending upon the individual. On this basis, three Vn phenotypes were defined. A polymorphism at position 381 in the Vn gene has been shown to cause these blood phenotypes [32]. In the current report, three groups of Vn patterns associated with various levels of 75 kDa peptide expression, which could correspond to these three phenotypes, were identified within ascites. Moreover, different molecular mass isoforms of ascitic proteins were evident, such as the 57 and 45 kDa fragments of Vn. The latter could have resulted from proteolytic cleavage, since comparable fragments were obtained when plasma Vn was subjected to thrombin or plasmin proteolysis [25,31]. Concerning Fn, the observed pattern of

bands at 250, 150 and 90 kDa within the whole ascites is compatible with the pattern of Fn purified from the sera of prostate cancer patients, while Fn from the plasma of healthy individuals is found as a 250 kDa band. These Fn fragments could be also generated through the activities of proteases such as the metalloproteinases [33]. In addition, owing to alternative splicing, Fn exists in various isoforms [34]; this could have led to the observation of a faint band smaller than 250 kDa for ascitic Fn. Besides, the oncofetal Fn isoform has been identified within ovarian cancer ascites [35]. Although the number of ascites samples presently studied ($n = 14$) was too small to envisage correlation studies, the results comfort the concept that Vn and Fn phenotypes within ascites might be of interest especially in regard to clinical parameters because their isoforms have different biological properties. For example, the

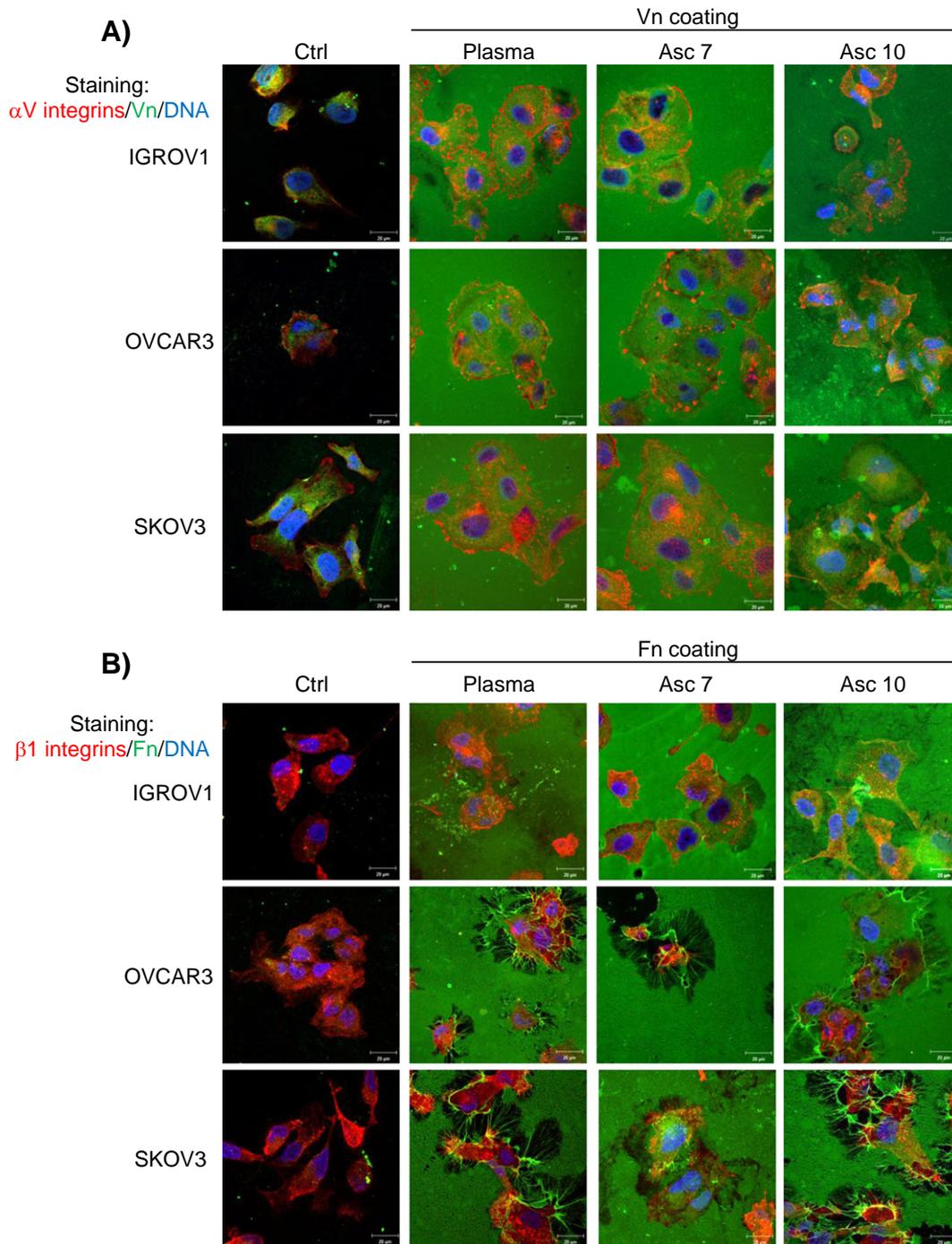


Fig. 9. Remodeling of purified ascitic proteins by ovarian cancer cells and localization of α V and β 1 integrins after 6 h of cell adhesion. Ovarian cancer cells (IGROV1 or OVCAR3 or SKOV3) were incubated 6 h on glass coverslips (ctrl) or on a coating of purified vitronectin (A) or fibronectin (B) from plasma or ascites samples (7 and 10). Vitronectin and α V integrins or fibronectin and β 1 integrins were colabeled and cell nuclei were stained with DAPI. Analyses were performed by confocal scanning laser microscopy (B). Scale bars: 20 μ m.

75 kDa and 65 kDa forms of Vn differ in their susceptibilities to PKA action [31].

In order to explore further the properties of Fn and Vn obtained from the specific microenvironment that constitutes ascites, we developed a combined affinity-based procedure to purify Fn and Vn successively from the same single ascites sample. The aim of this protocol was to isolate high molecular mass matrix proteins from complex pathological fluids that exhibit great molecular richness. To obtain satisfactory yield of Fn, we chose to elute the fraction retained on gelatin with 250 mM NaCl supplemented with 3 M urea in a way that precluded the electrostatic interaction of Fn with heparin. Concerning

Vn, we chose a 6 M urea concentration to make the protocol less denaturing as possible, and we eluted the heparin-retained fraction with 1 M NaCl to impede electrostatic binding [36]. Furthermore, considering that ascites is clinically heterogeneous, notably in terms of volume, it is to be noted that the purification procedure can be applied to ascites samples with different initial volumes. Although the decrease of quantity as the enrichment progresses is inherent to the purification, the rate of purification is comparable to those obtain by others [22–24]. This method represents an unmistakable mean to obtain in solution a protein ensuing from a given patient sample to further investigate it in terms of molecular properties and cell response.

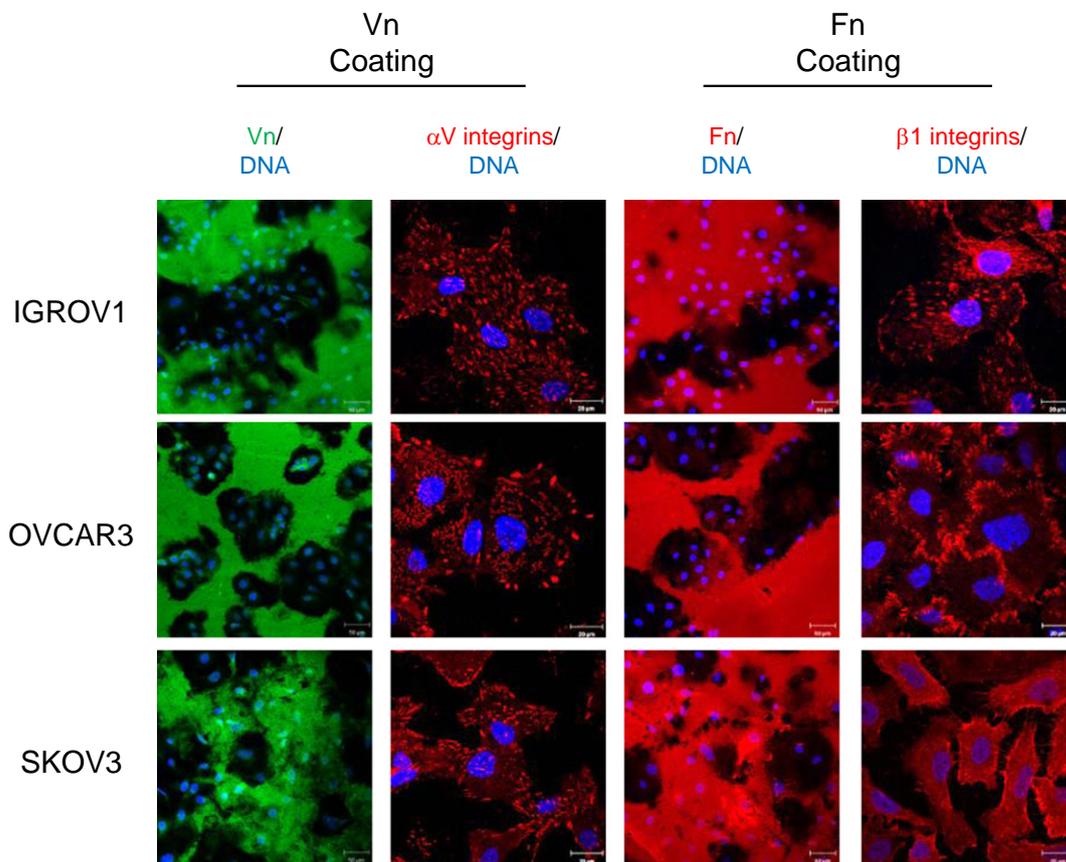


Fig. 10. Remodeling of purified ascitic proteins by ovarian cancer cells and localization of α V and β 1 integrins after 48 h of cell culture. Ovarian cancer cells (IGROV1 or SKOV3 or OVCAR3) were incubated for two days on a coating of ascitic vitronectin or fibronectin from sample 10 (50 μ g/mL). Immunofluorescence staining for vitronectin, fibronectin, α v integrins, β 1 integrins and cell nuclei was observed by confocal scanning laser microscopy. Scale bars: 50 μ m and 20 μ m for Vn, Fn, α v integrins, and β 1 integrins staining respectively.

Since ascites samples are complex and heterogeneous, they would contain various isoforms of ECM proteins. The western blot analyses of Fn and Vn performed from whole ascites reinforce this idea. After purification, different molecular mass isoforms were recovered. Although we cannot exclude that some variants of ECM proteins are lost during the purification process, the major isoforms are retrieved as well as some minor forms. In addition, even if identical purification processes were applied to the different samples, slight differences in protein conformation according to the ascites were evidenced. The apparent discrepancy between the increase of R_H and the absence of tryptophan exposure in ascitic Fn could be explained by sequential unfolding. Indeed, the global conformation of Fn could be modified while its domain remains correctly folded [26]. It could be of interest to consider the molecular properties of ascitic Fn and Vn further as putative neoepitopes, which are defined as post-translational modifications of proteins like protease cleavage, glycosylation, multimerization, etc. in a specific (physio)pathological context [37]. In particular, cancer results in the generation of neoepitopes distributed throughout the ECM; these might be cancer-specific so they could be potential biomarkers [37]. Thus the combined purification approaches we propose here could be important steps toward identifying the relationships between ascitic Fn and Vn phenotypes and clinical data. Similarly, the purification of other ascitic proteins such as kallikrein 6 was the basis for exploring its glycosylation pattern in ovarian cancer [38].

To regulate cellular behavior, soluble ECM proteins have to be incorporated within the cell's microenvironment [12]. When ascites immersed the cell supports in absence of cells, ascitic Vn easily became coated onto the culture support while ascitic Fn was little or not. Others constituents of the ascites would participate or impede to proteins coating. These observations, illustrate that the two proteins do not

have the same way of incorporation in presence of cells. The present results show that ascitic Vn and Fn are integrated into the ovarian cancer cell matrix. In particular, ascitic Fn was found in cell-associated fibrils. This observation supports the view that a dynamic interaction takes place between cancer cells and ascitic ECM proteins, since Fn fibrillogenesis is a complex cell-driven process [12]. Also, purified ascitic Fn and Vn proteins retained their biological activity and were shown to support ovarian cancer cell adhesion, spreading and migration. The organization of integrins within focal contacts when these cells spread on ascitic proteins argues in favor of the engagement of a cell signaling process. Fn and Vn in their solid forms, as well as their β 1 and α v integrin receptors, were previously described as key regulators of ovarian cancer cell adhesion [19,20,39], proliferation [17], invasion [1], and spheroid formation [40], and were shown to contribute to the acquisition of chemoresistance by various cancer cells [41,42]. Interestingly the ovarian cancer ascites protects from TRAIL induced cell death through α v β 5 integrin. Even if α v β 5 is known to be a Vn receptor the authors showed that Vn is not involved in this specific TRAIL pathway [6,43]. Nevertheless, Vn and/or Fn fragments have been shown to promote ovarian cancer cell implantation on the peritoneum [18,21]. Considering that ascites is the main route for metastasis of ovarian cancer cells, Fn and Vn could be ascitic factors that potentially promote tumor progression and enhanced chemoresistance in an environment that lacks the normal solid-phase scaffolding.

5. Conclusions

In the current report, we exploited the unique opportunity provided by the clinical accessibility of ascites fluid to extract ECM components from a complex tumor microenvironment. To our knowledge, this is the first time that such a combined protocol has been established to

purify two ECM proteins successively from a single pathological sample containing a great variety of bioactive molecules. This study highlights that ascites-derived fibronectin and vitronectin exhibit different properties depending on the ascites. This rapid and inexpensive method provides a powerful tool for further analysis of ascitic Fn and Vn structures and their influence on cell response.

The investigation of the relationships between the molecular properties of ascites components and ovarian cancer cell phenotype according to the source of the ascites sample may be critical for a better understanding of the recurrence of this lethal disease and for further biomarker identification.

Acknowledgements

The authors thank Dr. L. Copel from the Institut Curie, Paris, France and Dr. V. Villefranques from the Centre Hospitalier R. Dubos, Pontoise, France for their support in obtaining ascites samples. We thank Prof O. Gallet and Dr. C. Vendrely (ERRMECe) for their advice concerning protein purification and structural data. We thank Prof P. Gauduchon and Dr. L. Poulain for their constant support and advice and Dr. S. Lheureux and M. Briand (BioTICLA) for technical support. The manuscript was revised by Biomedes, for English language editing.

Funding

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer comité du Val d'Oise, France. L. Carduner is a recipient of a fellowship from the ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and of the Université de Cergy-Pontoise.

References

- [1] K.M. Burleson, M.P. Boente, S.E. Pambuccian, A.P. Skubitz, Disaggregation and invasion of ovarian carcinoma ascites spheroids, *J. Transl. Med.* 4 (2006) 6.
- [2] S.A. Cannistra, Cancer of the ovary, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 2519–2529.
- [3] H. Naora, D.J. Montell, Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 355–366.
- [4] A. Ayhan, M. Gultekin, C. Taskiran, P. Dursun, P. Firat, G. Bozdag, N.Y. Celik, K. Yuce, Ascites and epithelial ovarian cancers: a reappraisal with respect to different aspects, *Int. J. Gynecol. Cancer* 17 (2007) 68–75.
- [5] E.C. Kohn, L.A. Travers, J. Kassis, U. Broome, J. Klominek, Malignant effusions are sources of fibronectin and other promigratory and proinvasive components, *Diagn. Cytopathol.* 33 (2005) 300–308.
- [6] D. Lane, N. Goncharenko-Khaider, C. Rancourt, A. Piche, Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through alphavbeta5 integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation, *Oncogene* 29 (2010) 3519–3531.
- [7] M.L. Puiffe, C. Le Page, A. Filali-Mouhim, M. Zietarska, V. Ouellet, P.N. Tonin, M. Chevrette, D.M. Provencher, A.M. Mes-Masson, Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer, *Neoplasia* 9 (2007) 820–829.
- [8] S. Elschenbroich, V. Ignatchenko, B. Clarke, S.E. Kalloger, P.C. Boutros, A.O. Gramolini, P. Shaw, I. Jurisica, T. Kislinger, In-depth proteomics of ovarian cancer ascites: combining shotgun proteomics and selected reaction monitoring mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 2286–2299.
- [9] B.M. Cracchiolo, H.M. Hanauske-Abel, P.E. Schwartz, J.T. Chambers, B. Holland, S.K. Chambers, Procollagen-derived biomarkers in malignant ascites of ovarian cancer. Independent prognosticators for progression-free interval and survival, *Gynecol. Oncol.* 87 (2002) 24–33.
- [10] K.T. Preissner, D. Seiffert, Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling, *Thromb. Res.* 89 (1998) 1–21.
- [11] I. Schwartz, D. Seger, S. Shaltiel, Vitronectin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 539–544.
- [12] Y. Mao, J.E. Schwarzbauer, Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process, *Matrix Biol.* 24 (2005) 389–399.
- [13] E. Ruoslahti, Fibronectin in cell adhesion and invasion, *Cancer Metastasis Rev.* 3 (1984) 43–51.
- [14] F. Carreiras, Y. Denoux, C. Staedel, M. Lehmann, F. Sichel, P. Gauduchon, Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma, *Gynecol. Oncol.* 62 (1996) 260–267.
- [15] U. Reuning, Integrin alphavbeta3 promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors, *J. Cell. Biochem.* 112 (2011) 1909–1919.
- [16] F. Carreiras, V. Rigot, S. Cruet, F. Andre, P. Gauduchon, J. Marvaldi, Migration properties of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1: importance of alpha(v)beta3 integrins and vitronectin, *Int. J. Cancer* 80 (1999) 285–294.
- [17] S. Hapke, H. Kessler, B. Lubber, A. Benge, P. Hutzler, H. Hofler, M. Schmitt, U. Reuning, Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/vitronectin interaction, *Biol. Chem.* 384 (2003) 1073–1083.
- [18] L. Heyman, S. Kellouche, J. Fernandes, S. Dutoit, L. Poulain, F. Carreiras, Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro, *Tumour Biol.* 29 (2008) 231–244.
- [19] K.M. Burleson, R.C. Casey, K.M. Skubitz, S.E. Pambuccian, T.R. Oegema Jr., A.P. Skubitz, Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers, *Gynecol. Oncol.* 93 (2004) 170–181.
- [20] R.C. Casey, K.M. Burleson, K.M. Skubitz, S.E. Pambuccian, T.R. Oegema Jr., L.E. Ruff, A.P. Skubitz, Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids, *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 2071–2080.
- [21] H.A. Kenny, S. Kaur, L.M. Coussens, E. Lengyel, The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1367–1379.
- [22] L. Poulouin, O. Gallet, M. Rouahi, J.M. Imhoff, Plasma fibronectin: three steps to purification and stability, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 146–152.
- [23] T. Yatohgo, M. Izumi, H. Kashiwagi, M. Hayashi, Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography, *Cell Struct. Funct.* 13 (1988) 281–292.
- [24] B. Dahlback, E.R. Podack, Characterization of human S protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. Demonstration of a free reactive thiol group, *Biochemistry* 24 (1985) 2368–2374.
- [25] Z. Gechtman, A. Belleli, S. Lechpammer, S. Shaltiel, The cluster of basic amino acids in vitronectin contributes to its binding of plasminogen activator inhibitor-1: evidence from thrombin-, elastase- and plasmin-cleaved vitronectins and anti-peptide antibodies, *Biochem. J.* 325 (Pt 2) (1997) 339–349.
- [26] S. Patel, A.F. Chaffotte, F. Goubard, E. Pauthe, Urea-induced sequential unfolding of fibronectin: a fluorescence spectroscopy and circular dichroism study, *Biochemistry* 43 (2004) 1724–1735.
- [27] P. Zhuang, M.N. Blackburn, C.B. Peterson, Characterization of the denaturation and renaturation of human plasma vitronectin. I. Biophysical characterization of protein unfolding and multimerization, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 14323–14332.
- [28] M. Rocco, M. Carson, R. Hantgan, J. McDonagh, J. Hermans, Dependence of the shape of the plasma fibronectin molecule on solvent composition. Ionic strength and glycerol content, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 14545–14549.
- [29] C. Akgul, Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 1326–1336.
- [30] C.D. Roskelley, M.J. Bissell, The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer, *Semin. Cancer Biol.* 12 (2002) 97–104.
- [31] D. Chain, T. Kreizman, H. Shapira, S. Shaltiel, Plasmin cleavage of vitronectin. Identification of the site and consequent attenuation in binding plasminogen activator inhibitor-1, *FEBS Lett.* 285 (1991) 251–256.
- [32] D.M. Tollefsen, C.J. Weigel, M.H. Kabeer, The presence of methionine or threonine at position 381 in vitronectin is correlated with proteolytic cleavage at arginine 379, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9778–9781.
- [33] M.M. Jankovic, M.M. Kosanovic, Fibronectin pattern in benign hyperplasia and cancer of the prostate, *Dis. Markers* 25 (2008) 49–58.
- [34] C. French-Constant, Alternative splicing of fibronectin—many different proteins but few different functions, *Exp. Cell Res.* 221 (1995) 261–271.
- [35] A.W. Menzin, J.R. Loret de Mola, W.B. Bilker, J.E. Wheeler, S.C. Rubin, R.F. Feinberg, Identification of oncofetal fibronectin in patients with advanced epithelial ovarian cancer: detection in ascitic fluid and localization to primary sites and metastatic implants, *Cancer* 82 (1998) 152–158.
- [36] D.R. Canchi, D. Paschek, A.E. Garcia, Equilibrium study of protein denaturation by urea, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 2338–2344.
- [37] D.J. Leeming, A.C. Bay-Jensen, E. Vassiliadis, M.R. Larsen, K. Henriksen, M.A. Karsdal, Post-translational modifications of the extracellular matrix are key events in cancer progression: opportunities for biochemical marker development, *Biomarkers* 16 (2011) 193–205.
- [38] U. Kuzmanov, C.R. Smith, I. Batruch, A. Soosaipillai, A. Diamandis, E.P. Diamandis, Separation of kallikrein 6 glycoprotein subpopulations in biological fluids by anion-exchange chromatography coupled to ELISA and identification by mass spectrometry, *Proteomics* 12 (2012) 799–809.
- [39] J. Leroy-Dudal, L. Heyman, P. Gauduchon, F. Carreiras, Adhesion of human ovarian adenocarcinoma IGROV1 cells to endothelial cells is partly mediated by the alpha v integrins-vitronectin adhesive system and induces an alteration of endothelial integrity, *Cell Biol. Int.* 29 (2005) 482–488.
- [40] S. Kellouche, J. Fernandes, J. Leroy-Dudal, O. Gallet, S. Dutoit, L. Poulain, F. Carreiras, Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin, *Tumour Biol.* 31 (2010) 129–139.
- [41] J.H. Uhm, N.P. Dooley, A.P. Kyritsis, J.S. Rao, C.L. Gladson, Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 1587–1594.
- [42] H. Xing, Y. Cao, D. Weng, W. Tao, X. Song, W. Wang, L. Meng, G. Xu, J. Zhou, S. Wang, D. Ma, Fibronectin-mediated activation of Akt2 protects human ovarian and breast cancer cells from docetaxel-induced apoptosis via inhibition of the p38 pathway, *Apoptosis* 13 (2008) 213–223.
- [43] D. Lane, I. Matte, C. Rancourt, A. Piche, Osteoprotegerin (OPG) protects ovarian cancer cells from TRAIL-induced apoptosis but does not contribute to malignant ascites-mediated attenuation of TRAIL-induced apoptosis, *J. Ovarian Res.* 5 (2012) 34.

Annexe 2 : Cell cycle arrest or survival signaling through αv integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids.

L. Carduner, C.R. Picot, J. Leroy-Dudal, L. Blay, S. Kellouche, F. Carreiras.

Sous-presse à Experimental Cell Research.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Cell cycle arrest or survival signaling through αv integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids

Ludovic Carduner¹, Cédric R. Picot^{1,*}, Johanne Leroy-Dudal, Lyvia Blay, Sabrina Kellouche, Franck Carreiras

Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules, ERRMECe (EA 1391), Institut des Matériaux, Université de Cergy-Pontoise, 2 avenue Adolphe Chauvin, 95302 Cergy-Pontoise Cedex, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 24 July 2013

Received in revised form

11 November 2013

Accepted 14 November 2013

Available online 27 November 2013

Keywords:

Anoikis

Ovarian cancer

Spheroids

ERK1/2

PKC

 αv integrins

Quiescence

ABSTRACT

Ovarian cancer is the most lethal gynecologic cancer mainly due to spheroids organization of cancer cells that disseminate within the peritoneal cavity. We have investigated the molecular mechanisms by which ovarian cancer spheroids resist anoikis, choosing as models the 2 well-characterized human ovarian cancer cell lines IGROV1 and SKOV3. These cell lines have the propensity to float as clusters, and were isolated from tumor tissue and ascites, respectively. To form spheroids, IGROV1 and SKOV3 ovarian adenocarcinoma cells were maintained under anchorage-independent culture conditions, in which both lines survive at least a week. A short apoptotic period prior to a survival signaling commitment was observed for IGROV1 cells whereas SKOV3 cells entered G0/G1 phase of the cell cycle. This difference in behavior was due to different signals. With regard to SKOV3 cells, activation of p38 and an increase in p130/Rb occurred once anchorage-independent culture was established. Analyses of the survival signaling pathway switched on by IGROV1 cells showed that activation of ERK1/2 was required to evade apoptosis, an effect partly dependent on PKC activation and αv integrins. αv -integrin expression is essential for survival through activation of ERK1/2 phosphorylation.

The above data indicate that ovarian cancer cells can resist anoikis in the spheroid state by arrest in the cell cycle or through activation of αv -integrin-ERK-mediated survival signals. Such signaling might result in the selection of resistant cells within disseminating spheroids, favoring further relapse in ovarian cancers.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; ER, endoplasmic reticulum; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FAK, focal adhesion kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Mcl-1, myeloid cell leukemia sequence 1; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PI3k, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; Rb, retinoblastoma protein.

*Corresponding author. Fax: +33 1 34 25 66 94.

E-mail address: cedric.picot@u-cergy.fr (C.R. Picot).

¹ Contributed equally to this work.

Introduction

Ovarian cancer has the highest mortality rate of gynecologic cancers, mainly due to its late diagnosis. It is usually diagnosed at an advanced stage, when tumor has spread beyond the ovaries and disseminated into the peritoneal cavity, making conventional therapy less effective. Thus the 5-year survival rate is only 20–30% for advanced-stage disease [1]. Ascites accumulation is a frequent complication of ovarian cancer, being associated with a low survival rate [2]. Ascitic fluid contains ovarian cancer cells as single cells or spheroid-like structures, which is thought to favor peritoneal dissemination. Floating cancer spheroids acquire the ability to survive in an environment that lacks the normal solid-phase scaffolding of an extracellular matrix (ECM). This is accompanied by reduced cell proliferation and a protein expression pattern consistent with cellular quiescence, specifically decreased phospho-Akt and p45/SKP2 with a concomitant increase in p130/RBL2 and p27Kip1 [3,4]. Since anchorage dependence is usually a requirement for cell viability, the absence of an adhesion substratum or the disruption of cell–matrix interactions normally induces the pathways leading to apoptotic cell death, *via* a process that is called *anoikis* [5,6]. Anchorage-independent growth is a hallmark of some cancer cells, and resistance to anoikis may play a role in the survival of circulating tumor cells and metastasis [7]. However, activation of anoikis resistance during ovarian cancer spheroid dissemination remains unclear.

Following the loss of anchorage, a complex balance between survival and death signaling molecules involving Bcl-2 family proteins is seen in cells [6], their expression and stability governing a critical decision at a checkpoint that leads to either cell survival or death. Amongst Bcl-2 proteins, Mcl-1 expression can enhance the survival of different cell lines under apoptosis-inducing conditions, while reducing Mcl-1 content by caspase-3 cleavage leads to apoptosis [8]. Through their capacity to interact with the surrounding ECM, cell adhesion receptors of the integrin family also regulate tumor cell survival. While ligated integrins relay survival signals, it is becoming clear that unligated integrins act either positively or negatively on apoptotic cascades [9]. Upon cell adhesion to ECM, integrins trigger FAK/PI3K/Akt signaling, leading to the transcription of anti-apoptotic molecules of the Bcl-2 family. At the same time, downstream activation of Raf/MEK/ERK pathway might provoke the sequestration of the pro-apoptotic molecule, Bad [6]. In melanoma, PI3K/Akt and Ras/Raf/Mek/Erk constitute the best known cell survival-promoting pathways amongst those identified so far as being engaged by integrins [10].

Integrins are also likely to help regulate the extrinsic apoptosis pathway through the activation of protein kinase C (PKC) [6], a family of specific serine-/threonine-kinases implicated in a wide variety of cellular responses, including proliferation and regulation of gene expression. PKC can be involved in both protection from apoptosis and induction of apoptosis [11]. With the exception of atypical PKCs, conventional and novel PKCs can be activated by interaction with the endogenous ligand, diacylglycerol, or pharmacological compounds, such as phorbol esters [12]. The range responses mediated by PKCs have been attributed to cell type-specific expression and function of distinct isoforms. Interestingly, PKCs isoenzymes are recruited by $\alpha\beta$ 3-integrin and contribute to adhesion-dependent ERK1/2 activation [13];

thus their activation could be of importance in the regulation of cell survival.

Together, these observations suggest a complex connection between several signaling mechanisms in the regulation of survival of cancer cells; yet their putative contribution to the anchorage-independent survival of ovarian spheroids remains largely unexplored.

We previously found a contributory role for the α v integrins/vitronectin system in the initial step of spheroid formation in ovarian cancer [14]. Since the blockade of α v integrins mimicking loss of cell anchorage induces anoikis and subsequently tumor regression [15], Desgrosellier et al. [7] have also shown that α v β 3 expression could contribute to tumor progression and metastatic potential by activating c-src in an anchorage-independent manner of integrin ligation and FAK activation.

We have assessed whether α v integrin-mediated interactions during the formation of spheroids lead to the activation of cell survival signals and protect cells against anoikis. The 2 models we choose are well-characterized human ovarian cancer cell lines, IGROV1 and SKOV3, which were established from an adenocarcinoma and isolated after cultivation of ascitic fluid, respectively [16,17]. *In vitro*, adhering IGROV1 cells pile up, forming floating clusters of varying sizes. In this way, IGROV1 and SKOV3 cells constitute interesting models regarding cell anchorage-dependent survival, since those derived from adherent cells could detach to form multicellular aggregates whereas the other line derived from floating cells is adherent in culture. In addition, α v β 3 is also the sole member expressed in IGROV1 cells, whereas SKOV3 expresses both α v β 3 and α v β 5 integrins [18]. Expression of α v integrins and PKCs activation, together with ERK1/2 signaling, rescue IGROV1 ovarian cancer cells from anoikis when organized in spheroids, whereas anchorage independence triggers SKOV3 cells growth arrest within multicellular aggregates.

Materials and methods

Cell culture

Human ovarian adenocarcinoma cell lines, IGROV1 and SKOV3, were kindly provided by Drs J. Benard [16] and L. Poulain from BioTICLA unit (Caen, France), respectively. IGROV1 cells had been derived from a stage III ovarian adenocarcinoma of a 47 year-old woman, and SKOV3 cells were isolated from ascites, derived from a serous cystadenocarcinoma of a 64-year-old patient [17]. Both cell lines mimicked the progression of ovarian carcinoma when injected *i.p.* in nude mice models, giving rise to disseminated carcinomatoses associated with ascites showing a typical morphology consistent with the patients' primary tumors [16,17,19].

Cell culture media, reagents and fetal bovine serum (FBS) were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Cells were grown in RPMI-1640 glutamax medium containing sodium bicarbonate supplemented with 10% FBS (complete medium). The method of generating multicellular aggregates has been described previously [14,20]. Briefly, to prevent cell adhesion to a substratum, culture flasks (25 cm²) were filled with 4 mL 1% agarose (Eurobio, Courtaboeuf, France) in serum-free medium and allowed to solidify for 30 min at room temperature. Subconfluent cells were collected with trypsin–EDTA and resuspended in complete medium to obtain 1.5×10^6 cells/flask. When indicated for

individual experiments, the following drugs were added to the culture medium: U0126 (662005), PMA (524400) and calphostin C (208725) purchased from Millipore (Darmstadt, Germany), and staurosporine (S4400) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), with DMSO (UD8050-05-A) from Euromedex (Souffelweyersheim, France) used as the control.

Multicellular aggregates viability

Multicellular aggregates were cultivated for up to 7 days. Cells were collected by centrifugation and aggregates were disrupted in trypsin–EDTA for 10 min at 37 °C. Cell number was determined by counting viable cells by the trypan blue exclusion test. Depending on the experiment, results were expressed as a fold change in viable cell number compared to untreated cells. Each experiment was done at least 3 times.

Cell cycle analysis

Aggregates from each day were collected by centrifugation and incubated with trypsin–EDTA for 10 min at 37 °C. The cells were rinsed with Phosphate Buffer Saline (PBS) (1.30 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.2), fixed in 70% ethanol and stored at –20 °C pending analysis. Fixed cells were incubated for 30 min at 37 °C in PBS to release low molecular weight DNA that is characteristic of apoptotic cells. After centrifugation, the cells were resuspended and stained at room temperature for 20 min with propidium iodide using the DNA Prep Coulter Reagent Kit (Beckman Coulter, Villepinte, France). The samples were analyzed in an EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter), with cell cycle distribution being determined with Expo32 acquisition software (Beckman Coulter).

Western blotting

Cellular homogenates were obtained using the cell lysis buffer (9803 from cell signaling). The lysates were centrifuged at 15,000g for 15 min at 4 °C to pellet the cellular debris and the protein concentration of the supernatant was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Life Science Group, Marnes la Coquette, France). Total protein (30 µg) was separated on 12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel as described by Laemmli [21]. The gels were electrotransferred onto a Hybond nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) for 75 min at room temperature. Western blotting was done with anti- α v integrins (sc-376156), -p130/Rb (sc-317), -Mcl-1 (sc-819) (Santa Cruz, Heidelberg, Germany), or anti-PARP and cleaved PARP (9542), -bax (5023), -phospho ERK1/2 (4370), -phospho p38 (9211), -ERK1/2 (9102) and -p38 (9212) (Cell signaling, Danvers, MA, United States of America) or anti-actin (A5441) (Sigma-Aldrich) antibodies. Detection was done using an Immobilon substrate (Millipore), with actin as a loading control. Densitometry was used to calculate each capture (GS-800, BioRad). The ratio of signals to actin or to the non-phosphorylated form of protein was expressed as fold-changes in comparison to day 1 of non-adherent culture or untreated cells, according to the experiments.

Caspase-3 activity

The activity of caspase-3 was determined using a caspase colorimetric assay kit (K106-100, Biovision, Milpitas, California, USA). Briefly, cells were collected by centrifugation at 300g for 10 min at 4 °C, washed with ice-cold PBS and incubated in a lysis buffer. The lysates were tested for protease activity using a caspase-specific peptide conjugated with the color, p-nitroaniline. The chromophore of p-nitroaniline cleaved by caspases was quantified with a spectrophotometer at 405 nm. Caspase activity of cell lysates was directly proportional to the color reaction. Results are given as the relative fold-change of caspase-3 activity in the appropriate experimental condition compared to the caspase-3 activity of adherent cell (control) or that of non-adherent untreated cells, depending upon the experiment. Each experiment was done at least 3 times.

α v integrins knock-down

α v integrins were silenced by transient transfection of adherent cells with a mix of siRNA α v (sc-29373, Santa Cruz) or siRNA scrambled (sc 37007, Santa Cruz), targeting α v integrins mRNA and (control) non-targeting, respectively. Briefly, a mix of siRNA and INTERFERIN (Ozyme, St. Quentin-en-Yvelines, France) was diluted in the ratio 1:4. Six nM of siRNA mix with 25 µL INTERFERIN was used to silence α v expression over 24 h. The cells were collected and incubated in agarose-filled flasks for 2 days.

Statistical analysis

All experiments involved at least 3 independent experiments. The results are expressed as mean \pm SEM. For statistical analysis, Student's *t*-test was used with significance set at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.005$ (***)

Results

Formation and survival of ovarian carcinoma spheroids

Culture conditions in suspension or a non-adhesive environment favor multicellular spheroids formation [14,20]. The surviving ability of human ovarian adenocarcinoma cells organized into spheroids was analyzed. Cell aggregation was followed for 7 days. IGROV1 and SKOV3 cells formed mechanically stable multicellular aggregates during the course of the experiment (Fig. 1). After a few hours culture, cells began to cluster. Over time, they became tightly packed and reached 50–100 µm for IGROV1 cell line and >300 µm for SKOV3 after 4 days (Fig. 1A). IGROV1 clusters kept their structure for 7 days, forming compact aggregates containing 6 to >20 cells that correspond to the morphology of ovarian cancer spheroids isolated from ascites, as described by Burleson et al. [22]. SKOV3 clusters were organized differently: the number of cells per aggregate was >50 from the second day of culture and aggregates were less tight and compact than those formed by the IGROV1 cells. Furthermore, no isolated cells could be observed in non-adherent culture of SKOV3, unlike IGROV1.

Regarding survival within multicellular aggregates over the 7 days of culture, viable cells were counted after enzymatic and

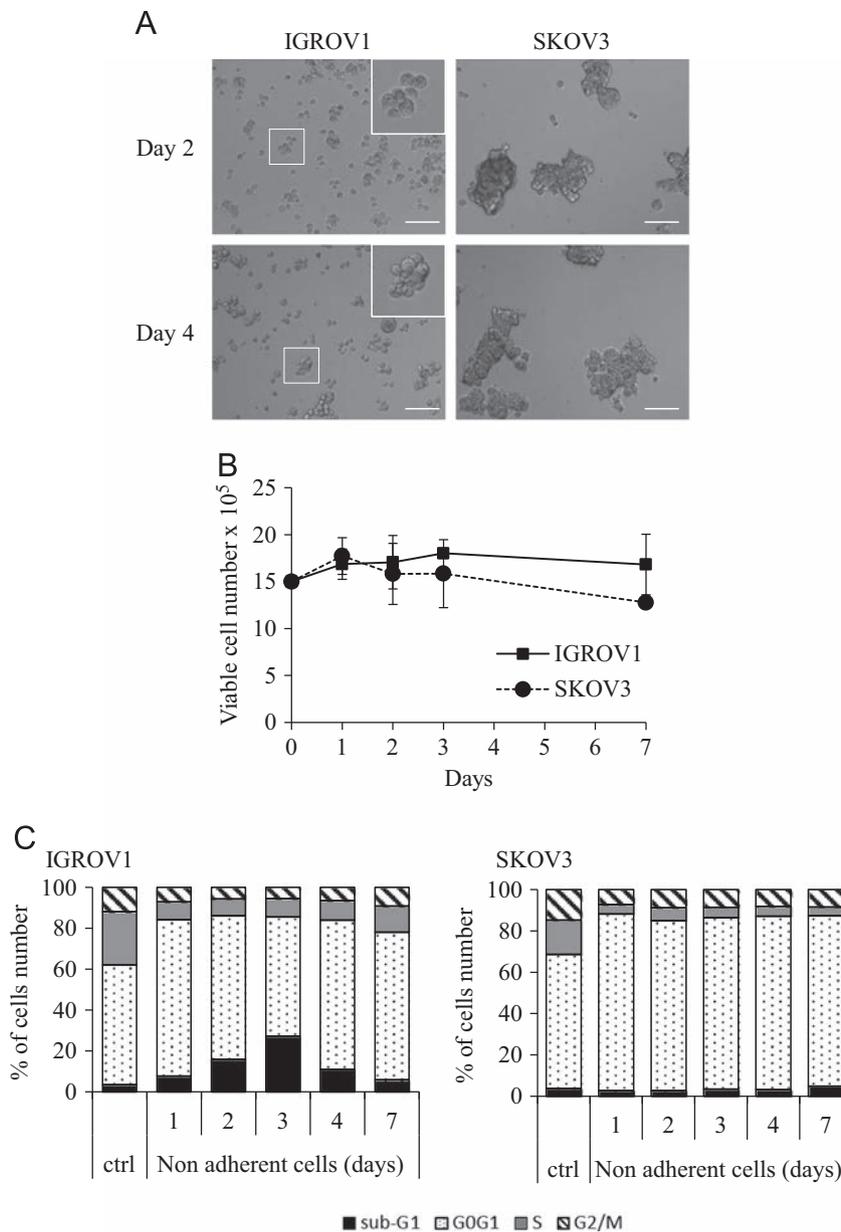


Fig. 1 – Formation and viability of ovarian carcinoma spheroids. (A) IGROV1 and SKOV3 ovarian cancer cells were grown under non-adherent conditions at 37 °C. Light micrographs were taken on days 2 and 4 (scale bar 100 μ m). Inset: high magnification of IGROV1 spheroids. (B, C) IGROV1 and SKOV3 spheroid cultures were maintained for 7 days. The resulting aggregates were gently collected each day to determine cell viability (B) and analyze cell cycle (C). Cells grown under adherent conditions for 48 h were used as controls (ctrl).

mechanically dissociation. The number of cells remained steady over this time for both IGROV1 and SKOV3, suggesting that both were able to survive under non-adhesive culture conditions (Fig. 1B). To confirm this, cell cycle distribution was followed throughout by flow cytometry. When cells are placed under non-adhesive conditions, the percentage of cells in G0–G1 increased significantly from 59% to 77% for IGROV1, and from 65% to 85% for SKOV3 cells (Fig. 1C). There was also a decrease in proliferation, since the percentage of cells in S phase decreased from 26% to 9% for IGROV1, and from 17% to 5% for SKOV3.

The two cells lines had different responses to non-adhesive culture conditions in terms of the proportion of cells in the sub-G1 peak, which represents cell debris and apoptotic cells.

A transient increase in the sub-G1 peak was seen after 1–3 days of spheroid culture of IGROV1 cells. This decrease in cells in the sub-G1 peak and the concomitant increase of IGROV1 cells in S and G2/M after 4 days of spheroids culture show that a subpopulation of IGROV1 cells survives. The data also suggest that a balance between cell death and survival results in the apparent stability of population (Fig. 1B) when IGROV1 cells were grown in an anchorage-independent way. In contrast, SKOV3 cells showed no changes in their distribution through the debris/apoptotic cells peak, or through the S and G2/M subpopulations during the course of the experiment, suggesting that the stability of SKOV3 cell number under anchorage-independent culture is associated with growth arrest.

Anchorage independent culture promotes a dual apoptosis/survival response in IGROV1 cells and SKOV3 cells cycle arrest

To understand the simultaneous presence of apoptotic and viable cells during anchorage-independent culture, expression of apoptosis and survival markers was followed over the 7 days of culture. Since PARP cleavage is a sign of apoptosis, this parameter was measured by western blot for IGROV1 and SKOV3 cells that had not attached to support. IGROV1 cells loss of anchorage leads to an increase of PARP cleavage that reaches a maximum on the third day (Fig. 2A), indicative of apoptosis induction. In contrast, SKOV3 spheroids had only a lower PARP cleavage throughout the 7 days of non-adhesive culture. These different types of behavior were confirmed following caspase-3 activation. While relative caspase-3 activity increased in the first days of non-adherent culture and decreased after a longer time for IGROV1 cells, it seems seldom if it was ever activated in SKOV3 non-adhesive cell

cultures (1.5 fold increase compared to adherent cells), whereas SKOV3 cells entered apoptosis, as attested by 1 μ M staurosporine treatment. Comparatively, the expression of Bax, a pro-apoptotic marker, increased during IGROV1 culture without anchorage in comparison to adherent cells, and then remained stable. Its expression transiently decreased on days 3 and 4 of culture without anchorage for SKOV3, prior to reaching a level close to that of adherent cells at day 7. The expression of survival molecules was also analyzed over the same period of time (Fig. 2B). Mcl-1 is increased from the first day of IGROV1 spheroid formation compared to adherent cells. It might have been upregulated during critical transitions in cell fate, its function being to provide short-term enhancement of viability. Unlike IGROV1, Mcl-1 expression in SKOV3 cell line did not vary to a significant extent between adherent and spheroid culture conditions.

One way cells avoid apoptosis is by arrest in the G₀/G₁ phase of the cell cycle, which involves the expression and activation of

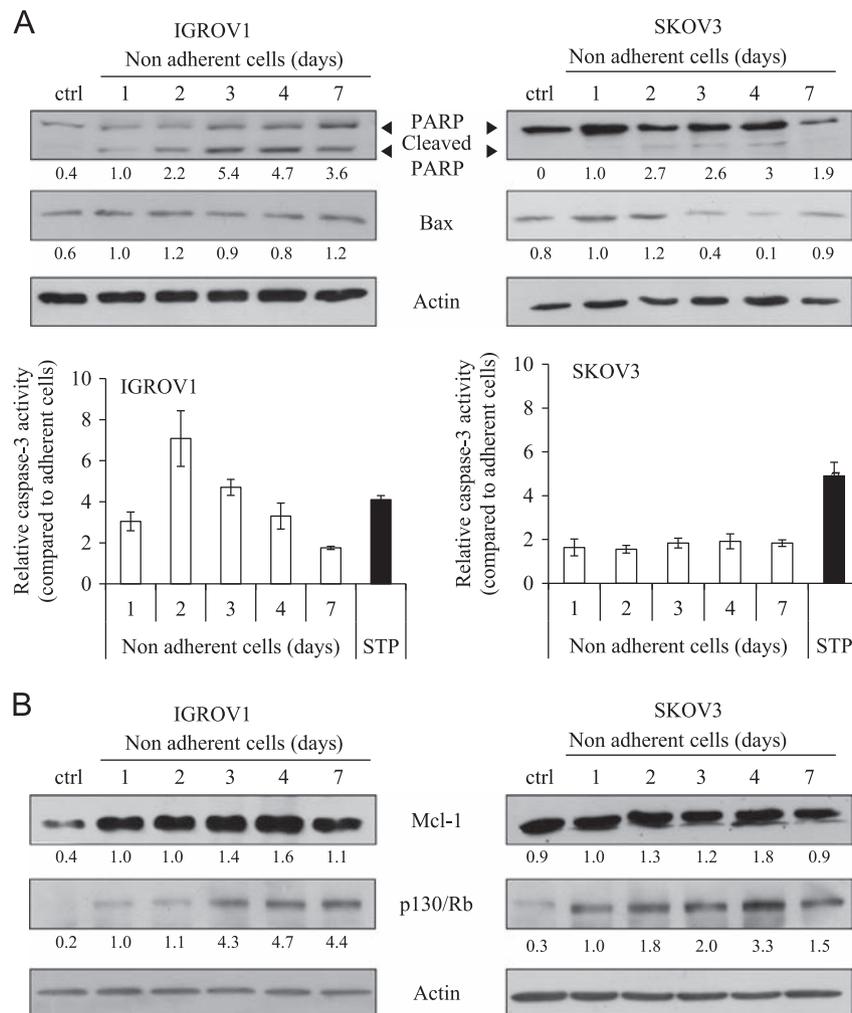


Fig. 2 – Non-adherent growth conditions induce modification of pro- and anti-apoptotic marker expression. (A) IGROV1 and SKOV3 spheroids were assayed for Bax, full length- and cleaved-PARP by western blotting, with actin as a loading control. Caspase-3 activity was measured using a colorimetric assay as described in M&M. Staurosporine A (STP) was used as a positive control for apoptosis induction. Results are given as relative fold change in caspase-3 activity under experimental condition in comparison to that of adherent cells. **(B)** Expression of Mcl-1 and p130/Rb was measured by western blotting, with actin as a loading control. Cells grown under adherent conditions for 48 h were used as controls (ctrl). Relative band intensities (under each blot) of blots were normalized to that of actin and expressed as fold change in comparison to day 1 of the non-adherent culture.

proteins, such as p130 and retinoblastoma protein (p130/Rb). An increase in p130/Rb expression occurred from the first day of spheroid formation in IGROV1 and became more marked by the third day (Fig. 2B). p130/Rb expression in SKOV3 cells progressively increased from the first day of non-adherent culture up to day 4. This difference in the kinetic of p130/Rb expression following loss of anchorage in IGROV1 and SKOV3 cells could support the cell cycle data. Indeed, G0/G1 arrest of SKOV3 cells was seen from the first day of spheroid formation, whereas an increase of the G0/G1 IGROV1 subpopulation occurred only after day 4, following an apoptotic period.

These results support the notion that the stability of IGROV1 and SKOV3 cell population with time under non-adhesive culture conditions leads to different behaviors. The stability of IGROV1 cell number within multicellular aggregates is associated at a molecular level with earlier expression of Mcl-1 together with cleaved PARP, indicating a dual balance between restoration of cell survival and an apoptotic episode, whereas a quiescent phenotype with a progressive expression of p130/Rb accompanies the stability of the SKOV3 cell population.

Therefore, ovarian carcinoma cells culture under conditions preventing substratum adhesion leads to the formation of viable spheroids. This indicates that survival and apoptosis signaling occur during spheroid formation.

ERK1/2 phosphorylation is required for IGROV1 ovarian cancer spheroids survival

Cell responses to environmental stresses, such as non-adhesive growth, are mediated by modification of intracellular signaling events. Among these, MAP kinases signaling is crucial to regulate several processes, including proliferation, survival and apoptosis. We therefore investigated the role of ERK1/2 and p38 in spheroid survival. Culture of IGROV1 cells without anchorage induced ERK1/2 phosphorylation modifications (Fig. 3). Loss of anchorage led to a significant decrease in ERK1/2 phosphorylation as compared to its phosphorylation in adherent cells (Fig. 3). In IGROV1 spheroids, p38 phosphorylation fluctuates, reaching a maximum after 2–3 days under non-adhesive culture conditions.

This increase at days 2 and 3 was associated with the marked increase of PARP cleavage and a maximal fold increase of caspase 3 activity within non-adherent IGROV1 cells (Fig. 2A). When SKOV3 cells were grown in an anchorage-independent manner, ERK1/2 phosphorylation did not change in the first few days in comparison with adherent culture conditions. p38 was activated in SKOV3 spheroids compared to p38 phosphorylation in SKOV3 adherent cells.

To characterize the importance of ERK1/2 phosphorylation in anoikis resistance, 1 or 2 day spheroids were treated with U0126 (Fig. 4). U0126 is an organic compound that specifically inhibits MEK1 and MEK2, and thus inhibits activation of ERK1 and ERK2 [23]. In the presence of U0126 inhibitor, the relative number of viable cells within non-adherent IGROV1 spheroids decreased in comparison to the control (DMSO treated cells), leading to a fall of 25% and 22% in cell survival at days 1 and 2, respectively. At the same time, U0126 treatment enhanced PARP cleavage and relative caspase-3 activity in cells grown without anchorage (Fig. 4A). Considering SKOV3 cells (Fig. 4B), even when treatment with U0126 compound led to inhibition of ERK1/2 phosphorylation, this did not significantly affect cell viability under non-adherent condition. In the same way, U0126 treatment did not induce significantly either PARP cleavage or caspase-3 activation in non-adherent SKOV3 cells. These results suggest that IGROV1 cells, unlike SKOV3 cells, resist apoptotic stresses partly by activation of ERK1/2 MAP kinase signaling.

PKC and αv integrins are involved in IGROV1 anoikis resistance

PKC are serine/threonine kinases that regulate a variety of cell functions, including proliferation and apoptosis. Treatment of IGROV1 cells with the PKC inhibitor, calphostin C, during the first 2 days of spheroid formation enhanced cell mortality, PARP cleavage and caspase-3 activation (Fig. 5A), while treatment with PMA, a commonly used phorbol ester that activates PKC isoenzymes, increased spheroid survival and simultaneously decreased both PARP cleavage and relative caspase-3 activity (Fig. 5B). Flow

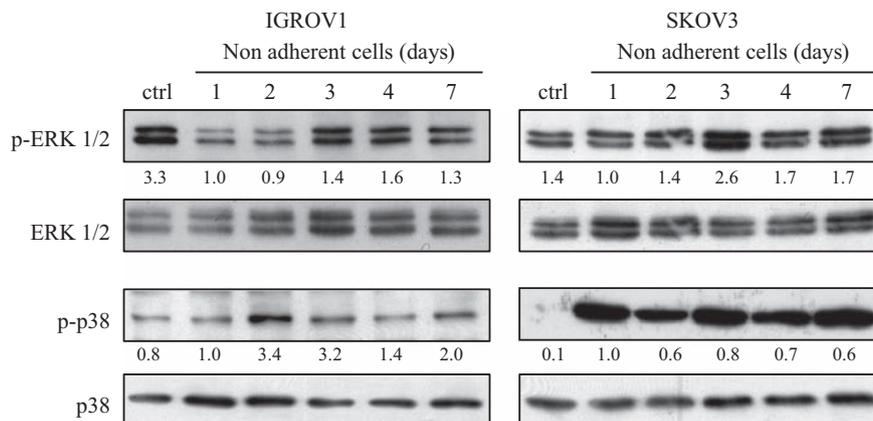


Fig. 3 – ERK1/2 and p38 signaling pathways activation under non-adherent growth conditions. IGROV1 and SKOV3 spheroids were assayed for ERK1/2, p38 and their phosphorylated form expression by western blotting. Relative band intensities of p-ERK1/2 and p-p38 normalized to non-phosphorylated ERK1/2 and p38, respectively, and expressed as fold change in comparison to day 1 of the non-adherent culture.

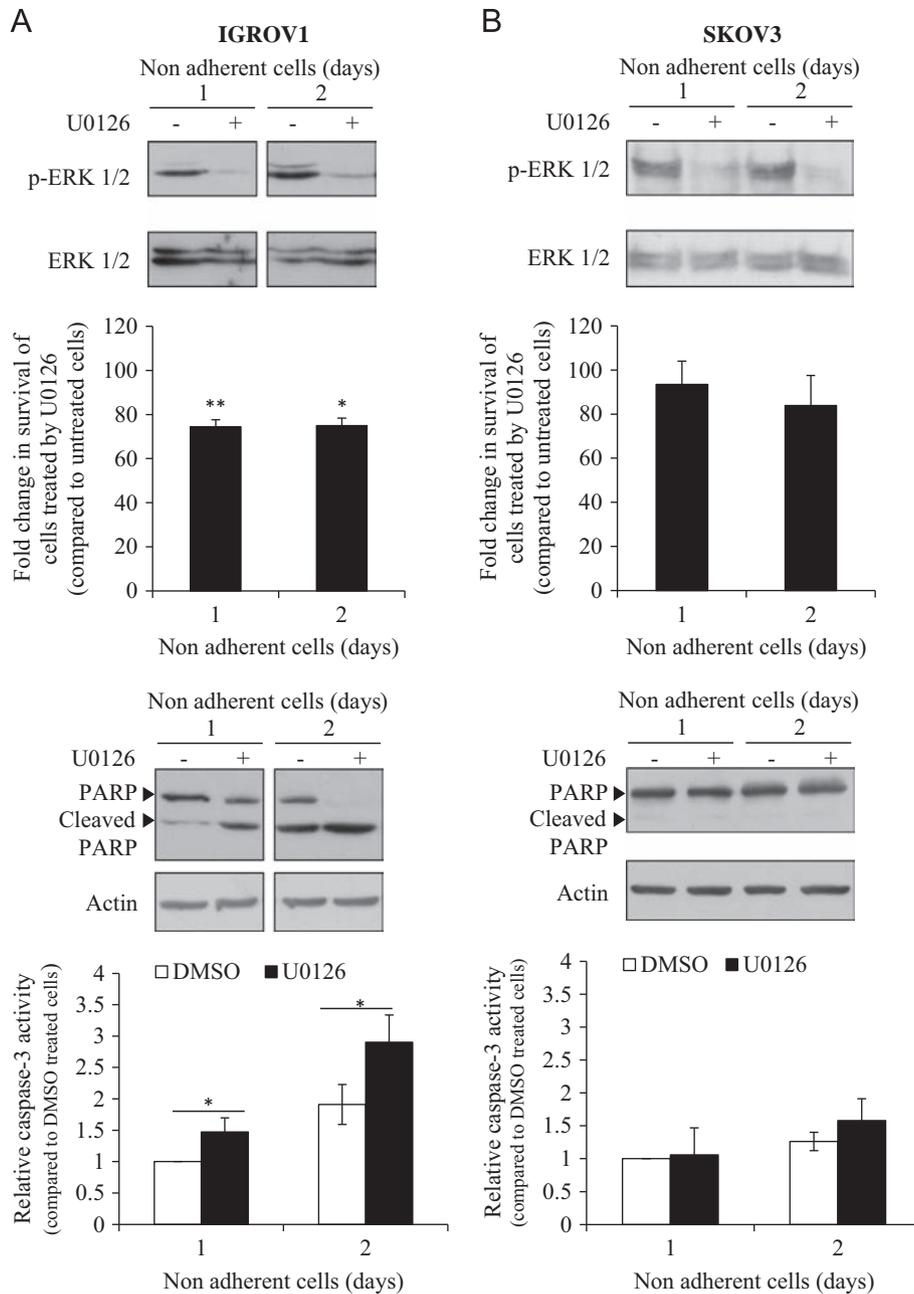


Fig. 4 – ERK1/2 phosphorylation requirement for survival of IGROV1 ovarian cancer spheroids. IGROV1 (A) or SKOV3 (B) cells were treated with 10 μ M U0126 (+), an inhibitor of ERK1/2 phosphorylation, or DMSO (–) as a control, for 1–2 days of non-adherent culture. Inhibition of ERK1/2 activation was verified by western blotting. Viable cell numbers were quantified and results are given as relative viable cell numbers compared to untreated cells for each day of treatment. Apoptosis was followed by western blotting of full length- and cleaved-PARP and caspase-3 activity. Results are given as relative fold change in caspase-3 activity in comparison to that of DMSO-treated cells at day 1. Student's *t*-test was used between untreated and treated cells for each day, and significant differences are marked by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

cytometry showed that PMA-treatment of IGROV1 spheroids also led to a marked decrease in cell debris and death during spheroid culture, especially under conditions where anchorage-independent induced apoptosis was maximal (i.e. during the first 3 days) (Fig. 5C). It appears that PKC activation favors spheroid viability.

Amongst adhesive systems, α v integrins are involved in ovarian pathology [24–27]. Cell interactions mediated by α v integrins are of importance in the initial formation of IGROV1 spheroids [14].

Desgrosellier et al. [7] showed the impact of α v β 3 integrin expression on the anchorage-independent survival and the aggressive behavior of cancer cells *in vivo*. The involvement of α v integrins in the survival and resistance to cell death of spheroids was therefore investigated. α v integrin expression was maintained in a steady-state during spheroid culture, despite a slight decrease during the first day of losing anchorage (Fig. 6A). We therefore analyzed the effect of decreased α v integrin

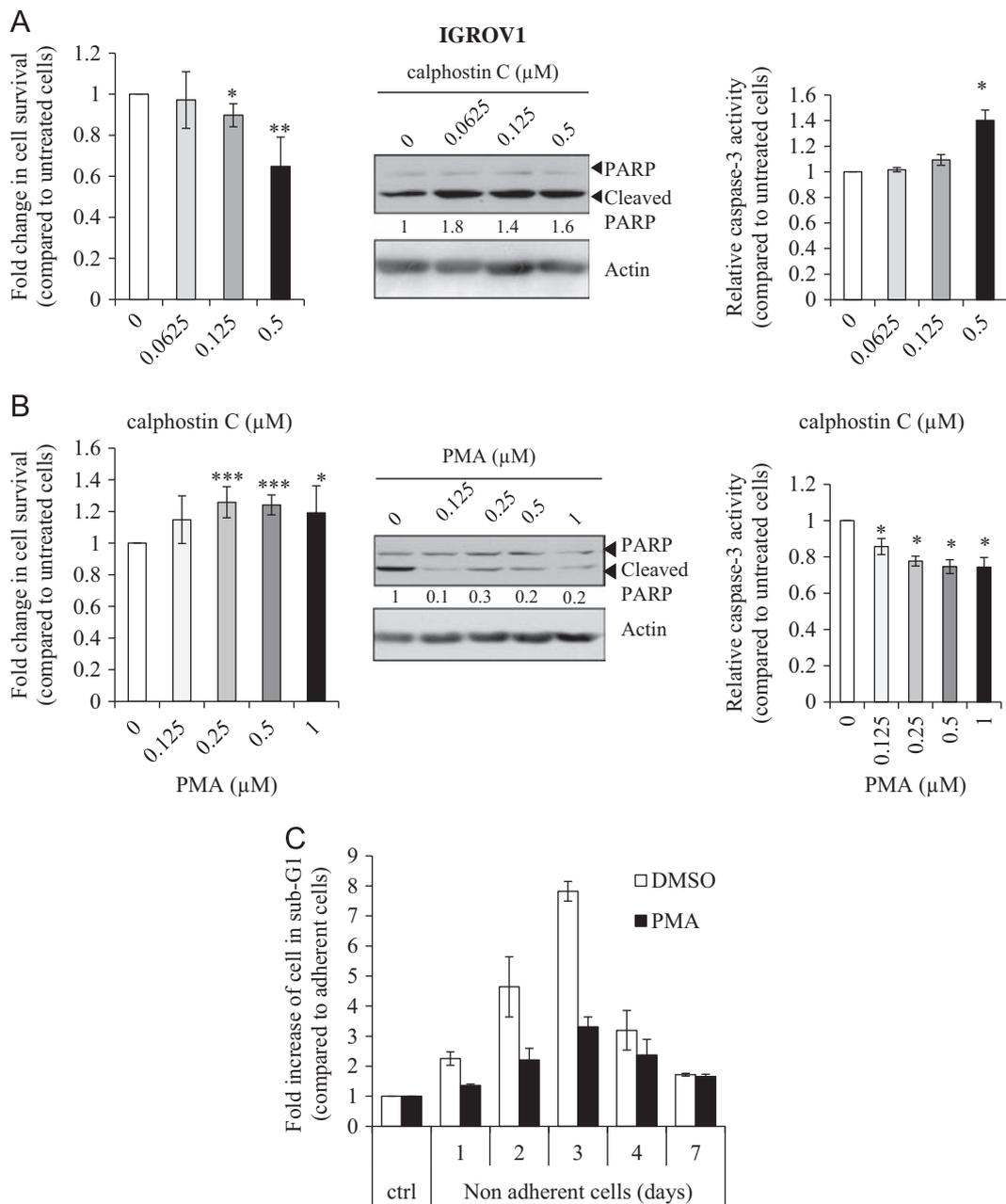


Fig. 5 – PKC involvement in IGROV1 anoikis resistance. (A, B) IGROV1 cell viability was assayed in the presence of calphostin C (A) or PMA (B) during the initial steps of spheroid formation (2 days of non-adherent culture). The resulting aggregates were gently collected to determine cell viability. Apoptosis was followed by full length- and cleaved-PARP western blotting, with actin as a loading control. Caspase-3 activity was measured and expressed as relative activity compared to the untreated controls. Relative band intensities of cleaved-PARP were normalized to that of actin signals and compared to the band intensity of the untreated condition. Student's *t*-test was used between untreated and treated cells, and significant differences are marked by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.005$. (C) IGROV1 spheroids were treated with DMSO or 1 μM PMA for 7 days and the sub-G1 fraction measured by cell cycle analysis. Results are given as a fold increase in sub-G1 peak under experimental condition compared to adherent cells.**

expression by siRNA directed against αv integrins mRNA on cell viability. Lower αv -integrin expression in IGROV1 adherent cells did not induce cell mortality (data not shown), but diminution in IGROV1 spheroids induced apoptosis, as shown by PARP cleavage and a slight increase in relative caspase-3 activity after 1–2 days of culture under non-adhesive conditions (Fig. 6B).

PKC and αv integrins converge towards ERK1/2 activation in IGROV1 cells

One of the most promising mechanisms for sustained MAPK signaling is the cross-talk between major intracellular signal cascades, that between MAPK signaling and PKC mediated-pathway

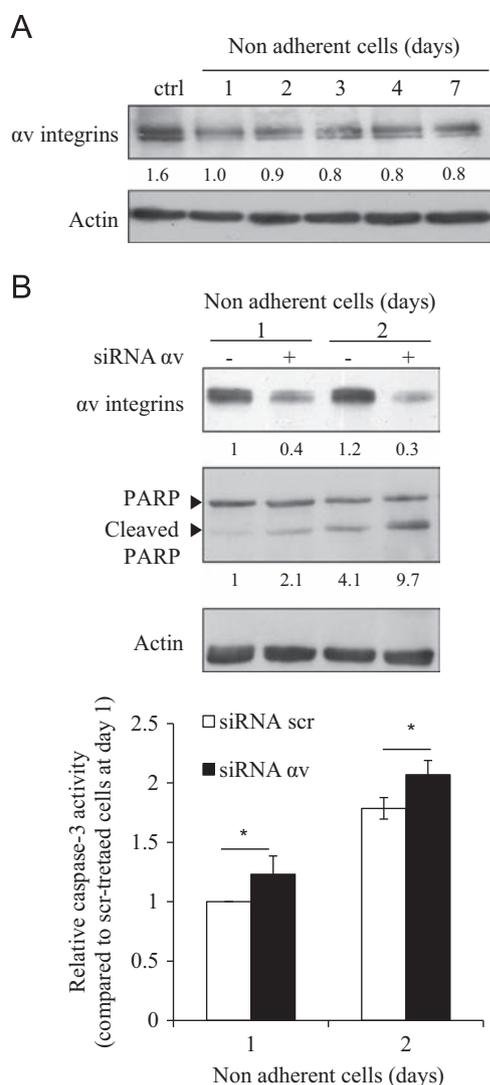


Fig. 6 – Importance of αv integrin expression in IGROV1 spheroid anoikis resistance. (A) Expression of αv integrins in different aged IGROV1 spheroids or adherent cells (ctrl) was analyzed by western blotting, with actin as a loading control. (B) Effect of αv integrins knock-down on 1 or 2 day IGROV1 spheroid survival. Adherent cells were transfected with siRNA αv integrins (αv) or siRNA scramble (scr). The cells were grown under non-adherent culture conditions over 1–2 days. Silencing efficiency was controlled by anti- αv integrin western blotting. Induction of apoptosis was followed by the expression of full length- and cleaved- PARP by western blotting, with actin as a loading control. Relative band intensities of αv integrins and cleaved-PARP were normalized to that of actin signals and expressed as relative fold change of band intensity of siRNA scrambled condition at day 1 of the non-adherent culture. Caspase-3 activity was measured and results are given as relative activity in comparison to the caspase-3 activity of siRNA scrambled-treated cells at day 1. Student's *t*-test was used and significant difference is marked by * $p < 0.05$.

being one of them. PKC may activate ERK1/2 signaling cascade for migration of ovarian cancer cells [13], but may also be involved in the activation of ERK1/2 during damage-induced apoptosis [28].

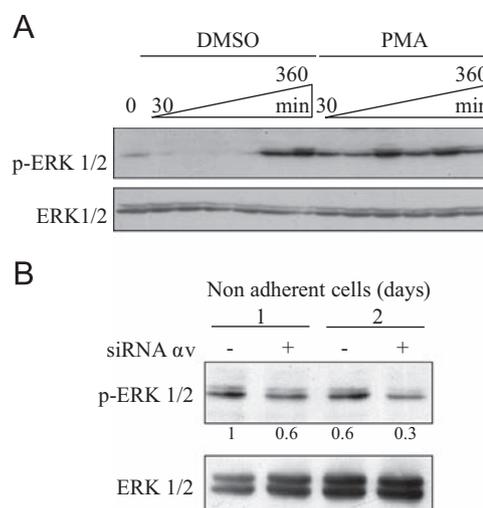


Fig. 7 – PKC and αv integrins converge towards ERK1/2 activation. (A) During the initial steps of spheroids formation (0–360 min), IGROV1 cells were treated with 1 μ M PMA or DMSO. ERK1/2 and its phosphorylated forms were analyzed by western blotting. (B) ERK1/2 phosphorylation analyzed by western blotting after αv integrins knock-down (+), and after siRNA scramble transfection (–). Relative band intensities of p-ERK1/2 were normalized to that of ERK1/2 signals and expressed as relative fold change of band intensity of siRNA scrambled condition at day 1 of the non-adherent culture.

ERK1/2 activation was analyzed after IGROV1 cells treatment with PMA during spheroid formation. While ERK1/2 phosphorylation decreased significantly up to 2 h under non-adherent culture conditions, PMA treatment (known to stimulate PKC) activated and sustained ERK1/2 with time (Fig. 7A).

Cross-talk between MAPK and integrin-dependent signaling has previously been described. Apoptosis after αv integrin silencing could be due to a decrease of ERK1/2 activation within 2 days in non-adherent culture (Fig. 7B). This suggests that αv integrins participate in the activation of survival that involves the induction of MAP kinase ERK-dependent pathways.

During SKOV3 spheroid culture αv integrin expression was maintained in a steady state despite a slight decrease after loss of anchorage. Unlike IGROV1 cells, αv integrin inhibition in SKOV3 cells did not induce modification of the ERK phosphorylation status or apoptosis (i.e. PARP cleavage or caspase-3 activity). Staurosporine treatment of SKOV3 cells excluding the absence of effect was due to SKOV3 cells being refractory to apoptosis (Fig. 8).

The results suggest that αv integrins and PKC stimulation converge in ERK1/2 activation, thereby contributing to IGROV1, but not SKOV3, and spheroid resistance to anoikis during the initial stage of spheroid formation.

Discussion

Ovarian cancer has a high mortality rate, mainly because of its resistance to chemotherapy, and the development of peritoneal metastases is largely responsible for relapse. The propensity of ovarian cancer cells to form free-floating spheroids within ascitic fluid accumulating as the cancer progresses leads to widespread

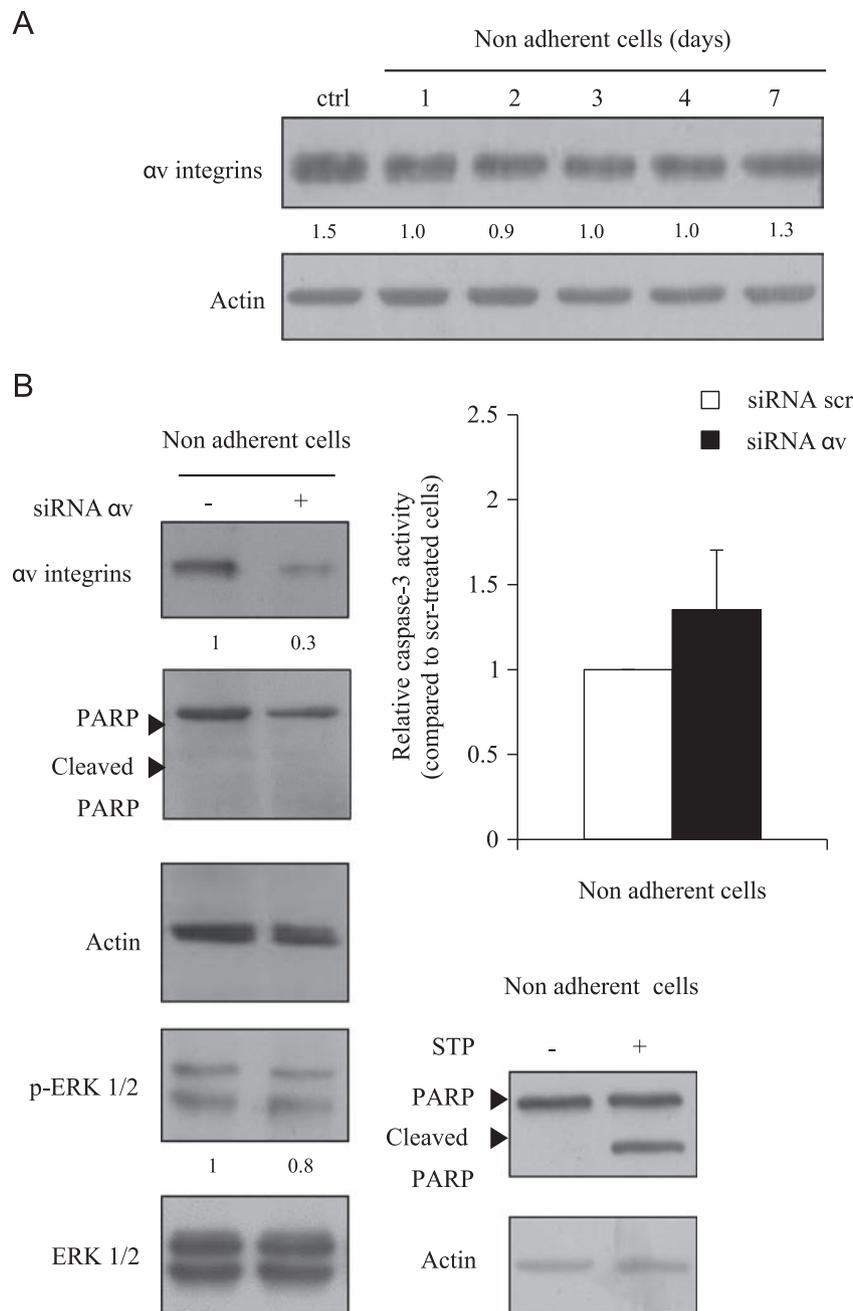


Fig. 8 – αv integrin expression in SKOV3 cells is not associated with ERK1/2 activation or sign of apoptosis. (A) Expression of αv integrins in differently aged SKOV3 spheroids or adherent cells (ctrl) was analyzed by western blotting, with actin as a loading control. (B) Effect of αv integrin knock-down on 2 day SKOV3 spheroid survival. Adherent cells were transfected with siRNA αv integrins (αv) or siRNA scramble (scr). The cells were grown under non-adherent culture conditions over 2 days. Silencing efficiency was controlled by anti- αv integrin western blotting. Induction of apoptosis was followed by the expression of full length- and cleaved- PARP by western blotting. ERK1/2 activation was also followed by western blotting. Relative band intensities of αv integrins and p-ERK1/2 were normalized to actin and ERK1/2 signals, respectively. Caspase-3 activity was measured and results expressed as a relative fold change in caspase 3 activity in comparison to the caspase-3 activity of siRNA scrambled-treated cells at day 2. Staurosporine A (STP) was used as a positive control for apoptosis induction.

intra-abdominal dissemination and most chemotherapeutic measures are ineffective on these cell structures in the peritoneum. Thus, the signaling pathways involved in the survival of cells in an anchorage-independent condition need to be identified as being of paramount importance. Nevertheless mechanisms making spheroids resistant to anoikis are poorly understood [2].

Our results show that the two cell lines (IGROV1 and SKOV3) behave differently as anoikis was provoked, which was due to switching on of different signals along survival pathways. PKC and αv integrins, both converging on ERK1/2 activation, allow IGROV1 cells to survive whereas anchorage-independence triggers SKOV3 cells to assume a quiescent phenotype.

When IGROV1 and SKOV3 cells were grown in a non-adhesive substratum, they form spheroids within 7 days under anchorage-independent conditions, with spheroids conserving their structure over at least 3 weeks (data not shown). Their sizes were comparable with *in vivo* spheroids obtained from ascitic fluid [22]. However, their compaction status differs from the tightly packed spheroids for IGROV1 cells to the less cohesive ones for SKOV3 cells [20], which might reflect the heterogeneity of ovarian cancers. Indeed, IGROV1 cells were derived from a polymorphous adenocarcinoma with endometrioid differentiation for the major part of the tumor, whereas SKOV3 cells were derived from ascites of a serous cystadenocarcinoma [16,17]. Since SKOV3 cells were isolated from ascitic fluid, their propensity to survive as single isolated cells could be higher than that of epithelial IGROV1 cells, which have to develop survival interaction. The absence of an adhesive substratum and disruption of cell–matrix interactions induce an apoptotic type known as anoikis in epithelial cells [5]. However, the growth curves and cell cycle profiles suggest that both ovarian cancer cell lines can survive under these stressful culture conditions. Accumulation of IGROV1 and SKOV3 cells in the G0–G1 phase of the cell cycle was obvious; nevertheless, an increase of IGROV1 cells in the sub-G1 region during the first days of culture suggested that some of them underwent apoptosis. Apoptosis and, by extension, anoikis are complex processes that involve a number of events which eventually combine to decide either life or death of a cell. In particular, Bcl-2 homolog family member expression represents a critical decision at a checkpoint within most apoptotic pathways. For instance, cells overexpressing the anti-apoptotic proteins, Bcl-X_L or Mcl-1, are highly

resistant to apoptosis [29]. Although Mcl-1 expression does not vary in SKOV3 cells during spheroid culture, it is upregulated in IGROV1 cells. Thus, the ability of ovarian cancer cells to survive *in vivo* as small clumps in ascitic fluid of the peritoneal cavity may be in part a consequence of failure to undergo anoikis.

The consequences of environmental changes, as in anchorage-independent culture conditions, could be mediated by modifications of the signaling pathways. Here, we have shown that, once IGROV1 cells are grown in an anchorage-independent way, ERK1/2 activity is transiently downregulated, as shown by a decrease of their phosphorylation prior to this phosphorylation being upregulated in spheroids maintained over 7 days under anchorage-independent conditions. Although PI3K/Akt may be a key pathway in regulating cell survival under anchorage-independent stress [3,10], modulation of ERK1/2 phosphorylation during the spheroid culture is correlated with the cleavage of PARP, demonstrating that the ERK1/2 signaling pathway is also involved in ovarian cancer cell anoikis resistance, as previously suggested [30]. p38 phosphorylation also plays an important role in cell proliferation by activating G1/S and G2/M checkpoints [31]. Since cultivation of SKOV3 cells in spheroids does not result in apoptosis, as seen by the absence of PARP cleavage, the sub-G1 peak and unmodified caspase-3 activity, we wondered whether SKOV3 cells are protected from anoikis by moving into quiescence on cultivation under anchorage-independent conditions. Activation of p38 in cells grown without anchorage could serve as a signal to induce quiescence of tumor cells, as previously suggested [32]. The molecular ratio between ERK1/2 and p38 expression can also regulate reprogramming of aggressive tumor cells into quiescence [33], the accumulation of p130/Rb being considered as a

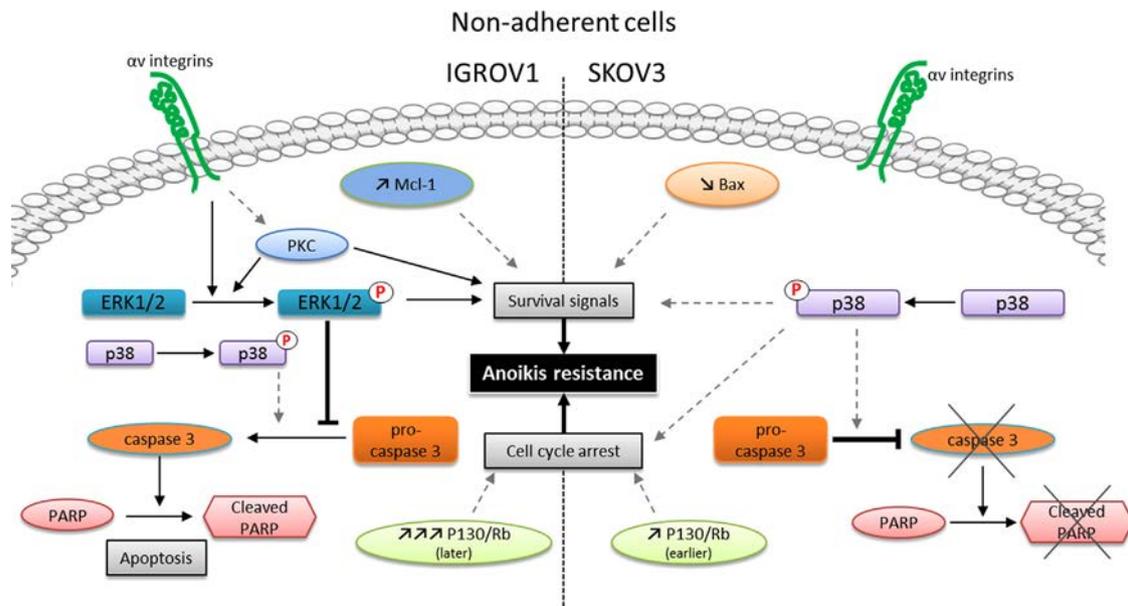


Fig. 9 – Schematic model illustrating anoikis resistance of ovarian cancer cells organized into spheroids. In IGROV1 cells, loss of anchorage induces a dual signaling between apoptosis and survival. Anoikis resistance needs ERK1/2 phosphorylation, which is dependent on PKC activation and α v integrin signaling. Once ERK1/2 had been phosphorylated, apoptosis was inhibited, as shown by a decrease of relative caspase-3 activity and a low level of PARP cleavage. In parallel, the expression of the survival molecule, Mcl-1, was strongly increased in the initial steps of IGROV1 spheroid formation. In SKOV3 cells, loss of anchorage promptly induces P130/Rb accumulation (known to be involved in cell cycle arrest in G0/G1 phase) and phosphorylation of p38 leading cells to become quiescent. This state protects SKOV3 cells from anoikis, as shown by a decrease of apoptotic markers (i.e.: PARP cleavage, caspase-3 activity and Bax). Full arrows represent direct effects, whereas dotted arrows represent putative effects (bibliographic data).

hallmark of quiescence [3]. Unlike IGROV1 cells, culture of SKOV3 in a non-adherent way also leads to a decrease in pro-apoptotic Bax expression. p38 can upregulate the ER chaperone, BiP/Grp78, which inhibits Bax activation [34], a phenomenon that helps cells to enter into dormancy. The difference in Bax expression between IGROV1 and SKOV3 cells when cultivated in an anchorage-independent way may explain why the IGROV1 transiently enter into apoptosis prior to surviving, whereas SKOV3 cells resist anoikis and become quiescent.

PMA treatment has a range of biological effects, mainly through the activation of typical PKCs, thereby increasing IGROV1 viability in non-adherent culture conditions compared to untreated cells, whereas inhibition of PKCs with calphostin C increases IGROV1 cell mortality. These results suggest that typical PKCs activation could also contribute to cell resistance to anoikis. The data may seem discrepant with the report that atypical protein kinase C activation is pro-apoptotic in ovarian cancer cells [35]. Nevertheless, the influence of PKC on the response to apoptosis is complex. While PKCs activation has previously been described as an apoptosis-inducer in e.g. prostate cancer cells [36], it could be a way to survive anoikis in melanoma [37]. This highlights the heterogeneity of cancers, in which signaling pathways are often modified in different ways depending on the environmental conditions. This contributes to the difficulties in using PKC inhibitors in clinical applications. In addition, the diversity in PKCs isozymes raises issues regarding signaling specificity. For example, both PKC α and PKC δ in prostate cancer models mediate an apoptotic response [38–40], whereas PKC ϵ is implicated in prostate tumorigenesis because of its stimulatory effects on proliferation, survival and invasiveness [41,42]. Activation of the MAPK/ERK1/2 signaling pathway by PMA and PKC has been reported [43–45]. In the present study, western blot analysis of protein lysates from spheroids culture showed that PMA increased the phosphorylation status of ERK1/2, thus confirming this cross-talk in the context of spheroid survival.

In addition to intracellular signals, spheroid survival could be mediated by cell–cell contacts, like those allowing the maintenance of Akt kinase activity as well as expression of E-cadherin [4,46]. Since the role of α v integrins in the initial steps of spheroid formation has been studied [14], we investigated their contribution to spheroid survival. Downregulation of α v integrin expression in IGROV1 cells with siRNA promotes apoptosis once cells have been grown in an anchorage-independent way. This result suggests that α v integrins could also trigger signaling of survival. Abrogation of α v chain expression induces apoptosis in breast cancer cells [47]. Supporting the importance of this integrin family in regulating anoikis, Morozovitch et al. [48] showed that human intestinal carcinoma cells became resistant to anoikis by selection of cells expressing on weakly α v β 3 integrins. Moreover, expression of α v β 3 integrins in glioma cells increases survival in response to stress, according to the availability of an appropriate ECM [49]. In this way, we had shown that vitronectin, the main ligand of α v integrins, is present in the core of ovarian carcinoma spheroids [14]. Interestingly, Desgrosellier et al. [7] also gave new insight into the contribution of α v β 3 integrin in cancer progression by demonstrating its expression being involved in anchorage-independent survival and dissemination, independently of integrin ligation and FAK activation. We have shown here that α v integrin downregulation decreases ERK1/2 phosphorylation, which is also associated with increased caspase-3 activity. This result therefore illustrates that

the known convergence of α v integrin-mediated adhesion and ERK1/2 survival pathway could also take place upon abrogation of cell anchorage. The involvement of integrin partners mediating this cross-talk needs further investigation.

In sum, our results provide new insight into how loss of anchorage abrogates survival signaling, and how ovarian cancer cells counteract this phenomenon in spheroid status (Fig. 9). During ovarian cancer dissemination, spheroids formation appears to result in the selection of anoikis-resistant cells, which may be a major contributor to recurrence.

Acknowledgments

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer comité du Val d'Oise, France. L. Carduner and L. Blay are recipients of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and of the Université de Cergy-Pontoise. The authors thank Prof. O. Gallet, Dr. L. Poulain and Dr. S. Cruet-Hennequart for their constant support and advice. We thank M. Guillamin from the Service Cytométrie of the Centre François Baclesse (BioTICLA). The manuscript was revised by Biomedes, for English language editing.

REFERENCES

- [1] J.L. Brun, A. Feyler, G. Chene, J. Saurel, G. Brun, C. Hocke, Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.* 78 (2000) 21–27.
- [2] K. Shield, M.L. Ackland, N. Ahmed, G.E. Rice, Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: biology and pathology, *Gynecol. Oncol.* 113 (2009) 143–148.
- [3] R.J. Correa, T. Peart, Y.R. Valdes, G.E. DiMattia, T.G. Shepherd, Modulation of AKT activity is associated with reversible dormancy in ascites-derived epithelial ovarian cancer spheroids, *Carcinogenesis* 33 (2011) 49–58.
- [4] B. Davidson, A. Berner, J.M. Nesland, B. Risberg, H.S. Berner, C.G. Trope, G.B. Kristensen, M. Bryne, V. Ann Florenes, E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression is up-regulated in ovarian carcinoma cells in serous effusions, *J. Pathol.* 192 (2000) 460–469.
- [5] S.M. Frisch, R.A. Screaton, Anoikis mechanisms, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 555–562.
- [6] D.G. Stupack, D.A. Cheresh, Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 3729–3738.
- [7] J.S. Desgrosellier, L.A. Barnes, D.J. Shields, M. Huang, S.K. Lau, N. Prévost, D. Tarin, S.J. Shattil, D.A. Cheresh, An integrin alpha(v) beta(3)-c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression, *Nat. Med.* 15 (2009) 1163–1169.
- [8] J. Michels, J.W. O'Neill, C.L. Dallman, A. Mouzakiti, F. Habens, M. Brimmell, K.Y. Zhang, R.W. Craig, E.G. Marcusson, P.W. Johnson, G. Packham, Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage, *Oncogene* 23 (2004) 4818–4827.
- [9] J.S. Desgrosellier, D.A. Cheresh, Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 9–22.
- [10] F. Meier, B. Schitteck, S. Busch, C. Garbe, K. Smalley, K. Satyamoorthy, G. Li, M. Herlyn, The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma, *Front. Biosci.* 10 (2005) 2986–3001.

- [11] M.E. Reyland, Protein kinase C isoforms: multi-functional regulators of cell life and death, *Front. Biosci.* 14 (2009) 2386–2399.
- [12] L.V. Dekker, R.H. Palmer, P.J. Parker, The protein kinase C and protein kinase C related gene families, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 (1995) 396–402.
- [13] N. Rucci, C. DiGiacinto, L. Orru, D. Millimaggi, R. Baron, A. Teti, A novel protein kinase C alpha-dependent signal to ERK1/2 activated by alphaVbeta3 integrin in osteoclasts and in Chinese hamster ovary (CHO) cells, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 3263–3275.
- [14] S. Kellouche, J. Fernandes, J. Leroy-Dudal, O. Gallet, S. Dutoit, L. Poulain, F. Carreiras, Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin, *Tumour Biol.* 31 (2010) 129–139.
- [15] F. Fukai, M. Mashimo, K. Akiyama, T. Goto, S. Tanuma, T. Katayama, Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide, *Exp. Cell Res.* 242 (1998) 92–99.
- [16] J. Benard, J. Da Silva, M.C. De Blois, P. Boyer, P. Duvillard, E. Chiric, G. Riou, Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice, *Cancer Res.* 45 (1985) 4970–4979.
- [17] B.G. Ward, K. Wallace, J.H. Shepherd, F.R. Balkwill, Intraperitoneal xenografts of human epithelial ovarian cancer in nude mice, *Cancer Res.* 47 (1987) 2662–2667.
- [18] S. Cruet-Hennequart, S. Maubant, J. Luis, P. Gauduchon, C. Staedel, S. Dedhar, alpha(v) integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells, *Oncogene* 22 (2003) 1688–1702.
- [19] T.J. Shaw, M.K. Senterman, K. Dawson, C.A. Crane, B.C. Vanderhyden, Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer, *Mol. Ther.* 10 (2004) 1032–1042.
- [20] R.C. Casey, K.M. Bursleson, K.M. Skubitz, S.E. Pambuccian, T.R. Oegema Jr., L.E. Ruff, A.P. Skubitz, Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids, *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 2071–2080.
- [21] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [22] K.M. Bursleson, R.C. Casey, K.M. Skubitz, S.E. Pambuccian, T.R. Oegema Jr., A.P. Skubitz, Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers, *Gynecol. Oncol.* 93 (2004) 170–181.
- [23] M.F. Favata, K.Y. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feeser, D.E. Van Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, P.A. Scherle, J.M. Trzaskos, Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18623–18632.
- [24] C.N. Landen, T.J. Kim, Y.G. Lin, W.M. Merritt, A.A. Kamat, L.Y. Han, W.A. Spannuth, A.M. Nick, N.B. Jennings, M.S. Kinch, D. Tice, A.K. Sood, Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer, *Neoplasia* 10 (2008) 1259–1267.
- [25] F. Carreiras, V. Rigot, S. Cruet, F. Andre, P. Gauduchon, J. Marvaldi, Migration properties of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1: importance of alpha(v)beta3 integrins and vitronectin, *Int. J. Cancer* 80 (1999) 285–294.
- [26] J. Leroy-Dudal, L. Heyman, P. Gauduchon, F. Carreiras, Adhesion of human ovarian adenocarcinoma IGROV1 cells to endothelial cells is partly mediated by the alphav integrins–vitronectin adhesive system and induces an alteration of endothelial integrity, *Cell. Biol. Int.* 29 (2005) 482–488.
- [27] U. Reuning, Integrin $\alpha\beta 3$ promotes vitronectin gene expression in human ovarian cancer cells by implicating rel transcription factors, *J. Cell Biochem.* 112 (2011) 1909–1919.
- [28] A. Basu, H. Tu, Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase Cdelta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334 (2005) 1068–1073.
- [29] K. Simonin, E. Brotin, S. Dufort, S. Dutoit, D. Goux, M. N'Diaye, C. Denoyelle, P. Gauduchon, L. Poulain, Mcl-1 is an important determinant of the apoptotic response to the BH3-mimetic molecule HA14-1 in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells, *Mol. Cancer Ther.* 8 (2009) 3162–3170.
- [30] M.K. Tang, H.Y. Zhou, J.W. Yam, A.S. Wong, c-Met overexpression contributes to the acquired apoptotic resistance of nonadherent ovarian cancer cells through a cross talk mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2, *Neoplasia* 12 (2010) 128–138.
- [31] D.V. Bulavin, A.J. Fornace Jr., p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor, *Adv. Cancer Res.* 92 (2004) 95–118.
- [32] A.P. Adam, A. George, D. Schewe, P. Bragado, B.V. Iglesias, A.C. Ranganathan, A. Kourtidis, D.S. Conklin, J.A. Aguirre-Ghiso, Computational identification of a p38SAPK-regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence, *Cancer Res.* 69 (2009) 5664–5672.
- [33] M.S. Sosa, A. Avivar-Valderas, P. Bragado, H.C. Wen, J.A. Aguirre-Ghiso, ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 5850–5857.
- [34] A.C. Ranganathan, L. Zhang, A.P. Adam, J.A. Aguirre-Ghiso, Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 1702–1711.
- [35] I. Nazarenko, M. Jenny, J. Keil, C. Gieseler, K. Weisshaupt, J. Sehouli, S. Legewie, L. Herbst, W. Weichert, S. Darb-Esfahani, M. Dietel, R. Schafer, F. Ueberall, C. Sers, Atypical protein kinase C zeta exhibits a proapoptotic function in ovarian cancer, *Mol. Cancer Res.* 8 (2010) 919–934.
- [36] X. Wu, M. Zhu, J.A. Fletcher, A. Giobbie-Hurder, F.S. Hodi, The protein kinase C inhibitor enzastaurin exhibits antitumor activity against uveal melanoma, *PLoS One* 7 (2012) e29622.
- [37] K. Jorgensen, M. Skrede, V. Cruciani, S.O. Mikalsen, A. Slipicevic, V.A. Florenes, Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate promotes anchorage-independent growth and survival of melanomas through MEK-independent activation of ERK1/2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (2005) 266–274.
- [38] M.L. Garcia-Bermejo, F.C. Leskow, T. Fujii, Q. Wang, P.M. Blumberg, M. Ohba, T. Kuroki, K.C. Han, J. Lee, V.E. Marquez, M.G. Kazanietz, Diacylglycerol (DAG)-lactones, a new class of protein kinase C (PKC) agonists, induce apoptosis in LNCaP prostate cancer cells by selective activation of PKCalpha, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 645–655.
- [39] M.V. Gavrielides, A.F. Frijhoff, C.J. Conti, M.G. Kazanietz, Protein kinase C and prostate carcinogenesis: targeting the cell cycle and apoptotic mechanisms, *Curr. Drug Targets* 5 (2004) 431–443.
- [40] C.T. Powell, N.J. Brittis, D. Stec, H. Hug, W.D. Heston, W.R. Fair, Persistent membrane translocation of protein kinase C alpha during 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis of LNCaP human prostate cancer cells, *Cell Growth Differ.* 7 (1996) 419–428.
- [41] M.H. Aziz, H.T. Manoharan, D.R. Church, N.E. Dreckschmidt, W. Zhong, T.D. Oberley, G. Wilding, A.K. Verma, Protein kinase Cepsilon interacts with signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3), phosphorylates Stat3Ser727, and regulates its constitutive activation in prostate cancer, *Cancer Res.* 67 (2007) 8828–8838.
- [42] J. Meshki, M.C. Caino, V.A. von Burstin, E. Griner, M.G. Kazanietz, Regulation of prostate cancer cell survival by protein kinase Cepsilon involves bad phosphorylation and modulation of the TNFalpha/JNK pathway, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 26033–26040.
- [43] C. Fernandez, A.M. Ramos, P. Sancho, D. Amran, E. de Blas, P. Aller, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate may both potentiate and decrease the generation of apoptosis by the antileukemic agent arsenic trioxide in human promonocytic

- cells. Regulation by extracellular signal-regulated protein kinases and glutathione, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 3877–3884.
- [44] A. Mauro, C. Ciccarelli, P. De Cesaris, A. Scoglio, M. Bouche, M. Molinaro, A. Aquino, B.M. Zani, PKCalpha-mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 3587–3599.
- [45] M.J. Park, I.C. Park, H.C. Lee, S.H. Woo, J.Y. Lee, Y.J. Hong, C.H. Rhee, Y.S. Lee, S.H. Lee, B.S. Shim, T. Kuroki, S.I. Hong, Protein kinase C-alpha activation by phorbol ester induces secretion of gelatinase B/MMP-9 through ERK1/2 pathway in capillary endothelial cells, *Int. J. Oncol.* 22 (2003) 137–143.
- [46] K. Shield, C. Riley, M.A. Quinn, G.E. Rice, M.L. Ackland, N. Ahmed, Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis, *J. Carcinog.* 6 (2007) 11.
- [47] P.A. Townsend, I. Villanova, E. Uhlmann, A. Peyman, J. Knolle, R. Baron, A. Teti, M.A. Horton, An antisense oligonucleotide targeting the alphaV integrin gene inhibits adhesion and induces apoptosis in breast cancer cells, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 397–409.
- [48] G.E. Morozevich, N.I. Kozlova, A.N. Chubukina, A.E. Berman, Role of integrin alphavbeta3 in substrate-dependent apoptosis of human intestinal carcinoma cells, *Biochemistry (Mosc)* 68 (2003) 416–423.
- [49] J.H. Uhm, N.P. Dooley, A.P. Kyritsis, J.S. Rao, C.L. Gladson, Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 1587–1594.

Influence de sécrétions ascitiques sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes : identification de cibles moléculaires adhésives.

Le cancer de l'ovaire représente la première cause de décès par cancer gynécologique. La survie globale des patientes à 5 ans est inférieure à 30%. Ce sombre pronostic s'explique à la fois par la découverte tardive de la maladie et par le développement d'une chimiorésistance. L'ascite est un fluide exsudatif qui est fréquemment accumulé dans la cavité péritonéale au cours de la progression des cancers de l'ovaire. Ce « microenvironnement tumoral » particulier contribue à la dissémination des cellules cancéreuses et à leurs implantations péritonéales.

L'objectif global du travail de thèse a été d'une part d'évaluer l'influence de l'ascite sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes et d'autre part d'étudier les mécanismes de résistance à la perte d'ancrage des cellules cancéreuses ovariennes.

Nous avons ainsi démontré que l'ascite induit une transition épithélio-mésenchymateuse partielle et que les modifications des comportements cellulaires observées sont dépendantes des intégrines α_v . Deux ligands de ces intégrines, la vitronectine et la fibronectine, ont été purifiés selon un protocole original permettant la caractérisation des deux protéines à partir d'une même ascite. Ces protéines ascitiques ont des propriétés différentes selon leur origine et donc selon les patientes dont elles sont issues et influencent le comportement adhésif des cellules avec un degré variable. L'importance de la signalisation dépendante des intégrines α_v et des voies MAP Kinases a également été démontrée dans l'établissement d'une résistance des sphéroïdes tumoraux à l'anoïkis.

En perspective, approfondir les connaissances des processus cellulaires et moléculaires conduisant à la dissémination intrapéritonéale et à l'émergence de chimiorésistance ainsi que déterminer le rôle potentiel de protéines ascitiques dans ces processus pourraient permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Influence of ascitic fluids on the behaviour of ovarian cancer cells: identification of molecular adhesives targets.

Ovarian cancer is the most lethal gynaecological malignant disease, mainly due to late diagnosis and to acquired chemoresistance. Ascites is an exudative fluid which frequently accumulates within the abdominal cavity during ovarian cancer progression. This unique tumor microenvironment contributes to cancer cell dissemination and peritoneal metastasis.

The aim of the study was to evaluate the influence of ascites on cancer cell behaviors and to better understand the mechanisms of ovarian cancer cell resistance to the loss of anchorage.

We demonstrate that ascites induces a partially epithelial–mesenchymal transition and that the modifications of cell behaviors observed were dependent of α_v integrins. Two ligands of these integrins, the vitronectin and the fibronectin, were purified by combined purification protocol from a single pathological sample. These purified ascitic proteins have different molecular features according to the patients and impact adhesive cell behavior with various degrees. The importance of α_v integrins and MAP Kinases signalling pathways was showed in anoikis resistance of ovarian cancer spheroids.

Our prospects are *i)* to increase the knowledge of the cellular and molecular processes leading to the intraperitoneal dissemination and to the emergence of chemoresistance and *ii)* to determine the potential role of ascitics proteins in these processes. We expected that these investigations could allow the discovery of new therapeutic targets.