

ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET INGENIERIE DE L'UNIVERSITE PARIS-SEINE
AU SEIN DE L'UNIVERSITE DE CERGY-PONTOISE

THESE

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Cergy-Pontoise

Discipline : Science de la vie et de la santé

Spécialité : « Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie »

Présentée par

Lyvia BLAY

Le 29 juin 2016

**Etude de l'impact de la fibronectine et de la vitronectine
ascitiques sur la récurrence des carcinomes ovariens**

Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellule

EA 1391

Devant le jury composé de :

Philippe Galera	Professeur des universités, Université de Caen	Rapporteur
Maxime Lehmann	Professeur des universités, Université de Strasbourg	Président du jury
Christophe Denoyelle	Maître de conférences (HDR), Université de Caen	Examinateur
Johanne Leroy-Dudal	Maître de conférences, Université de Cergy Pontoise	Encadrante
Cédric R. Picot	Maître de conférences, Université de Cergy Pontoise	Encadrant
Franck Carreiras	Professeur des universités, Université de Cergy-Pontoise	Directeur de thèse

ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET INGENIERIE DE L'UNIVERSITE PARIS-SEINE
AU SEIN DE L'UNIVERSITE DE CERGY-PONTOISE

THESE

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Cergy-Pontoise

Discipline : Science de la vie et de la santé

Spécialité : « Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie »

Présentée par

Lyvia BLAY

Le 29 juin 2016

**Etude de l'impact de la fibronectine et de la vitronectine
ascitiques sur la récurrence des carcinomes ovariens**

Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellule

EA 1391

Devant le jury composé de :

Philippe Galera	Professeur des universités, Université de Caen	Rapporteur
Maxime Lehmann	Professeur des universités, Université de Strasbourg	Président du jury
Christophe Denoyelle	Maître de conférences (HDR), Université de Caen	Examinateur
Johanne Leroy-Dudal	Maître de conférences, Université de Cergy Pontoise	Encadrante
Cédric R. Picot	Maître de conférences, Université de Cergy Pontoise	Encadrant
Franck Carreiras	Professeur des universités, Université de Cergy Pontoise	Directeur de thèse

Cette étude a été effectuée grâce au financement d'un contrat doctoral de l'Université de Cergy-Pontoise et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

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

Si seulement j'avais autant de temps que d'idées
[Anonyme]

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire ERRMECe (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule), dans le groupe thématique Matrice Extracellulaire-Comportement cellulaire et Physiopathologie (MEC-uP) à l'Université de Cergy-Pontoise.

Je tiens à remercier vivement les deux rapporteurs qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : le Professeur Philippe Galéra, professeur au Laboratoire MILPAT (Microenvironnement Cellulaire et Pathologies) (EA 4652), à l'université de Caen, et le Professeur Maxime Lehmann, chercheur au laboratoire de biophotonique et pharmacologie (UMR 7213) à l'Université de Strasbourg.

Je remercie également le Docteur Christophe Denoyelle, chercheur au sein de l'unité Biologie et Thérapie Innovantes des Cancers Localement Agressifs (BioTICLA) d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je remercie les professeurs Véronique Larreta-Garde et Olivier Gallet, les deux directeurs successifs de l'équipe, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire ERRMECe au cours de ces dernières années.

Mes plus grands remerciements vont au Professeur Franck Carreiras, mon directeur de thèse. La première fois que nous nous sommes parlés, j'étais en Ecosse à me demander ce que j'allais bien pouvoir faire en rentrant en France. Merci de m'avoir gentiment répondu, de m'avoir acceptée en stage et de m'avoir accordé l'opportunité de démarrer ce projet de thèse. Merci, de m'avoir permis de participer à différents congrès et ainsi enrichir ma culture scientifique. Une thèse est une expérience unique qui change une vie et la conception que l'on a de soi. Alors pour tout cela, un grand merci Franck.

A mes encadrants de thèse, Docteur Johanne Leroy-Dudal et Docteur Cédric R. Picot, je tiens également à dire un énorme merci. Johanne, tes méthodes de travail, ta pédagogie et ton amour de ton métier sont pour moi un exemple à suivre. Je tiens à te remercier pour toutes les fois où tu m'as accordé du temps sur des sujets professionnels et également personnels. Merci pour les fameuses « poupouilles » qui ont toujours apporté un supplément d'âme et de qualités aux écrits, présentations orales ou posters que j'ai eu à faire. Merci également pour toutes ces séances de boulot derrière une paillasse ou devant un écran d'ordinateur. Ces moments ont été plus qu'enrichissants.

Cédric je tiens à te remercier pour deux choses en particulier parmi tout le reste, d'abord merci de m'avoir formé aux nombreuses techniques de culture cellulaire et biochimie que j'ai eu à utiliser au cours de mon projet, merci pour ta disponibilité toutes les fois où je suis passée à ton bureau à l'improviste en commençant par « dis moi... » ou « j'ai une question... ». Merci également pour la petite citation magique, « l'expérience est une lumière qui n'éclaire que soit ». J'en ai fait des erreurs et j'en ferai encore, mais je pense sans cesse à m'améliorer et à ne plus les reproduire.

Je remercie l'équipe Bioticla pour leur précieuse collaboration. Merci au Professeur Maxime Lehmann de nous avoir fourni des anticorps et pour ces précieux conseils sur la technique d'immunofluorescence sur les sphéroïdes. Merci également au Docteur Arnaud Ponche, du laboratoire IS2M (LRC CNRS 7228, Institut de Science des Matériaux) de Mulhouse pour son aide lors des expériences de XPS.

Je tiens également à remercier les membres du groupe thématique MEC-uP. Sabrina je te remercie pour tous les conseils et l'aide que tu m'as apporté toutes ces années. Merci de m'avoir permis de profiter du calme de ton bureau pour rédiger mon manuscrit. Olivier je te remercie pour l'œil critique que tu as eu sur mes résultats et ton aide au cours des expériences. Merci à toi Charlotte, pour ton aide et pour les réflexions que nous avons eu sur mon sujet. Ludovic, je tiens également à te remercier pour tout le temps que tu m'as accordé. Merci à toi de m'avoir « ouvert la voie » et divulguer tes petites astuces. Tiffany, Loïc, Jorgelindo, Michael, Emilia, Carine et Cynthia, à un moment ou un autre nous avons eu à discuter sur vos sujets ou le mien, travailler avec vous a été un plaisir, je vous remercie pour votre bonne humeur. Anaïs, je te remercie pour tes encouragements et ton aide. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite de tes travaux.

Ma thèse n'aurait pas été la même sans l'équipe technique. Rémy, Mathilde et Lamia je vous remercie. Rémy tu as abattu un énorme travail et non des moindres. Je t'adresse un énorme merci pour ta patience et ta disponibilité au cours de mes formations chromatographique, caractérisation, confocal et DLS. Merci d'avoir pris le temps de purifier tant de mL de plasma et d'ascites. Lamia, je te remercie de m'avoir aidé à faire avancer mon sujet, ton aide a été précieuse. Nous avons partagé tant d'électrophorèses et de moments « ménage » dans le L2. Je te remercie pour ta disponibilité. Isabelle, tu es une perle en termes d'organisation et de gestion des emplois du temps, je te remercie pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Merci à tous les membres d'ERRMECe, pour les discussions et les encouragements tout au long de ma thèse.

Je ne compte plus le nombre de fois où j'ai dû appeler la prépa bio pour demander des réactifs, du milieu, et autre en urgence pour des dépannages de dernières minutes. Je vous remercie pour votre gentillesse.

Elodie, Eléonore et Rumeysa, mes comparses du bureau des THESARDES, je vous remercie pour la zen-attitude que vous m'avez inspiré tout au long de mon doctorat. Les minutes culturelles ont été enrichissantes et la préparation des différentes manifestations du laboratoire ont été une partie de plaisir grâce à vous. Votre amitié m'est très précieuse. Marie et Julie, je vous souhaite de réussir dans tous vos projets. Mathieu, Thomas, Audrey, les bébés-doc, derniers arrivés du bureau des THESARDS, nous n'avons pas eu beaucoup de moments partagés ensemble, mais à vous de maintenir la bonne ambiance de travail et d'entraide de ce bureau.

Jérémy, Audrey, Damien, Hélène, Jonathan, Stessy, Sébastien, Alice, Frantzy, Aurélie, Cédric, à vous mes amis je vous adresse tous mes remerciements pour votre présence, pour avoir supporté ma merveilleuse humeur ces derniers temps, ma folie et mes absences. Merci d'être là. Merci d'être vous.

Tous mes remerciements vont enfin à ma famille. Maman et papa un océan nous sépare, 6h de décalage horaire, un peu plus de 7000 km et pourtant nous avons été si proches. Cette thèse est aussi la votre, merci de m'avoir poussé dans mes retranchements et de m'avoir reboosté. Vous avez été ma force. Doris et Amélie, mes sœurs, merci d'avoir été présentes et d'avoir supporté mes absences et l'absence de nouvelles pendant ma période de rédaction. A toi, Michel, #mongarssûr, mon meilleur ami, je t'adresse tous mes remerciements pour tes encouragements et ton aide. Tu m'as aidé à relativiser dans les moments où « tout » allait mal. Merci à tous.

Table des matières

Liste des abréviations	I
Liste des figures et tableaux	III
Liste des publications et communications	VII
Avant-propos	1
État de l'art	3
Partie I	4
I. Généralités sur les ovaires	5
I.1. Anatomie et physiologie des ovaires	5
I.2. Histologie des ovaires et de leur environnement	7
II. Les cancers de l'ovaire	8
II.1. Données épidémiologiques	8
II.2. Données biologiques	10
II.2.1. Les différents types histologiques	10
II.2.2. Grades et Stades	11
II.2.3. Classification moléculaire	12
II.2.4. Hypothèse sur l'origine des cancers ovariens	13
II.3. Données cliniques	17
II.3.1. Diagnostic	17
II.3.2. Prise en charge thérapeutique	18
III. Le verrou thérapeutique majeur de la récurrence des cancers ovariens	27
III.1. Les cancers ovariens ont une propension importante à récidiver	27
III.2. Les capacités adaptatives des cellules cancéreuses	28
III.2.1. Capacité des cellules à résister à la mort cellulaire : un enjeu dans le processus de propagation des cellules cancéreuses	29
III.3. Chimiorésistance des cancers ovariens	34
III.3.1. Les événements précédant l'interaction entre l'ADN et le CDDP (pre-target resistance)	35
III.3.2. Les événements directement liés aux lésions induites par les adduits sur l'ADN (on-target resistance)	36
III.3.3. Les altérations des voies de signalisation activées en réponse aux lésions sur l'ADN et qui conduisent à l'apoptose (post-target resistance)	36
III.3.4. Les événements liés aux mécanismes activés parallèlement à la platination de l'ADN (off-target resistance)	37
III.4. Propension des cellules cancéreuses ovariennes à disséminer dans la cavité péritonéale	37
Partie II	40

I. Généralités sur le microenvironnement	41
I.1. Biologie de la Matrice extracellulaire	41
I.1.1. Le matrisome	42
I.1.2. La fibronectine	46
I.1.3. La vitronectine	49
I.1.4. La dynamique de la matrice extracellulaire	51
I.2. Interactions cellules-matrice extracellulaire	53
I.2.1. Structure et classification des intégrines	53
I.2.2. Intégrines et signalisation	54
I.3. Signalisation MEC-dépendante	57
II. Le microenvironnement tumoral	58
II.1. La théorie de la mutation somatique et la théorie du champ d'organisation tissulaire	58
II.2. La composition du microenvironnement tumoral	60
II.3. Le microenvironnement tumoral ovarien	62
II.3.1. Le stroma tumoral ovarien	62
II.3.2. Les interactions cellules cancéreuses-matrice extracellulaires au sein des carcinomes ovariens	63
II.3.3. Microenvironnement et dissémination tumorale	64
II.4. L'ascite est un microenvironnement tumoral particulier	66
II.4.1. Formation de l'ascite	66
II.4.2. Composition de l'ascite	67
II.4.3. Rôle de l'ascite dans la progression tumorale	72
Matériel & Méthodes	73
I. Culture Cellulaire	74
I.1. Caractéristiques des lignées cellulaire	74
I.2. Condition de culture	74
I.2.1. Culture des cellules en condition adhérente	74
I.2.2. Culture des cellules en condition non-adhérente : Formation de sphéroïdes tumoraux	75
II. Préparation des échantillons d'ascites	76
III. Analyse du comportement cellulaire	77
III.1. Croissance et viabilité	77
III.1.1. Comptage des cellules viables	77
III.1.2. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux	77
III.1.3. Mesure de l'activité caspase-3	77

III.1.4. Test de cytotoxicité	77
III.2. Adhérence	78
III.2.1. Test d'adhérence cellulaire	78
III.2.2. Détermination de l'index de morphologie cellulaire	79
III.3. Migration	79
Test de transmigration	79
III.4. Diminution de l'expression des intégrines α	80
Transfection transitoire d'ARN interférant	80
IV. Localisation moléculaire/Immunofluorescence.....	80
Caractéristiques du microscope utilisé	81
V. Analyse des protéines cellulaires en SDS-PAGE et western-blot	81
V.1. Extraction des protéines cellulaires	81
V.2. Electrophorèse des protéines cellulaires en SDS-PAGE	82
V.3. Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose et blotting.....	82
VI. Purification simultanée de la fibronectine et de la vitronecctine ascitiques.....	83
VI.1. Chromatographies d'affinité	83
VI.2. Western Blot	85
VI.3. Spectroscopie de fluorescence	85
VII. Spectrométrie photoélectronique X	85
VII.1. Préparation des lames de verre	86
VII.2. Préparation des échantillons	86
VIII. Analyses statistiques	86
Présentation des résultats	90
A. Présentation de l'étude	91
B. Présentation des résultats	94
I. Les ascites et la matrice extracellulaire ascitique favorisent la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes	94
I.1. Impact de l'ascite sur l'adhérence et la migration cellulaire	94
I.2. Impact de l'ascite sur la prolifération cellulaire	98
I.2.1. Formation spontanée de sphéroïdes par les cellules IGROV1	98
I.2.2. Modification de la morphologie des cellules SKOV3.....	102
I.3. Caractérisation du phénotype des sphéroïdes en milieu complet	104
I.3.1. <i>Obtention et caractérisation des sphéroïdes tumoraux</i>	104
I.3.2. Caractérisation de la signalisation induite au sein des sphéroïdes tumoraux	108

I.4. Impact de l'ascite sur la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses	114
I.5. Caractérisation « matricielle » des sphéroïdes en milieux ascitiques.....	116
I.6. Caractérisation et impact de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques sur les comportements cellulaires impliqués dans la récurrence	122
I.6.1. Caractérisation de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques.....	122
I.6.2. Incorporation et « utilisation » de la fibronectine exogène dans les sphéroïdes	124
I.6.3. Impact de la fibronectine, de la vitronectine et des intégrines α_v sur la survie des cellules organisées en sphéroïdes.....	124
I.6.4. Impact de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques sur l'adhérence et la migration des cellules cancéreuses ovariennes.....	128
II. Impact du microenvironnement ascitique sur la résistance des cellules cancéreuses ovariennes à la chimiothérapie.....	134
II.1. Effet du cisplatine sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes	134
II.2. Effet de l'ascite sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes suite aux traitements avec du cisplatine	136
II.3. Spécificité du microenvironnement ascitique sur la chimiorésistance des cellules cancéreuses ovariennes	146
II.4. Impact des protéines matricielles ascitiques sur la réponse des cellules au CDDP	150
II.4.1 « Piégeage » du CDDP par la vitronectine et la fibronectine ascitiques	152
II.5. Réponse des cellules IGROV1, SKOV3 et OVCAR3 adhérentes au carboplatine	154
II.5.1. Effet du carboplatine sur les cellules IGROV1, SKOV3 et OVCAR3.....	154
II.5.2. Caractérisation de l'effet du carboplatine sur la survie des cellules formant des sphéroïdes	154
II.5.3. Effet du carboplatine sur les sphéroïdes d'IGROV1, SKOV3 et OVCAR3 déjà formés.....	158
Discussion - Perspectives	165
Références bibliographiques.....	178
Annexe	198

Liste des abréviations

α : Alpha

α -SMA: α -smooth muscle actin

β : Beta

$^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius

% : Pourcentage

μg : Microgramme

ABC: ATP-Binding Cassette

Ac. M: Anticorps monoclonal

Ac. P: Anticorps polyclonal

ADAM: A disintegrin and metalloproteinase

ADAMTS: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

ADN: Acide Désoxyribonucléique

Akt: Protéines kinase B

AMC: Agrégat Multicellulaire

ARN: Acide Ribonucléique

ARN_m: Acide Ribonucléique messenger

AUC: Area under the curve

BCA: Acide Bicinchoninique

BH: Bcl-2 homology domain

brca-1/-2: Gène breast cancer -1/-2

BSA : Bovin Serum Albumin

CA-125: Cancer Antigen 125

Ca²⁺: Ion calcium

CAF: Cancer Associated Fibroblast

CDDP: Cisplatine

CEO: Cancer de l'Épithélium Ovarien

Cl₅₀: Concentration minimale inhibitrice

Cl⁻: Ion chlorure

cm: Centimètre

Cm²: Centimètrécarré

CSC: Cellule Souche Cancéreuse

CSCO: Cellule Souche Cancéreuse ovarienne

CSI: Cell Shape Index

CSPG: Chondroïtin-sulfate proteoglycan

Cu²⁺: Ion cuivre

DAPI: 4,6-diamino-2-phenyliindol dihydrochloride

DISC: Death inducing signaling complex

DSPG: Dermatan-sulfate proteoglycan

EDA: Extradomaine de type A

EDB: Extradomaine de type B

EDTA: Éthylène Diamine Tétracétique

EFS: Etablissement Français du sang

EOS: Épithélium ovarien de surface

ERCC1: Excision Repair Cross Complementation group 1

FACIT: Fibril-associated collagens with interrupted triple

helices

FADD: Fas Associated Death Domain

FAK: Focal Adhesion Kinase

FDA: Food and Drug Administration

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

FITC : Fluorescein isothiocyanate

Fn: Fibronectine

Fn_{asc}:Fibronectine ascitique

Fn_c : Fibronectine cellulaire

Fn_p: Fibronectine plasmatique

GAG: Glycosaminoglycane

GPI: GlycosylPhosphatidylinositol

GSH: Gluthation

h: Heure

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

HMG: High Mobility Group

HSPG: Heparan-sulfate proteoglycan

IAP : Inhibitor of apoptosis protein

IgG: Immunoglobuline G

IgM: Immunoglobuline M

IL: Interleukine

IP: Intra-péritonéal

IP: Iodure de propidium

IV: Intra-veineux

JNK: c-Jun-N-terminal Kinase

Kda: Kilodalton

KSPG: Keratan-sulfate proteoglycan

LPA: Lysophosphatidic acid

m²: Mètre carré

mA: Milliampère

MACIT: Membrane-associated collagen with interrupted triple helices

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

Mcl-1: Myeloid cell leukemia 1

MEC: Matrice Extracellulaire

mg Milligramme:

Mg²⁺: Ions magnesium

min: Minute

mL: Millilitre

mM: Millimolaire

MMP: Matrix Metalloproteinases

MMR: MisMatch Repair

MT-MMP: Membrane Type-MMP

mS: Millisiemens

m/v: Masse/volume

N_aCl: Chlorure de sodium

NC: Non-collagène

NER: Nucleotide Excision Repair

nm: Nanometer

O_H: Ion Hydroxide

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OPG: Ostéoprotégérine

OS: Overall survival

P_{AI-1}: Plasminogen Activator Inhibitor-1

PARP: Poly(ADP-ribose) polymérase

PBS: Phosphate Buffer Saline

PDK1: Phosphatidylinositol 3-dependant kinase 1

PFA : Paraformaldéhyde

PFS: Progression Free Survival

PG: protéoglyane

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase

PIP: phosphatidylinositol phosphate

PI2P: Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PIP3: Phosphatidylinositol-3, 4, 5- triphosphate

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

PKC: Protein kinase C

PTEN: Phosphatase and Tensin homologue

R_{OS}: Reactive Oxygen Species

S_{DS}: Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

siRNA: Small interfering RNA

SMB: Somatomédine B (Domaine)

STIC: Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma

SVF: Sérum de Veau Foetal

T_{BS} : Tris Buffer Saline

TE : Tris EDTA

TEM: Transition épithélio-Mésenchymateuse

TGF-β: Transforming Growth Factor-β

TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

TMS: Théorie de la Mutation Somatique

TNF: Tumor necrosis factor

TNFR1: Tumor necrosis factor receptor 1

TOFT: Tissue Organization Field Theory

TRITC: Tetramethylrhodamine

TRADD: TNF Receptor Associated Death Domain

TRAIL-1/-2: TNF Related Apoptosis Inducing Ligand 1 et 2

U_A : Unité arbitraire

U/mL : Unité par millilitre

uPA: Urokinase-type Plasminogen Activator

uPAR: Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor

V : Volt

VEGF: Vascular Epidermal Growth Factor

Vn: Vitronectine

Vn_{asc}: Vitronectine ascitique

Vn_c: Vitronectine cellulaire

Vn_p: Vitronectine plasmatique

X_{PA}: Xeroderma Pigmentosum protein A

XPS : X-Ray Photoelectron Spectroscopy

XTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium)

Liste des figures et tableaux

Etat de l'art

Figure 1: Localisation anatomique des ovaires.	5
Figure 2: Trompe de Fallope coiffant l'ovaire au moment de l'expulsion de l'ovule.	6
Figure 3: Coupe longitudinale du péritoine.....	6
Figure 4: Coupe transversale de l'ovaire.	7
Figure 5: Incidences et mortalités des cancers dépistés chez les femmes en 2012.	8
Figure 6: Incidence estimée du cancer de l'ovaire par âge en France en 2005.	9
Figure 7: Les grands types histologiques des cancers ovariens selon l'OMS.	10
Figure 8: Coupes illustrant les différents sous-types histologiques majoritaires des cancers de l'épithélium ovarien.	11
Figure 9: Les 4 stades des tumeurs de l'ovaire selon la classification de la FIGO.	12
Figure 10: Lésions génétiques observées selon les types de cancers de l'épithélium ovarien.....	12
Figure 11: Modèle des kystes d'inclusion.....	14
Figure 12: Modèle de l'origine séreuse des tumeurs ovariennes.	15
Figure 13: Origine des cancers de l'épithélium ovarien - modèle à 2 voies.....	16
Figure 14: Transfert des STICs des fimbriae vers les ovaires et formation de kystes d'inclusion..	16
Figure 15: Taux de survie à 5 ans par stade ou tous stades confondus chez l'adulte (15-99ans).	18
Figure 16: Principe de l'administration d'agents chimiothérapeutiques par voie intrapéritonéale. ...	19
Figure 18: Entrée du cisplatine dans la cellule et cibles moléculaires.	20
Figure 17: Molécule de cisplatine (pH et charge neutre).....	20
Figure 19: Hydrolyse du cisplatine et formation des complexes cationiques.....	21
Figure 20: Représentation schématique d'un adduit.....	21
Figure 21: Représentation de la double hélice d'ADN déformée par les adduits de CDDP.	22
Figure 22: Liaison du complexe protéique HMG sur l'adduit CDDP-ADN..	22
Figure 23: Molécules de (A) carboplatine et (B) oxaliplatine (pH et charges neutres)..	23
Figure 24: Formule chimique du paclitaxel (C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄).	23
Figure 25: Mécanisme d'action du paclitaxel.....	24
Figure 26: Mécanisme d'action du bevacizumab.	24
Figure 27: Schéma récapitulatif des différentes thérapies ciblées proposées dans les cancers ovariens.	26
Figure 28: Classification des cancers ovariens récidivants en fonction de leur sensibilité au platine.)..	28
Figure 29: Caractéristiques des cellules cancéreuses.	29
Figure 30: Différences entre l'apoptose et la nécrose.	30
Figure 31: Induction de l'apoptose par les voies intrinsèque et extrinsèque.....	31
Figure 32: Voie mitochondriale (intrinsèque) de l'apoptose..	32
Figure 33: Activation de l'anoïkis.....	33
Figure 34: Mécanismes impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses contre le cisplatine..	35
Figure 35: Régulation de la voie de signalisation p53 par les cellules cancéreuses résistantes aux CDDP.....	36
Figure 36: Dissémination des cellules cancéreuses ovariennes <i>via</i> les flux ascitiques.	38
Figure 37: Représentation schématique de la création d'un foyer métastatique secondaire par les cellules cancéreuses ovariennes.	38

Figure 38: Modes de dissémination des cellules cancéreuses ovariennes du site primaire vers les sites secondaires..... 39

Figure 39: Représentation schématique des deux types principaux de matrice extracellulaire. 41

Figure 40: Assemblage des triples hélices α 43

Figure 41: Fibrille de collagène hétérotypique composée des types II et XI..... 43

Figure 42: Assemblage des collagènes formant des réseaux..... 44

Figure 43: Diversité de structure et de localisation des protéoglycanes.. 45

Figure 44: Structure d'un monomère de fibronectine. 46

Figure 45: Domaines fonctionnels de la fibronectine et sites de liaison des molécules matricielles et des récepteurs cellulaires..... 47

Figure 46: Processus de fibrillogénèse de la fibronectine..... 48

Figure 47: Structure de la vitronectine..... 50

Figure 48: Fonctions biologiques majeures de la vitronectine. 51

Figure 49: Structure des MMPs..... 52

Figure 50: Classification des intégrines.. 54

Figure 51: Les différents états d'activation des intégrines. 55

Figure 52: Signalisation inside-out des intégrines..... 55

Figure 53: Adhésions focales..... 56

Figure 54: Voies de signalisation potentiellement activées par les intégrines et réponses des cellules.. 57

Figure 55: Carcinogénèse selon la théorie du champ d'organisation cellulaire..... 59

Figure 56: Interaction entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral. 60

Figure 57: Influence des CAFs sur le microenvironnement tumoral..... 61

Figure 58: Influence de la MMP-2 sur les étapes précoces de métastases des cellules cancéreuses ovariennes sur le péritoine ou l'épiploon.. 63

Figure 59: Clairance du mésothélium par les cellules cancéreuses ovariennes.. 65

Figure 60: Production de liquide d'ascite..... 67

Figure 61: Composition du microenvironnement ascitique..... 68

Figure 62: Formation de sphéroïdes à partir d'une monocouche de cellules. 70

Figure 63: Cellules souches cancéreuses ovariennes..... 71

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des protocoles de traitements chimiothérapeutiques standards des cancers ovariens..... 25

Tableau 2: Séquences peptidiques portées par les ligands matriciels et reconnues par les intégrines 54

Matériel & Méthodes

Figure 64: Lignées cellulaires d'adénocarcinomes ovariens cultivées en condition adhérente. 74

Figure 65: Représentation schématique de la culture des cellules en suspension..... 75

Tableau 3 : Milieux de culture et solutions utilisés pour la culture cellulaire..... 75

Tableau 4: Liste des ascites utilisées 76

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence. 81

Tableau 6: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en western-blot..... 83

Tableau 7 : Rendements des purifications des fibronectines ascitiques	84
Tableau 8 : Rendements des purifications des vitronectines ascitiques.....	84
Tableau 9: Anticorps primaires et secondaire utilisés pour les western-blot des protéines matricielles purifiées.....	85

Présentation des résultats

Figure 66: Impact de l'ascite sur l'adhérence cellulaire.....	93
Figure 67: Impact de l'ascite sur la migration cellulaire.....	95
Figure 68: Impact de l'ascite sur la prolifération cellulaire.....	98
Figure 69: Impact de l'ascite sur la formation spontanée de sphéroïdes d'IGROV1.	100
Figure 70: Impact de l'ascite sur la modification de morphologie des cellules SKOV3.....	101
Figure 71: Obtention et caractérisation des sphéroïdes tumoraux..	105
Figure 72: Caractérisation de la signalisation induite au sein des sphéroïdes tumoraux.	109
Figure 73: Schéma bilan illustrant les signalisations permettant la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses ovariennes organisées en sphéroïdes.	112
Figure 74: Impact de l'ascite sur la morphologie des sphéroïdes formés par les cellules IGROV1 et SKOV3.	114
Figure 75: Impact de l'ascite sur la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses (IGROV1).	115
Figure 76: Caractérisation « matricielle » des sphéroïdes d'IGROV1 en milieu ascitique.	117
Figure 77: Caractérisation « matricielle » des sphéroïdes de SKOV3 en milieu ascitique.	119
Figure 78: Caractérisation de la fibronectine et de la vitronectine purifiées à partir de liquides d'ascites.....	121
Figure 79: Incorporation de MEC exogènes dans les agrégats multicellulaires formés par les cellules IGROV1..	123
Figure 80: Impact des ligands matriciels et des récepteurs d'adhérence de type intégrine αV sur la survie des cellules organisées en sphéroïdes.....	125
Figure 81: Impact des MEC ascitiques sur l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes.....	127
Figure 82: Impact des MEC ascitiques sur la migration des cellules cancéreuses ovariennes... ..	129
Figure 83: L'ascite est un microenvironnement permissif à la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes.	132
Figure 84: Effet du cisplatine sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes en milieu complet.. ..	133
Figure 85: Impact de l'ascite sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes traitées au cisplatine.	135
Figure 86: Impact de l'ascite sur la progression des cellules IGROV1 traitées au cisplatine dans les différentes phases du cycle cellulaire..	137
Figure 87: Impact de l'ascite sur la progression des cellules SKOV3 traitées au cisplatine dans les différentes phases du cycle cellulaire..	139
Figure 88: Influence de l'ascite sur la survie des cellules IGROV1 et SKOV3 traitées au CDDP.	142
Figure 89: Influence de l'ascite sur la survie des cellules IGROV1 et SKOV3 traitées au CDDP..	144
Figure 90: Effet de la concentration protéique des ascites sur la viabilité cellulaire.....	145
Figure 91: Spécificité de l'ascite sur la chimiorésistance des cancéreuses ovariennes.	147
Figure 92: Impact de la MEC ascitique sur la chimiorésistance des cellules cancéreuses..	149
Figure 93: Piégeage du CDDP par les protéines matricielles.....	151

Figure 94: Effet du carboplatine sur les cellules cancéreuses ovariennes.	153
Figure 95: Effet du carboplatine sur les sphéroïdes d'IGROV1, SKOV3 et OVCAR3.....	155
Figure 96: Effet du carboplatine sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes (au cours de la formation des grappes).	157
Figure 97: Effet du carboplatine sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes (après formation des grappes)..	159
Figure 98: Effet du carboplatine sur l'organisation des cellules adhérentes avant formation des sphéroïdes.	161
Figure 99: L'ascite influence la sensibilité des cellules cancéreuses ovariennes aux traitements à base de platine.....	164
Tableau 10: Récapitulatif de la caractérisation de la matrice extracellulaire des sphéroïdes et agrégats multicellulaires.....	120
Tableau 11 : Répartition des cellules IGROV1 dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de leur microenvironnement.	138
Tableau 12: Influence du microenvironnement des cellules SKOV3 sur leur progression des cellules dans le cycle cellulaire suite à un traitement au CDDP.	140
Tableau 13: Dosage de protéines et du glucose dans les ascites et dans le SVF	146

Liste des publications et communications

Publications

Cell cycle arrest or survival signaling through α v integrins, activation of PKC and Erk-1/-2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids

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

Experimental Cell Research, January 2014 (**Annexe 1**)

Communications orales

Ascites promote ovarian cancer cells survival

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

XXII^{ème} Réunion Annuelle de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire

Limoges, 2014

Communications par affiches

Ascites and extracellular matrix proteins derived from ascites constitute permissive microenvironment for ovarian cancer cells widespread and survival

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

International Joint Meeting of the German and French Societies for Matrix Biology

Freiburg, 2016

Ascites is a permissive microenvironment for ovarian cancer cells widespread and survival: Importance of ascites extracellular matrix

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

Colloque annuel de l'ITMO Bases Moléculaires et Structurales du Vivant (BMSV) de l'Alliance

Aviesan

Paris, 2015

Fibronectin model matrices for extracellular matrix – cells relationships studies and cancer therapies

C. R. Picot, J. Da Veiga Moreira, M. Jeannot, **L. Blay**, L. Carduner, R. Agniel, S. Kellouche, F. Carreiras, and C. Vendrely

XXIII^{ème} Réunion Annuelle de la Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire

Lyon, 2015

Fibronectin model matrices for extracellular matrix – cells relationships studies and cancer therapies

C. R. Picot, J. Da Veiga Moreira, M. Jeannot, **L. Blay**, L. Carduner, R. Agniel, S. Kellouche, F. Carreiras, and C. Vendrely

International workshop on Biomaterial Innovations: Toward repair of the Human Body
Cergy-Pontoise, 2014

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

L. Carduner, C. R. Picot, **L. Blay**, R. Agniel, L. Poulain, J. Leroy-Dudal, 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?

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

50th Anniversary of the French Society for Extracellular Matrix Biology
Paris, 2012

Avant-propos

Au sein d'un tissu, les cellules sont dans la plupart des cas en contact permanent avec un enchevêtrement complexe et dynamique de macromolécules fibreuses et adhésives, la matrice extracellulaire (MEC). Cette MEC, contribue à la régulation des comportements cellulaires et au maintien de l'architecture tissulaire. Les interactions cellules-MEC induisent notamment l'initiation de l'activation de voies de signalisations régulant la survie des cellules. À ce titre, la MEC est un constituant majeur du microenvironnement cellulaire.

Bien que la pathologie cancéreuse soit caractérisée par le résultat d'altérations successives de gènes, les foyers tumoraux sont également considérés comme des organes à part entière. L'influence du microenvironnement et notamment de sa composante matricielle sur le développement, la progression tumorale et donc l'évolution de la pathologie fait l'objet de nombreuses études. La composition et la « qualité » de la MEC au sein de ces foyers tumoraux peut-être altérée et ainsi impacter la dissémination tumorale.

Les cancers ovariens, souvent qualifiés de tueurs silencieux, sont des pathologies peu communes et représentent la première cause de mortalité due aux cancers gynécologiques dans les pays développés. Un mode de dissémination atypique au sein de la cavité péritonéale ainsi que l'acquisition d'une résistance à la chimiothérapie contribuent à l'échec relatif des traitements et à la récurrence de ces tumeurs dans près de 75% des cas. Une accumulation de liquide inflammatoire appelée ascite dans la cavité péritonéale est constatée chez près d'un tiers des patientes. La présence d'ascite est même considérée comme un facteur aggravant et est associée à un mauvais pronostic. Les ascites représentent des microenvironnements liquides uniques ayant une composition complexe. En plus des éléments moléculaires « bioactifs » qu'elles contiennent, elles renferment une population hétérogène de cellules. L'un des modes de dissémination des cellules cancéreuses ovariennes au sein de la cavité péritonéale implique ce liquide. Les cellules isolées ou organisées en agrégats multicellulaires, également appelés sphéroïdes, baignent dans l'ascite et sous cette forme ils sont capables de résister à la mort cellulaire induite par la perte d'ancrage, l'anoïkis. D'autre part, les sphéroïdes sont également résistants à la chimiothérapie et favorisent la formation de foyers tumoraux secondaires en se réimplantant sur les parois de la cavité abdominale, le péritoine.

L'impact et le rôle de l'ascite et des molécules qu'elle renferme dans la récurrence des cancers de l'ovaire reste méconnu.

Dans ce contexte, l'objectif global de ces travaux a été de contribuer à la compréhension de l'influence de l'ascite sur les processus favorisant la récurrence des cancers de l'ovaire. Approfondir les connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires favorisant la dissémination atypique et la chimiorésistance des cellules cancéreuses, ainsi que déterminer le rôle de l'ascite et plus particulièrement de la composante matricielle ascitique dans ces processus est au cœur de la problématique développée dans ce travail. Mes travaux de thèse se sont notamment attachés à définir la pertinence de la vitronectine et de la fibronectine ascitiques en tant que facteurs diagnostics et/ou cibles thérapeutiques.

Dans le cadre des travaux présentés, le manuscrit comporte une première partie bibliographique divisée en deux volets. Le premier décrit les cancers de l'ovaire et le verrou thérapeutique majeur que constitue la résistance de ces cancers à la chimiothérapie. Une description des données épidémiologiques et biologiques est présentée. La prise en charge thérapeutique de ces cancers et les mécanismes de résistance aux traitements sont présentés succinctement. Le second volet de la synthèse bibliographique présente l'importance du microenvironnement matriciel tumoral et notamment, de l'ascite dans la progression des cancers de l'ovaire. La composition de la matrice extracellulaire, ainsi que les interactions entre les cellules et le microenvironnement, et la signalisation qui en découle sont décrites (de manière non exhaustive). Le microenvironnement tumoral ovarien, les caractéristiques cellulaires et moléculaires de l'ascite et son influence sur la progression tumorale sont également abordés.

A la suite de cette synthèse bibliographique, les méthodes expérimentales et le matériel utilisé dans le cadre de ces travaux sont décrits. Une présentation globale, l'objectif de l'étude et les résultats, divisés en deux chapitres, sont ensuite présentés. Le premier chapitre porte sur les résultats obtenus au cours de l'analyse de l'influence de l'ascite et des protéines matricielles ascitiques sur les comportements des cellules cancéreuses ovariennes propices à leur dissémination. La permissivité de l'ascite sur ces comportements cellulaires a été investiguée et une caractérisation « matricielle » des sphéroïdes a été réalisée. Le second chapitre, porte sur l'étude de l'influence des acteurs précédemment cités sur la réponse des cellules cancéreuses ovariennes aux dérivés du platine. La spécificité de la composition de l'ascite quant à son effet protecteur sur les cellules cancéreuses ovariennes a été investiguée. Une discussion générale et les perspectives sur lesquelles découle ce travail de thèse sont également exposées. Les références bibliographiques utilisées tout au long du manuscrit sont répertoriées à la suite. Pour finir une partie « annexe » comporte l'article publié dont est tiré une partie des résultats de ce travail de thèse.

État de l'art

Partie I

Les cancers de l'ovaire

I. Généralités sur les ovaires

I.1. Anatomie et physiologie des ovaires

Les ovaires, au nombre de deux, sont des organes génitaux féminins enfouis profondément dans le bassin, de part et d'autre de l'utérus, à proximité des trompes de Fallope (**Figure 1**). Ils ont la forme d'une amande et mesurent 4 cm de long et 2 cm de large en moyenne, de la puberté à la ménopause. Par la suite, ils s'atrophient.

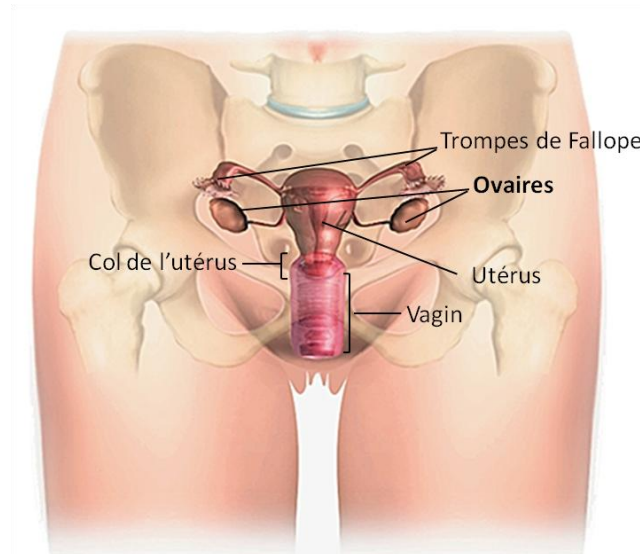


Figure 1: Localisation anatomique des ovaires. Modifiée d'après (www.anticancerfund.org)

Les ovaires font partie du système reproducteur féminin. Ils sont le siège de la production des cellules germinales femelles, les ovules. Les ovaires sont aussi des glandes endocrines, qui sécrètent des hormones stéroïdiennes, telles que les œstrogènes, les progestérones, les androgènes et non stéroïdiennes comme les inhibines. La sécrétion de ces dernières se superpose au cycle menstruel. Elles ont un rôle dans le développement et la maturation de l'ovule.

Les ovaires sont au contact des *fimbriae*, protubérances situées à l'extrémité des trompes de Fallope. Celles-ci recouvrent les ovaires au moment de l'ovulation, capturent les ovules et les transportent vers l'utérus grâce à des mouvements ciliaires et péristaltiques (**Figure 2**).

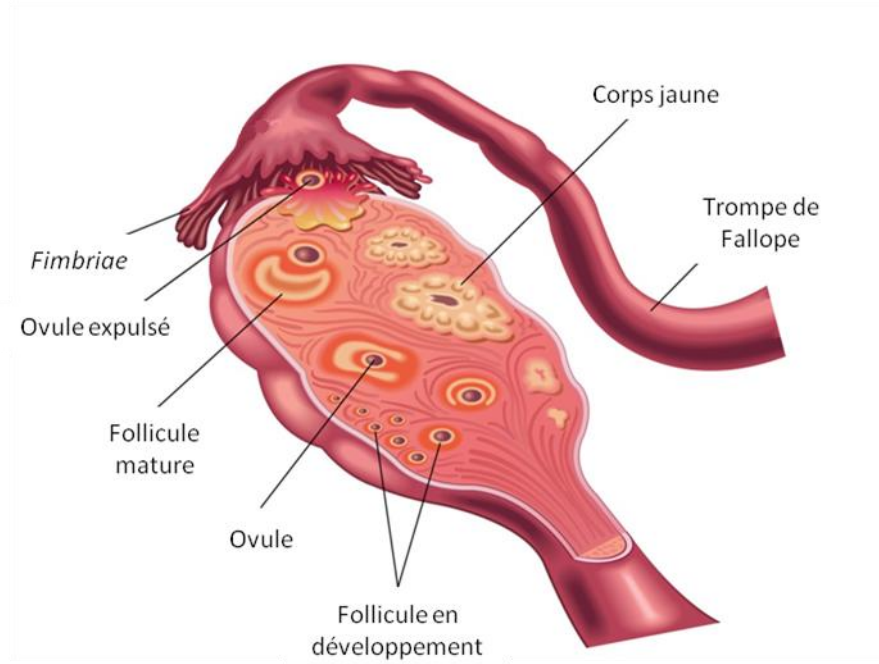


Figure 2: Trompe de Fallope coiffant l'ovaire au moment de l'expulsion de l'ovule. L'ovule est capté par les *fimbriae* et acheminé dans l'utérus. Modifiée d'après (www.fotosearch.fr/CSP467/k18602583)

Les ovaires sont localisés au sein de la cavité abdominale nommée cavité péritonéale. C'est la plus grande cavité de l'organisme. Elle contient aussi le foie, la vésicule biliaire, l'estomac, les reins, les intestins, la vessie et l'utérus. Elle est tapissée par une large membrane séreuse, mince et solide, appelée péritoine, d'une surface de 2 m² environ (**Figure 3**).

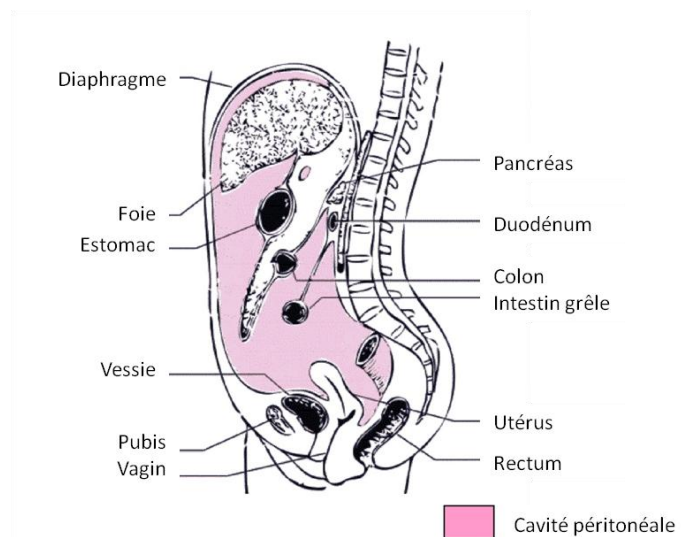


Figure 3: Coupe longitudinale du péritoine. De (www.docvadis.fr/oncologie-baclesse)

I.2. Histologie des ovaires et de leur environnement

Les ovaires sont constitués de deux zones : (i) la zone médullaire située au centre de l'ovaire, constituée de tissu conjonctif lâche, de nerfs, de vaisseaux lymphatiques et sanguins et (ii) la zone corticale, située à la périphérie de l'ovaire. Cette dernière est composée du stroma ovarien dans lequel résident les cellules germinales et est recouverte par l'épithélium ovarien de surface (EOS) (Figure 4).

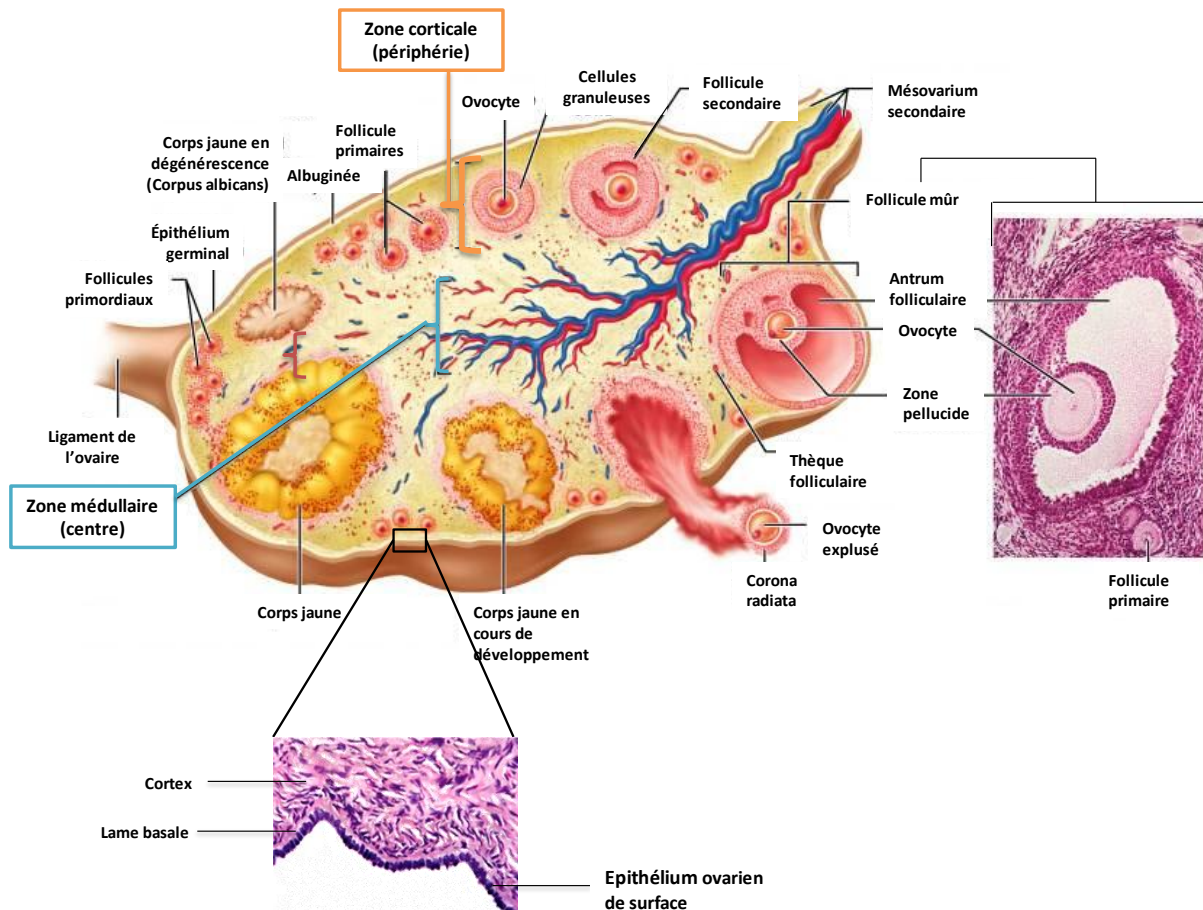


Figure 4: Coupe transversale de l'ovaire. Modifiée d'après (www.imagesbiogeolfxm.free.fr)

L'EOS est un épithélium cubique simple. L'EOS et le stroma sous-jacent (tunique albuginée) sont séparés par une lame basale. Les cellules de l'EOS ont la particularité d'y être faiblement attachées (Okamura et al. 2006) : elles peuvent facilement se détacher de la membrane par exfoliation, notamment lors de l'ovulation (Auersperg et al. 2001). Après l'ovulation, les cellules épithéliales de l'EOS prolifèrent rapidement, migrent afin de combler la brèche formée suite à la libération de l'ovule (Okamura et al. 2006) et contribuent à restaurer la zone corticale en synthétisant des éléments de la matrice extracellulaire.

Dans la cavité abdominale, l'EOS est en continuité avec le tissu mésothélial qui tapisse le péritoine (Auersperg 2013).

L'EOS et le mésothélium péritonéal sont d'origine mésodermique. Bien qu'ils aient la même origine embryonnaire et partagent le même environnement, il existe des différences structurales et fonctionnelles entre ces deux tissus. Pour exemple, les cellules de l'EOS expriment des récepteurs aux œstrogènes et aux progestérones ainsi qu'à certains facteurs de croissance, alors que ces récepteurs ne sont pas exprimés par les cellules mésothéliales. D'autre part, l'EOS est un tissu épithélial « peu différencié ». En effet, certains marqueurs de différenciation épithéliaux sont peu ou pas exprimés à la surface des cellules, notamment les E-cadhérines et MUC-16 (CA-125). En revanche, les cellules de l'EOS expriment des marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine et la N-cadhérine (Auersperg et al. 2001).

II. Les cancers de l'ovaire

II.1. Données épidémiologiques

Chaque année dans le monde, 240 000 nouveaux cas de cancers ovariens sont diagnostiqués, dont 4 600 en France. Ils sont responsables de 150 000 décès par an dans le monde (3 100 décès en France) (Institut national de veille sanitaire, 2012; (Torre et al. 2015)). Ils représentent la huitième cause de décès tous cancers confondus, mais la première en termes de décès dus aux cancers gynécologiques (**Figure 5**).

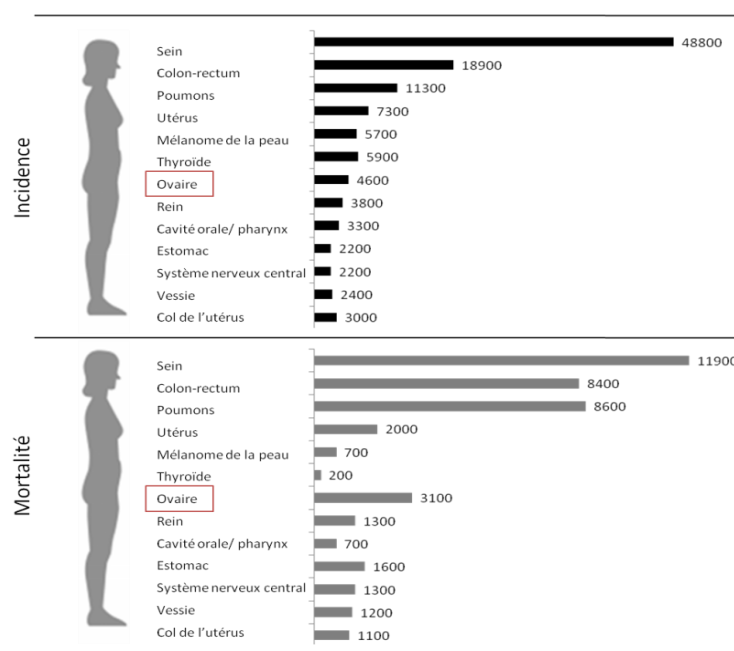


Figure 5: Incidences et mortalités des cancers dépistés chez les femmes en 2012. D'après les chiffres de l'inVs (2012)

Dans la plupart des cas, les cancers ovariens affectent les femmes âgées de plus de 45 ans avec une incidence maximale autour de 75 ans (**Figure 6**).

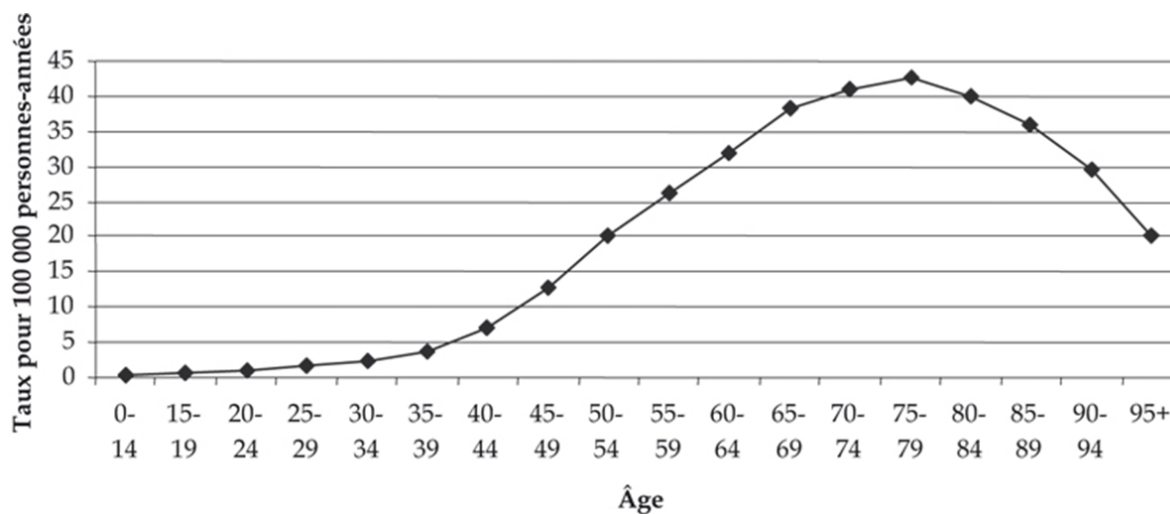


Figure 6: Incidence estimée du cancer de l'ovaire par âge en France en 2005. De Francim (France Cancer Incidence et Mortalité), InVS, Hospices civils de Lyon.

Plusieurs facteurs de risque sont associés à l'apparition de ces cancers. Ils sont d'ordres génétiques, hormonaux et/ou liés au mode de vie et à l'environnement.

5 à 10 % des cancers ovariens sont qualifiés d'héréditaires car le risque de développer un cancer des ovaires augmente de 1,4 % dans la population générale à plus de 5 % chez les femmes ayant des antécédents familiaux. Des mutations au niveau des gènes suppresseurs de tumeur *brca-1* et *-2* (breast cancer *-1/-2*) sont notamment impliquées, à savoir des délétions, des insertions de paires de bases, des codons-stop ou des substitutions non-sens (Miki et al. 1994). Les protéines BRCA-1 et BRCA-2 régulent les réponses aux dommages de l'ADN afin de maintenir l'intégrité du génome. Le risque de développer un cancer de l'ovaire pour une femme présentant des mutations sur les gènes *brca-1* et *-2* se situe entre 36 et 46 % et entre 10 et 27 %, respectivement (Rebbeck, Kauff, and Domchek 2009).

Pour les cas non héréditaires, dits sporadiques, la nulliparité, la précocité des règles ou la ménopause tardive sont des facteurs de risques avérés. Les contraceptifs oraux auraient un rôle protecteur. En 1971, M. Fathalla suggéra que les incessantes ruptures des ovaires lors de l'ovulation, suivies de la prolifération rapide des cellules de l'EOS pour réparer les lésions pourraient conduire au développement des cancers ovariens (Fathalla 1971). D'autre part, les traitements hormonaux par œstrogènes et œstro-progestatifs augmenteraient le risque de développer des cancers de l'ovaire (Glud et al. 2004). Par ailleurs, les femmes ayant des antécédents d'endométriose auraient un risque accru de développer ces cancers (Kim et al. 2014).

II.2. Données biologiques

II.2.1. Les différents types histologiques

Les cancers de l'ovaire sont des pathologies complexes et les types lésionnels observés sont multiples. Toutes les composantes cellulaires des ovaires peuvent potentiellement être à l'origine de cancers ovariens. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) les classe en trois grands groupes histologiques : les cancers de l'épithélium ovarien ou adénocarcinomes qui représentent 90 % des cancers ovariens, les cancers du mésenchyme et des cordons sexuels qui représentent environ 1 à 5 % et les cancers affectant les cellules germinales (1 à 5 %) (**Figure 7**).

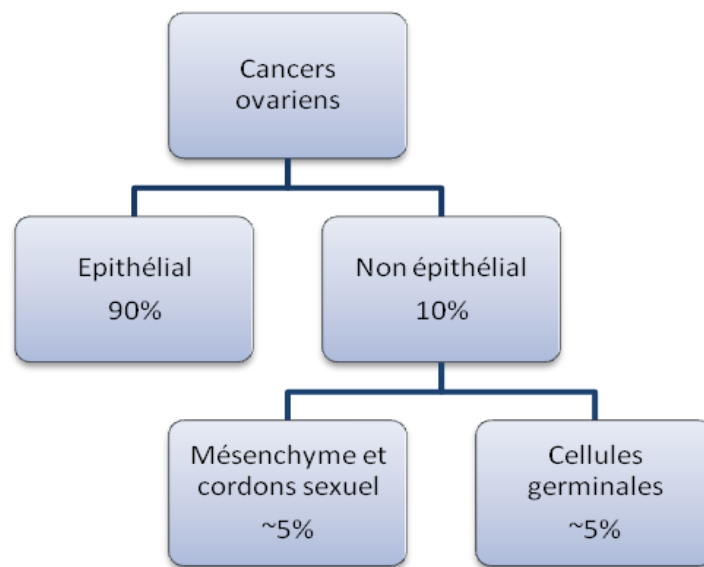


Figure 7: Les grands types histologiques des cancers ovariens selon l'OMS.

Parmi les cancers de l'épithélium ovarien (CEO), se distinguent 4 sous-types histologiques principaux: séreux, endométriodes, à cellules claires et mucineux, tandis que les carcinomes transitionnels (de Brenner), à cellules épithéliales mixtes, à cellules mixtes Mülleriennes et indifférenciés sont plus rares (Seidman et al. 2004) (**Figure 8**).

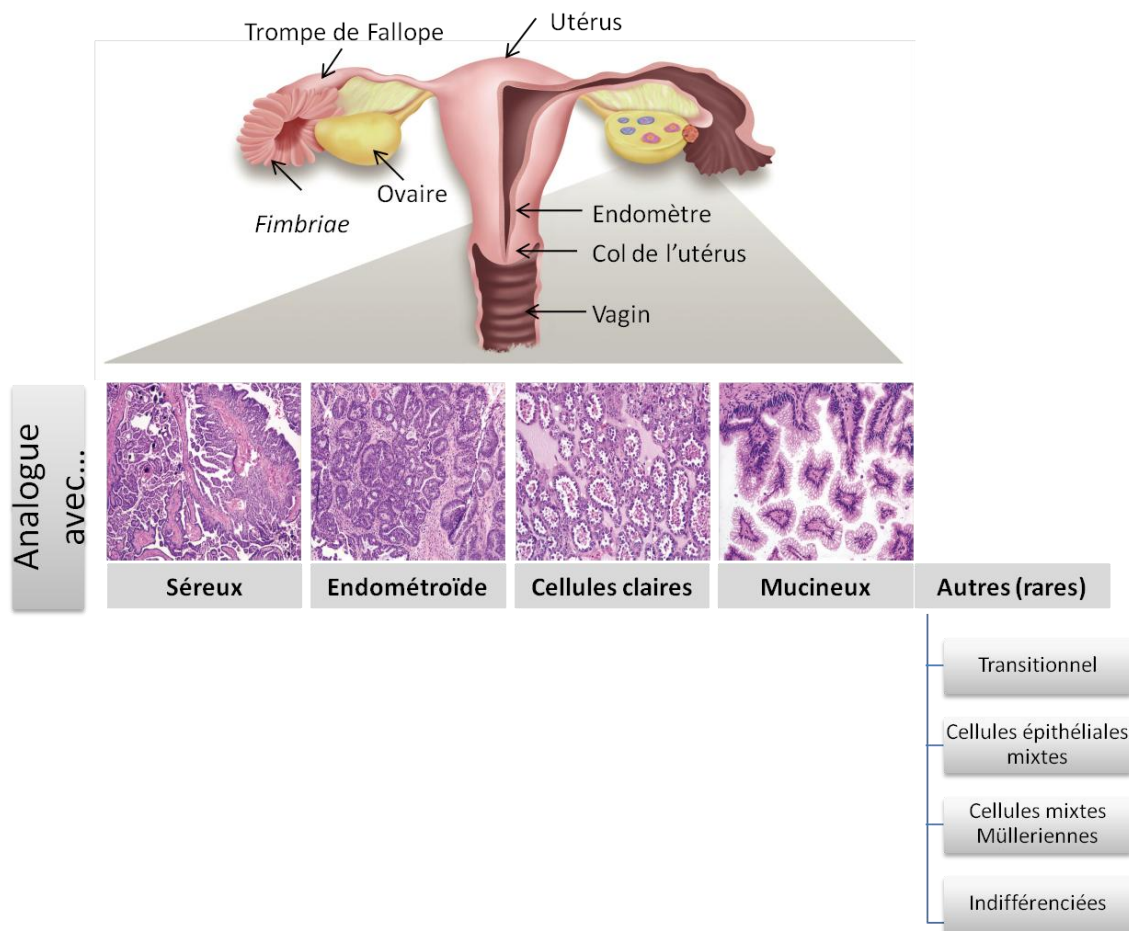


Figure 8: Coupes illustrant les différents sous-types histologiques majoritaires des cancers de l'épithélium ovarien. Modifiée d'après (Karst and Drapkin 2010).

II.2.2. Grades et Stades

Pour chaque sous-type histologique de CEO, sont définis 3 grades selon le degré de dédifférenciation cellulaire et l'agressivité tumorale.

- Grade 1 (Bas grade) : moins de 5 % de cellules indifférenciées – croissance lente, risque de propagation peu élevé.
- Grade 2 (Grade modéré) : entre 5 et 50 % de cellules indifférenciées.
- Grade 3 (Haut grade) : plus de 50 % de cellules indifférenciées – croissance rapide, risque de propagation élevé.

L'étendue de la propagation tumorale dans l'organisme est quant à elle caractérisée par le stade. Selon la classification FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), 4 stades sont définis en fonction de la présence de tumeurs sur l'un ou sur les deux ovaires, sur les organes avoisinants et dans la cavité péritonéale. La plupart des cancers de l'ovaire sont diagnostiqués à un stade avancé (IIB-IV) (Figure 9).

Stades FIGO	Description
Stades I	Cancer est localisé sur un ou les deux ovaires
IA	Croissance limitée à un seul ovaire, sans ascite. Aucune tumeur sur la surface externe de l'ovaire. Capsule intacte
IB	Croissance limitée sur les deux ovaires, sans ascite. Aucune tumeur sur la surface externe de l'ovaire. Capsule intacte
IC	Tumeur de stade IA ou IB. Présence de tumeurs à la surface externe d'un ou deux ovaires ou présentant une capsule rompue
Stades II	Croissance tumorale impliquant un ou les deux ovaires avec présence d'extensions locales sur les organes pelviens
IIA	Extensions et/ou métastases sur l'utérus ou les trompes de Fallope. Pas de cellules cancéreuses dans l'abdomen
IIB	Extensions et/ou métastases sur d'autres tissus pelviens. Présence de cellules cancéreuses dans le liquide de l'abdomen
Stades III	Tumeurs étendue au péritoine ou aux ganglions pelviens appelées métastases régionales
IIIA	Métastases microscopiques découvertes sur le péritoine après chirurgie ou après biopsie
IIIB	Présence de métastases péritonéales mesurant jusqu'à 2cm, ganglions pelviens non atteints
IIIC	Certaines métastases du péritoine mesurent plus de 2cm et /ou propagation aux ganglions pelviens
Stade IV	Croissance tumorale impliquant un ou deux ovaires avec présence de métastase à distance

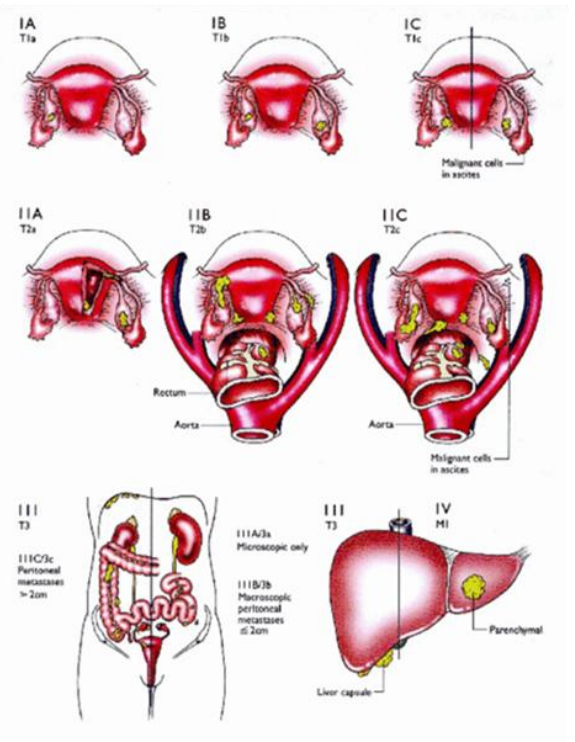


Figure 9: Les 4 stades des tumeurs de l'ovaire selon la classification de la FIGO. Modifiée d'après (Heintz et al. 2006).

II.2.3. Classification moléculaire

En 2004, I. Shih et R. Kurman ont proposé d'ajouter un critère moléculaire permettant de classer les CEO en un sous-type I ou II en fonction de leurs lésions génétiques (Shih and Kurman 2004) (Figure 10).

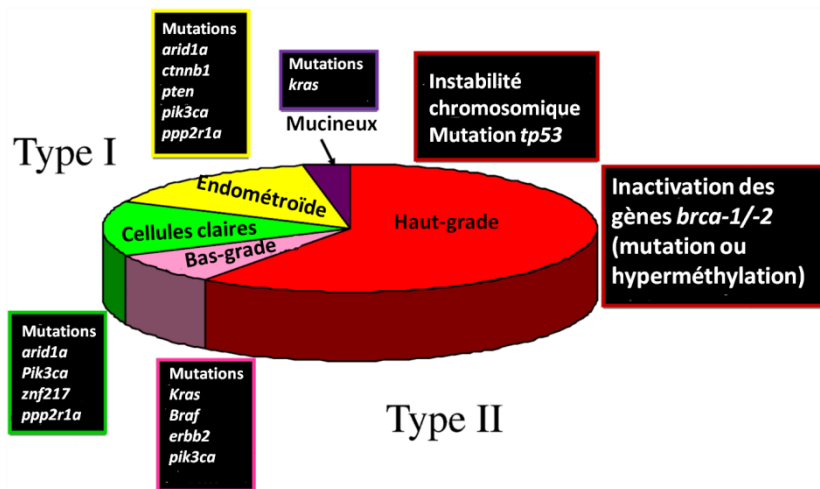


Figure 10: Lésions génétiques observées selon les types de cancers de l'épithélium ovarien. Modifiée d'après (Kurman Robert J. 2011).

Le type I regroupe les CEO présentant des mutations au niveau des gènes *kras*, *braf*, *erb-b2*, *ctnnb1*, *pten*, *pik3ca*, *ardid1a*, *ppp2r1a* (Singer et al. 2003; Singer et al. 2005; Jones et al. 2012). Ces gènes codent pour des protéines des voies de signalisation MAP-Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase) et PI3-Kinase/PTEN (PhosphoInositide 3-Kinase/ Phosphatase and Tensin homologue) (Peyssonnaud and Eychène 2001). Les voies de signalisation MAP-Kinase et PI3-Kinase convergent vers le même facteur de traduction eIF4B. Celui-ci aurait un rôle important dans le développement des tumeurs de type I (Shahbazian et al. 2006). Ce groupe inclut les tumeurs séreuses et endométriales de bas grade, les tumeurs mucineuses, les tumeurs à cellules claires et transitionnelles. Elles partagent un faible pouvoir invasif, prolifèrent peu, restent généralement confinées sur l'ovaire et sont relativement stables génétiquement. Les CEO de type I se développent par étape à partir de lésions précurseurs et sont généralement détectés à des stades précoces.

Le type II regroupe les CEO présentant une mutation du gène *tp53* (Ahmed et al. 2010; Bell et al. 2011) et/ou une inactivation des gènes *brca-1* et *-2* par mutation ou hyperméthylation (Chan et al. 2000). Il inclut les types histologiques séreux et endométriaux de haut grade. Ces tumeurs sont généralement agressives, elles sont détectées à des stades avancés et présentent une grande instabilité génétique. Ces tumeurs évoluent rapidement et sont de mauvais pronostic (Singer et al. 2005).

II.2.4. Hypothèses sur les différents modèles de l'origine des cancers ovariens

Si l'origine et la pathogénie des CEO sont peu connues, différents modèles ont été avancés.

Comme l'a suggéré M. Fathalla dès 1971, les fréquents cycles de ruptures/réparations du cortex ovarien lors de l'ovulation conduisent à l'apparition d'invaginations de l'EOS dans le stroma sous-jacent. Les cellules qui tapissent ces invaginations sont progressivement intégrées dans le stroma et y forment des kystes d'inclusions (Fathalla 1971). Les cellules de l'EOS se trouvent ainsi dans un nouvel environnement qui favorise la survenue de mutations et la cancérogenèse (**Figure 11**).

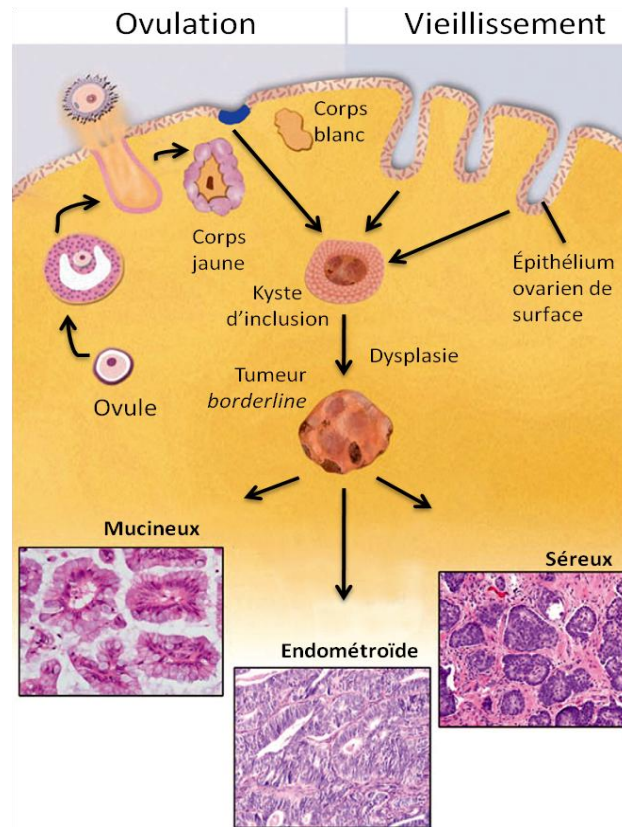


Figure 11: Modèle des kystes d'inclusion. Modifiée d'après (Levanon, Crum, and Drapkin 2008).

Ce modèle est en accord avec les données épidémiologiques indiquant qu'une diminution des cycles ovulatoires réduit les risques de développer des cancers de l'ovaire (Cf II.1 ; page 9). Cependant il ne permet pas de rendre compte de la grande variabilité histologique et génétique des différents sous-types de CEO.

Un autre modèle propose que les ovaires soient les sites secondaires de tumeurs d'origine péritonéale provenant des tissus adjacents aux ovaires. Pour exemple, X. Jiang et ses collaborateurs ont démontré que les lésions de l'endométriose pourraient être des précurseurs d'adénocarcinomes de types endométriodes ou à cellules claires (Jiang et al. 1998).

En outre, J. Pieck et ses collaborateurs ont mis en évidence des lésions au niveau des trompes de Fallope chez des femmes présentant une prédisposition génétique à développer des cancers de l'ovaire. Les lésions localisées sur les trompes de Fallope ne sont pas retrouvées sur les ovaires. D'un point de vue histologique, elles ressemblent aux tissus tumoraux des cancers épithéliaux ovariens séreux de haut grade. Selon l'hypothèse des auteurs, ces lésions, qu'ils ont appelées carcinomes tubaires intra-épithéliaux, peuvent évoluer vers des carcinomes séreux tubaires intra-épithéliaux (serous tubal intraepithelial carcinoma: STIC), se développant dans les trompes de Fallope.

Les cellules issues des STICs migreraient ensuite vers l'EOS et seraient à l'origine des carcinomes ovariens de type séreux (Piek et al. 2001; Piek et al. 2003). Les STICs et les carcinomes ovariens séreux de haut grade sont d'ailleurs génétiquement proches et partagent, entre autre, une expression élevée de la protéine p53, accumulée dans le cytoplasme. Ces similitudes suggèrent une relation de type clonale entre les deux types de lésions (Kurman and Shih 2010) (**Figure 12**).

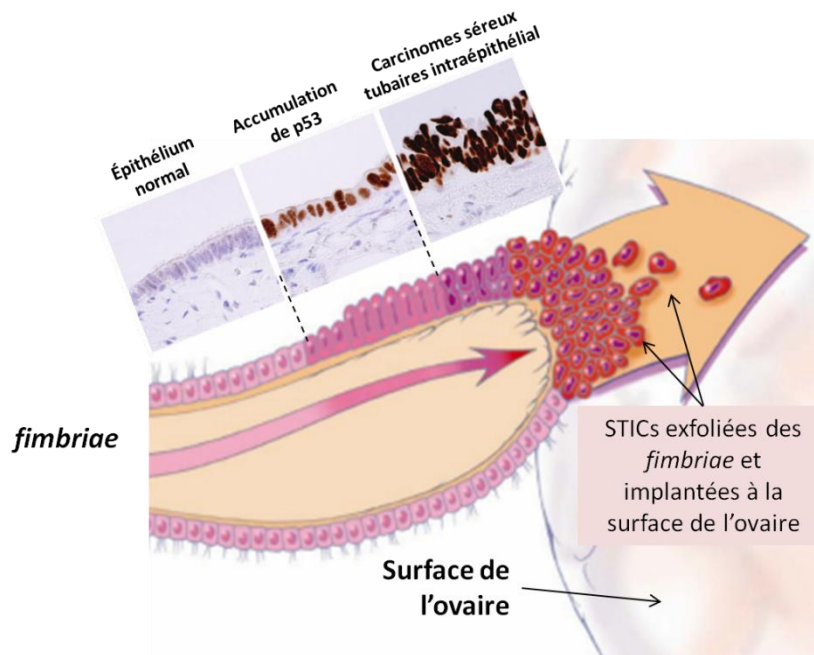


Figure 12: Modèle de l'origine séreuse des tumeurs ovariennes. Les images d'immunohistochimie représentent les cellules de l'épithélium normal des *fimbriae* (à gauche), une accumulation de la protéine p53 dans l'épithélium (au centre) et dans le carcinome (à droite). Modifiée d'après (Karst and Drapkin 2010; Kurman and Shih 2010).

En 2007, D. Kinselberger et ses collaborateurs ont démontré que les carcinomes tubaires intra-épithéliaux pouvaient également être observés dans 50 à 60 % des cas de cancers ovariens sporadiques (Kindelberger et al. 2007). En accord avec le modèle de développement des cancers ovariens à partir des STICs, il a été démontré qu'une ligature bilatérale des trompes de Fallope permet de réduire de 34 % le risque de développer des cancers ovariens séreux (Cibula et al. 2011).

- ***Vers une unification des deux modèles***

Y. Lee et ses collaborateurs ont proposé un modèle incluant les deux voies distinctes menant à la cancérogénèse ovarienne. La première, qui repose sur la formation de métaplasies dans les kystes d'inclusion serait à l'origine des carcinomes ovariens de type I, tandis que la seconde implique les STICs et serait à l'origine des tumeurs de type II (Lee et al. 2007) (**Figure 13**).

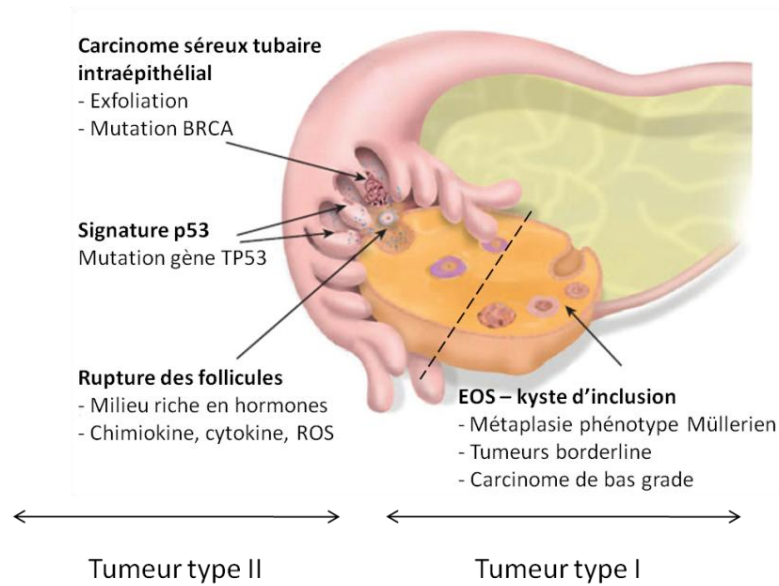


Figure 13: Origine des cancers de l'épithélium ovarien - modèle à 2 voies. Modifiée d'après (Levanon, Crum, and Drapkin 2008).

En outre, il se pourrait que les cellules des STICs se déversent à la surface de l'ovaire au niveau de micro-cicatrices créées par l'ovulation. Les cellules des STICs coloniseraient ainsi l'EOS et pourraient ensuite s'invaginer dans le stroma sous forme de kystes d'inclusion, avec une possible évolution vers des carcinomes ovariens (Kurman and Shih 2010) (**Figure 14**).

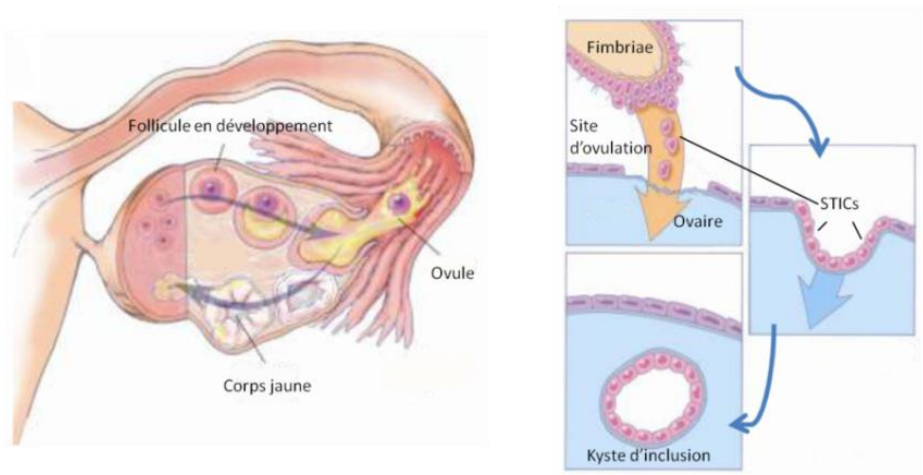


Figure 14: Transfert des STICs des fimbriae vers les ovaires et formation de kystes d'inclusion. Modifiée d'après (Kurman and Shih 2010).

II.3. Données cliniques

II.3.1. Diagnostic

Les cancers ovariens sont difficiles à détecter car il est possible qu'aucun symptôme ne se manifeste. En effet, la cavité abdominale offre un espace suffisant à la tumeur pour se développer et prendre du volume asymptomatiquement. Les symptômes peuvent n'apparaître qu'une fois que les métastases atteignent les tissus environnants et lorsqu'ils sont présents, ils sont souvent aspécifiques (Goff et al. 2007). Ils peuvent être confondus avec ceux de pathologies gastro-intestinales ou de désordres urinaires. Les patientes ressentent des pressions pelviennes menant à une sensation d'inconfort abdominal, ainsi que des pressions sur la vessie causant des problèmes urinaires tels que des changements de la fréquence et de l'urgence des mictions. L'évolution de la maladie peut provoquer une augmentation lente et progressive du tour de taille, des saignements vaginaux, une gêne respiratoire, une sensation de satiété rapide, entre autre (Gajjar et al. 2012). Ces symptômes n'étant pas alarmistes, les patientes consultent souvent tardivement.

Le diagnostic s'appuie d'abord sur un examen physique. Le praticien effectue un toucher pelvien pour palper l'utérus et les ovaires et observe le vagin et le col de l'utérus. Le médecin peut également examiner l'abdomen à la recherche de masses, ou vérifier si un ou plusieurs organes sont enflés.

Une échographie abdomino-pelvienne complémentaire permet de localiser la tumeur, de la mesurer, de déterminer le degré d'extension et de rechercher la présence de liquide inflammatoire dans la cavité péritonéale. Des marqueurs tumoraux sanguins seront recherchés tel le CA-125 (glycoprotéine de surface exprimée par les cellules cancéreuses ovariennes mais non par celles de l'EOS). En diagnostic clinique, l'augmentation du taux sanguin de CA-125 au-delà de 30 U/mL est corrélée avec l'évolution du cancer de l'ovaire (Roupa et al. 2004).

Afin d'améliorer le dépistage à des stades précoces, l'association du dosage du CA-125 et de l'échographie transvaginale a été proposée (Roupa et al. 2004; Zacharakis et al. 2013). Aucune étude ne permet d'avoir de retours sur le bénéfice réel de cette combinaison d'examens. Toutefois, de nombreux efforts sont déployés pour identifier de potentiels marqueurs tumoraux des cancers ovariens. A ce jour, l'héparane, la MMP-9 ou encore la survivine sont des candidats à l'étude (Zhang et al. 2011; No et al. 2011; Chen et al. 2013).

La détection des cancers de l'ovaire à des stades précoces conditionne la survie des patientes. Les patientes diagnostiquées aux stades IA à IIA ont un taux de survie à 5 ans de l'ordre de 80 à 95 % (Hennessy, Coleman, and Markman 2009). En revanche, les patientes diagnostiquées aux stades

avancés IIA à IV (75% des cas), ont un taux de survie à 5 ans est de l'ordre de 44 % (Herzog et al. 2016) (Figure 15).

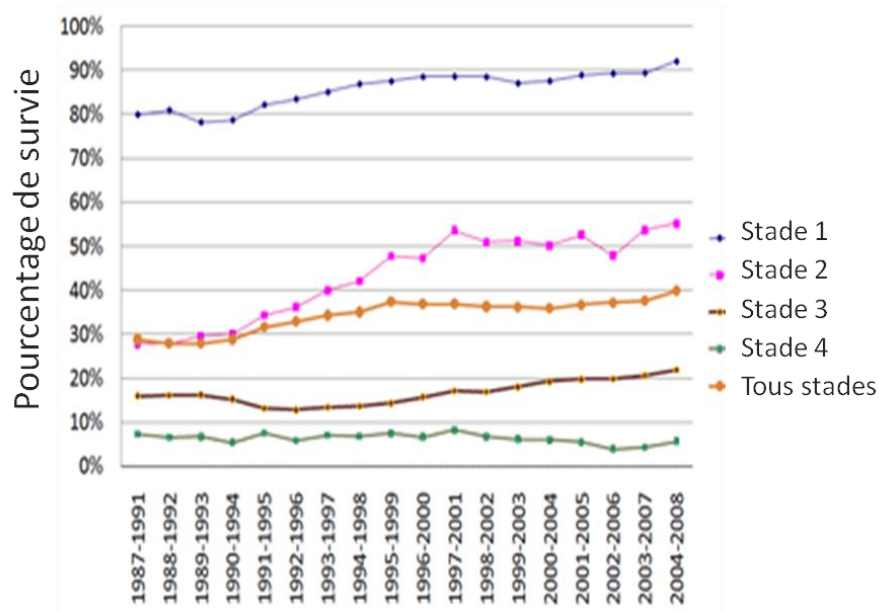


Figure 15: Taux de survie à 5 ans par stade ou tous stades confondus chez l'adulte (15-99ans). De (Anglia Cancer network).

Le pronostic est estimé en fonction des critères suivants :

- Age et état de santé général
- Type histologique, stade et grade de la tumeur
- Valeur du taux CA-125
- Volume résiduel de la tumeur après exérèse initiale

II.3.2. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique des cancers ovariens se fait dans des centres spécialisés. Elle repose sur la chirurgie et la chimiothérapie. La radiothérapie reste marginale.

- **La chirurgie**

La chirurgie est un acte important dans la prise en charge des patientes atteintes de cancers ovariens. Elle a pour objectif d'une part, l'exérèse des lésions et d'autre part, de compléter le diagnostic, notamment en précisant l'extension intra-abdominale. Elle permet de réaliser une exploration méthodique et visuelle région par région en précisant le site des lésions, leur diamètre initial et résiduel. La chirurgie cytoréductrice est dite optimale quand aucun nodule carcinomateux résiduel n'est visible macroscopiquement (Stuart et al. 2011). En effet, la présence de nodules carcinomateux résiduels supérieurs à 1 cm étant un facteur de mauvais pronostic.

- **La chimiothérapie**

Les protocoles standards de chimiothérapie pour les cancers ovariens associent des sels de platine, induisant des dommages à l'ADN avec un autre agent, généralement de la classe des taxanes, qui inhibe la dynamique des microtubules (McGuire et al. 1996; Piccart et al. 2000). Un anti-angiogénique ciblant les néo-vaisseaux tumoraux peut-être associé selon les cas. Ces agents chimiothérapeutiques sont inoculés en intraveineuse (IV) à raison de six cycles, un toutes les trois semaines. La chimiothérapie intrapéritonéale (IP) peut également être utilisée afin de délivrer des doses plus élevées d'agents chimiothérapeutiques au sein de la cavité péritonéale, site d'implantation métastatique des cancers ovariens (**Figure 16**).

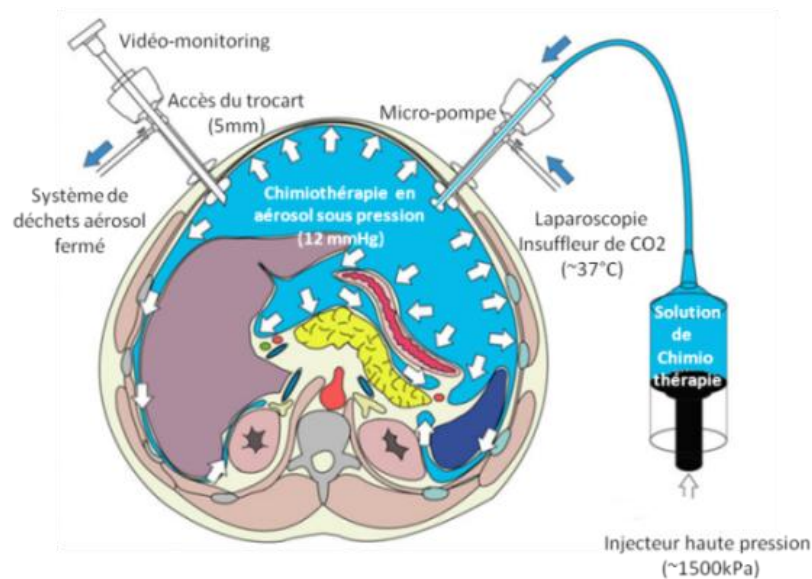


Figure 16: Principe de l'administration d'agents chimiothérapeutiques par voie intrapéritonéale. Modifiée d'après (Solass et al. 2014).

Les principaux agents chimiothérapeutiques proposés aux patientes sont les sels de platine, notamment le cisplatine. Ils appartiennent à la classe des composés alkylants. Ils provoquent l'arrêt de la prolifération des cellules après s'être liés à l'ADN.

Le potentiel cytotoxique du cisplatine a été découvert de façon fortuite en 1965 par B. Rosenberg et ses collaborateurs. En appliquant un champ électrique, à partir d'électrodes de platine, sur une culture de bactéries *Escherichia coli*, ils ont remarqué un arrêt des divisions cellulaires. Ils ont démontré que l'inhibition des divisions cellulaires était due à la formation d'un complexe entre le platine produit par les électrodes et le chlorure d'ammonium se trouvant dans le milieu (Rosenberg, Vancamp, and Krigas 1965). Depuis, plusieurs complexes de platine ont été testés afin d'analyser leur effet cytotoxique. Le *cis*-dichloro-diamino-platine (II), ou CDDP, est le composé dont les effets sont les plus prononcés (Rosenberg et al. 1969).

Le CDDP est une molécule composée d'un atome de platine central, de deux atomes de chlore labiles en position *cis* et deux groupements ammoniac inertes (**Figure 17**). En 1970, B. Rosenberg et ses collaborateurs ont montré que le CDDP présentait une activité anti-tumorale significative chez des souris ayant développé des sarcomes et des leucémies (Rosenberg and VanCamp 1970). Par la suite, des essais cliniques chez l'homme ont montré l'efficacité de traitements à base de CDDP sur les cancers de testicules (Higby et al. 1974). Son utilisation en tant que composé anti-tumoral a été validée par la FDA (Food and Drug Administration) en 1978. Plus de 35 ans après, le CDDP reste le médicament le plus utilisé dans le traitement des cancers de l'ovaire.

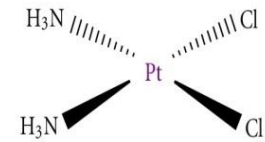


Figure 17: Molécule de cisplatine (pH et charge neutre). De (Gómez-Ruiz et al. 2012).

Le CDDP pénètre dans la cellule par diffusion passive, facilitée *via* les transporteurs de cuivre ou active (Andrews et al. 1991; Ishida et al. 2002) (**Figure 18**).

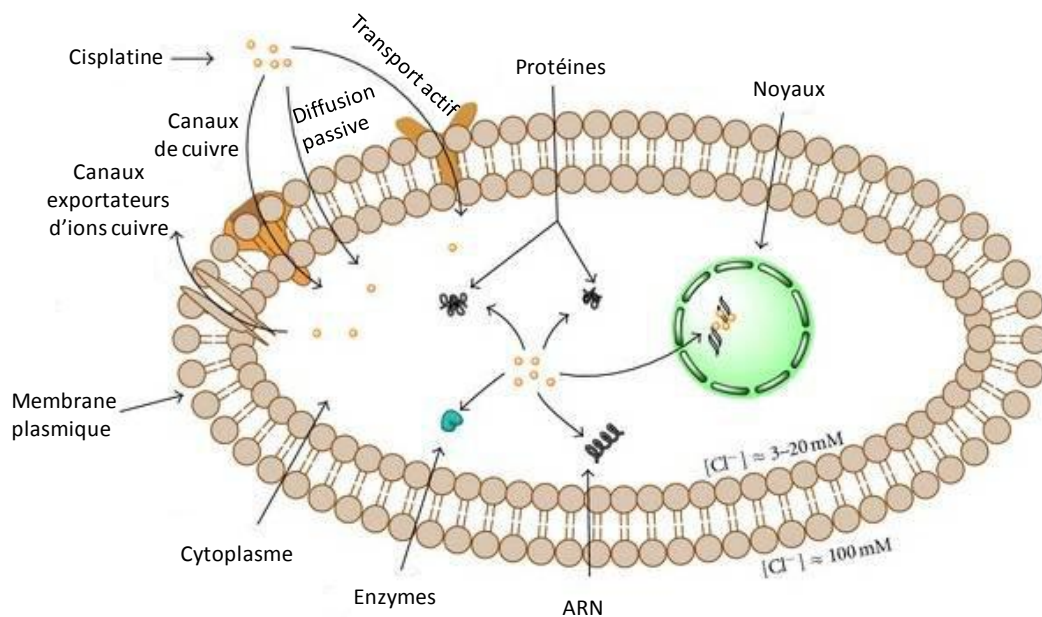


Figure 18: Entrée du cisplatine dans la cellule et cibles moléculaires. Modifiée d'après (Gómez-Ruiz et al. 2012).

Dans le cytosol, les ions chlorures (Cl^-) du CDDP sont substitués par des groupements hydroxyles (OH^-) (**Figure 19**).

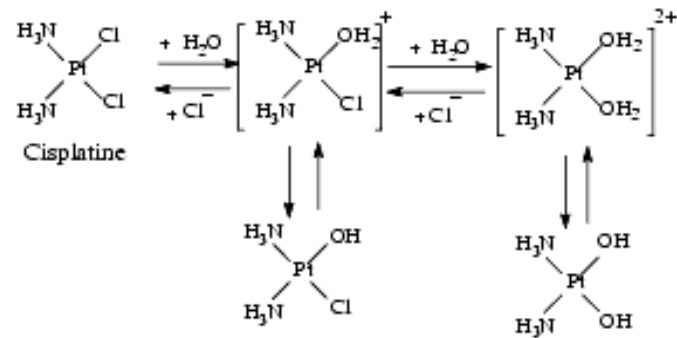


Figure 19: Hydrolyse du cisplatine et formation des complexes cationiques. De (www.pharmacorama.com).

A pH physiologique, ces complexes électrophiles réagissent avec des sites nucléophiles comme les bases azotées de la molécule d'ADN. Cependant, seuls 5 à 10 % de la concentration totale de CDDP intracellulaire sont retrouvés dans le noyau. La fraction de CDDP restante se lie aux ARNs, aux protéines ou au glutathion (tripeptide retrouvé dans le cytoplasme des cellules, il y joue un rôle d'antioxydant) (Fuertes, Alonso, and Pérez 2003).

L'activité anti-tumorale du CDDP repose majoritairement sur sa capacité à former des réticulations mono- (liées à une base) ou bi-fonctionnelles (liées à deux bases) sur l'ADN. Ces dernières sont nommées adduits et l'ADN est dit platiné. 90 % des adduits sont formés entre deux purines sur le même brin d'ADN (**Figure 20**).

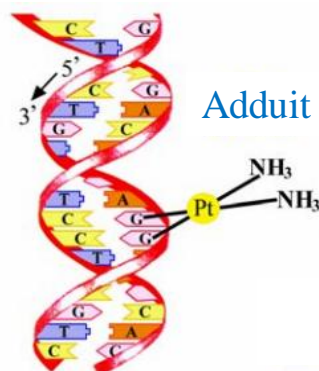


Figure 20: Représentation schématique d'un adduit. Modifiée d'après (Pizarro and Sadler 2009).

Le pontage des bases d'ADN par le CDDP sur la double hélice induit des modifications structurales de cette dernière, notamment une distorsion locale sévère qui entraîne son déroulement et la présence de vrilles sur l'ADN (Bellon, Coleman, and Lippard 1991) (**Figure 21**).

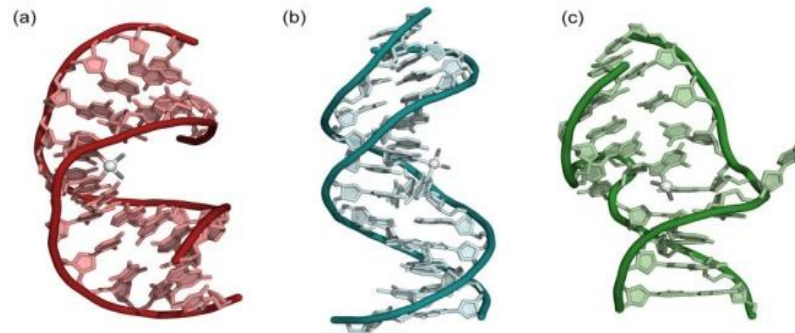


Figure 21: Représentation de la double hélice d'ADN déformée par les adduits de CDDP. Analyse par diffraction aux rayons X (a) adduit intrabrin 1,2-d(GpG) (b) adduit intrabrin 1,3-d(GpTpG) (c) adduit interbrin. De (Todd and Lippard 2009)

La déformation de la double hélice d'ADN entraîne des altérations de la réplication, de la transcription et de la reconnaissance/réparation de ces adduits. Les boucles formées par les adduits de CDDP sur l'ADN peuvent être reconnues par différents complexes protéiques de réparation de l'ADN tels que les systèmes NER (Nucleotide Excision Repair) (Zamble et al. 1996) ou MMR (Mismatch Repair) (Yamada et al. 1997). Elles peuvent également être reconnues par les protéines HMG (High mobility Group) qui empêcheront alors l'interaction entre les sites platinés et les systèmes de réparations (Donahue et al. 1990) (**Figure 22**).

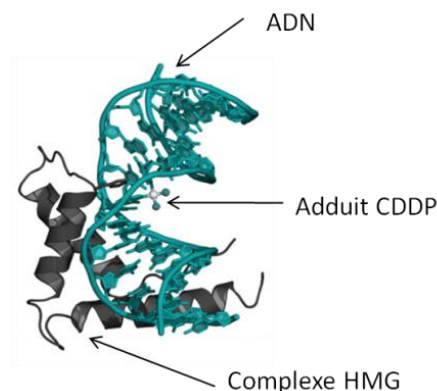


Figure 22: Liaison du complexe protéique HMG sur l'adduit CDDP-ADN. Modifiée d'après (Todd and Lippard 2009).

Dans ce cas, les dommages de l'ADN deviennent permanents. En conséquence, les voies de signalisation qui conduisent à la mort cellulaire sont activées (Persons et al. 1999). Ainsi, la capacité des cellules à effectuer ou non des réparations suite aux lésions de l'ADN causées par le CDDP module leur sensibilité aux traitements.

Le cisplatine est le premier dérivé du platine à avoir été utilisé en chimiothérapie. Toutefois son importante toxicité limite son utilisation (néphrotoxicité, neurotoxicité, ototoxicité). Trois composés analogues peuvent être utilisés en chimiothérapie : le carboplatine, l'oxaliplatine et le nédaplatine. Cependant, seuls le carboplatine et l'oxaliplatine sont autorisés en France (**Figure 23**). Ces agents

chimiothérapeutiques ont le même mécanisme d'action que le CDDP dont ils diffèrent en revanche, par la stabilité, la bio-distribution et surtout la toxicité.

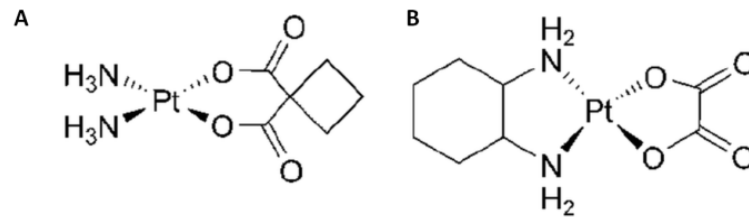


Figure 23: Molécules de (A) carboplatine et (B) oxaliplatine (pH et charges neutres). De (Ahmad 2010).

Souvent combinés avec les sels de platine (cisplatine ou carboplatine) pour le traitement des cancers ovariens, les taxanes (paclitaxel ou docetaxel) sont des diterpènes alcaloïdes naturels extraits d'écorces ou des aiguilles d'ifs (McGuire et al. 1989; Bishop et al. 1999; Bonomi et al. 2000; Jordan and Wilson 2004). Ils sont composés de deux groupements : un anneau taxane et une chaîne latérale d'ester homo-chiral (**Figure 24**).

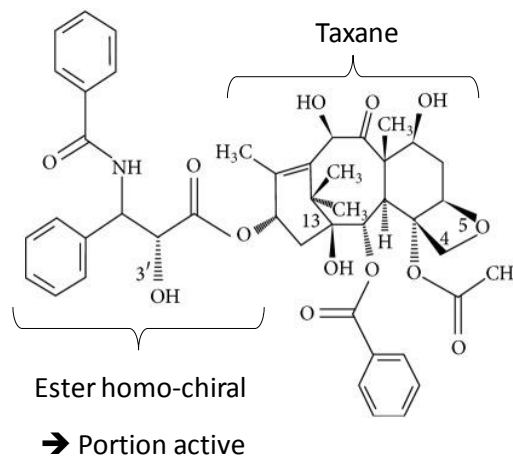


Figure 24: Formule chimique du paclitaxel (C₄₇H₅₁NO₁₄). Modifiée d'après (Kampan et al. 2015).

Les taxanes exercent leur effet cytotoxique en se liant aux microtubules du cycle cellulaire et inhibent la division cellulaire en empêchant la dépolymérisation des microtubules au cours de la phase G₂/M (précédant la mitose) (Rao et al. 1994).

D'autre part, il a été démontré que l'administration hebdomadaire de paclitaxel induit une mort cellulaire indépendante de la stabilisation des microtubules. La transcription de différents gènes intervenant dans la réparation des dommages à l'ADN, dans l'inflammation ou dans la prolifération des cellules est, en effet, également modulée. De plus, plusieurs voies de signalisation apoptotiques ou liées au stress oxydatif sont aussi activées en réponse au paclitaxel. Tous ces éléments concourent à potentialiser l'activité anti-cancéreuse du paclitaxel (**Figure 25**).

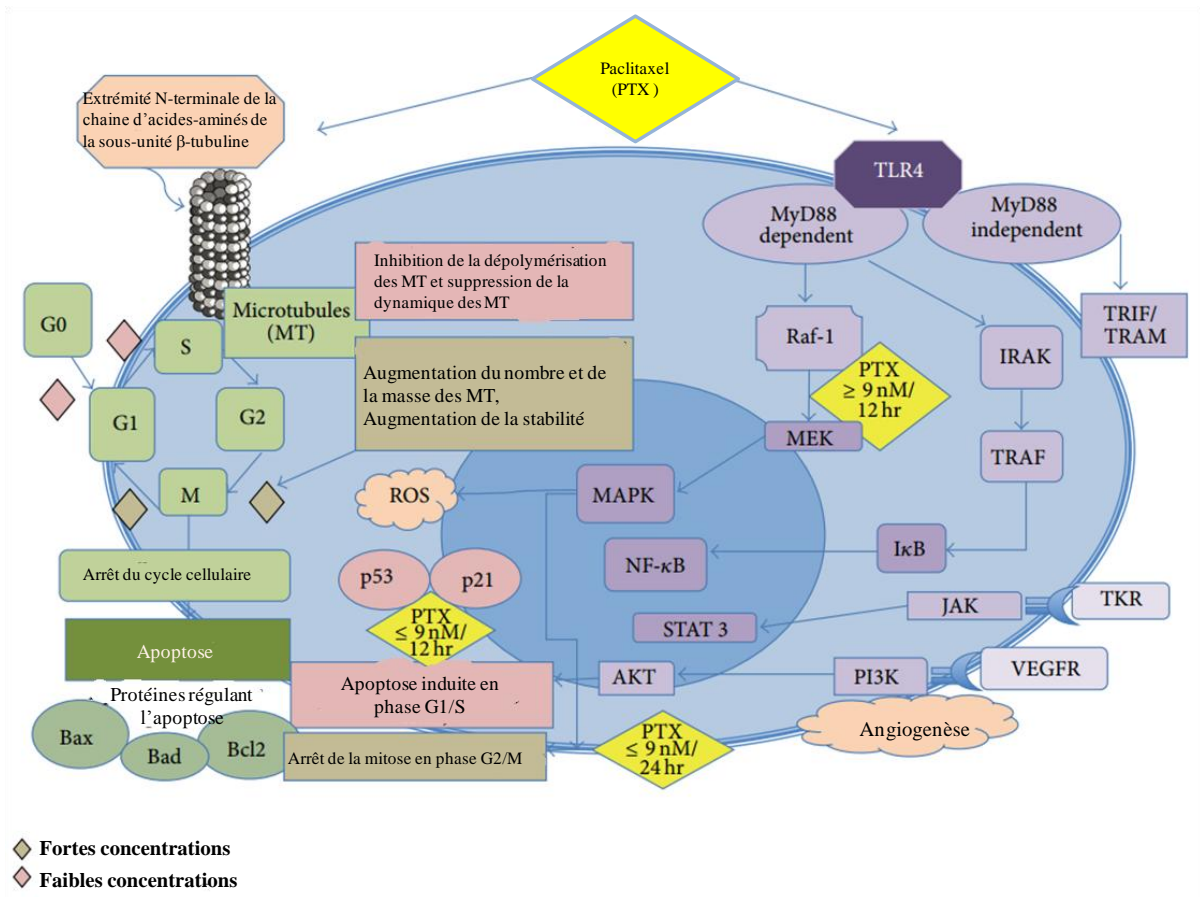


Figure 25: Mécanisme d’action du paclitaxel. Modifiée d’après (Kampan et al. 2015).

Récemment, les agents anti-angiogéniques ont été introduits dans les protocoles de traitements des cancers de l’ovaire. Ils ciblent la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (angiogénèse), processus nécessaire à la survie et la dissémination tumorale. Le bevacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal qui se lie au facteur pro-angiogénique VEGF (Vascular Epidermal Growth Factor) et empêche son interaction avec ses récepteurs localisés à la surface des cellules endothéliales (Figure 26).

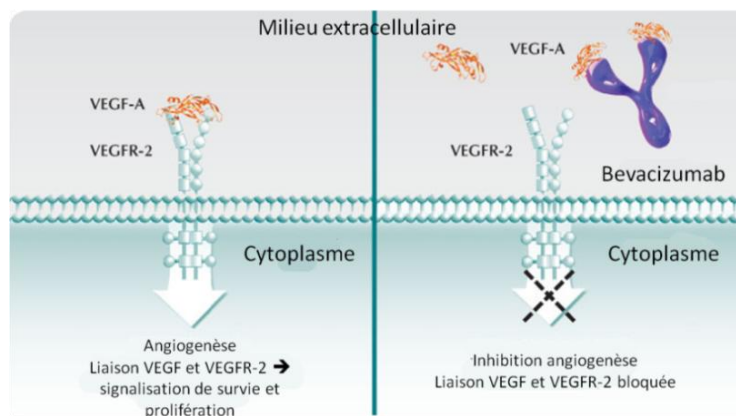


Figure 26: Mécanisme d’action du bevacizumab. De <http://www.avastin-hcp.com>.

Dans les traitements standards des cancers de l'ovaire, le bevacizumab est utilisé en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel ou peut être administré seul jusqu'à 15 mois après le dernier cycle de chimiothérapie. Les effets secondaires majeurs associés à l'administration de bevacizumab sont de l'hypertension artérielle, des perforations gastriques, des migraines, des thromboses et/ou des saignements. Les perforations gastro-intestinales semblent être liées spécifiquement à l'administration du bevacizumab (Richardson et al. 2010).

Les traitements chimiothérapeutiques standards sont résumés dans le **Tableau 1**.

Traitement	Dose	Administration	Durée du cycle
Paclitaxel + Cisplatine + Paclitaxel	135 mg/m ² (jour 1) 75 – 100 mg/m ² (jour 2) 60 mg/m ² (jour 8)	IV IP IP	Toutes les 3 semaines 6 cycles
Paclitaxel + Carboplatine + Bevacizumab Ou Paclitaxel + Carboplatine + Bevacizumab	175 mg/m ² (jour 1) 6 AUC (jour 1) 7,5 mg/kg (jour 1) 175 mg/m ² (jour 1) 6 AUC (jour 1) 15 mg/kg (jour 1 cycle 2)	IV IV IV IV IV IV	Toutes les 3 semaines 5-6 cycles 3 cycles (bevacizumab) Toutes les 3 semaines 5-6 cycles Toutes les 3 semaines 13 cycles

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des protocoles de traitements chimiothérapeutiques standards des cancers ovariens.

Depuis l'introduction des agents chimiothérapeutiques dérivés du platine au début des années 80, les combinaisons de traitements précédemment cités ont grandement amélioré la survie des patientes atteintes de cancers ovariens. L'utilisation combinée de sels de platine et des taxanes a permis d'augmenter les taux de survie moyens de 24 à 38 mois. Cependant, en raison des effets secondaires liés au paclitaxel, tels que l'alopécie et la neurotoxicité, des essais cliniques ont été menés afin d'étudier l'efficacité de la combinaison du carboplatine et du docetaxel (carboplatine AUC 5 mg/mL/min – docetaxel 75 mg/m²) comparativement à la combinaison classique (carboplatine AUC 5 mg/mL/min – paclitaxel 175 mg/m²). Ces essais ont été réalisés sur des patientes atteintes de cancers ovariens aux stades IC - IV (Vasey et al. 2004). Bien que les deux traitements présentent les mêmes taux de survie sans progression de la maladie (PFS : progression free survival) et de survie globale (OS : Overall survival), l'utilisation de docetaxel induit une neurotoxicité moindre que le

III. Le verrou thérapeutique majeur de la récurrence des cancers ovariens

III.1. Les cancers ovariens ont une propension importante à récidiver

70 à 80 % des patientes répondent bien aux traitements initiaux. Cependant, plus de 80 % des patientes rechutent dans les 6 à 36 mois suivants. Les traitements de seconde ligne incluent une chirurgie cytoréductrice associée à la chimiothérapie. L'intervalle de rémission depuis le premier traitement dicte le choix de l'agent chimiothérapeutique. La sensibilité initiale au platine est le facteur prédictif des réponses aux traitements à venir (Davis, Tinker, and Friedlander 2014) (**Figure 28**). On distingue ainsi les cas :

- Réfractaires au platine : les patientes récidivent pendant la première chimiothérapie. La probabilité de réponse à un traitement par le CDDP est nulle. Les patientes sont alors traitées avec des monothérapies à base de paclitaxel ou de gemcitabine (analogue de nucléosides) (Ledermann and Kristeleit 2010). La survie globale (OS) des patientes réfractaires au CDDP est comprise entre 3 et 5 mois (Sjoquist et al. 2013).
- Résistants au platine : les patientes récidivent dans les 6 mois après l'administration de la première la chimiothérapie. La survie sans progression de la maladie (PFS) est de 3 mois en moyenne et l'OS est comprise entre 9 et 12 mois. La probabilité que ces cancers répondent à des traitements ultérieurs à base de CDDP est inférieure à 10 %.
- Sensibles ou partiellement sensibles au platine : les patientes récidivent entre 6 et 12 mois suivant la première chimiothérapie (partiellement sensibles) ou après 12 mois (sensibles). La PFS est comprise entre 9 et 12 mois et l'OS est comprise entre 24 et 36 mois en moyenne. La probabilité que ces cancers répondent aux traitements de seconde ligne à base de platine est comprise entre 30 et 50 % voir plus pour les cancers sensibles au platine. Les patientes sont alors traitées avec des chimiothérapies combinées à base de platine et paclitaxel ou gemcitabine.

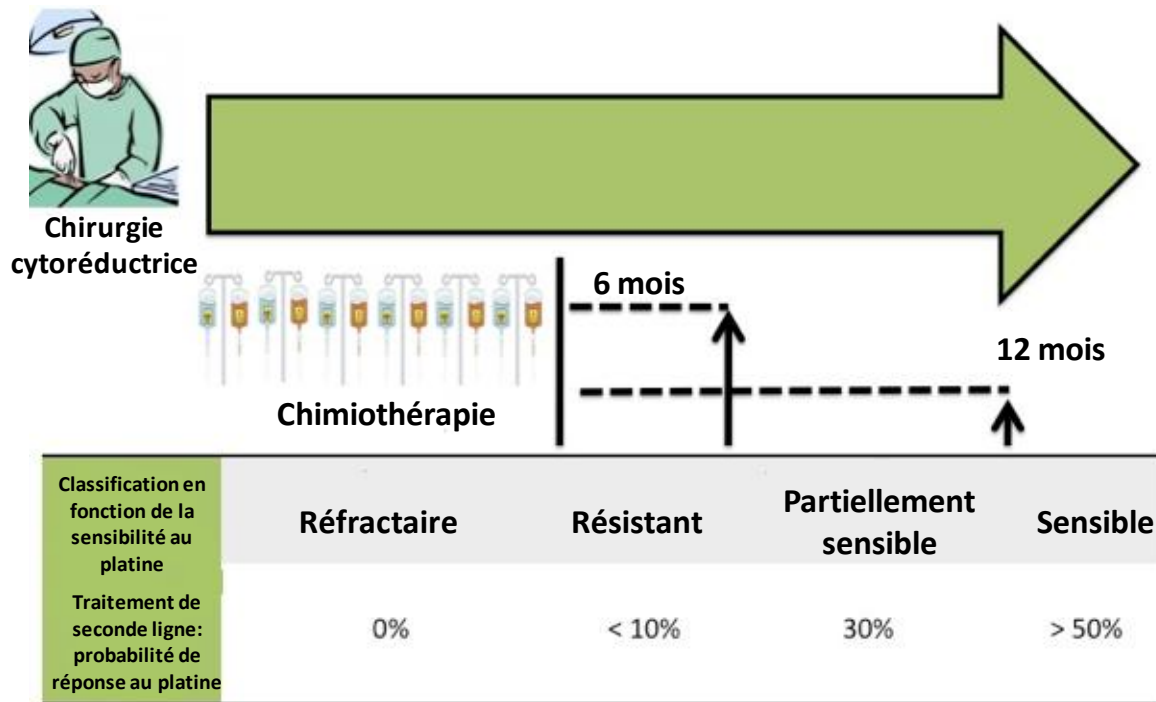


Figure 28: Classification des cancers ovariens récidivants en fonction de leur sensibilité au platine. Modifiée d'après (Tapia and Diaz-Padilla 2013).

Dans tous les cas, du bevacizumab est également administré aux patientes en complément (Aghajanian et al. 2012).

Les traitements de seconde ligne ont pour but d'améliorer la qualité de vie des patientes et d'augmenter la survie sans progression de la maladie. En absence de thérapies efficaces, la plupart des cancers ovariens récurrents sont incurables.

III.2. Les capacités adaptatives des cellules cancéreuses

Au cours du processus de récurrence, les cellules cancéreuses ovariennes acquièrent un phénotype adaptatif leur permettant de surpasser les mécanismes garants de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. L'adaptation phénotypique est d'ailleurs un processus commun aux cellules cancéreuses. Ces caractéristiques ont été recensées en 2000 et complétées en 2011 par D. Hanahan et R. Weinberg (Douglas Hanahan and Weinberg 2000; Douglas Hanahan and Weinberg 2011). Ces caractéristiques sont : (i) une autosuffisance en signaux prolifératifs (ii) une insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, (iii) une capacité à se répliquer indéfiniment, (iv) une instabilité génomique, (v) un potentiel d'induction angiogénique, (vi) une capacité à envahir les tissus et à former des métastases, (vii) une dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, (viii) une capacité à échapper au système immunitaire et à promouvoir un environnement inflammatoire et

(ix) une capacité à résister à la mort cellulaire. Cela constitue un obstacle majeur dans la prise en charge thérapeutique des cancers (**Figure 29**).

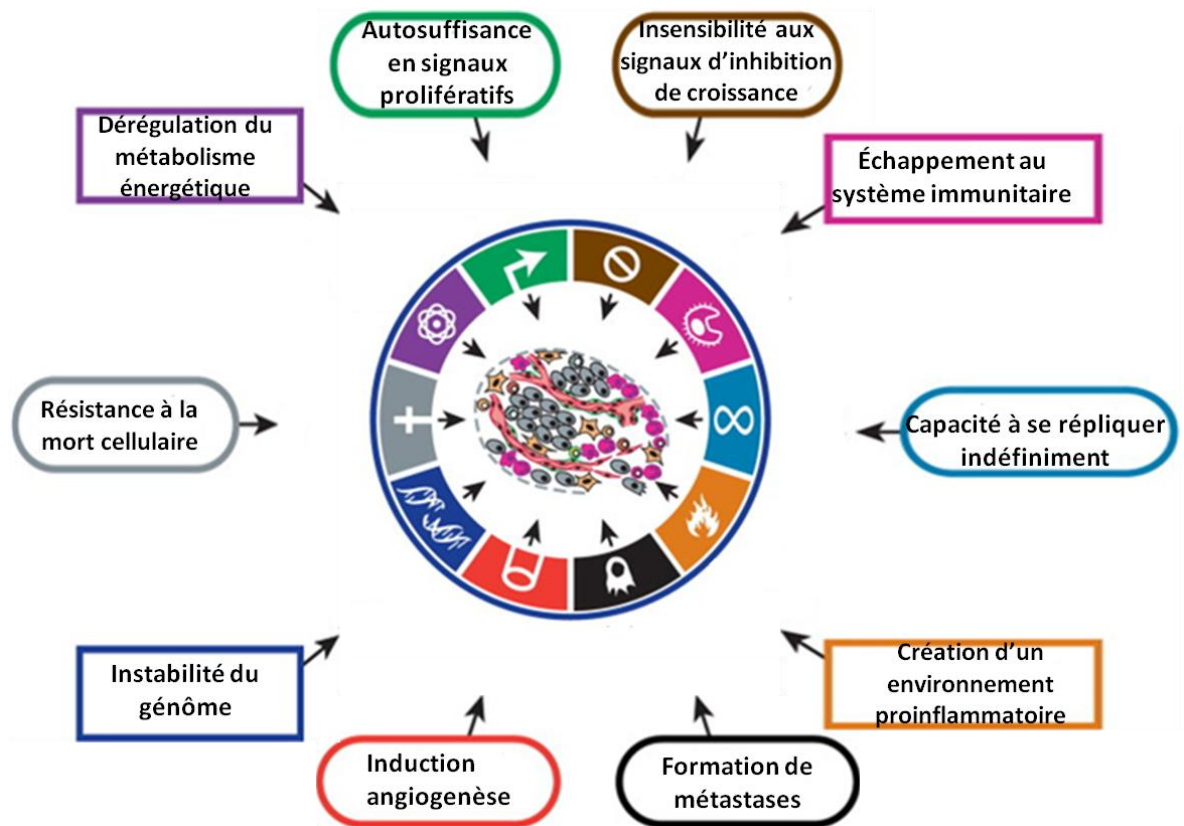


Figure 29: Caractéristiques des cellules cancéreuses. Modifiée d'après (Douglas Hanahan and Weinberg 2011).

III.2.1. Capacité des cellules à résister à la mort cellulaire : un enjeu dans le processus de propagation des cellules cancéreuses

Deux types principaux de mort cellulaire sont décrits. L'apoptose qui est un mécanisme de mort programmée, finement régulée et contrôlée génétiquement et la nécrose qui est généralement décrite comme une mort accidentelle (**Figure 30**).

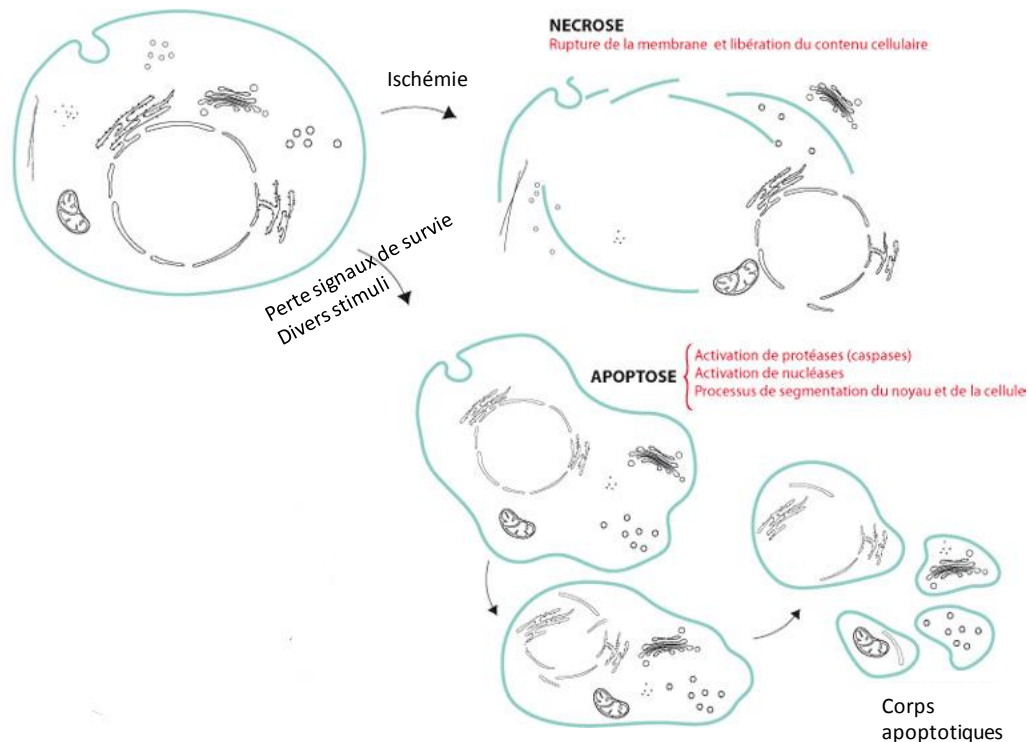


Figure 30: Différences entre l'apoptose et la nécrose. Modifiée d'après (www.afd-ld.org).

L'apoptose est déclenchée en réponse à l'interruption de signaux de survie, à une exposition à des facteurs de mort cellulaire ou à la suite de stress comme le stress oxydatif ou les radiations. Les cellules en apoptose se caractérisent par une morphologie arrondie, un volume cellulaire réduit, une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire et un bourgeonnement des membranes. Au niveau moléculaire, l'activation de protéases intracellulaires comme les caspases, le clivage de la chromatine par des endonucléases endogènes sont les principales caractéristiques des cellules apoptotiques.

Les caspases sont des cystéines protéases. On recense douze caspases chez l'Homme. Toutes sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs appelés pro-caspases. Les caspases initiatrices (-8 et -10) sont capables de s'auto-activer en réponse aux stimuli pro-apoptotiques. Elles activent ensuite les caspases effectrices (-3 -6 et -7). Ces dernières sont impliquées dans la protéolyse de différents substrats cellulaires tels que les lamines, les protéines du cytosquelette ou encore la protéine poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), contribuant ainsi au « démantèlement » de la cellule.

Il existe deux voies d'induction de l'apoptose : la voie extrinsèque (ou voie des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale). Ces deux voies convergent vers des effecteurs communs, notamment les caspases-3 (**Figure 31**).

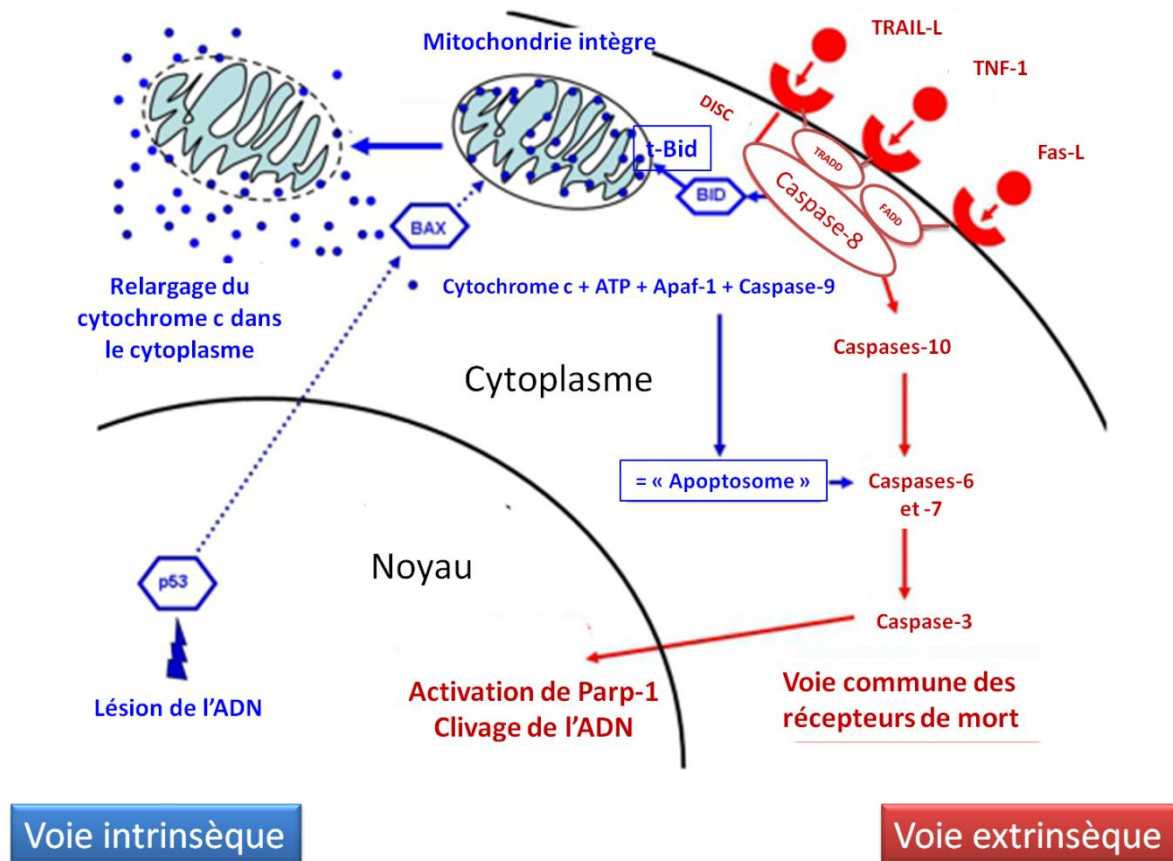


Figure 31: Induction de l'apoptose par les voies intrinsèque et extrinsèque. Les deux voies sont liées. La voie des récepteurs de mort peut initier l'activation de la voie mitochondriale via les caspases-8. Modifiée d'après (Blankenberg 2009).

Les récepteurs de mort cellulaire, enchâssés dans la membrane plasmique, appartiennent à la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor). Cette famille comprend entre autres les récepteurs Fas, TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-1) et TRAIL-1 et -2 (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand -1 -2). L'activation de ces récepteurs permet le recrutement de protéines cytosoliques adaptatrices telles que FADD (Fas Associated Death Domain) ou TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain). Ces dernières interagissent avec les caspases initiatrices -8 et -10 formant ainsi le complexe DISC (Death Inducing Signaling cComplex). L'auto-activation des caspases -8 et -10 au niveau du DISC initie l'activation des caspases effectrices -3 -6 et -7.

La voie mitochondriale est régulée par de nombreuses protéines de la famille Bcl-2. Cette famille regroupe des membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) et des membres pro-apoptotiques qui présentent soit plusieurs domaines BH (Bcl-2 homology domain) comme Bax et Bak, soit un seul domaine BH tels que Bid, Bad, Bim, Bik, Bmf, Noxa, Puma et Hrk (nommés « BH3-only »). Les protéines anti-apoptotiques sont généralement localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, tandis que les pro-apoptotiques sont souvent localisées dans le cytosol. Le ratio entre protéines pro- et anti-apoptotiques, ainsi que

leur oligomérisation conditionne l'évolution de la cellule vers la survie ou la mort par apoptose. En réponse à un stimulus apoptotique, les protéines Bax et Bak sont transloquées du cytosol vers la membrane mitochondriale externe où elles s'oligomérisent et forment des pores. Cela provoque la perméabilisation de la membrane mitochondriale, la perte du potentiel membranaire mitochondrial et la diffusion du cytochrome c vers le cytosol (préalablement localisé au niveau de la chaîne respiratoire dans la membrane interne des mitochondries). Le cytochrome c s'associe alors à la caspase-9 et à Apaf-1. Le complexe ainsi formé est appelé apoptosome et permet l'activation de la caspase-9. S'ensuit le recrutement et l'activation des caspases effectrices -3 et -7. De façon concomitante, des protéines apoptogènes comme Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 sont aussi relarguées hors de la mitochondrie. Dans le cytosol elles inactivent les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) inhibitrices des caspases effectrices (**Figure 32**).

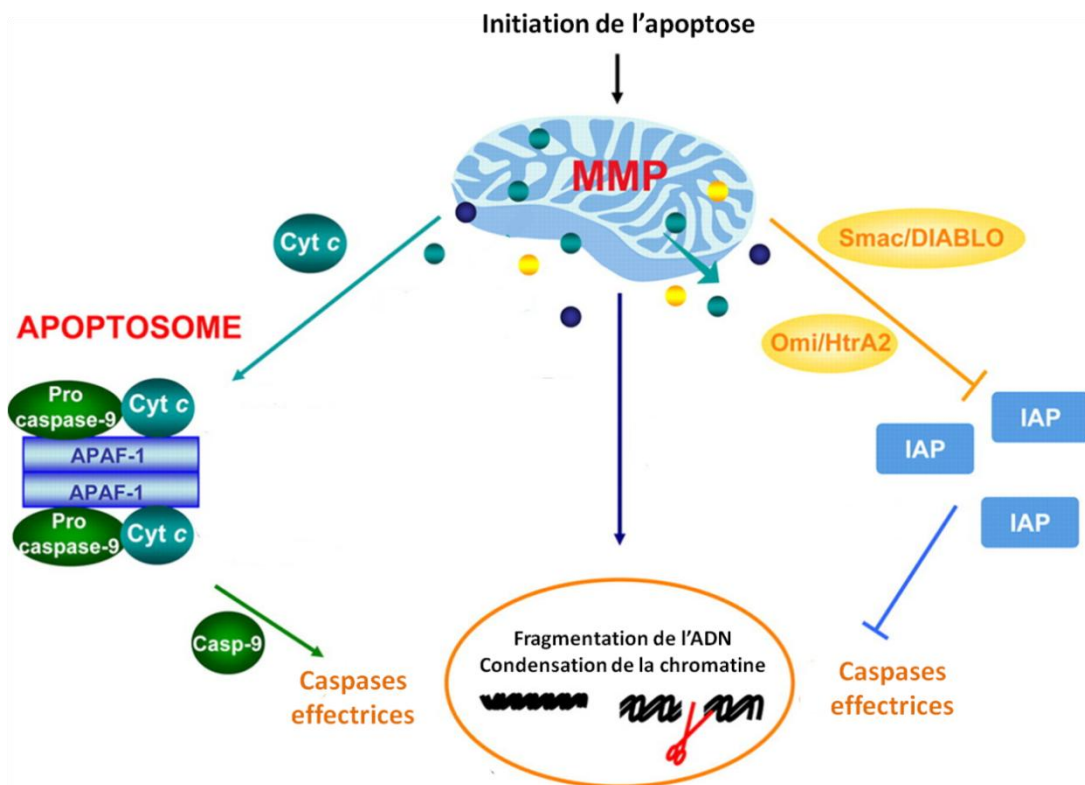


Figure 32: Voie mitochondriale (intrinsèque) de l'apoptose. L'activation de la voie intrinsèque induit le relarguage de différents facteurs apoptogènes dans le cytoplasme. L'activation des caspases fait suite à la formation de l'apoptosome. Elle est rendue possible par l'inactivation des inhibiteurs des caspases (IAP). Modifiée d'après (Kroemer, Galluzzi, and Brenner 2007).

Lorsque le processus de mort cellulaire par apoptose est déclenché spécifiquement par une perte d'ancrage des cellules à leur matrice extracellulaire environnante, celui-ci est nommé anoïkis (signifie en grec « sans-abri »). L'anoïkis peut-être médiée par la voie intrinsèque de l'apoptose ou, dans certains cas, par la voie extrinsèque. En effet, la perte d'adhérence à la matrice extracellulaire entraîne la suppression de l'inhibition des voies pro-apoptotiques (**Figure 33**).

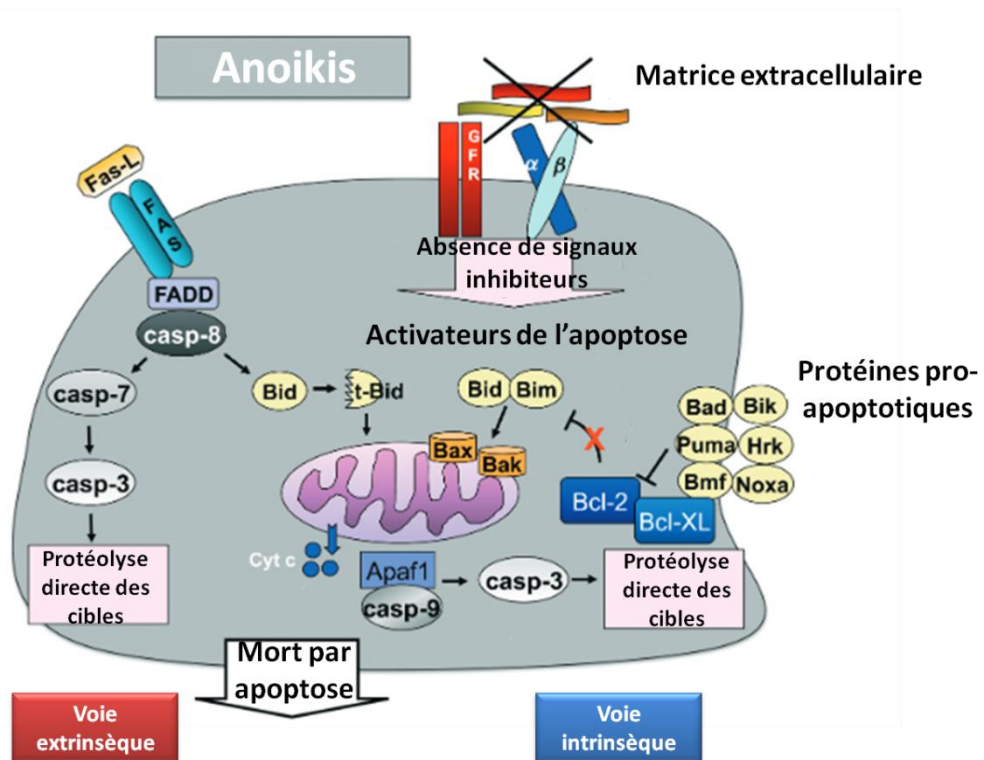


Figure 33: Activation de l'anoïkis. La perte d'ancrage à la matrice extracellulaire ou l'adhérence sur une matrice inappropriée induit l'interruption des signaux de survie intégrines-dépendante. Les deux voies peuvent contribuer à l'anoïkis indépendamment ou en coopérant. Modifiée d'après (Taddei et al. 2012).

Comme l'ont décrit D. Hanahan et R. Weinberg, les cellules cancéreuses ont une forte propension à résister à la mort cellulaire, notamment celle associée à l'activation des voies de survie PI3-Kinase/Akt et MAP-Kinase (Hanahan et Weinberg 2000 et 2011).

La PI3-Kinase (PhosphoInositide 3-Kinase) est une sérine thréonine kinase qui phosphoryle principalement des phospholipides et notamment des phosphatidylinositol phosphate (PIP). Une fois activée, elle permet la phosphorylation du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI2P) en phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PIP3) (Hemmings and Restuccia 2012). La sérine/thréonine kinase B (PKB/Akt) est alors recrutée à proximité de la membrane plasmique au niveau de PIP3 et activée par phosphorylation par PDK1 (Phosphatidylinositol 3-dépendant kinase 1). Une fois activée, la kinase Akt réprime l'expression de p53, un facteur de transcription activant l'apoptose. L'activation d'Akt aboutit également à une augmentation de l'expression de gènes codant des protéines anti-apoptotiques telles que Mcl-1, Bcl-2 ou Bcl-x_L. Enfin, elle peut également induire la phosphorylation de Bak, Bax et Bad, des protéines pro-apoptotiques, inhibant ainsi leur activation et donc l'apoptose. La phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homologue) exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activation d'Akt, notamment, en déphosphorylant PIP3. Dans la plupart des cancers, des altérations de la PI3-Kinase (mutation, surexpression du transcrit, surexpression de la protéine et/ou

augmentation de son activité) et une sous-expression de PTEN sont souvent observées (Vivanco and Sawyers 2002; Mitsiades, Mitsiades, and Koutsilieris 2004) .

Les MAP-Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase) sont des sérine/thréonine kinases qui s'activent en cascade (Plotnikov et al. 2011). Les MAP-Kinases activées phosphorylent une grande variété de substrats, dont des facteurs de transcription. Il en résulte des réponses cellulaires variées comme des modifications métaboliques, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore des mouvements cellulaires (Yang, Sharrocks, and Whitmarsh 2013). Plus particulièrement, Erk-1/-2 (Extracellular signal-Regulated Kinase-1/-2) contrôlent l'expression des gènes de la cycline D1 et de Cdk (jouent un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire). Les voies JNK (c-Jun-N-terminal Kinase) et p38 sont quant à elles principalement activées, en réponse aux stress environnementaux (hypoxie, perte d'ancrage à la matrice, environnement inflammatoire, stress métabolique). En fonction du contexte cellulaire et des cibles activées elles peuvent induire aussi bien la prolifération que la différenciation et l'apoptose. Des mutations des protéines impliquées dans les voies de signalisation des MAP-Kinases sont fréquemment observées dans les cancers (Dhillon et al. 2007).

De plus, il existe des interconnexions dynamiques et complexes entre les voies de signalisation PI3-Kinase Akt et MAP-Kinase qui peuvent concourir à maintenir et amplifier le phénotype de résistance à la mort cellulaire.

Enfin, les cellules cancéreuses subissent des modifications phénotypiques lors de transitions épithélio-mésenchymateuses (TEM). Les cellules de phénotype initial épithélial acquièrent alors des caractéristiques de cellules mésenchymateuses (pertes des jonctions cellulaires et acquisition d'un phénotype migratoire). Il a été observé une activation de la voie de signalisation PI3-Kinase/Akt et une surexpression des protéines de la famille Bcl-2 lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (An et al. 2015; Larue and Bellacosa 2005).

III.3. Chimiorésistance des cancers ovariens

La chimiorésistance est définie comme la capacité des cellules cancéreuses à survivre à l'effet cytotoxique des agents anticancéreux. Elle peut se manifester d'emblée, on parle alors de chimiorésistance intrinsèque. Dans d'autres cas, les traitements permettent d'obtenir une réponse partielle ou incomplète, puis deviennent inefficaces au cours du temps. On parle de chimiorésistance acquise. La perte de sensibilité des cellules cancéreuses ovariennes aux traitements à base de platine est l'une des complications majeures des cancers ovariens. L. Galluzi et ses collaborateurs ont classé en 4 catégories les mécanismes qui conduisent à l'apparition de cette chimiorésistance selon le

moment où ils interviennent dans la chaîne de réponse du CDDP (Galluzzi et al. 2012; Galluzzi et al. 2014) (**Figure 34**).

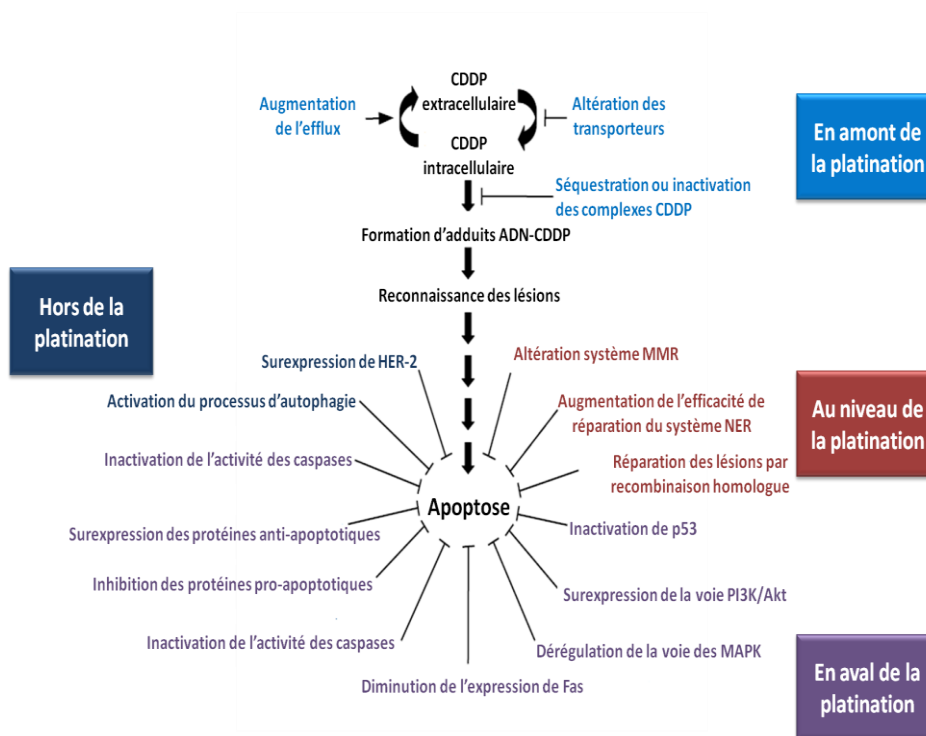


Figure 34: Mécanismes impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses contre le cisplatine. Modifiée d'après (Siddik 2003).

III.3.1. Les événements précédant l'interaction entre l'ADN et le CDDP (pre-target resistance)

Deux mécanismes favorisent l'inhibition de l'effet cytotoxique du CDDP avant son interaction avec l'ADN :

- une diminution de la concentration de CDDP intracellulaire suite à une inhibition de la diffusion facilitée par le transporteur de cuivre ou une augmentation de son efflux par des transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette). Par exemple, la surexpression d'ATP7A (un membre de la famille des protéines ABC) est associée à un mauvais pronostic (Samimi et al. 2003).
- et/ou une augmentation de la « séquestration » du CDDP par les thiols intracellulaires. Par exemple le glutathion (GSH) est capable de réagir avec le CDDP formant ainsi un complexe platine-GSH qui sera par la suite éliminé. Il a été montré que la γ -glutamylcystéine synthétase, enzyme responsable de la synthèse de GSH, est surexprimée dans les cancers ovariens (Li et al. 2009).

III.3.2. Les évènements directement liés aux lésions induites par les adduits sur l'ADN (on-target resistance)

La résistance des cellules cancéreuses au CDDP est directement liée à l'efficacité des systèmes de réparation des lésions de l'ADN et notamment du système de réparation NER (Nucleotide Excision Repair) qui est composé de 17 protéines dont ERCC1 (Excision Repair Cross Complementation group 1) et XPA (Xeroderma Pigmentosum protein A). Il a été montré que la surexpression de ERCC1 et XPA confère aux cellules une chimiorésistance (Selvakumaran et al. 2003). D'ailleurs le niveau d'expression de la protéine ERCC1 pourrait être corrélé avec la résistance aux sels de platine (Welsh et al. 2004). Le système MMR (Mismatch repair) reconnaît les adduits mais ne répare pas ce type de lésion. Une signalisation pro-apoptique est alors enclenchée. Des mutations inactivatrices ou une sous-expression de protéines appartenant au système MMR ont été détectées dans les cellules résistantes au CDDP (Gifford et al. 2004). Enfin des mécanismes de recombinaisons homologues peuvent contribuer à réparer les cassures dans la molécule d'ADN induite par le CDDP et ainsi favoriser l'acquisition d'une chimiorésistance (Sakai et al. 2008).

III.3.3. Les altérations des voies de signalisation activées en réponse aux lésions sur l'ADN et qui conduisent à l'apoptose (post-target resistance)

La persistance d'adduits non réparés sur l'ADN déclenche une signalisation conduisant à la mort cellulaire. La résistance « post-target » résulte d'altérations moléculaires de ces voies de signalisation. Pour exemple, le gène *tp53* est muté dans près de 95 % des cancers ovariens de type II. La protéine p53 est un facteur de transcription impliquée dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et de l'induction de l'apoptose. Les mutations inactivatrices de p53 sont associées à une diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques comme Bax. Dans ce cas, les cellules cancéreuses résistent davantage aux traitements à base de sels de platine (Perego et al. 1996; Brown et al. 1993) (**Figure 35**).

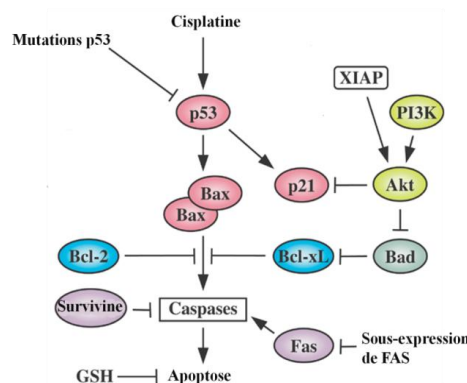


Figure 35: Régulation de la voie de signalisation p53 par les cellules cancéreuses résistantes aux CDDP. Modifiée d'après (Siddik 2003).

Par ailleurs, les protéines Erk-1/-2 sont surexprimées dans les cellules cancéreuses ovariennes résistantes au CDDP (Lee, Yoon, and Kim 2007), tandis que l'expression d'Akt protège les cellules du processus d'apoptose induit par le CDDP. En effet, La protéine Akt phosphoryle la protéine XIAP (membre de la famille des IAP, (Cf III.2.1 ; page 32) qui à son tour inhibe l'activation des caspases-3 (Asselin, Mills, and Tsang 2001). L'activation d'Akt induit également une diminution de l'expression de Fas (Ohta et al. 2006). D'autre part, le maintien de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L, en coopération avec Mcl-1, confère un phénotype résistant aux cellules cancéreuses ovariennes lorsqu'elles sont exposées au CDDP (Williams et al. 2005; Villedieu et al. 2007; Brotin et al. 2010). Enfin, il a été démontré que la survivine, une protéine inhibitrice des caspases, est surexprimée dans les cellules résistantes au CDDP (Ferrandina et al. 2005).

III.3.4. Les évènements liés aux mécanismes activés parallèlement à la platination de l'ADN (off-target resistance)

La sensibilité des cellules au CDDP peut-être contrecarrée par une amplification des voies de survie contribuant à une interruption du processus d'apoptose (Galluzzi et al. 2012). Ainsi, la protéine ErbB2 (ou HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2), fréquemment surexprimée dans les carcinomes ovariens, délivrerait des signaux de survie *via* la kinase Akt et induirait l'arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation des lésions de l'ADN (Hengstler et al. 1999).

III.4. Propension des cellules cancéreuses ovariennes à disséminer dans la cavité péritonéale

Outre, la chimiorésistance, la propension des cellules cancéreuses ovariennes à disséminer au sein de la cavité péritonéale concoure à la récurrence des cancers ovariens. Les cellules cancéreuses ovariennes migrent et colonisent, par extension directe, les organes avoisinants (trompes de Fallope, utérus). Les carcinomes ovariens présentent également un profil métastatique atypique et spécifique lié à une dissémination transcoelomique. Plus de 70 % des patientes présentent des métastases péritonéales dans les stades avancés de la maladie (Braicu et al. 2011). Ces métastases péritonéales contribuent à la morbidité associée aux carcinomes ovariens. La dissémination transcoelomique est souvent associée à l'accumulation de fluide dans la cavité péritonéale. Ces effusions malignes sont appelées ascites (Cf Partie II ; page 66). Elles provoquent une augmentation de la pression intra-abdominale, une distension des abdominaux, une sensation de satiété précoce qui conduit à des carences alimentaires, une circulation sanguine mais aussi lymphatique altérée et une gêne respiratoire consécutive à la compression du diaphragme.

Les cellules cancéreuses ovariennes peuvent s'exfolier du foyer primaire de façon isolée ou sous forme d'agrégats multicellulaires (AMC) et être transportées passivement au sein des fluides

péritonéaux et/ou des ascites vers le mésothélium péritonéal. L'épiploon (repli du péritoine) constitue le site métastatique privilégié des cellules cancéreuses ovariennes (Sehoul et al. 2009) (**Figure 36**).

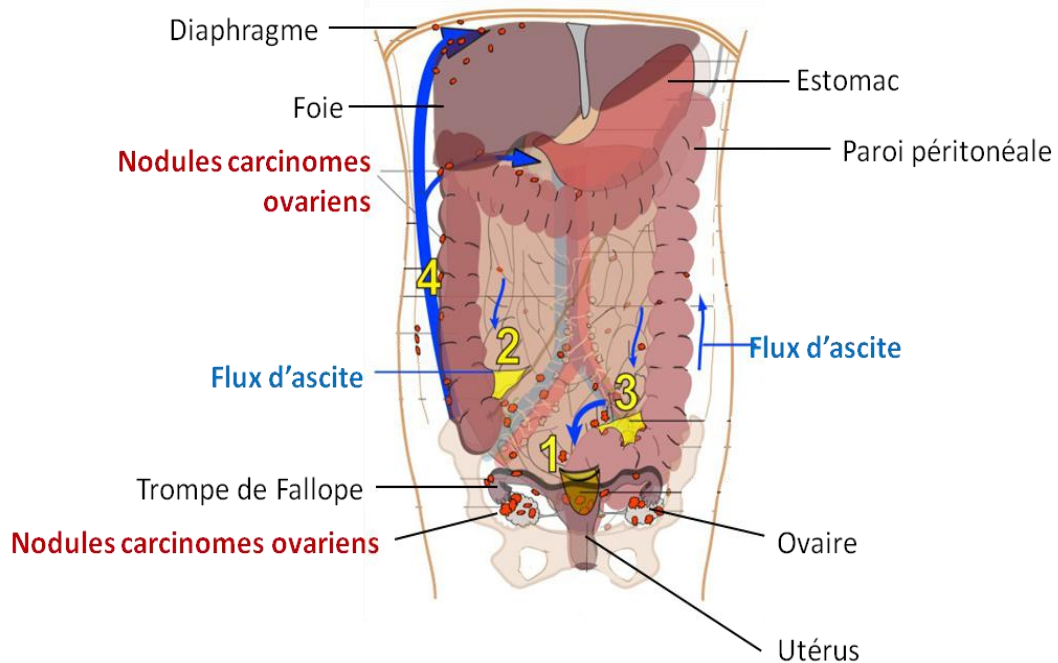


Figure 36: Dissémination des cellules cancéreuses ovariennes via les flux ascitiques. Les sites métastatiques préférés des cellules cancéreuses ovariennes sont numérotés de 1 à 4. Ils se situent au niveau des flux ascendants et descendants des fluides péritonéaux (flèches bleues). Les foyers tumoraux secondaires sont indiqués en rouge. Modifiée d'après (Rizvi et al. 2013).

La composition du microenvironnement péritonéal, notamment en termes de matrice extracellulaire, participe au tropisme des cellules cancéreuses (**Figure 37**).

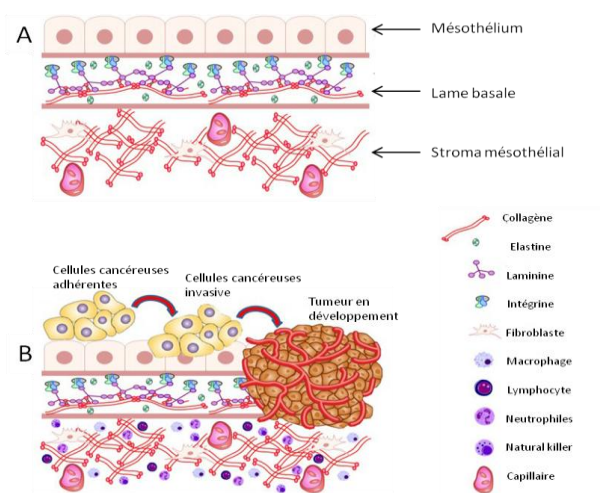


Figure 37: Représentation schématique de la création d'un foyer métastatique secondaire par les cellules cancéreuses ovariennes. (A) Structure de la paroi péritonéale, site privilégié des métastases ovariennes. (B) Amas de cellules cancéreuses ovariennes « adhérentes », envahissant et proliférant sur la paroi péritonéale après clairance du mésothélium. Modifiée d'après (Fuller and Howell 2014).

Une fois implantées, et suite à des processus d'angiogenèse et de lymphangiogenèse, les cellules cancéreuses ovariennes peuvent également se propager à travers les vaisseaux lymphatiques vers les ganglions ou emprunter la circulation sanguine pour coloniser des organes éloignés ; toutefois la dissémination hématogène reste plus rare (Eisenkop and Spirtos 2001) (**Figure 38**).

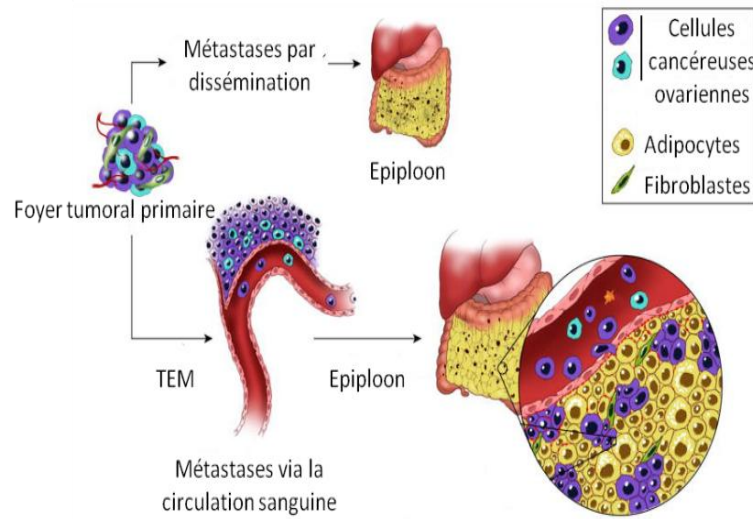


Figure 38: Modes de dissémination des cellules cancéreuses ovariennes du site primaire vers les sites secondaires. Les cellules cancéreuses peuvent disséminer dans la cavité péritonéale par diffusion passive ou en empruntant la circulation sanguine vers l'épiploon. Modifiée d'après (Pradeep et al. 2014).

Partie II

Rôle du microenvironnement sur la progression des cancers de l'ovaire

I. Généralités sur le microenvironnement

I.1. Biologie de la Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau dynamique de macromolécules enchevêtrées entre et autour des cellules. En plus de former une structure stable qui contribue aux propriétés mécaniques des tissus et à l'ancrage des cellules, la MEC régule les comportements cellulaires tels que la prolifération, l'adhérence, la migration, la différenciation ou la survie (Hynes 2009). En effet, les molécules qui la constituent interagissent avec les cellules *via* les récepteurs d'adhérence exprimés à la surface cellulaire. La matrice est, de plus, un réservoir de facteurs de croissance et de molécules bioactives. Les propriétés biophysiques telles que la rigidité ou la déformabilité de la matrice influencent également les fonctions cellulaires.

La MEC existe sous forme interstitielle, le stroma, ou sous forme plus fine et étroitement associée à la face inférieure des cellules, la lame basale (**Figure 39**).

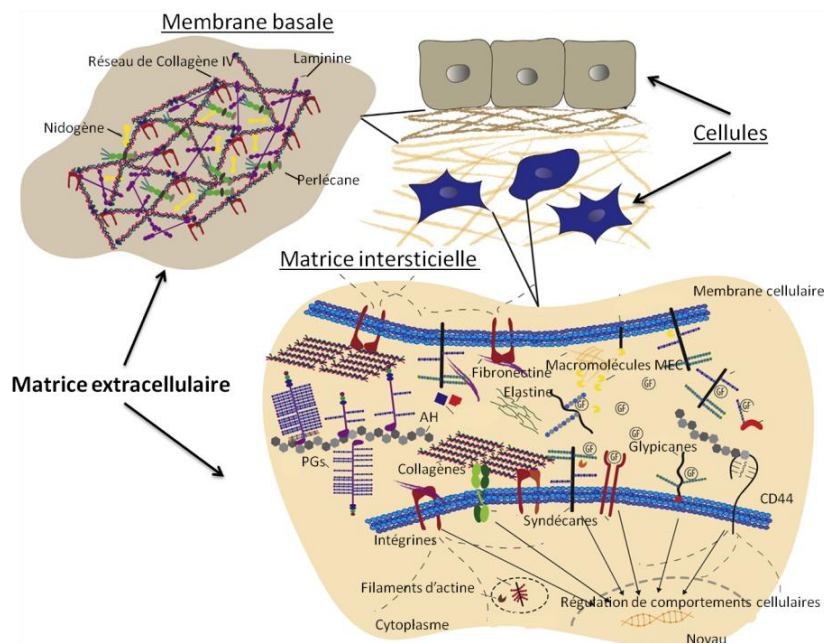


Figure 39: Représentation schématique des deux types principaux de matrice extracellulaire. Modifiée d'après (Theocharis et al. 2015).

La MEC stromale est abondante et riche en fibres de collagène et d'élastine. On y trouve de façon éparse des fibroblastes qui synthétisent cette matrice, des cellules inflammatoires et des vaisseaux sanguins. La lame basale est un feuillet d'une centaine de nanomètre d'épaisseur. Identifiée initialement au sein des tissus épithéliaux comme séparant les cellules épithéliales du tissu conjonctif sous-jacent, les membranes basales sont également présentes autour des axones et des

cellules musculaires. Les constituants majeurs des lames basales sont le collagène de type IV, la laminine, les protéoglycanes à héparane-sulfate et le nidogène.

I.1.1. Le matrisome

Selon leur localisation tissulaire, leur structure et leur composition moléculaire, les matrices extracellulaires sont uniques. Cependant, toute MEC est composée de protéines fibreuses, de glycoprotéines structurales et de polysaccharides. En raison de son caractère insoluble, l'étude de la MEC reste difficile. Toutefois, le séquençage complet du génome ainsi que l'accumulation de connaissances sur les molécules matricielles ont permis à A. Naba et ses collaborateurs de dresser une liste des composants du microenvironnement matriciel, regroupés sous le terme de matrisome (Naba et al. 2012). Leurs travaux, basés sur des études protéomiques, démontrent que le matrisome englobe deux catégories : les composants « core », constituants le cœur de la MEC et les molécules associées ou affiliées. Ils ont établi que le cœur du matrisome est constitué de près de 300 protéines, soit 1 à 1,5 % du protéome. Parmi elles, 43 sont des collagènes, 35 sont les cores protéiques des protéoglycanes et près de 200 sont des glycoprotéines. Les protéases, les glycosydases, les enzymes qui catalysent la formation des liaisons covalentes entre les macromolécules de la MEC, les facteurs de croissance et les cytokines sont quant à eux qualifiées de molécules associées à la MEC.

- ***Les collagènes***

Ce sont les protéines les plus abondantes de l'organisme. Les collagènes représentent près de 30 % de la masse totale de protéines du corps humain. Ils sont sécrétés principalement par les fibroblastes. Les collagènes partagent une structure commune composée de 3 chaînes polypeptidiques α . Les collagènes peuvent être homotrimériques avec 3 chaînes α identiques ($(\alpha 1)_3$) ou hétérotrimériques avec 2 ($(\alpha 1)_2\alpha 2$) ou 3 chaînes différentes ($\alpha 1\alpha 2\alpha 3$). Les chaînes α sont composées d'une séquence peptidique répétitive, $(\text{Gly-X-Y})_n$, où X et Y sont souvent une proline et une hydroxyproline respectivement. Cette séquence favorise la formation de triples hélices stables, caractéristiques des collagènes. A ce jour, 28 types de collagènes sont recensés selon leurs structures et fonctions. Ils sont classés en sept groupes en fonction des assemblages supramoléculaires qu'ils génèrent :

- Les collagènes formant des fibres (collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII): Ils ont pour caractéristique commune d'avoir un long segment ininterrompu en triple-hélice avec la séquence $(\text{Gly-X-Y})_n$ répétée sur toute la longueur. Le segment peptidique est flanqué de domaines globulaires non-collagène (NC) aux extrémités N- et C-terminales, éliminés par protéolyse. Les segments en triple hélice permettent

l'association latérale de plusieurs molécules de collagènes sous forme de fibrilles puis de fibres. Ces dernières sont les éléments structuraux majeurs des tissus conjonctifs (**Figure 40**).

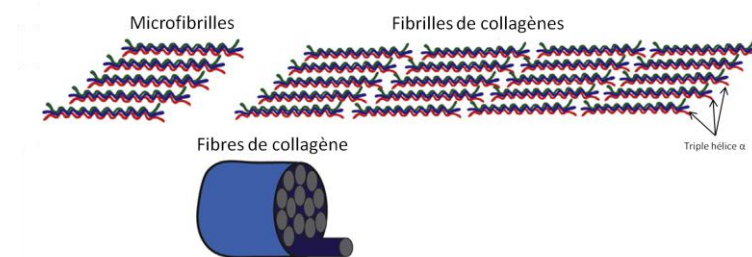


Figure 40: Assemblage des triples hélices α . Modifiée d'après (Theocharis et al. 2015)

- Les collagènes FACITs (Fibril-associated collagens with interrupted triple helices) (collagènes de type IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII) : Ces collagènes contiennent une alternance de domaines en triple hélice et de domaines NC, ce qui leur confère une certaine flexibilité. Ils ne s'associent pas en fibrilles mais participent à l'assemblage des collagènes fibrillaires entre eux ou avec d'autres molécules de la matrice (Eyre 2002) (**Figure 41**).

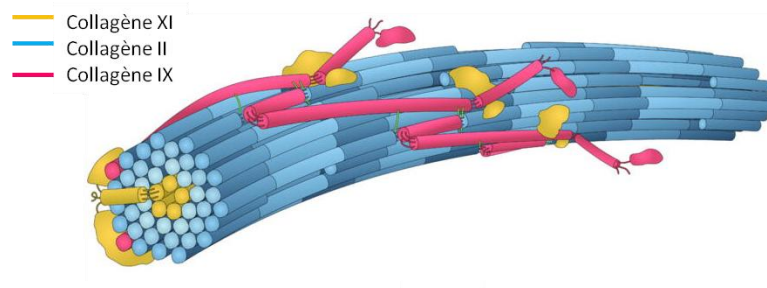


Figure 41: Fibrille de collagène hétérotypique composée des types II et XI. Le collagène de type IX appartient au groupe des FACITs. Il possède des domaines NC qui lui confèrent sa flexibilité. Il est associé à la surface des fibrilles. De (Eyre, Weis, and Wu 2008).

- Les collagènes formant des réseaux (collagènes de type IV, VIII et X) : Ces collagènes possèdent plusieurs interruptions dans la triple hélice. Outre leur flexibilité, ils s'associent entre eux et forment des réseaux. Ils peuvent également interagir avec d'autres macromolécules matricielles et créer des complexes multimoléculaires comme celui entre le collagène IV, la laminine et le nidogène dans les lames basales. Ces collagènes jouent notamment un rôle dans la filtration des molécules (**Figure 42**).

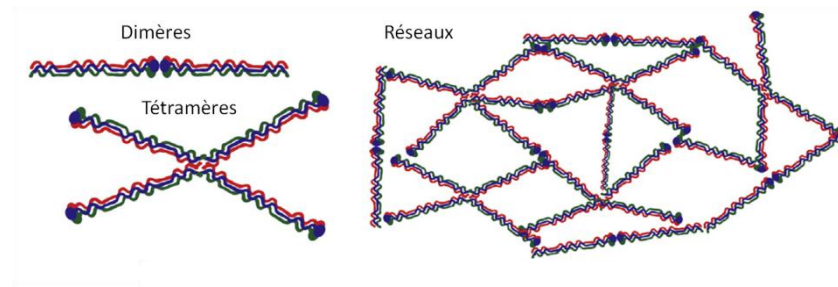


Figure 42: Assemblage des collagènes formant des réseaux. Modifiée d'après (Theocharis et al. 2015)

- Les collagènes MACITs (membrane-associated collagen with interrupted triple helices) (collagènes de type XIII, XVII, XXIII et XXV) : Ces collagènes sont transmembranaires avec un large domaine extracellulaire collagénique et un domaine intracellulaire court. Ils interviennent dans l'adhérence cellulaire (Franzke et al. 2003).
- Les fibrilles d'ancrage (collagène de type VII) : Ce collagène est formé d'un domaine central collagénique interrompu par un court domaine NC et flanqué de domaines NC aux extrémités N- et C-terminales. Deux molécules de collagène de type VII se dimérisent pour former des fibrilles d'ancrage permettant de connecter lame basale et stroma (Kadler et al. 2007).
- Les « filaments perlés » (collagènes de type VI, XXVI et XXVIII) : Ces collagènes forment des tétramères qui se connectent entre eux au niveau de leurs extrémités globulaires, formant ainsi des filaments perlés avec des billes de 25 nm alignées tous les 100 nm (Sato et al. 2002).
- Les multiplexines (collagènes de type XV et XVIII) : ces collagènes peuvent porter des chaînes de glycosaminoglycane et possèdent un domaine NC en C-terminal de type endostatine. La libération protéolytique de ce fragment contribue à réguler l'angiogenèse.
- **Les protéoglycane**

Les protéoglycane (PGs) sont constitués d'un cœur protéique (10 à 400 000 kDa) sur lequel sont greffées une ou plusieurs chaînes latérales de glycosaminoglycane (GAGs) sulfatées, identiques ou différentes. Les GAGs sont de longs polymères dont les poids moléculaires varient. En effet, ils sont constitués d'unités répétées de disaccharides, principalement composées d'hexosamines *N*-acétylés (*N*-acetylglucosamine ou *N*-acetylgalactosamine) et d'acide D-/L-hexuronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique). Les GAGs sont liés au core protéique *via* des résidus sérine.

On distingue différents PGs selon la nature des GAGs qui les composent. Les chondroïtine-sulfate (CSPG) sont constitués d'acide glucuronique et de *N*-acétyl-galactosamine et les dermatane-sulfate (DSPG) sont constitués d'acide L-iduronique et de *N*-acétyl-galactosamine. Les héparane-sulfate (HSPG) sont des répétitions de disaccharides de glucosamine, d'acide glucuronique et iduronique. Les kératane-sulfate (KSPG) sont constitués uniquement de D-galactose. En outre, on distingue également l'acide hyaluronique qui existe sous forme libre ou lié à un core protéique de façon non-covalente. Il est constitué de répétitions de disaccharides (acide D-glucuronique et *N*-acétyl-D-glucosamine) et n'est pas sulfaté (Afratis et al. 2012).

Les PGs diffèrent également dans leur localisation qui peut être extracellulaire, intracellulaire, transmembranaire ou péricellulaire. D'autre part, ils peuvent être ubiquitaires ou tissus-spécifiques (Iozzo and Schaefer 2015) (**Figure 43**).

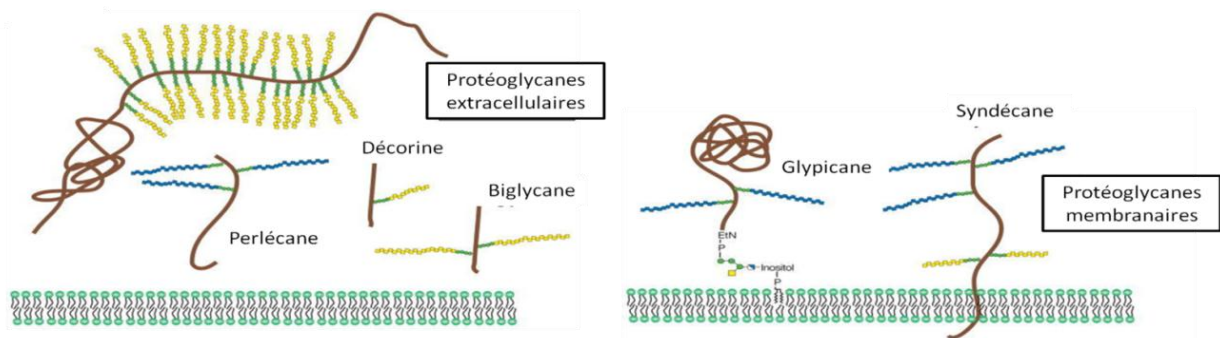


Figure 43: Diversité de structure et de localisation des protéoglycans. Les PGs sont des macromolécules composées d'un core protéique (marron) et d'une ou plusieurs chaînes GAG, chondroïtine, dermatane-sulfate (jaune) ou héparane-sulfate (bleu). Modifiée d'après (Esko, Kimata, and Lindahl 2009).

Enfin, la nature à la fois osidique et protéique des PGs leur permet d'interagir avec de nombreux constituants de la MEC ou des composants cellulaires. Ainsi, les PGs assurent des fonctions structurales et fonctionnelles au sein des tissus. Pour exemple, les PGs transmembranaires peuvent être des co-récepteurs des intégrines ou des récepteurs à activité tyrosine-kinase retrouvés à la surface des cellules et contribuer à ce titre à la signalisation cellulaire. En outre, les PGs sont très hydrophiles. Ils séquestrent des molécules d'eau et des cations divalents, ce qui favorise l'hydratation des tissus. Enfin, ils interagissent avec des facteurs de croissance, cytokines, chimiokines et des morphogènes, jouant ainsi un rôle de réservoir de molécules « bioactives » au sein des tissus.

- **Les glycoprotéines adhésives**

En plus des collagènes et des PGs qui influencent l'architecture et l'hydratation de la MEC, le matrisome compte près de 200 glycoprotéines. Elles interviennent dans les interactions entre les macromolécules matricielles, dans l'adhérence des cellules et dans la signalisation cellulaire. Les

glycoprotéines sont capables de fixer des facteurs de croissance pour moduler leur biodisponibilité. Elles peuvent être insolubles incorporées dans les matrices ou circulantes. Les laminines font partie des glycoprotéines adhésives les plus étudiées. Elles sont les composants majoritaires des lames basales, où elles forment un réseau par auto-assemblage. Parmi les glycoprotéines circulantes on retrouve principalement celles intervenant dans l'hémostase comme le facteur de Von Willebrand ou le fibrinogène. Enfin des glycoprotéines comme la fibronectine ou la vitronectine peuvent être retrouvées à la fois sous une forme soluble dans les liquides biologiques tel que le plasma ou incorporées dans les matrices extracellulaires (Hynes 2009).

I.1.2. La fibronectine

La fibronectine (Fn), du latin *fibro-* fibre, *necto-* adhérer, est une glycoprotéine dimérique ubiquitaire de 500 kDa environ. Elle est issue d'un gène unique, *fn1*, dont l'épissage alternatif génère 20 isoformes différentes qui ont des rôles et des localisations différents (Schwarzbauer 1991). La (les) fibronectine(s) est (sont) composée(s) de deux sous-unités homologues, d'un poids moléculaire compris entre 230 et 270 kDa. Elles sont reliées entre-elles à l'extrémité C-terminale par des ponts disulfures (Hynes 1990). Chacun des monomères de fibronectine est constitué par une succession de domaines protéiques particuliers : 12 modules de type I, 2 modules de type II et 15 à 17 modules de type III (Hynes and Yamada 1982). Les domaines EDA (Extradomaine de type A), EDB (Extradomaine de type B) et IIICS ou V (type III connecting segment) sont les sites d'épissages alternatifs (**Figure 44**).

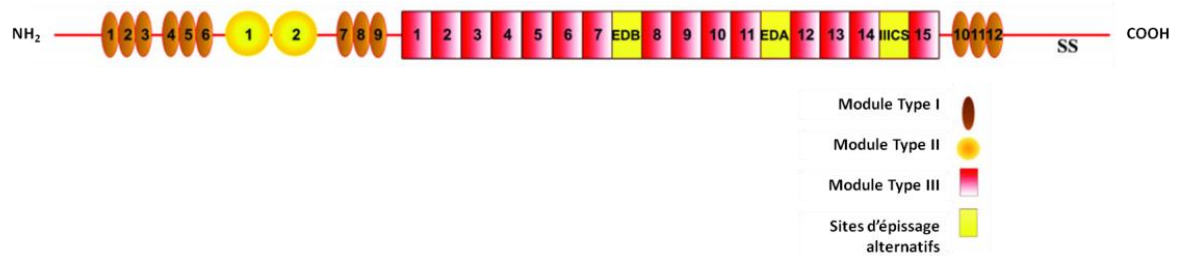


Figure 44: Structure d'un monomère de fibronectine. Les sous-unités de fibronectine sont composées de modules de type I (ovale marron), de type II (rond jaune) et de type III (carré rose). EDA, EDB et IIICS sont les sites d'épissages alternatifs (carrés jaunes). Modifiée d'après (To and Midwood 2011).

La succession de plusieurs modules définit des régions fonctionnelles permettant notamment l'interaction de la fibronectine avec de nombreux partenaires moléculaires et cellulaires.

Parmi ces domaines fonctionnels on retrouve notamment, le domaine situé à l'extrémité N-terminale (Fn I₁₋₉) qui confère à la molécule de fibronectine une affinité pour divers ligands matriciels tels que le collagène, l'héparine ou encore la fibrine. Le domaine de liaison central (Fn III₁₋₁₂) contient notamment les sites de reconnaissance par les récepteurs d'adhérence de type

intégrines, en particulier la séquence RGD. Enfin, on trouve un domaine de liaison aux chaînes de GAGs des protéoglycanes (Fn III₁₂₋₁₄) situé à l'extrémité C-terminale (Pankov 2002) (**Figure 45**).

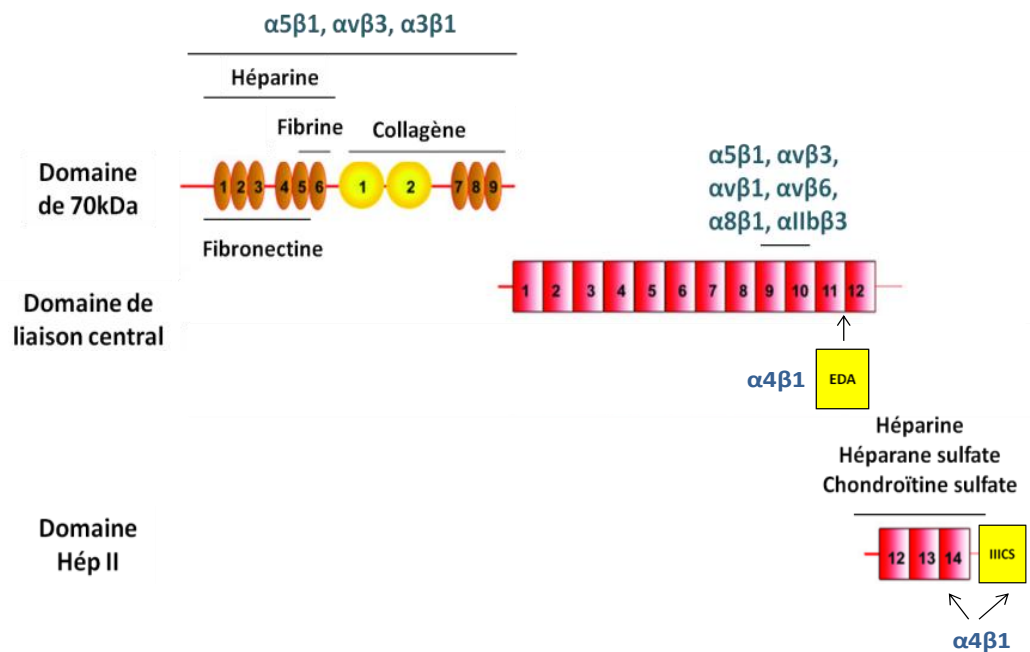


Figure 45: Domaines fonctionnels de la fibronectine et sites de liaison des molécules matricielles et des récepteurs cellulaires. Modifiée d'après (To and Midwood 2011).

La fibronectine est soumise à des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation sur les résidus sérines/thréonines et sulfatation sur les résidus tyrosine. La fibronectine est aussi *N*-et/ou *O*-glycosylée. Les glycosylations représentent jusqu'à 5 % de son poids moléculaire (Poulouin 2002). Les profils de glycosylation de la fibronectine sont différents en fonction du stade de développement et/ou des conditions physiopathologiques. A titre d'exemple, l'expression de la fibronectine *O*-glycosylée est détectée dans les tissus tumoraux adultes en association avec les transitions épithélio-mésenchymateuses (Freire-de-Lima et al. 2011).

La fibronectine est synthétisée et sécrétée dans le plasma par les hépatocytes à la concentration de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cette fibronectine plasmatique (Fn_p) ne contient pas les domaines EDA et EDB. Elle est également retrouvée dans les fluides biologiques tels que les urines ou encore le liquide amniotique. La fibronectine peut également être retrouvée dans des fluides pathologiques comme l'ascite (Fn ascitique ou Fn_{asc}) (Carduner et al. 2013). La fibronectine « déposée » en fibrilles insolubles dans les matrices extracellulaires (Fn cellulaire ou Fn_c) est synthétisée par différents types cellulaires, notamment, les fibroblastes, les chondrocytes ou les cellules endothéliales. La Fn_c contient les domaines EDA et EDB dans des proportions variables, ainsi que le IIICS (Tressel et al. 1991). F. Moretti et ses collaborateurs ont démontré que la Fn_p peut diffuser dans les tissus et être incorporée dans la matrice extracellulaire sous forme fibrillaire (Moretti et al. 2007).

Dans les matrices extracellulaires, la fibronectine forme un réseau dense de fibres interconnectées entre elles de quelques nanomètres à quelques micromètres de diamètre et quelques micromètres de longueur. Ces fibres correspondraient à l'assemblage de plusieurs dizaines/centaines de molécules de fibronectine. Ce processus d'assemblage, ou fibrillogenèse, se déroule en plusieurs étapes et est dépendant de l'interaction fibronectine-cellules. Les principaux récepteurs cellulaires de la fibronectine, les intégrines $\alpha 5\beta 1$, reconnaissent spécifiquement la séquence RGD présente dans le module Fn III₁₀ (Sottile and Wiley 1994). La liaison de la fibronectine avec les intégrines induit un phénomène de regroupement des intégrines $\alpha 5\beta 1$, ce qui génère une augmentation de la concentration locale en fibronectine. Cela facilite les interactions fibronectine-fibronectine. La partie cytoplasmique des intégrines interagit avec les filaments d'actine qui exercent des forces de tension et induisent une translocation des intégrines de la périphérie vers le centre des cellules. Cela permet le dépliement des molécules de fibronectine et l'exposition des sites d'auto-assemblage cryptiques, préalablement enfouis, aboutissant ainsi à la formation de fibrilles (Wierzbicka-Patynowski and Schwarzbauer 2003) (**Figure 46**).

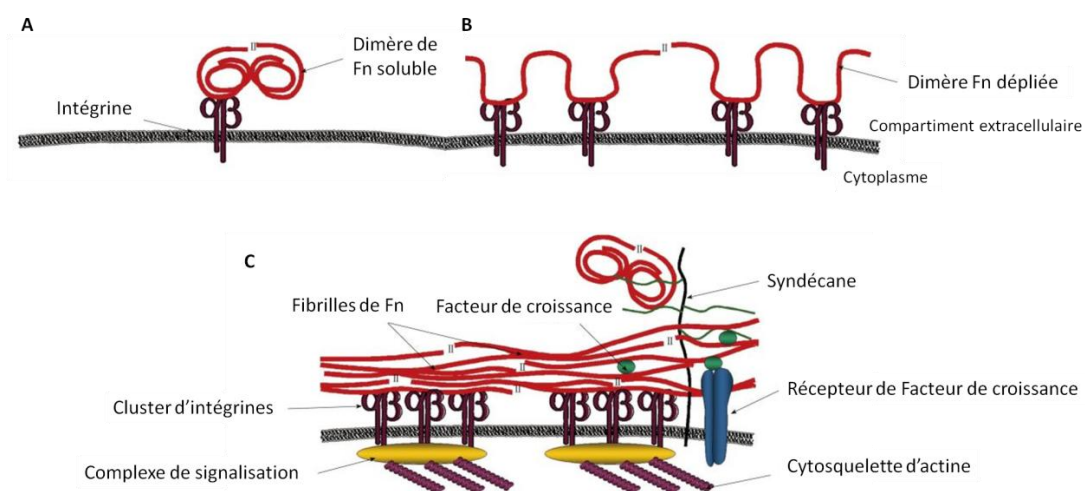


Figure 46: Processus de fibrillogenèse de la fibronectine. (A). La fibrillogenèse est initiée dès lors que les dimères de Fn solubles interagissent avec des récepteurs d'adhérence, généralement des intégrines. (B) Les dimères de Fn dépliés interagissent avec d'autres récepteurs et les dimères de Fn à proximité s'auto-assemblent. (C) Les récepteurs se regroupent en cluster et forment des complexes de signalisation qui induisent la réorganisation du cytosquelette d'actine. Cela provoque des forces de tension. A terme, les molécules de Fn sont très étirées et leurs sites cryptiques rendus accessibles leur permettent d'interagir avec d'autres types de molécules matricielles. Les PGs transmembranaires recrutent des molécules de Fn plus éloignées vers la périphérie des cellules. Modifiée d'après (Aziz-Seible and Casey 2011).

Au sein des matrices extracellulaires, la fibronectine régule la stabilité et l'architecture matricielle *via* sa capacité à interagir avec de multiples molécules matricielles. Elle favorise également le dépôt et l'assemblage de diverses macromolécules dans la matrice extracellulaire, comme par exemple la tenascine (Sottile and Hocking 2002). De plus, les fibrilles de fibronectine constituent un support structural pour l'adhérence des cellules et les interactions consécutives qui s'établissent induisent la transduction de signaux. La fibronectine régule les comportements cellulaires tels que la survie, la

prolifération, la différenciation ou encore la migration cellulaire (Scott et al. 2015). Ainsi, la fibronectine contribue à différents processus physiologiques comme l'embryogenèse, la coagulation, la cicatrisation, ou pathologiques comme les fibroses ou le développement tumoral. Enfin la fibronectine interagit avec des cytokines comme le TGF- β , modulant ainsi leur biodisponibilité (Fontana et al. 2005).

I.1.3. La vitronectine

Le nom vitronectine (Vn) dérive du latin *vitro-* verre, *necto-* adhérer. En effet, lors de sa découverte, la vitronectine a été décrite comme une protéine adhésive favorisant l'attachement et l'étalement des cellules primaires sur des supports en verre (Holmes 1967). La vitronectine est une glycoprotéine synthétisée par les hépatocytes et sécrétée dans le plasma (Vn plasmatique ou Vn_p) à une concentration d'environ 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Izumi, Yamada, and Hayashi 1989). On la retrouve également dans d'autres fluides corporels et sous une forme insoluble dans les matrices extracellulaires, sécrétées par d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales ou encore les cellules cancéreuses ovariennes (Seiffert 1997; Carreiras et al. 1999a).

La vitronectine est une glycoprotéine de 75 kDa multifonctionnelle. Plusieurs ponts disulfures, localisés au niveau des domaines N- et C-terminaux stabilisent la protéine. Le pont disulfure entre les résidus cystéines 274 et 453 relie les deux fragments endogènes de 10 et 65 kDa : Vn-10 et Vn-65, respectivement. Dans le plasma, la vitronectine peut être retrouvée sous la forme d'une seule chaîne de 75 kDa ou deux chaînes de 65 et 10 kDa.

Elle contient au moins deux sites de sulfatation, de multiples sites de phosphorylations et trois sites de glycosylation. La portion de carbohydrates représente environ 30 % de la masse moléculaire totale de la glycoprotéine.

La vitronectine est composée de plusieurs domaines fonctionnels. Le domaine somatomédine-B (SMB) à l'extrémité N-terminale est le site d'interaction entre la vitronectine avec d'une part, le récepteur de l'urokinase (uPAR) et d'autre part l'inhibiteur de l'urokinase PAI-1 (Seiffert 1997). A proximité du domaine SMB, on trouve la séquence RGD reconnue par les récepteurs cellulaires de type intégrine. Les principaux récepteurs de la vitronectine sont les intégrines de la famille αv , particulièrement l'intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$. Toutefois, elle est également reconnue par les intégrines $\alpha\text{v}\beta 1$, $\alpha\text{v}\beta 5$, $\alpha\text{v}\beta 6$, $\alpha\text{v}\beta 8$ et $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Felding-Habermann and Cheresh 1993). Le domaine central, chargé négativement et contenant des répétitions du motif hémopexine-like interagit avec le complexe thrombine-antithrombine III. Enfin le domaine C-terminal chargé positivement contenant également des motifs hémopexine-like est le site de liaison à l'héparine. Il est également impliqué dans les

interactions entre la vitronectine et le collagène, les GAGs, le plasminogène et des composants du système du complément (Milis et al. 1993). Des interactions ioniques s'établissent entre le domaine central et le domaine de liaison à l'héparine et confèrent à la vitronectine sa structure tridimensionnelle (**Figure 47**).

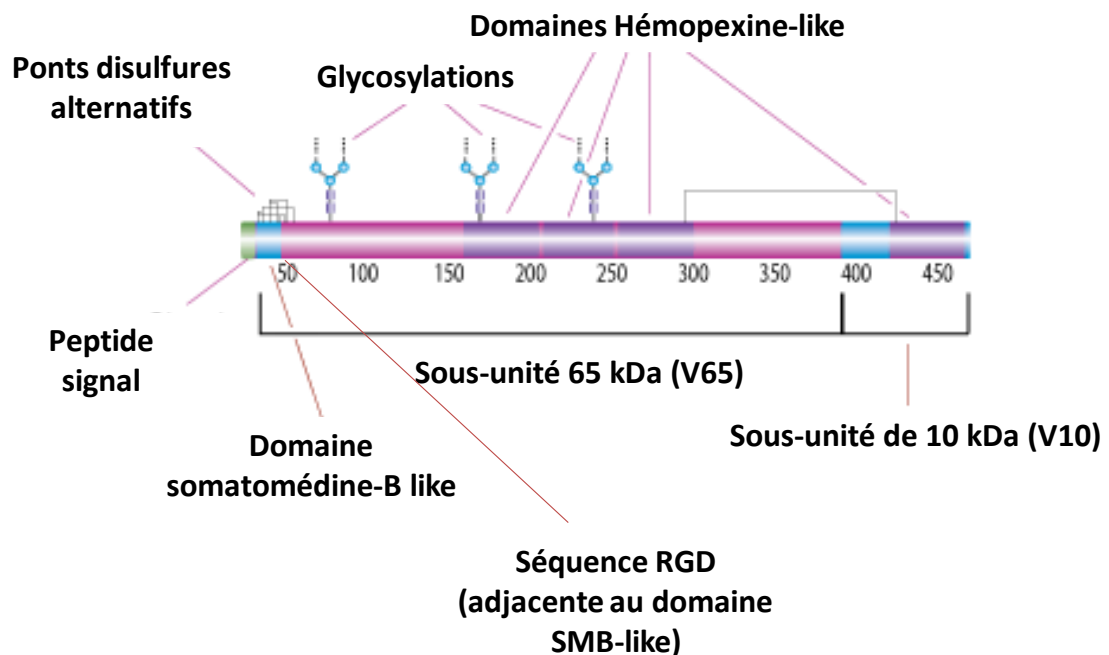


Figure 47: Structure de la vitronectine. Modifiée d'après (<http://www.sigmaaldrich.com>).

Dans le plasma, la Vn_p est retrouvée sous forme de monomères compacts et solubles. Sous cette conformation le domaine de liaison à l'héparine et la séquence RGD sont masqués (conformation native). En conséquence, elle présente peu d'affinité avec d'autres molécules ou avec les cellules. Quand elle est incorporée dans la matrice extracellulaire, les sites masqués sont exposés. Dans cette conformation « dénaturée », la vitronectine forme des multimères et est insoluble (Stockmann et al. 1993). Les deux conformations de la vitronectine ont des activités biologiques distinctes (Preissner 1991).

La vitronectine est une protéine « matricellulaire », c'est-à-dire qu'elle module les interactions entre d'autres protéines matricielles et les récepteurs cellulaires et que ses fonctions propres sont dépendantes des liaisons qu'elle établit avec ces diverses molécules (Murphy-Ullrich and Sage 2014). En effet, ces interactions induisent des changements conformationnels de la vitronectine et l'assemblage de complexes hétérogènes multimoléculaires (Stockmann et al. 1993). Ainsi, la vitronectine joue un rôle dans l'adhérence, l'étalement et la migration des cellules (Cherny, Honan, and Thiagarajan 1993; Huang et al. 1998). Elle régule la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire en interagissant avec des composants du système uPA/uPAR (urokinase Plasminogen

Activator/urokinase Plasminogen Activator Receptor). Enfin, elle interagit avec les éléments du complément. A ce titre, la vitronectine a un rôle pléiotrope dans différents processus physiologiques et pathologiques. Elle est notamment impliquée dans les processus hémostatique et immunitaire. En réponse à une blessure, la vitronectine contribue à la formation du thrombus (Reheman et al. 2005). Elle stabilise l'occlusion des vaisseaux altérés, intervient dans la réponse inflammatoire et dans la réponse immunitaire (Sheehan et al. 1995; Podor et al. 2002) (**Figure 48**).

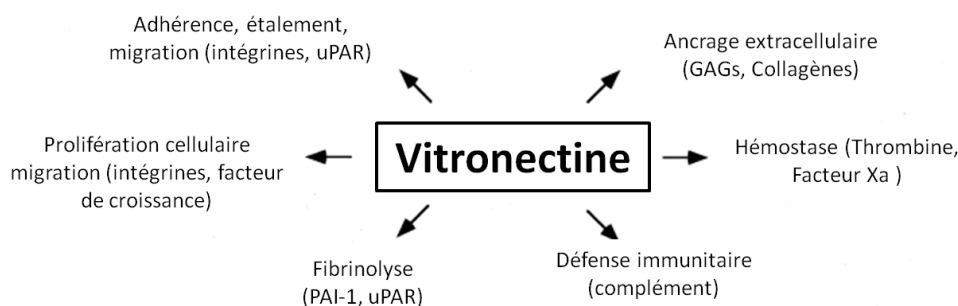


Figure 48: Fonctions biologiques majeures de la vitronectine. La vitronectine est une glycoprotéine matricielle dont les fonctions sont dépendantes des interactions effectuées avec d'autres molécules. Modifiée d'après (Schvartz, Seger, and Shaltiel 1999).

I.1.4. La dynamique de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un compartiment dynamique. Sa composition et son organisation sont modifiées en permanence dans le temps et dans l'espace. En effet, les molécules matricielles sont régulièrement synthétisées, « déposées » et incorporées dans les réseaux matriciels. Leurs conformations peuvent être modifiées et elles peuvent être dégradées par des protéases et des glycosidases.

La production et le dépôt des molécules matricielles sont des processus cellulaires contrôlés qui se font en réponse à divers signaux tels que les facteurs de croissance. En retour, le dépôt de ses molécules dans les réseaux matriciels contribue au déroulement de processus physio-pathologiques. Par exemple, la production transitoire de fibronectine est observée lors du développement embryonnaire et de l'angiogenèse (Kostourou and Papalazarou 2014). Au contraire, une accumulation fibrillaire anormale de collagène IV a notamment été observée dans différents types de tumeurs (Ji et al. 2013).

Les molécules matricielles possèdent des sites d'interaction avec de nombreux partenaires (autres protéines de la matrice extracellulaire, récepteurs cellulaires de type intégrines...) ou des domaines possédant une activité biologique propre. Ces régions bioactives peuvent être enfouies et masquées dans la conformation native des molécules. Des modifications conformationnelles, des

interactions avec d'autres partenaires ou la protéolyse des molécules matricielles entraînent l'exposition de ces sites cryptiques. Ainsi exposés, ils présentent une activité biologique différente de la molécule native. Pour exemple, l'anastelline est un fragment issu de la fibronectine, présentant une activité anti-angiogénique (Neskey et al. 2008). D'autre part, la dégradation protéolytique de constituants matriciels peut libérer des facteurs de croissance préalablement piégés.

Le remodelage matriciel est contrôlé, d'une part, par des enzymes liantes, comme la lysyl-oxydase et la transglutaminase, qui créent des pontages covalents rigidifiant la MEC, et d'autre part, par des enzymes dégradantes, dont les protéases. Ces enzymes sont nombreuses et ont des modes d'action variés. On peut notamment citer, les MMPs (Matrix Metalloproteinases). Ce sont des endoprotéases zinc-dépendantes. Cette famille est composée de 23 membres. Bien que la plupart des MMPs sont sécrétées, certaines sont transmembranaires et sont appelées MT-MMPs (MMP-14, -15, -17, -23, -24 et -25). Les MMPs sont sécrétées sous forme de précurseurs inactifs. Une fois que le pro-domaine auto-inhibiteur masquant le site catalytique est clivé, les MMPs sont sous forme active (Page-McCaw, Ewald, and Werb 2007) (**Figure 49**).

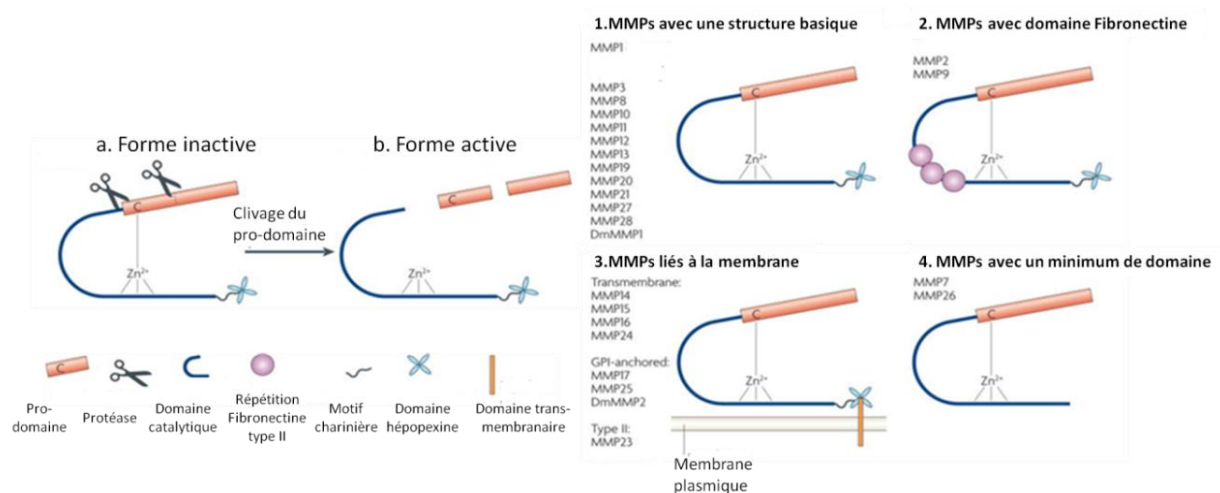


Figure 49: Structure des MMPs. a. Les métalloprotéases matricielles sont exprimées sous formes inactives (pro-MMPs). b. la forme active résulte de clivages successifs du pro-domaine des MMPs. (1). La plupart des MMPs ont une structure commune conservée au cours de l'évolution : un pro-domaine, un domaine catalytique, un motif charnière et un domaine hémapexine. (2). Les MMP-2 et MMP-9 possèdent trois répétitions de type Fn II dans leur domaine catalytique. (3). Les MT-MMPs sont liées à la membrane plasmique soit par un domaine transmembranaire soit par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) attachée au domaine hémapexine. (4). Les MMPs avec une structure minimale ne possèdent pas de motif flexible et de domaine hémapexine. Modifiée d'après (Page-McCaw, Ewald, and Werb 2007).

Les MMPs dégradent la plupart des molécules de la matrice. Leur activité est régulée par des inhibiteurs tissulaires de MMPs (TIMPs : Tissue Inhibitor of Metalloproteinase). Chaque MMP peut avoir un spectre de substrats restreint ou au contraire très large. Elles peuvent coopérer entre elles pour dégrader une molécule matricielle ou pour s'activer mutuellement. Certains facteurs de

croissance et leurs récepteurs peuvent également être la cible des MMPs. L'ensemble de ces éléments confère aux MMPs des rôles pléiotropes.

D'autres familles d'enzymes peuvent également dégrader les molécules matricielles comme les cathepsines, les sérines-protéases de type uPA (urokinase Plasminogen Activator), les ADAMs (a Disintegrin and metalloproteinase) et les ADAMTs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs), ou encore les sulfatases et hyaluronidases qui ciblent plus particulièrement les protéoglycanes et l'acide hyaluronique.

I.2. Interactions cellules-matrice extracellulaire

L'adhérence des cellules sur la MEC nécessite la présence de récepteurs cellulaires exprimés à la surface des cellules. Ces récepteurs transmembranaires possèdent un domaine extracellulaire en interaction avec les ligands matriciels et un domaine cytosolique interagissant avec des protéines adaptatrices, de structure et de signalisation, en contact avec le cytosquelette. Bien que certains protéoglycanes, notamment de la famille des syndécanes, remplissent ce rôle, les principaux récepteurs d'adhérence sont les intégrines.

I.2.1. Structure et classification des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs cellulaires hétérodimériques composés de 2 sous-unités α et β , associées de façon non-covalente.

A ce jour, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été répertoriées. Leur combinaison génère 24 intégrines différentes. Elles sont classées par « familles » en fonction des combinaisons des sous-unités, des séquences reconnues ou selon la nature de leurs ligands. Certaines sous-unités β peuvent s'associer avec plusieurs sous-unités α , c'est notamment le cas de la sous-unité $\beta 1$. De même, certaines sous-unités α peuvent s'associer avec plusieurs sous-unités β , comme les sous-unités $\alpha 6$ ou αv . Au contraire, certaines sous-unités α ne peuvent s'associer qu'avec une seule sous-unité β , c'est le cas de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, qui est le récepteur spécifique de la fibronectine (**Figure 50**). Ces différentes combinaisons confèrent aux intégrines leurs spécificités de liaison, fonction et localisation.

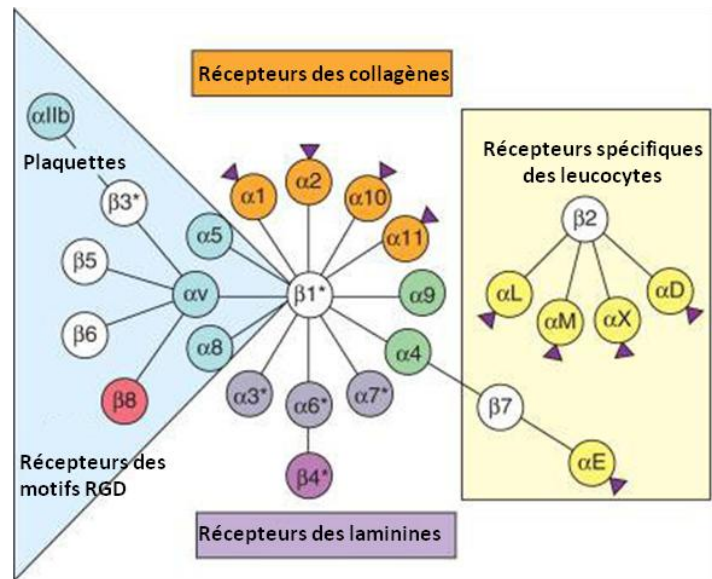


Figure 50: Classification des intégrines. Modifiée d'après (Hynes and Naba 2012).

Les intégrines interagissent avec les ligands matriciels *via* des séquences spécifiques et peuvent être classées en fonctions des séquences reconnues (**Tableau 2** [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#)).

Séquences peptidiques	Intégrines	Ligands
RGD (Arg-Gly-Asp)	$\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha 11\beta 3$	Fn, Vn, Collagènes
GFOGER (Gly-Phe-hydroxyPro-Gly-Glu-Asp)	$\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ et $\alpha 11\beta 1$	Collagènes
LDV (Leu-Asp-Val)	$\alpha 4\beta 1$	Fn

Tableau 2: Séquences peptidiques portées par les ligands matriciels et reconnues par les intégrines

I.2.2. Intégrines et signalisation

Les intégrines assurent la transmission de signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule « outside-in », mais également, de l'intérieur vers l'extérieur des cellules « inside-out ».

La présence de cations divalents tels que le calcium (Ca^{2+}) ou le magnésium (Mg^{2+}) sont indispensables à l'activation des intégrines. En absence de ces ions, les intégrines ont une conformation fermée et inactive, de faible affinité pour les ligands matriciels. La liaison des cations sur les intégrines ainsi que les interactions entre leurs domaines intracellulaires et les molécules cytoplasmiques et l'actine permettent un « switch conformationnel » vers une conformation ouverte (**Figure 51**). En effet, le cytosquelette et les protéines associées contrôlent l'affinité des intégrines pour leurs ligands extracellulaires *via* la signalisation inside-out.

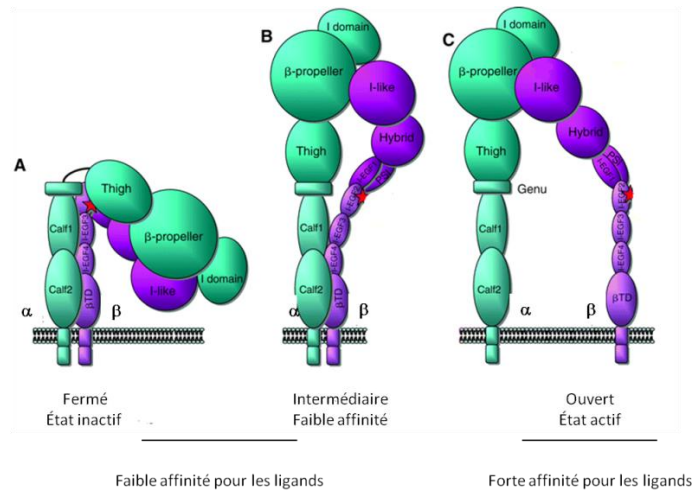


Figure 51: Les différents états d'activation des intégrines. (A) Conformation fermée, les deux sous-unités sont proches l'une de l'autre, l'intégrine est inactive et présente une faible affinité pour les ligands. (B) Dans la conformation intermédiaire, les sous-unités sont proches et étendues, mais l'affinité avec le ligand est faible. (C) Dans la conformation ouverte les domaines cytoplasmiques et transmembranaires sont éloignés, l'affinité des intégrines pour les ligands est élevée. Modifiée d'après (Evans et al. 2009).

La taline et les kindlines sont impliquées dans ce processus. Elles font le lien entre le cytosquelette d'actine et le domaine cytoplasmique des sous-unités β facilitant ainsi l'acquisition de leur conformation active (Campbell and Humphries 2011). Dans cette conformation ouverte, les deux sous-unités α et β sont éloignées l'une de l'autre et la tête extracellulaire se déploie. Cela libère une cavité entre les deux sous-unités α et β dans laquelle s'insère le ligand (Arnaout, Mahalingam, and Xiong 2005) (**Figure 52**).

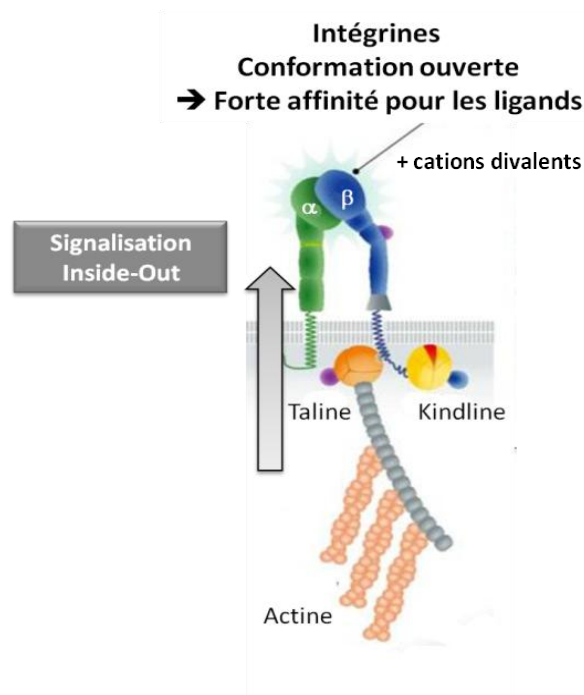


Figure 52: Signalisation inside-out des intégrines. Modifiée d'après (Bottcher and Fassler 2014).

L'interaction des intégrines avec des macromolécules de la matrice extracellulaire permet d'initier une signalisation *outside-in* qui aboutit à la modulation du comportement cellulaire. La fixation du ligand sur les intégrines s'accompagne d'un regroupement de plusieurs intégrines (*cluster* d'intégrines) et de la séparation des domaines transmembranaires et cytoplasmiques des sous-unités α et β . Ces dernières, dépourvues d'activité enzymatique intrinsèques interagissent avec des molécules intracellulaires de structure, comme la vinculine, la taline ou la paxiline et des molécules de signalisation comme FAK (Focal Adhesion Kinase) ou Src (Kanchanawong et al. 2010). Ces complexes multimoléculaires, ou adhésions focales, sont des transducteurs qui convertissent les informations mécaniques du microenvironnement (composition biochimique, topographie et aussi rigidité) en signaux biologiques (Geiger, Spatz, and Bershadsky 2009) (**Figure 53**).

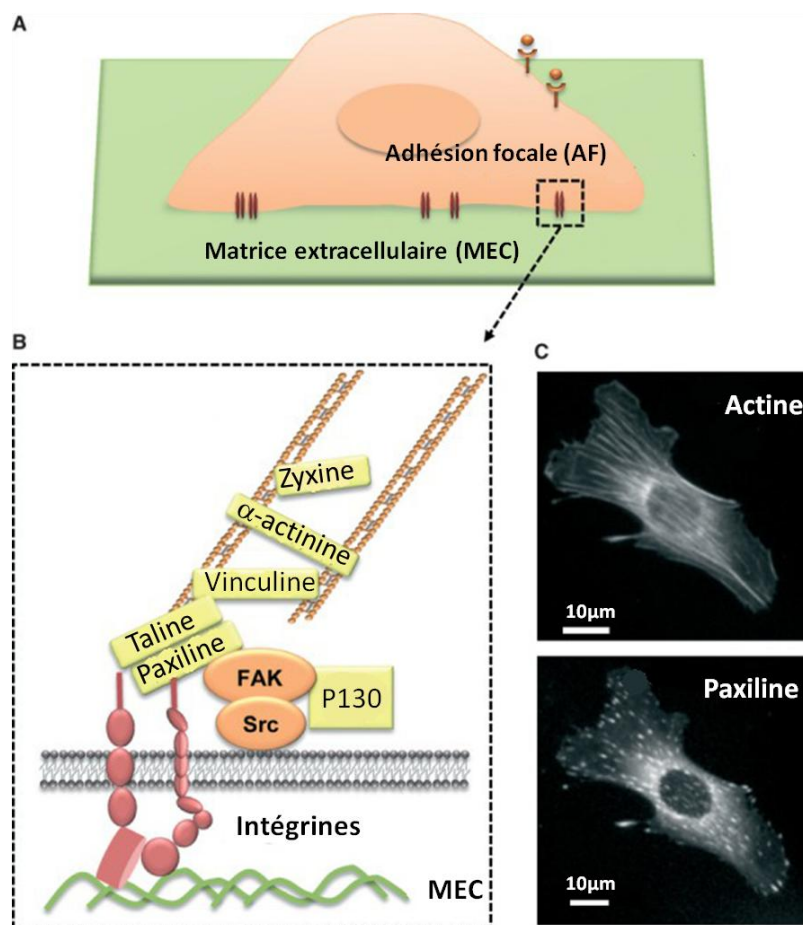


Figure 53: Adhésions focales. (A) Les adhésions focales font le lien physique entre le compartiment extracellulaire (MEC) et intracellulaire. (B) Représentation schématique de la structure et de la composition des adhésions focales. Quand les intégrines sont liées à la MEC, elles recrutent, d'une part, des molécules de signalisation telles que FAK et Src (orange) et d'autre part, des molécules de structure (jaune) liées au cytosquelette. (C) Les fibres de tension (actine) se développent à partir des contacts focaux et dont la position coïncide avec le marquage de la paxiline. Modifiée d'après (Seong, Wang, and Wang 2013).

I.3. Signalisation MEC-dépendante

Le recrutement de protéines cytosoliques suite à l'interaction cellules-MEC *via* le *cluster* d'intégrines, initie différentes voies de signalisation, dont celles des FAK/MAP-Kinases, celles des PI3-Kinase/AKT et celles des PKC (Cf Partie I ; page 33) (**Figure 54**).

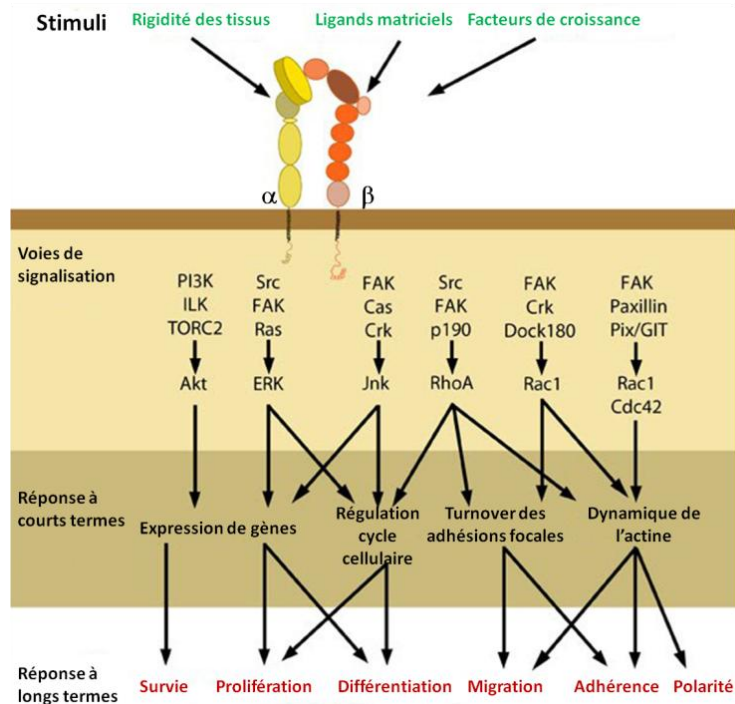


Figure 54: Voies de signalisation potentiellement activées par les intégrines et réponses des cellules. En réponse à des stimuli émanant de la MEC, les intégrines se lient aux macromolécules matricielles et sont activées. Plusieurs voies de signalisation peuvent être activées. Elles influencent certains événements cellulaires à moyen terme ou modifient les comportements cellulaires à longs termes. De (<http://www.mechanobio.info>).

L'activation de ces voies aboutit à l'expression de gènes, à des réarrangements du cytosquelette, à des cycles d'assemblage/désassemblage des adhésions focales ou encore à l'influx de messagers biochimiques (ouverture des canaux ioniques). Dans certains cas, des récepteurs à activité tyrosine kinase sont associés aux intégrines et exercent une action synergique sur la signalisation intracellulaire.

Les signaux émanant de la matrice sont intégrés par les cellules pour induire des réponses adaptées aux propriétés du microenvironnement, à une localisation et un temps donné : l'adhérence et l'étalement correspondent aux processus par lesquels les cellules s'attachent à leur support. Cet ancrage favorise la survie cellulaire (Bruckert et al. 2002; Chamaraux et al. 2008; Socol et al. 2010). Suite à leur adhérence, les cellules acquièrent une morphologie, c'est-à-dire une forme qui est caractéristique de chaque type cellulaire. La différenciation correspond au processus par lequel une cellule acquiert un phénotype et une fonction spécifique d'un type cellulaire (Keller 2005). Suite à

leur adhérence et différenciation, la prolifération permet aux cellules de se multiplier. Enfin, la migration correspond au processus qui permet aux cellules de se déplacer en fonction des propriétés du microenvironnement matriciel (Petrie, Doyle, and Yamada 2009).

La modulation de ces comportements cellulaires aura des répercussions sur les processus physiologiques et pathologiques. Par exemple, la prolifération et la migration cellulaire sont primordiales dans la mise en place des différents tissus lors du développement embryonnaire. Dans les tissus adultes, une dérégulation de ces deux comportements mène à des processus pathologiques comme le développement tumoral.

II. Le microenvironnement tumoral

II.1. La théorie de la mutation somatique et la théorie du champ d'organisation tissulaire

La théorie de la mutation somatique (TMS) a longtemps permis de décrire le cancer comme un processus cellulaire autonome résultant de l'accumulation de mutations successives dans les gènes codant pour des protéines proto-oncogènes ou suppresseurs de tumeurs. Le développement des cancers serait le résultat de la sélection de cellules ayant acquis des anomalies génétiques et épigénétiques leur conférant de nouvelles propriétés comme l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération, l'échappement à la sénescence réplivative, à l'apoptose ou à la réponse immune, la capacité à induire l'angiogenèse et la capacité d'invasion et de dissémination à distance des cellules cancéreuses (Douglas Hanahan and Weinberg 2011) (Cf Partie I ; page 28).

Cependant la croissance tumorale est encore plus complexe. En effet, les foyers tumoraux peuvent s'apparenter à des « organes » car ils sont composés de cellules génétiquement altérées, les cellules cancéreuses, et d'une population hétérogène de cellules provenant de différents tissus (fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales, etc) enchâssée dans une matrice extracellulaire formant le stroma tumoral (Hu and Polyak 2008). La théorie du champ d'organisation tissulaire (ou TOFT : Tissue Organization Field Theory) se fonde sur le principe que la carcinogenèse se produit à l'échelle du tissu et non plus seulement à l'échelle cellulaire. Elle propose que le microenvironnement tumoral, notamment le stroma soit le siège de modifications induites par des agents carcinogènes (Soto and Sonnenschein 2004) (**Figure 55**).

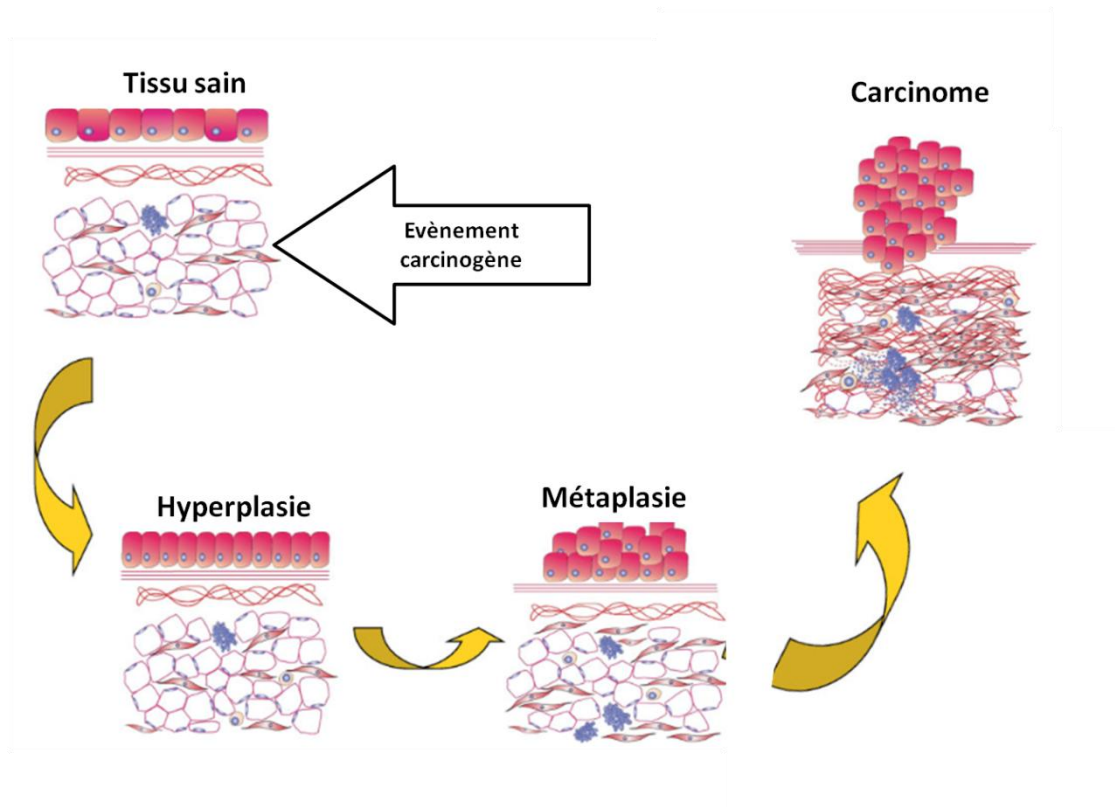


Figure 55: Carcinogénèse selon la théorie du champ d'organisation cellulaire. Une exposition à un ou plusieurs agents carcinogènes perturbe la communication entre les cellules et le stroma sous-jacent. Il en résulte l'apparition d'anomalies et d'altérations dans le stroma et dans l'épithélium. La prolifération et la mobilité des cellules sont incontrôlées. Ce qui induit une hyperplasie du tissu épithélial. Les anomalies s'accumulent et induisent l'apparition de carcinomes. Le stroma est également altéré, il peut devenir desmoplasique et/ou inflammatoire. Modifiée d'après (Soto and Sonnenschein 2011).

Outre son rôle au cours de la carcinogénèse, le microenvironnement joue également un rôle central dans le tropisme des métastases cancéreuses. C'est la théorie du « seed and soil », littéralement « la graine et le sol », émise par S. Paget en 1889 : « les graines des plantes sont portées dans toutes les directions ; mais elles peuvent vivre et grandir seulement si le sol est adapté » (Paget 1889). Ce chirurgien a démontré que les cellules cancéreuses du sein (the « seed ») ont une affinité particulière pour des organes précis, à savoir, les os, les poumons, le foie ou le cerveau (the « soil ») pouvant fournir un terrain avantageux de développement de ces cellules cancéreuses (Mathot and Steninger 2012). Depuis sa formulation différents travaux ont étayé cette théorie (Barcellos-Hoff 1998; Maffini et al. 2004).

En conditions physiologiques, le microenvironnement exerce un rôle suppresseur de tumeur. En revanche, si son équilibre homéostatique est rompu, il est impliqué dans la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses. En retour, la transformation cellulaire induit des modifications du microenvironnement tumoral.

II.2. La composition du microenvironnement tumoral

Au sein du microenvironnement tumoral, les différents types cellulaires (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules immunitaires, cellules souches mésenchymateuses...) interagissent physiquement *via* l'établissement de complexes jonctionnels et communiquent *via* des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire comme des chimiokines, des facteurs de croissance ou des hormones. La composante non cellulaire, le stroma tumoral, inclut une matrice extracellulaire dense et complexe, sécrétée par les cellules cancéreuses et non cancéreuses. Cette dernière est remaniée de façon exacerbée avec une synthèse/dégradation accrue, des modifications de sa composition biochimique et de ses propriétés biophysiques (**Figure 56**).

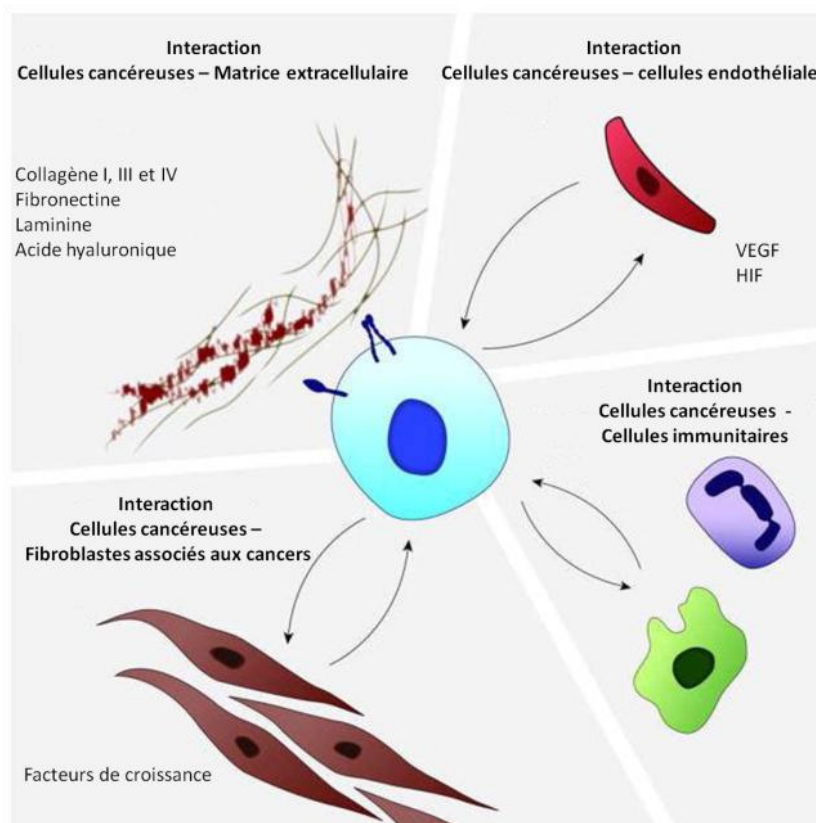


Figure 56: Interaction entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral. Modifiée d'après (Whatcott et al. 2013).

- Les fibroblastes associés aux cancers (Cancer associated fibroblasts : CAFs) sont les composés majeurs retrouvés dans le stroma tumoral. Non cancéreuses, ces cellules présentent cependant des différences phénotypiques et fonctionnelles par rapport aux fibroblastes sains (Littlepage, Egeblad, and Werb 2005). Les CAFs expriment la protéine α -SMA (α -smooth muscle actin), caractéristique des myofibroblastes et deviennent contractiles. Les facteurs sécrétés par les cellules cancéreuses peuvent induire cette modification phénotypique. Pour exemple, le TGF- β sécrété par les

cellules cancéreuses ovariennes, contribue à la transformation des cellules souches mésenchymateuses ou des fibroblastes normaux de l'épipoon en CAFs (Jeon et al. 2008). Les CAFs sécrètent, en grandes quantités, des facteurs de croissance (HGF, VEGF) et des cytokines (IL-2, TGF- β) qui agissent de manière paracrine sur tous les autres types cellulaires du foyer tumoral et aussi de manière autocrine (Yu et al. 2014) (**Figure 57**).

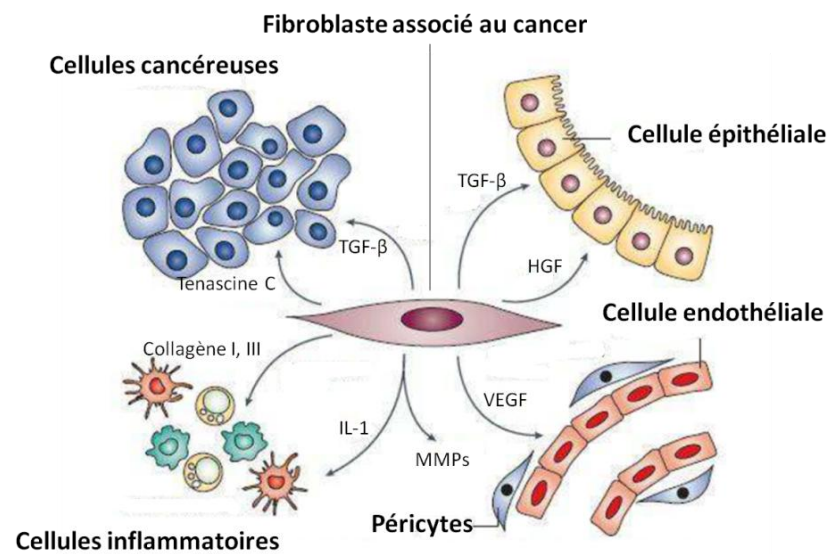


Figure 57: Influence des CAFs sur le microenvironnement tumoral. Les CAFs sécrètent différents types de molécules, dont des éléments de la matrice extracellulaire, des protéases, des cytokines ou des facteurs de croissance. Ils contribuent au développement tumoral en favorisant la survie des cellules cancéreuses, l'angiogenèse etc. Modifiée d'après (Kalluri and Zeisberg 2006).

Les CAFs synthétisent et sécrètent des macromolécules matricielles telles que les collagènes et aussi des enzymes protéolytiques (MMPs). De plus, elles contractent la MEC et la rigidifient. Ainsi, les CAFs sont de véritables « conspirateurs » du développement tumoral. D'ailleurs il a été démontré que les CAFs contribuent à l'accroissement de la sous-population de cellules initiateurs de tumeurs dans les cancers ovariens en recrutant des cellules souches mésenchymateuses (McLean et al. 2011).

- Les cellules endothéliales et les vaisseaux sanguins : La vascularisation des tumeurs est associée à une augmentation de leur taille et de leur potentiel métastatique (D. Hanahan and Folkman 1996). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins irriguant le foyer tumoral à partir de vaisseaux pré-existants, résulte d'un processus angiogénique au cours duquel les cellules endothéliales quiescentes sont activées et acquièrent un phénotype prolifératif et migratoire. Le switch angiogénique est sous la dépendance de facteurs pro-angiogéniques et en premier chef le VEGF (Vascular

Epidermal Growth Factor). Il a été démontré que le taux d'expression du VEGF dans les cellules cancéreuses ovariennes est supérieur à celui des cellules saines (Olson et al. 1994). D'autres études ont démontré une corrélation entre l'expression du VEGF, la progression des cancers de l'ovaire et le risque de décès ou de récurrence (Belotti et al. 2008; Bandiera et al. 2012).

- Les cellules immunitaires : Les cellules du système immunitaire semblent avoir une place prépondérante dans la carcinogenèse et notamment, celle des cancers ovariens. Au cours des ovulations incessantes, les dommages engendrés par l'expulsion du follicule au niveau de l'EOS induisent une réponse inflammatoire puis la cicatrisation des lésions (Cf Partie I ; page 9). Il a été établi *in vivo* que les macrophages sont retrouvés en grandes quantités dans les kystes d'inclusion formés dans les ovaires (Gaytán et al. 2007). D'autre part, le stroma tumoral ovarien est l'analogue d'un tissu chroniquement inflammé. Les différentes cytokines inflammatoires, chimiokines, facteurs de croissance, ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont sécrétés par les cellules cancéreuses et/ou par les cellules immunitaires activées. De fait, l'environnement pro-inflammatoire auquel sont soumises les cellules cancéreuses ovariennes, peut favoriser l'induction et/ou la sélection de cellules cancéreuses agressives (Macciò and Madeddu 2012).

II.3. Le microenvironnement tumoral ovarien

II.3.1. Le stroma tumoral ovarien

La matrice extracellulaire des carcinomes ovariens est constituée de protéines fibreuses comme les collagènes de type I, II, III et plus rarement de type IV, de PGs comme les syndécans et les perlécans, des glycoprotéines adhésives comme la vitronectine, la fibronectine ou la laminine (Carreiras et al. 1996; Carreiras et al. 2002). La fibronectine est retrouvée sous une forme fibrillaire très fine, faiblement exprimée, voire absente dans les amas carcinomateux ovariens. En revanche, elle est fortement exprimée dans le stroma environnant. De plus, sa forme oncofoetale est également exprimée (Menzin et al. 1998). La vitronectine, quant à elle, est exprimée par les cellules cancéreuses ovariennes mais peu dans le stroma (Carreiras et al. 1999a). La composition de la matrice extracellulaire tumorale ovarienne serait dépendante du type histologique et serait associée aux paramètres clinico-pathologiques des carcinomes ovariens (Jazaeri et al. 2005). Une expression élevée de fibronectine dans les matrices extracellulaires est d'ailleurs associée au stade tumoral et à une diminution de la survie globale (Ricciardelli and Rodgers 2006).

Les molécules matricielles régulent les comportements des cellules cancéreuses ovariennes. A titre d'exemple, la vitronectine est impliquée dans l'adhérence et la migration cellulaire (Carreiras et al. 1999a; Carreiras et al. 1999b). Elle intervient dans les étapes initiales de la formation des agrégats multicellulaires (Cf II.4.2 ; page 69) (Kellouche et al. 2010). D'autre part, la vitronectine induit partiellement l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes sur les cellules endothéliales et mésothéliales (Heyman et al. 2008). En outre, H. Kenny et ses collaborateurs, ont montré que le clivage de la fibronectine et de la vitronectine par la MMP-2 sécrétée par les cellules cancéreuses favorise leur adhérence sur le mésothélium *via* les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, respectivement (Kenny et al. 2008; Kenny and Lengyel 2009) (**Figure 58**).

1. Contact entre les cellules cancéreuses ovariennes et l'épipoon augmente la transcription, l'expression, l'activation et la sécrétion de la MMP-2 par les cellules cancéreuses ovariennes

3. Augmentation de l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes sur les fragments de Vn et Fn *via* les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$ respectivement

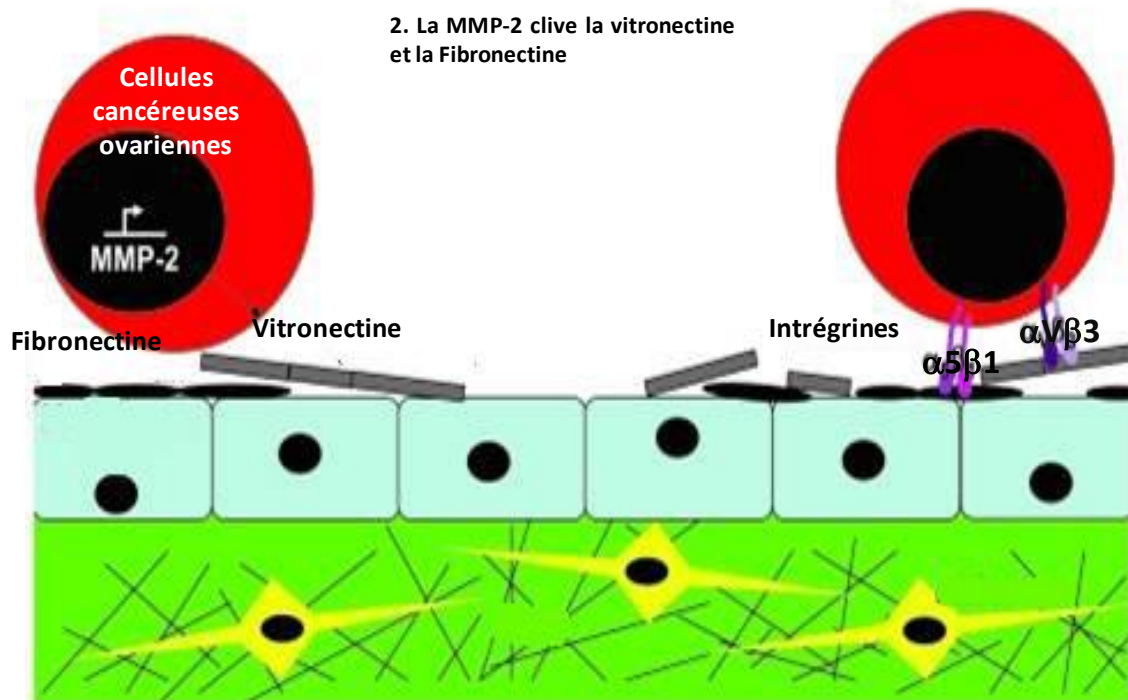


Figure 58: Influence de la MMP-2 sur les étapes précoces de métastases des cellules cancéreuses ovariennes sur le péritoine ou l'épipoon. Modifiée d'après (Kenny et al. 2008).

II.3.2. Les interactions cellules cancéreuses - matrice extracellulaire au sein des carcinomes ovariens

Le répertoire d'intégrines exprimé par les cellules cancéreuses ovariennes comprend les intégrines des familles $\beta 1$, αv et l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Cruet et al. 1999). Les intégrines de la famille αv , notamment, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ et $\alpha v\beta 6$, en interagissant avec la vitronectine, favorisent la prolifération, la

migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Carreiras et al. 1996; Carreiras et al. 2002; Hapke et al. 2003). Les intégrines αv contribuent à la survie des cellules cancéreuses ovariennes en activant la voie de signalisation Akt (Landen et al. 2008). L'intégrine $\alpha v \beta 3$ est impliquée dans la progression des cancers ovariens et dans leur propension à métastaser (Lössner et al. 2008). L'expression des intégrines $\alpha v \beta 6$, quant à elle, est associée à un phénotype invasif *via* la sécrétion de l'uPA et des MMPs (Ahmed et al. 2002). En outre, l'expression des intégrines αv , en particulier $\alpha v \beta 5$, contribuerait à l'acquisition d'un phénotype résistant aux traitements par le cisplatine (Maubant et al. 2002).

II.3.3. Microenvironnement et dissémination tumorale

Les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire jouent un rôle clef dans le processus de dissémination atypique des cancers ovariens. Cela implique des cycles d'adhérence/perte d'adhérence des cellules sur différents tissus. Lors de leur dissémination, les cellules cancéreuses ovariennes se détachent du foyer tumoral primaire. Les cellules exfoliées de l'ovaire, sont retrouvées sous forme isolée ou organisées en agrégats multicellulaires (AMC) dans le liquide d'ascite immergeant la cavité abdominale. R. Casey et ses collaborateurs ont montré que des anticorps anti- $\beta 1$ stimulants ou un apport exogène de fibronectine favorisent la formation d'AMC par les cellules cancéreuses ovariennes. Au contraire des anticorps bloquants anti- $\alpha 5$ ou anti- $\beta 1$ inhibent ce processus. Ces résultats indiquent que les interactions entre la fibronectine et $\alpha 5 \beta 1$ sont impliquées dans la formation des AMC (Casey et al. 2001). Le détachement des cellules cancéreuses ovariennes est précédé d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ce processus est initié par une diminution de l'expression des E-cadhérines. Il a été démontré que l'inhibition de l'expression des E-cadhérines induit la surexpression du récepteur spécifique de la fibronectine, $\alpha 5 \beta 1$, favorisant l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes sur les sites métastatiques secondaires comme l'épiploon et le péritoine (Sawada et al. 2008).

Les AMC formés par les cellules cancéreuses ovariennes, en suspension dans l'ascite, adhèrent sur le mésothélium. Le mésothélium est un feuillet de cellules mésothéliales adhérentes à une membrane basale. Cette membrane basale est composée majoritairement des collagènes de type I et IV, de la fibronectine et de la laminine (Witz et al. 2001). K. Burleson et ses collaborateurs ont démontré que les AMC adhèrent spécifiquement sur la fibronectine, la laminine et le collagène IV de la MEC du mésothélium (Burleson et al. 2004). Les AMC adhérant sur le mésothélium vont provoquer sa clairance afin d'accéder à la MEC sous-jacente (**Figure 59**).

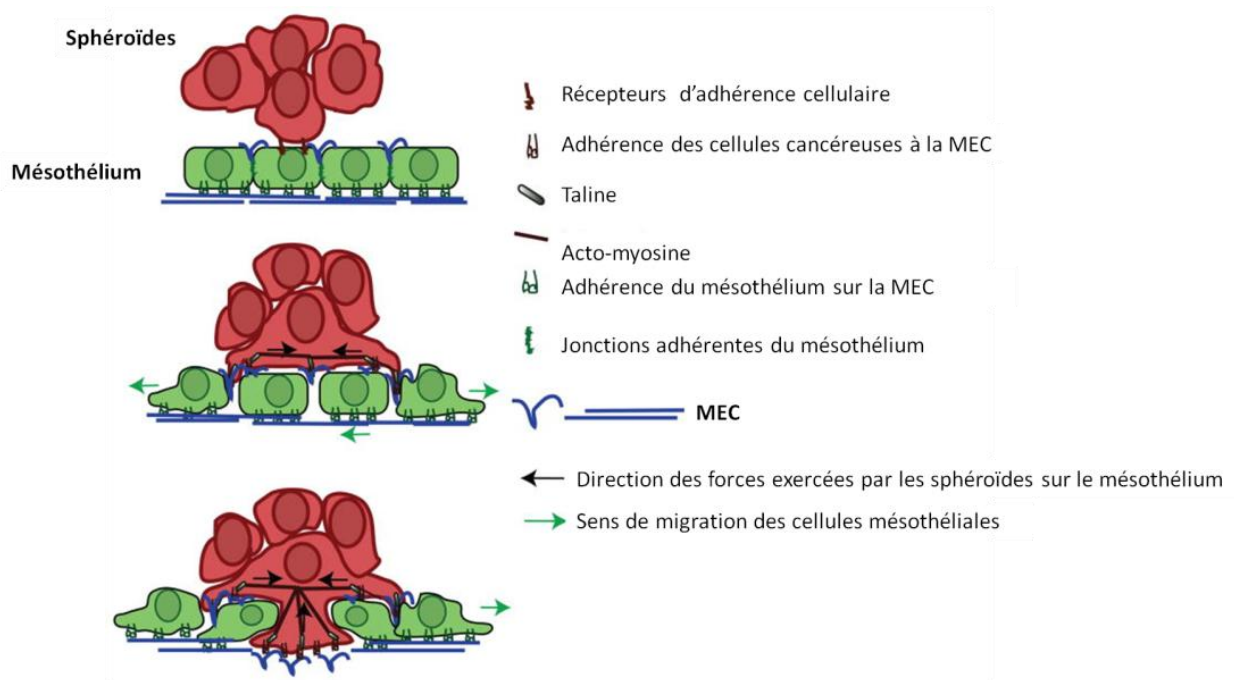


Figure 59: Clairance du mésothélium par les cellules cancéreuses ovariennes. Les sphéroïdes (ou agrégats multicellulaires) adhèrent au mésothélium en utilisant un panel de molécules d'adhérence tel que CD44 ou les intégrines. L'interaction entre les intégrines $\alpha 5\beta 1$ exprimées par les cellules cancéreuses et la fibronectine sécrétée par les cellules mésothéliales provoque l'activation de myosine dans les sphéroïdes. Cela induit la transmission de forces entre la myosine et la fibronectine. Les cellules mésothéliales sont dissociées et migrent à l'opposé du site d'invasion des sphéroïdes. Modifiée d'après (Iwanicki et al. 2011).

Comme démontré par M. Iwanicki et ses collaborateurs, les AMC adhérant à la surface du mésothélium s'étalent et émettent des protusions sous le mésothélium. Cela induit des ruptures localisées de jonctions d'adhérence cellule-cellule. En réponse, les cellules mésothéliales migrent et s'écartent. L'intégrine $\alpha 5\beta 1$, la taline et la myosine II exprimées par les cellules composant les AMC, sont indispensables à ce processus de clairance. Ces résultats suggèrent que les cellules cancéreuses ovariennes organisées en sphéroïdes exercent des forces contractiles grâce aux fibrilles de fibronectine de la matrice mésothéliale (Iwanicki et al. 2011).

En outre, le blocage des sous-unités αv , $\alpha 5$ et $\beta 1$ ainsi que l'utilisation d'un peptide RGD inhibe l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes sur une monocouche de cellules mésothéliales (Strobel and Cannistra 1999; Heyman et al. 2008). Les cellules cancéreuses ovariennes expriment également des intégrines $\alpha 4\beta 1$ susceptibles d'interagir avec le récepteur VCAM-1 exprimé à la surface des cellules mésothéliales. Tous ces éléments concourent à la dissémination péritonéale des cancers de l'ovaire.

II.4. L'ascite est un microenvironnement tumoral particulier

Au moment du diagnostic, plus d'un tiers des patientes atteintes de carcinomes ovariens présente une accumulation de liquide inflammatoire, l'ascite, dans la cavité péritonéale. Cliniquement, les ascites peuvent être observées, avec une incidence de 45 à 75 % selon le sous-type histologique de carcinome ovarien, le type séreux étant le plus fréquemment associé à la présence d'ascite (Partridge and Barnes 1999). D'autre part, les ascites sont observées à partir du stade IC (Cf Partie I ; page 12). Une relation progressive entre la présence d'ascite et le stade tumoral a été identifiée allant de 17 % aux stades I-II à 89 % pour les stades avancés (III-IV). De plus, les volumes d'ascite sont généralement inférieurs à 0,5 litres au moment de la chirurgie pour les patientes atteintes d'un cancer ovarien de stades I-II, alors qu'ils sont largement supérieurs chez les 2/3 des patientes à un stade avancé de la maladie (III-IV) (Shen-Gunther and Mannel 2002).

Au cours de l'histoire, la présence d'ascite a toujours été reconnue comme un signe de mauvais pronostic. Dans les années 1700, Sir Thomas Spencer Wells écrit « les chirurgiens ont tremblé devant les flots des eaux ovariennes » (Shen-Gunther and Mannel 2002). La présence d'ascite diminue la survie à 5 ans de 45 % sans ascite, à 5 % pour des femmes avec un carcinome ovarien à un stade avancé (Graves et al. 2004). A l'heure actuelle aucun traitement n'existe pour éradiquer ces liquides inflammatoires.

II.4.1. Formation de l'ascite

En conditions physiologiques, un fluide péritonéal est produit en continu dans la cavité péritonéale. Il a pour rôles de maintenir les surfaces séreuses de la paroi péritonéale lubrifiées, de favoriser le glissement des organes et de permettre le passage de solutés entre la paroi péritonéale et les organes adjacents. Son volume physiologique est compris entre 20 et 50 mL. Ce dernier joue un rôle de lubrifiant en permettant aux organes de bouger sans frictions (Feki et al. 2009). En plus de ses propriétés lubrifiantes, le liquide péritonéal renferme des globules blancs en concentration élevée qui lui confère un rôle dans la protection immunitaire. Il est en permanence réabsorbé par les vaisseaux lymphatiques situés sur la face inférieure du diaphragme. Au cours du développement tumoral ovarien la sécrétion accrue du facteur pro-angiogénique VEGF, par les cellules cancéreuses ovariennes entre autres, induit une augmentation de la perméabilité des vaisseaux lymphatiques (Byrne et al. 2003). En conséquence, la production de liquide péritonéal est exacerbée. De plus, les cellules cancéreuses disséminant peuvent obstruer les vaisseaux lymphatiques et ainsi empêcher la réabsorption du liquide péritonéal. Ce déséquilibre entre une production de liquide péritonéal excessive et une résorption restreinte contribue à l'accumulation d'ascite exsudative qui contient une quantité importante de protéines. Les volumes accumulés peuvent varier de quelques millilitres

à plusieurs litres. Cependant, l'accumulation d'ascite en tant que simple conséquence du développement tumoral ou en tant que facteur contribuant à l'aggravation de la pathologie, reste matière à débat (**Figure 60**).

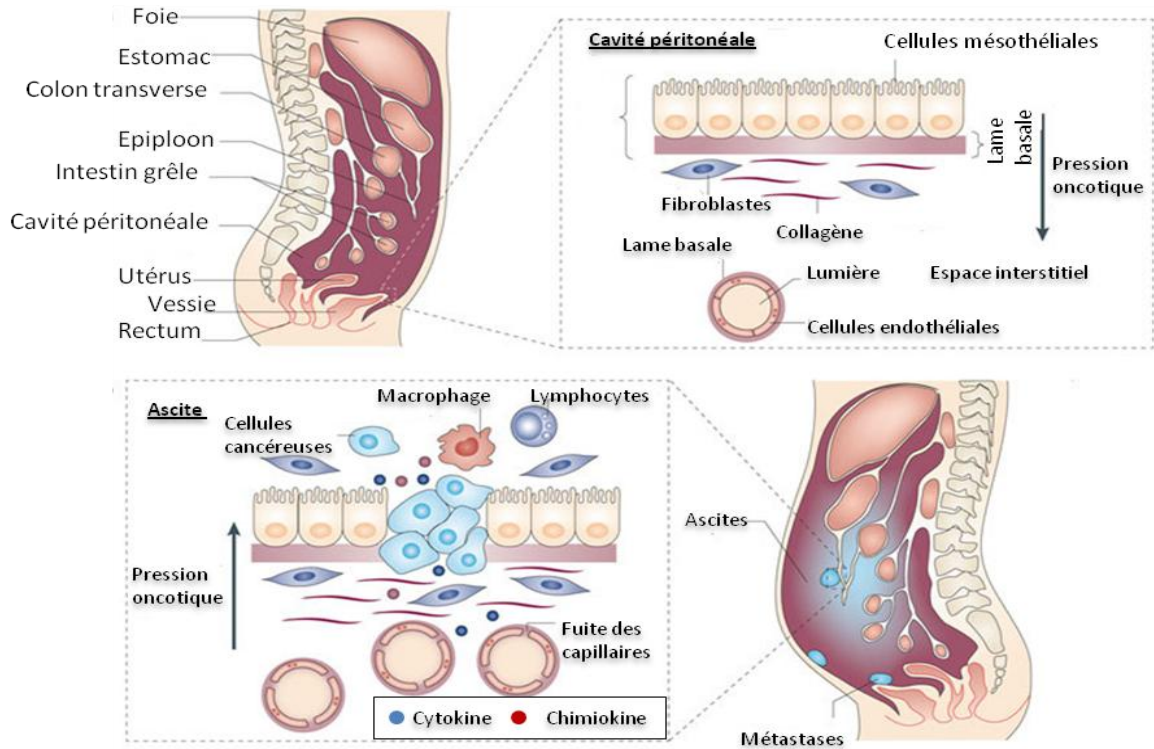


Figure 60: Production de liquide d'ascite. L'infiltration de cellules cancéreuses ovariennes dans le mésothélium et l'augmentation de la perméabilité des capillaires entraînent une fuite des liquides interstitiels. En conséquence le volume du liquide péritonéal augmente et l'ascite se forme. Il contient des cellules immunitaires et des cellules cancéreuses entre autres. Modifiée d'après (Kipps, Tan, and Kaye 2013).

L'ascite immerge la cavité péritonéale dans laquelle résident les cellules cancéreuses mais aussi les cellules mésothéliales. A ce titre, l'ascite représente un microenvironnement tumoral particulier, notamment en raison de son caractère fluide et de son accessibilité clinique.

II.4.2. Composition de l'ascite

L'ascite est un environnement complexe qui contient une grande variété de composants solubles et une population hétérogène de cellules (**Figure 61**).

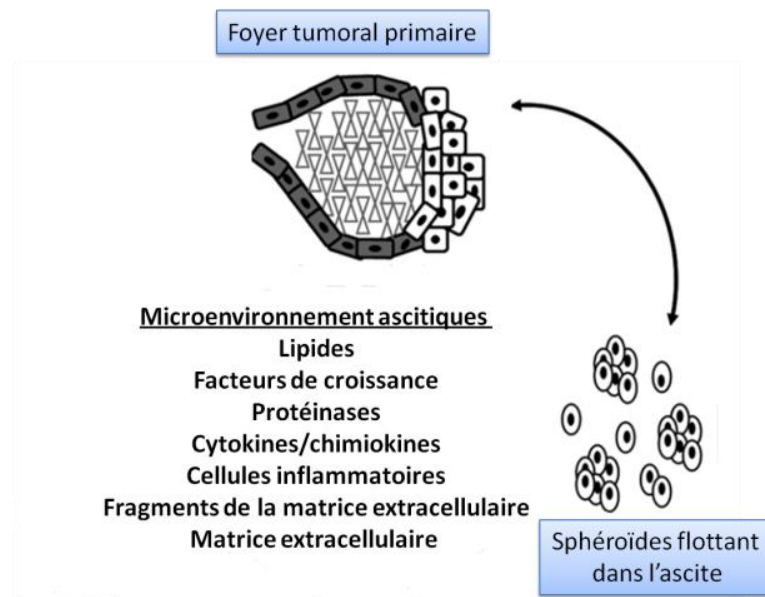


Figure 61: Composition du microenvironnement ascitique. L'ascite est un microenvironnement qualifié de "riche". Il renferme de nombreux composés solubles et des populations cellulaires hétérogènes. Modifiée d'après (Barbolina et al. 2009).

- ***La composante acellulaire des ascites***

Une analyse protéomique a permis de caractériser plus de 200 molécules dans la fraction soluble des ascites. Parmi elles, on trouve des lipides comme l'acide lysophosphatidique (LPA), des facteurs de croissance comme l'EGF et le VEGF, des interleukines, notamment les interleukines IL-6 -8 et -10, des cytokines et des protéases sous forme zymogène ou sous forme active telles que la pro- et la MMP-2, des molécules de la matrice extracellulaire intègres ou fragmentées comme la fibronectine et la vitronectine par exemple (Carduner et al. 2013; Matte et al. 2012; Davidson et al. 2001; Gortzak-Uzan et al. 2008).

L'ascite étant principalement formée par des exsudats de plasma, les protéines matricielles circulantes peuvent s'y accumuler. Une augmentation de la concentration en laminine a d'ailleurs été observée dans les ascites de patientes atteintes de cancers 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). En plus de l'accumulation de certaines protéines ou de leurs fragments de dégradation, des modifications des profils de glycosylation des protéines sont observées dans les ascites. Les cellules cancéreuses ovariennes peuvent présenter une dérégulation de l'expression des sialyltransférases responsables de modifications 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 marqueurs pour le suivi des pathologies (Kuzmanov et al. 2009; Christie et al. 2008).

En 2012, I. Matte et ses collaborateurs ont étudié le profil d'expression de cytokines au sein de dix ascites tumorales provenant de patientes atteintes de cancers ovariens. Ils ont constaté qu'une teneur élevée en ostéoprotégérine (OPG), en leptines et en IL-10 est associée à une faible survie sans progression de la maladie (PFS) (Matte et al. 2012). IL-6 est associé à un stade avancé de cancers ovariens de type séreux. Sa présence permettrait de discriminer les formes bénignes des formes malignes. D'autre part, la leptine ascitique permet de prédire la réponse des patientes aux chimiothérapies adjuvantes de première ligne (Lane et al. 2015). En outre, la teneur en VEGF des ascites est corrélée avec leur volume et l'avancée de la pathologie (Belotti et al. 2003).

- ***La composante cellulaire***

La fraction cellulaire des ascites est un mélange hétérogène de cellules dites « résidentes » et « non-résidentes ». Les cellules cancéreuses ovariennes exfoliées à partir de la surface des ovaires et les cellules mésothéliales desquamées des organes de la cavité péritonéale, appartiennent au groupe des cellules résidentes. Les cellules « non-résidentes » des ascites telles que les macrophages, les monocytes, les hématies ou les cellules souches mésenchymateuses de la moelle sont quant à elles recrutées (Khaidar et al. 2012). Toutes ces cellules coopèrent au sein du microenvironnement tumoral et contribuent au développement de la pathologie.

Les cellules cancéreuses ovariennes exfoliées du foyer tumoral primaire se retrouvent en suspension dans l'ascite. Des cellules individuelles ou sous forme d'agrégats multicellulaires (AMC) ont pu être isolées à partir de l'ascite (Burlison et al. 2004). Au cours de la chirurgie d'exérèse, des AMC peuvent être également retrouvés adhérent à la cavité péritonéale. Si certains y sont faiblement attachés et peuvent être éliminés au cours de l'opération, d'autres au contraire, adhèrent fortement sur le péritoine sous forme de petites tumeurs vascularisées (Zeimet et al. 2012).

Les AMC retrouvés dans les ascites peuvent se former suite à l'agrégation de cellules cancéreuses ovariennes isolées ou bourgeonner à partir de cellules en monocouche (Pease, Brewer, and Tirnauer 2012) (**Figure 62**).

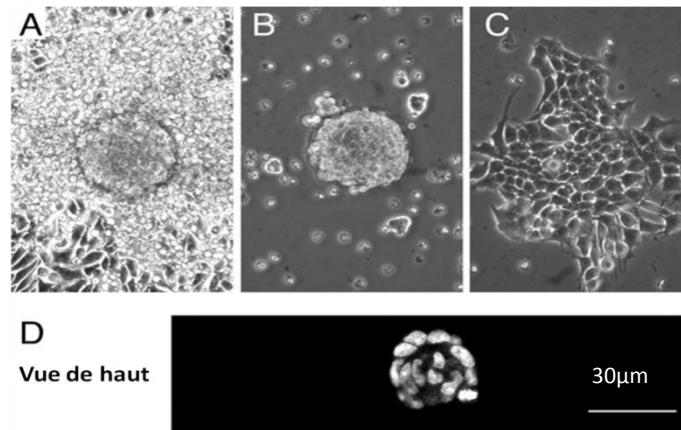


Figure 62: Formation de sphéroïdes à partir d'une monocouche de cellules. (A) Les sphéroïdes bourgeonnent à partir d'une monocouche de cellules cancéreuses ovariennes adhérentes. (B) Cliché de sphéroïdes en suspension dans le milieu de culture. (C) Les sphéroïdes sont capables d'adhérer de nouveau et de former une monocouche. (D) Sphéroïdes bourgeonnant d'une monocouche de cellules observés au microscope confocal. Modifiée d'après (Pease, Brewer, and Tirnauer 2012).

Organisées en AMC, les cellules survivent dans l'ascite bien qu'elles ne soient pas adhérentes (Khaider et al. 2012). L'émergence d'une sous-population cellulaire quiescente ou dont le cycle cellulaire est ralenti a été décrite au sein des AMC (Shield et al. 2009). Ces caractéristiques confèrent aux cellules organisées en AMC une résistance aux chimiothérapies qui ciblent les cellules prolifératives (L'Espérance et al. 2008).

Des cellules cancéreuses présentant un phénotype de type cellules souches cancéreuses (CSC) ont également été décrites dans les ascites. S. Bapat et ses collaborateurs ont isolé un clone cellulaire à partir d'une population cellulaire hétérogène présente dans les ascites. Ce clone présente une croissance indépendante de l'ancrage *in vitro* et une capacité à établir des tumeurs *in vivo* après des xélogreffes successives (Bapat et al. 2005). De façon analogue, J. Liao et ses collaborateurs ont suggéré que les sphéroïdes (ou AMC) trouvés dans les liquides d'ascites sont enrichis en cellules CSC-like car elles surexpriment des gènes caractéristiques des cellules souches (*Notch1*, *Nanog*, *Cdcp1*, *CD34*, *Myc*, etc) et sont capables d'auto-renouvellement. *In vivo*, ces sphéroïdes sont capables de former des tumeurs présentant des phénotypes identiques et sont plus invasives et plus agressives que les cellules parentes (Liao et al. 2014). Ainsi une proportion de ces cellules souches cancéreuses ovariennes (CSCO) concentrées dans les sphéroïdes, flottant dans les ascites contribuerait à la chimiorésistance et la récurrence des cancers. Elle contribuerait également à un enrichissement de la population de cellules cancéreuses ovariennes exprimant des marqueurs de CSC en réponse au cisplatine ou au paclitaxel ou avec une combinaison des deux agents chimiothérapeutiques (Abubaker et al. 2013; Bapat et al. 2005; Liao et al. 2014; N. Ahmed, Abubaker, and Findlay 2014).

A. Latifi et ses collaborateurs ont notamment démontré que la proportion de CSCs varie au sein des ascites selon leur statut chimionaiïf (jamais traité) ou chimiorésistant. En effet, les patientes qui présentent des cancers ovariens chimiorésistants ont une quantité de cellules souches cancéreuses plus importante que les patientes chimionaiïves. Ces dernières seraient indétectables dans les tumeurs résiduelles qui persistent après les traitements. Leur nombre augmenterait graduellement suite aux cycles de traitements consécutifs (Latifi et al. 2012) (**Figure 63**).

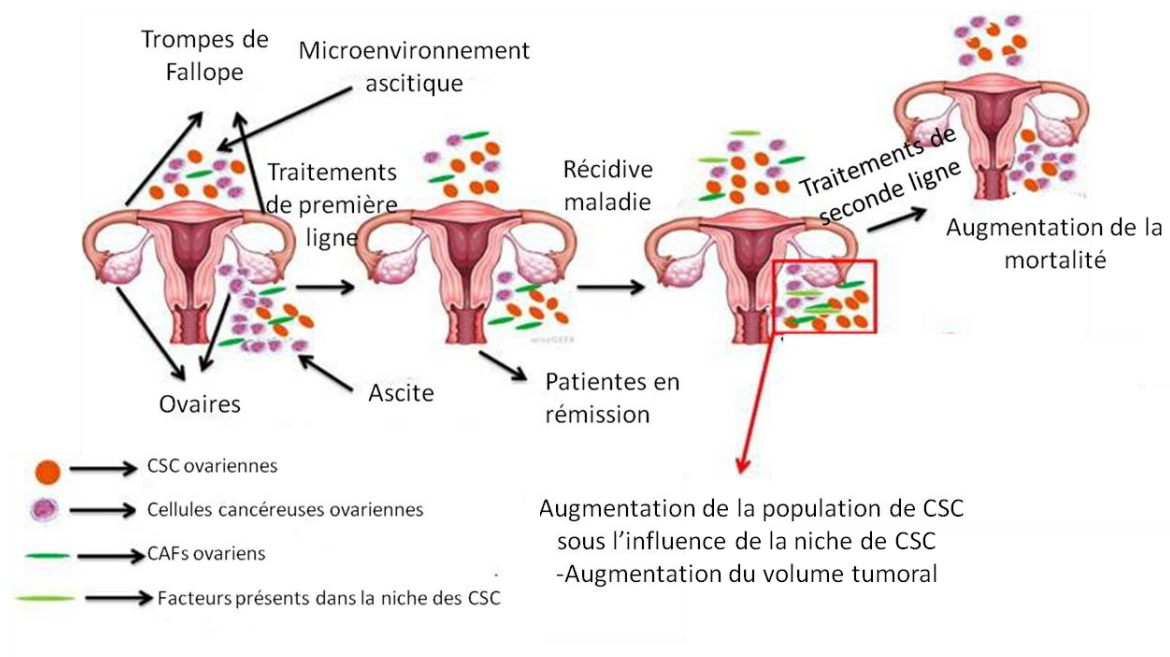


Figure 63: Cellules souches cancéreuses ovariennes. Au moment du diagnostic, une majorité des patientes présentent des cancers ovariens à des stades avancés et associés avec une accumulation de liquides d'ascites qui contiennent des cellules souches cancéreuses. Suite aux traitements de première ligne, la majorité du volume tumoral est éradiqué mais des cellules souches cancéreuses résistantes subsistent. Après une période de rémission comprise entre 16 et 22 mois en moyenne, certaines patientes rechutent. Le volume tumoral résiduel augmente considérablement et le nombre de CSCs également. Ces patientes sont soumises à des traitements de seconde ligne mais alternent entre rémissions et rechutes. A terme les taux de mortalité sont importants. Modifiée d'après (Ahmed, Abubaker, and Findlay 2014).

Les cellules isolées ou en AMC pourraient être transportées via les courants ascitiques vers les trois sites majoritaires d'implantation métastatiques que sont le grand épiploon, la région sous-phrénique et la poche de Douglas (Sehouli et al. 2009). *In vitro*, les ascites régulent la prolifération, l'invasion et la formation de sphéroïdes (Puiffe et al. 2007). D'autre part, les sphéroïdes provenant de liquide d'ascites sont capables d'adhérer et de migrer sur une monocouche de cellules mésothéliales cultivées *ex-situ* et de l'envahir (Burleson et al. 2006).

Au sein de liquides d'ascites provenant de patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens de stade III, des cellules souches mésenchymateuses, les hospicells ont également été isolées. Lorsqu'elles sont co-injectées avec des cellules cancéreuses ovariennes, la croissance tumorale sous-cutanée ou intrapéritonéale augmente, tout comme le volume d'ascite (Pasquet et al. 2010).

Ainsi, l'ascite par sa composition moléculaire et cellulaire, est un véritable « conspirateur » du développement tumoral.

II.4.3. Rôle de l'ascite dans la progression tumorale

En plus d'être associé à un mauvais pronostic vital, l'ascite est un microenvironnement riche et complexe qui favorise la survie des cellules cancéreuses et leur mobilité. Ainsi, il peut contribuer au développement d'une chimiorésistance et à la dissémination, deux processus sous-jacents à la récurrence des cancers ovariens.

La présence de cellules cancéreuses ovariennes dans les liquides d'ascite augure une possible récurrence de la maladie, l'ascite constituant un « réservoir » de cellules agressives. Au cours de la dissémination péritonéale, la survie des cellules cancéreuses en absence d'ancrage est cruciale (Dong et al. 2013). La teneur élevée en VEGF dans les ascites favoriserait ainsi la survie des cellules cancéreuses ovariennes. I. Sher et ses collaborateurs ont démontré que le VEGF-A et son récepteur, le VEGFR-2, protègent de l'anoïkis les cellules cancéreuses ovariennes en suspension dans l'ascite (Sher et al. 2009). En outre, l'ascite augmente la transcription de Mcl-1 selon un processus Erk-1/-2 et Elk1-dépendant, protégeant ainsi les cellules cancéreuses de la mort par apoptose (Goncharenko-Khaider et al. 2012).

Les ascites associées aux cancers ovariens sévères de haut grade, les plus répandus, constituent un microenvironnement protecteur contre l'effet cytotoxique des agents chimiothérapeutiques. I. Matte et ses collaborateurs ont montré que les ascites contribuent à la chimiorésistance en protégeant les cellules de l'apoptose induite par TRAIL. (Matte et al. 2012). Cet effet impliquerait IL-10, puisque sa neutralisation inhibe l'effet protecteur des ascites (Lane et al. 2010a). L'intégrine $\alpha\beta 5$ seraient également impliquée. En effet, l'interaction de ces intégrines avec leurs ligands spécifiques induit la formation d'adhésions focales et l'activation de la voie Akt. La capacité des ascites à induire la phosphorylation d'Akt est directement corrélée avec la capacité à résister à l'apoptose induite par TRAIL (Lane et al. 2010b). En outre, l'analyse de profils protéomiques de cellules cancéreuses ovariennes provenant d'ascites avant et après chimiothérapie révèle une augmentation de l'activation de voie de signalisation Akt suite aux traitements (Davidson et al. 2006).

L'ensemble de ces études souligne l'importance d'étudier l'influence de l'ascite sur les comportements cellulaires afin de mieux comprendre les processus conduisant à la dissémination et à la chimiorésistance des cellules cancéreuses ovariennes, deux événements majeurs dans l'apparition des cancers ovariens.

Matériel & Méthodes

I. Culture Cellulaire

I.1. Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées

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 (Inserm 1199, Unité de Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Agressifs, Centre de Lutte contre le Cancer F. Baclesse, Caen). Les cellules IGROV1 ont un aspect polygonal et ont un temps de doublement d'environ 20 h. 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 (**Figure 64**).

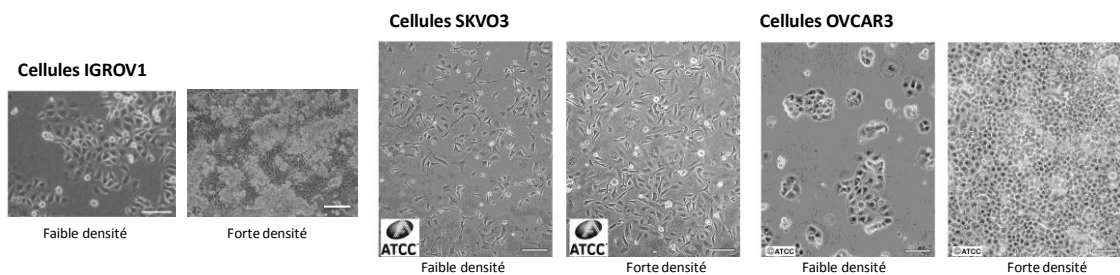


Figure 64: Lignées cellulaires d'adénocarcinomes ovariens cultivées en condition adhérente. (Barres d'échelles = 100µm)

I.2. Condition de culture

I.2.1. 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 décomplémenté et filtré sur filtre 0,22 µm (SVF) et 7,5 % de bicarbonate de sodium (milieu complet) (**Tableau 3**).

I.2.2. Culture des cellules en condition non-adhérente : Formation de sphéroïdes tumoraux

Afin de générer des sphéroïdes, les cellules ont été cultivées dans les boîtes de culture de 25 cm² recouvertes par 8 mL d'agarose 1 % (dissout dans de l'eau distillée). Après solidification de l'agarose, les cellules sont ensemencées dans du milieu complet à une densité de 150 000 cellules/mL (**Figure 65**).

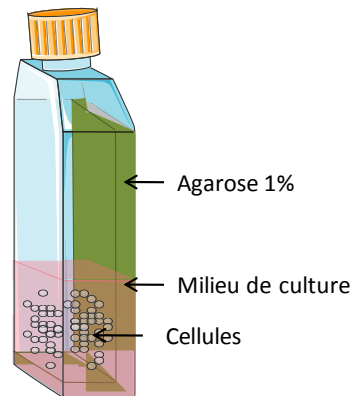


Figure 65: Représentation schématique de la culture des cellules en suspension

Sérum de veau foetal	
SVF	Sérum foetal de bovin (Biosera) décomplémenté
Milieux de culture	
Milieu complet	RPMI 1640 glutamax (Gibco) Bicarbonate de sodium 7,5 % (Gibco) SVF 10 %
Milieu seul	RPMI 1640 glutamax Bicarbonate de sodium 7,5n% (Invitrogen)
Solutions utilisées en culture cellulaire	
PBS	PBS (Gibco)
Trypsine	Trypsine (500mg/L)-EDTA (200mg/mL) (Gibco)
Agarose	Agarose 1 % dans l'eau distillée

Tableau 3 : Milieux de culture et solutions utilisés pour la culture cellulaire

II. Préparation des échantillons d'ascite

Les échantillons d'ascite 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 échantillons d'ascites sont recensés et référencés dans un fichier commun avec les centres hospitaliers.

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 supplémentées avec de la pénicilline-streptomycine (200 UI/mL-200 µg/mL, 15140-122, Gibco) et de la fungizone® (Amphotéricine B 2,50 µg/mL, 15290-018, Gibco). Les différentes ascites testées sont recensées dans le **Tableau 4**. Pour la purification des protéines matricielles, les ascites sont décongelées à +4°C, centrifugées à 5 000 g pendant 10 min à +10°C pour éliminer les éventuels agrégats ou débris. 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).

Ascites utilisées		
N°	Nom	Centres hospitaliers
1	Asc-2	René Dubos (Pontoise, France)
2	CFB-1	Centre François Baclesse (Caen, France)
3	CFB-2	
4	CFB-5	
5	CFB-6	
6	CFB-9	
7	CFB-10	
8	CFB-12	
9	IC-2	Institut Curie (Paris, France)
10	IC-4	
11	Nov-1	René Dubos (Pontoise, France)
12	Nov-2	

Tableau 4: Liste des ascites utilisées

Les protéines totales sont dosées par la technique de l'acide bicinchoninique (BCA, B9643/C2284, Sigma Aldrich) basée sur la complexation de Cu²⁺ avec les liaisons peptidiques. La teneur en glucose des différentes ascites est dosée avec le kit glucose RTUTM (61269, Biomérieux) qui se base sur la séquence glucose oxydase – peroxydase – chromogène. L'intensité de coloration du chromogène, la quinonéimine, est mesurée à 505 nm et est proportionnelle à la quantité de glucose présente dans les ascites.

III. Analyse du comportement cellulaire

III.1. Croissance et viabilité

III.1.1. Comptage des cellules viables

Après incubation pendant le temps désiré, les cellules sont décrochées de leur support ou les agrégats sont dissociés par action de la trypsine-EDTA (5 à 10 min à 37°C) et les cellules viables sont dénombrées en cellule de Malassez en utilisant le test d'exclusion au bleu trypan (CSTCOL03-0U, Eurobio).

III.1.2. 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 resuspendues 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.

III.1.3. 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.

III.1.4. Test de cytotoxicité

Les agents chimiothérapeutiques cisplatine et carboplatine ont été généreusement fournis par le Docteur L. Poulain (Inserm 1199, Unité de Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Aggressifs, Centre de Lutte contre le Cancer F. Baclesse, Caen). Le cisplatine est à 1 mg/mL et le carboplatine à 10 mg/mL.

- ***Test au XTT***

La viabilité des cellules adhérentes après traitement à différentes doses de cisplatine a été déterminée par le test XTT (11465015001, Roche). Le test utilise le sel de tétrazolium XTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium). Il repose sur la capacité des mitochondries fonctionnelles des cellules vivantes à réduire le sel de tétrazolium en cristaux de formazan quantifiables par mesure colorimétrique. Il permet donc d'évaluer les effets des traitements étudiés sur la survie cellulaire, en déterminant la concentration en drogue qui inhibe 50 % de viabilité cellulaire (CI_{50} : Concentration minimale inhibitrice), en la comparant à la condition contrôle pour laquelle aucun traitement n'a été appliqué. Les tests sont réalisés en plaque 48 puits, 15 000 cellules par puits sontensemencées en milieu complet et incubées pendant 6 h. Après rinçage au PBS, les cellules sont incubées pendant 16 h en présence de milieu complet, de milieu seul, d'ascites, de milieu seul additionné de fibronectine ou de vitronectine plasmatiques ou ascitiques à 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou de SVF, à 37°C en atmosphère humide, à 5 % de CO_2 . Les cellules sont ensuite traitées à différentes doses de cisplatine pendant 72 h. Après cette période de traitement, les surnageants de culture sont éliminés. Les cellules sont ensuite incubées en présence de la solution de XTT (milieu de culture seul sans rouge de phénol, solution XTT, solution d'activation A) pendant 2 h à 37°C, sous atmosphère humide avec 5 % de CO_2 . L'absorbance spécifique est lue au spectrophotomètre à 570 nm à laquelle est retranchée l'absorbance non spécifique de la solution de XTT seule.

- ***Comptage des cellules viables***

Les cellules IGROV1, SKOV3 et OVCAR3 ont été traitées avec une concentration fixe de carboplatine (dose CI_{50} à 72 h déterminée en condition adhérente) 24h après la formation des sphéroïdes, au cours de l'ensemencement sur substrat non adhésif en milieu complet ou au cours de la culture des cellules adhérentes avant la formation des sphéroïdes. La viabilité des cellules a été déterminée après dissociation enzymatique des agrégats multicellulaires par comptage avec le test d'exclusion au bleu trypan.

III.2. Adhérence

III.2.1. Test d'adhérence cellulaire

Les tests d'adhérence sont réalisés dans des plaques 96 puits. Les puits sont incubés pendant 2 h à 37°C avec des protéines matricielles purifiées à partir de plasmas ou d'ascites à la concentration de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (coating), du milieu complet ou de l'ascite. 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 et

20 000 cellules par puits sont ensemencées. Après 2 h 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.

III.2.2. Détermination de l'index de morphologie cellulaire

L'aire et le périmètre des cellules ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ. Ces deux paramètres permettent de déterminer l'indice de forme de la cellule (Cell Shape Index :CSI)(Xu et al. 2012; Thakar et al. 2009) selon la formule :

$$CSI = \frac{4\pi A}{P^2}$$

Avec, CSI l'indice de la formule, A l'aire de la cellule et P le périmètre de la cellule. Un indice de 1 indique que la cellule a une forme circulaire et un indice de 0 correspond à une forme allongée.

III.3. Migration

Test de transmigration

Les tests de transmigration cellulaire ont été réalisés en utilisant des chambres de Boyden modifiées possédant une membrane de polycarbonate dont les pores ont un diamètre de 8 µm (12-565-008, Nunc). La membrane de l'insert à été « coatée » par immersion en ascites, en milieu seul, en milieu complet ou en milieu sans SVF additionné de protéines matricielles à 20 µg/mL pendant 1 h. Ces mêmes milieux sont placés dans les compartiments inférieurs. Les cellules IGROV1 et SKOV3 subconfluentes sont décrochées au PBS-EDTA 0,5 mM, resuspendues en milieu seul et 50 000 cellules sont ensemencées dans les compartiments supérieurs des chambres de Boyden. Le test de transmigration se déroule à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ pendant 6 h. Après le test de transmigration, les cellules non-invasives se trouvant sur la face supérieure de la membrane de la chambre de Boyden sont éliminées en utilisant un coton-tige. Les cellules invasives se trouvant sur la face inférieure du filtre sont fixées et colorées par du bleu fixateur (bleu de Coomassie 0,12 % en méthanol/acide acétique/eau (45 :10 :45)). La transmigration a été déterminée en comptant le nombre de cellules sur 5 champs microscopiques par filtre pour 3 puits indépendants.

III.4. Diminution de l'expression des intégrines α v

Transfection transitoire d'ARN interférant

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 (INTERFERin®, Ozyme) préalablement diluée dans 10 % de milieu seul. Ce mélange de transfection est incubé 30 min à température ambiante. Les cellules à 70 % de confluence sont incubées en milieu sans SVF contenant 10 % du mélange siRNA/INTERFERin® 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.

IV. Localisation moléculaire/Immunofluorescence

Les cellules cultivées sur des lamelles de verre 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 (2 min) à 4°C, rincées 3 fois au PBS-BSA et incubées 1 h à température ambiante avec un anticorps primaire en chambre humide (**Tableau 5**). Après plusieurs lavages dans du PBS-BSA, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire approprié couplé à un fluorochrome. 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.

Cible de l'anticorps (Anti-)	Référence	Espèce, Nature, couplage	Fournisseur	Dilution Optimale de l'anticorps
Anticorps Primaires				
Vitronectine	V7881	Ac M., IgM de souris	Sigma-Aldrich	1/50 ^{ème}
Fibronectine	F3648	Ac P., IgM de lapin		
Laminine	L9393	Ac P., IgG de lapin		
Collagène IV	C1926	Ac M., IgM de souris		
Fibrinogène	a0080	Ac P., Ig de souris	DAKO	
Protéine couplée à un fluorochrome				
Fibronectine – Alexa 568			Fn purifiée au laboratoire ERRMECe Alexa 568 (Invitrogen)	20 µg/mL
Anticorps secondaires				
Anti-IgG de lapin	T6778	TRITC	Sigma-Aldrich	1/50 ^{ème}
Anti-lapin	A21428	Alexa 555	Invitrogen	1/500 ^{ème}
Anti-IgM de souris (chèvre)	F9259	FITC	Sigma-Aldrich	1/50 ^{ème}

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunofluorescence. (Ac P. : Anticorps polyclonaux, Ac M. : Anticorps monoclonaux)

Caractéristiques du microscope utilisé

Les observations des marquages fluorescents 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.

V. Analyse des protéines cellulaires en SDS-PAGE et western-blot

V.1. Extraction des protéines cellulaires

Les cellules sont lavées avec du tampon PBS froid. Les culots cellulaires, obtenus après centrifugation à 350 g à +4°C pendant 10 min, sont repris dans du tampon de lyse (9803, Cell signaling). La lyse cellulaire est optimisée par des agitations au vortex. Les lysats sont incubés dans la glace pendant 30 min puis sont débarrassés des débris cellulaires par centrifugation à 15000 g à +4°C pendant 20 min. Les surnageants protéiques sont dosés extemporanément par la méthode BCA en utilisant une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) allant de 0 à 20 µg. L'absorbance de chaque échantillon est mesurée par un spectrophotomètre (Bio-Tek) à la longueur d'onde de 575 nm.

V.2. Electrophorèse des protéines cellulaires en SDS-PAGE

Les protéines cellulaires sont soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions réductrices, selon Laemmli. Les échantillons sont réduits 10 min dans du tampon de charge (62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 2 % SDS, 100 mM β -mercaptoéthanol, 0,01 % bleu de bromophenol, 10 % glycérol) à 90°C. Après dépôt, les échantillons et les standards de poids moléculaire (Precision Plus Protein All blue standard, 161-0373, Biorad) sont soumis à un SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). La migration s'effectue sous un courant électrique (30 mA/gel) pendant 1 h dans du tampon (50 mM Tris-HCl, 100 mM glycine pH 8,4 contenant 0,1 % de SDS) (Laemmli 1970). Des quantités équivalentes de protéines (30 μ g/puits pour les lysats cellulaires) sont séparées dans les gels de polyacrylamide (de 6 à 12 %). Ensuite les protéines peuvent être révélées par une coloration au bleu 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 des standards.

V.3. Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose et blotting

Dans le cas d'un western-blot, les protéines contenues dans le gel d'électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Biosciences) par application d'un courant électrique de 110 V pendant 1h dans un tampon de transfert (25mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 20 % éthanol, pH 8,). L'efficacité de transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau. La membrane de nitrocellulose est ensuite placée dans une solution de TBS (Tris Buffer Saline) contenant 5 % (m/v) de lait écrémé ; 0.1 % de tween-20 pendant 1 h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée dans une solution d'anticorps primaires dilués dans du TBS-Tween 0,1 % et 3 % (m/v) de lait écrémé pendant 16 h à 4°C. Après lavages dans du tampon TBS-Tween 20 0,1 %, la membrane est ensuite mise en contact avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (**Tableau 6**) à une dilution de 1:5000 pendant 1 h à température ambiante. La membrane est lavée et révélée par incubation dans le réactif Immobilon de Millipore pendant 5 min à l'abri de la lumière. La détection de la chemoluminescence est réalisée avec un film photographique (Amersham) et les films sont numérisés avec un scanner (GS-800, Biorad). Les bandes peuvent être également révélées après exposition des membranes de nitrocellulose sous avec une caméra de chemoluminescence (LAS 500, GE-Healthcare).

Type d'anticorps Anti-	Clone (Référence)	Espèce, Nature, couplage	Fournisseur	Dilution Optimale de l'anticorps
Anticorps Primaire				
PARP	9542	Ac P., IgG de lapin	Cell Signaling	1/1000 ^{ème}
Erk-1/-2	9102	Ac P., IgG de lapin		
Erk-1/-2 phosphorylé	4370	Ac M., IgG de lapin		
Intégrines α v	sc-9969	Ac M., IgG de souris	Santa-Cruz	
Tubuline	T9026	Ac M., IgG de souris	Sigma-Aldrich	
Actine	A5441	Ac M., IgG de souris		
Anticorps secondaires				
Anti-Ig de lapin	na-934V	Peroxydase	GE-Healthcare	1/5000 ^{ème}
Anti-Ig de souris	na-931VS			

Tableau 6: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en western-blot. (Ac P. : Anticorps polyclonaux, Ac M. : Anticorps monoclonaux)

VI. Purification simultanée de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques

VI.1. Chromatographies d'affinité

Ce protocole de purification a été publié par notre groupe (Carduner et al. 2013). Toutes les étapes de purification sont réalisées à +8°C avec un AKTA Purifier 10 UPC (GE Healthcare). Les colonnes de chromatographies d'affinité 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 L. Poulouin et ses collaborateurs (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 la fraction non-retenue 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 fibronectine purifiée.

Pour purifier la vitronectine, la fraction non-retenue de la première colonne de gélatine Sepharose est chargée 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, la fraction non-retenue est complétée avec 6 M d'urée et agitée pendant 3 h. Avant de charger ce mélange, la colonne d'héparine Sepharose est régénérée avec du TE/Urée 6 M/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 T. Yatohgo et ses collaborateurs (Yatohgo et al. 1988). La vitronectine 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 6 M/NaCl 1 M pour permettre l'utilisation de la même colonne pour l'ensemble du protocole. La fibronectine et la vitronectine sont également purifiées selon ce protocole à partir de plasma de donneurs sains pour servir de référence. Le plasma est fourni par l'Établissement Français du Sang (EFS).

Les solutions de fibronectine et de vitronectine purifiées sont filtrées à travers une membrane de 0,22 μm sous poste de sécurité microbiologique et conservées stérilement à +4°C dans des tubes en verre.

Ces protéines sont caractérisées afin de déterminer leur taux de pureté et le rendement de la purification. La concentration est déterminée par absorbance à 280 nm, le coefficient d'extinction molaire est de : 1,28 $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**Tableau 7** et **Tableau 8**).

Fn purifiée	Volume ascite (mL)	Volume de Fn (mL)	[Fn] mg/mL	Quantité de Fn mg	mg Fn/L Ascite
Ascite 4	400	38	0,5	20	49
Ascite 6	950	25	0,2	5	5
Ascite 8	350	23	1	23	66

Tableau 7 : Rendements des purifications des fibronectines ascitiques

Vn purifiée	Volume ascite (mL)	volume de Vn (mL)	[Vn] mg/mL	Quantité de Vn mg	mg Vn/L Ascite
Ascite 4	400	8	0,3	2	6
Ascite 6	950	15	0,4	5	6
Ascite 8	350	16	0,2	3	9

Tableau 8 : Rendements des purifications des vitronectines ascitiques

VI.2. Western Blot

Avant d'être analysées par Western blot, les protéines purifiées sont dosées par la méthode du 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%). L'hybridation des protéines présentes sur les membranes de nitrocellulose est réalisée en utilisant les anticorps primaires et secondaires référencés dans le **Tableau 9**.

Type d'anticorps Anti-	Clone (Référence)	Espèce, nature	Fournisseur	Dilution optimale de l'anticorps
Anticorps Primaires				
Fibronectine	F3648	Ac P, IgG de lapin	Sigma-Aldrich	1/1000 ^{ème}
Vitronectine	681125	Ac P, IgG de lapin	Merck	
Anticorps secondaires				
IgG de lapin	na-934V	Peroxydase	GE-Healthcare	1/5000 ^{ème}

Tableau 9: Anticorps primaires et secondaire utilisés pour les western-blot des protéines matricielles purifiées. (Ac P. : Anticorps polyclonaux, Ac M. : Anticorps monoclonaux).

VI.3. Spectroscopie de 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 étudiées (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 HEPES 10 mM pH 7,4 seul.

VII. Spectrométrie photoélectronique X

La technique de Spectrométrie Photoélectronique X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) consiste à irradier un échantillon avec des rayons X et analyser les électrons qui sont émis. A partir de là, il est possible de remonter à l'identification des atomes sur la surface, leur quantité et également leur environnement chimique. C'est une technique de surface qui ne peut analyser qu'au maximum 10 nm de profondeur. La préparation des échantillons est donc délicate. Ces expérimentations ont été réalisées par le Dr A. Ponche ((IS2M) - LRC CNRS 7228, Institut de Science des Matériaux de Mulhouse).

VII.1. Préparation des lames de verre

Les lames sont dégraissées à l'acétone puis séchées sous une sorbonne. Après un traitement à l'éthanol, les lames sont à nouveau séchées et conservées à l'obscurité jusqu'à utilisation.

VII.2. Préparation des échantillons

Le cisplatine a été préalablement incubé à différentes concentrations (1 et 10 µg/mL) en présence de vitronectine ou fibronectine (à 50 mg/mL) en milieu de culture sans SVF pendant 3 h à 37°C, en atmosphère humide et à 5 % de CO₂. Des solutions de cisplatine seules (à 1 et 10 µg/mL) ont également été incubées dans les mêmes conditions et constituent les témoins. 50 µL de chaque solution ont été déposés sur les lames traitées et sèchent à l'air libre sous sorbonne chimique.

VIII. Analyses statistiques

Les données sont exprimées par la moyenne ± l'écart type d'au moins trois expériences indépendantes. Le test de Student (t.student) est utilisé pour déterminer les différences significatives entre les résultats : * p<0,05 ; **p< 0,01 et *** p< 0,001.

Récapitulatif des références du matériel utilisé

Matériel de culture cellulaire

Produits	Références
Agarose	BP160-100, Fissher-Scientific
Bicarbonate de sodium	25080-060, Gibco
Bleu trypan	CSTCOL03-0U, Eurobio
Carboplatine, Hospira	Fourni par le Dr. L.Poulain
Cisplatine, Mylan	Fourni par le Dr. L. Poulain
Chambre de Boyden	12-565-008, Nunc, membrane de polycarbonate - pores de 8 μm
Fungizone [®]	15290-018, Gibco
PBS	14190-094, Gibco
Péniciline/streptomycine	15140-122, Gibco
RPMI 1640-glutaMAX	72500-054, Gibco
Sérum de veau fœtal	FB-1001G/500, Biosera
siRNA α	sc-29373, Santa Cruz
siRNA «scramble»	sc-37007, Santa Cruz
Tampon de lyse	9803, Cell signaling
Interferrin TM	409-10, Ozyme
Trypsine	25200-056, Gibco

Anticorps pour western-Blot

Cible	Hôte	Type	Dilution	Référence
Actine	IgG monoclonal, souris	Ac I	1/1000 ^{ème}	A544, Sigma-Aldrich
Erk-1/-2	IgG polyclonal, lapin	Ac I	1/1000 ^{ème}	9102, Cell Signaling
Erk-1/-2 phosphorylé	IgG monoclonal, lapin	Ac I	1/1000 ^{ème}	4370, Cell Signaling
Intégrines α v	IgG monoclonal, lapin	Ac I	1/1000 ^{ème}	sc-9969, Santa-Cruz
Fibronectine	IgG polyclonal, lapin	Ac I	1/1000 ^{ème}	F3648, Sigma-Aldrich
PARP	IgG polyclonal, lapin	Ac I	1/1000 ^{ème}	9542, Cell Signaling
Tubuline	IgG monoclonal, lapin	Ac I	1/1000 ^{ème}	T9026
Vitronectine	IgG polyclonal de lapin	Ac I	1/1000 ^{ème}	681125, Merck
IgG de lapin (Peroxydase)	Singe	Ac II	1/5000 ^{ème}	NA934V, GE-Healthcare
IgG de souris (Peroxydase)	Mouton		1/5000 ^{ème}	NA931V, GE-Healthcare

Anticorps pour immunomarquage fluorescent

Cible	Hôte	Type	Dilution	Références
Vitronectine	IgM monoclonal, souris	Ac I	1/50 ^{ème}	V7881, Sigma-Aldrich
Fibronectine	IgM polyclonal, lapin	Ac I	1/50 ^{ème}	F3648, Sigma-Aldrich
Laminine	IgG polyclonal, lapin	Ac I	1/50 ^{ème}	L9393, Sigma-Aldrich
Collagène IV	IgM monoclonal, souris	Ac I	1/50 ^{ème}	C1926, Sigma-Aldrich
Fibrinogène	Ig polyclonal, souris	Ac I	1/50 ^{ème}	a0080, DAKO
Fibronectine – Alexa 568			20µg/mL	Alexa 568 (Invitrogen)
IgG de lapin (TRITC)	Polyclonal, Chèvre	Ac II	1/50 ^{ème}	T6778, Sigma-Aldrich
IgG lapin (Alexa 555)	IgG polyclonal, Chèvre	Ac II	1/500 ^{ème}	A21428, Invitrogen
IgM de souris (FITC)	Chèvre	Ac II	1/50 ^{ème}	F9259, Sigma-Aldrich

Matériel utilisés pour immunomarquage fluorescent

Produits	Références
DAPI	D9542, Sigma
Phalloïdine	p5282, Sigma
Prolong Gold Antifade Reagent	p36930, Invitrogen

Kits

Produits	Références
BCA protein assay kit	B9643/C2284, Sigma Aldrich
Aspase-3 Colorimetric Assay Kit	K106, Biovision
Coulter DNA Prep Reagent	6607055, Beckman Coulter
Glucose RTU TM	61269, Biomérieux
Cell proliferation Kit II, XTT	1146501500, Roche
Immobilon TM Western	WBKL0500, Millipore
Silver Stain kit	1610443, Bio-Rad

Réactifs de biochimie

Produits	Références
Acide acétique	20104.298, Prolabo
Acrylamide en solution (40 %)	A4989, Applichem
Billes de Gélatine	Gelatin sepharose TM 4B, GE Healthcare
Billes d'Héparine	Heparin sepharose TM 6 fast flow, GE Healthcare
Cristal Violet	C0775, Sigma
EDTA	111 YR, Prolabo
Film photographique	Amersham Biosciences
Glutaraldéhyde	G-400-4, Sigma
Glycine	161-0724, Biorad
HEPES	7365-45-9, Fisher-Scientific
Hyperfilm TM ECL	28906836, Amersham
Methanol	20864.320, Prolabo

NaCl	7647-14-5, Fisher-Scientific
Nitrocellulose blotting membrane	10600004, Amersham
PMSF	P7626, Sigma
Precision Plus Protein All blue standard	161-0373, Biorad
SDS	BP1311-200, Fisher-Scientific
Tris	77-86-1, Prolabo
Triton-X100	BP151-500, Fisher-Scientific
Tween-20	P1379, Sigma-Aldrich
Urée	57-13-6, Prolabo

Appareils

Appareils	Références
Caméra de chemoluminescence	LAS 500, GE-Healthcare
Chromatographie d'affinité	AKTA Purifier 10 UPC, GE Healthcare
Cytomètre de flux	EPICS XL, Beckman Coulter
Densitomètre	GS-800, Biorad
Microscope confocal	Zeiss LSM710, Carl Zeiss Equipé 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
Spectrophomètre à fluorescence	Perkin Elmer LS 50B, Waltham Equipé d'un porte cuve thermostaté

Logiciels

Logiciels	Références
Expo32	Beckman Coulter
Image J	National Institutes of Health

Présentation des résultats

A. Présentation de l'étude

Comme décrit dans la partie bibliographique du manuscrit, le cancer ovarien est une pathologie grave et insidieuse diagnostiquée tardivement à un stade pour lequel le taux de survie à 5 ans demeure inférieur à 30 %. Même si les traitements combinant chirurgie et chimiothérapie permettent d'obtenir une réponse initiale correcte (de l'ordre de 80 %), plus des 3/4 des patientes atteintes de cancers de l'ovaire rechutent, en raison notamment de la propension des cellules cancéreuses ovariennes à disséminer dans la cavité abdominale et à développer une chimiorésistance. Les mécanismes sous-jacents à l'acquisition d'un phénotype propice à la récurrence restent peu connus.

Dans la physiopathologie des carcinomes ovariens, la composante «micro-environnementale» est particulièrement importante, en raison notamment du développement multi-sites de ces cancers. Les cellules cancéreuses ovariennes colonisent l'ovaire dans un premier temps, puis les organes avoisinants. De plus, les cellules s'exfolient à partir du foyer primaire sous forme d'amas multicellulaires appelés sphéroïdes. Ces sphéroïdes ont la capacité de survivre «en suspension», indépendamment d'un ancrage classique à la matrice extracellulaire et facilitent la formation de métastases au niveau du mésothélium péritonéal tapissant la cavité abdominale. D'autre part, au moment du diagnostic, plus d'un tiers des patientes présente une accumulation de liquide inflammatoire, l'ascite, dans la cavité abdominale. L'ascite, semble être un véritable élément «conspirateur» du développement tumoral ovarien. Elle pourrait constituer un microenvironnement permissif pour les cellules cancéreuses ovariennes. Les cellules cancéreuses peuvent être véhiculées *via* ce liquide jusqu'aux parois du péritoine qui tapissent la cavité abdominale et les coloniser. L'ascite contient différents facteurs bioactifs tels des facteurs de croissance, des protéases et aussi des protéines de la matrice extracellulaire. A ce titre, elle représente donc un microenvironnement tumoral unique en raison de son caractère fluide et de son accessibilité par ponction. Cependant, la relation entre ascite et récurrence reste matière à débat.

Les travaux antérieurs menés au sein du groupe MEC-uP ont démontré l'importance de protéines de la matrice extracellulaire et de leurs récepteurs d'adhérence spécifiques dans le comportement des cellules cancéreuses ovariennes. Pour faire suite à ces travaux, l'hypothèse selon laquelle l'ascite et les éléments bioactifs contenus dans ces ascites, notamment des protéines matricielles ascitiques comme la fibronectine et la vitronectine, auraient un impact sur les cellules favorisant leur dissémination et leur résistance, nous est apparue comme une piste de recherche à explorer.

Ainsi, **l'objectif de l'étude** est de contribuer à améliorer les connaissances sur les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses ovariennes acquièrent un phénotype propice à la récurrence en

étudiant le rôle qu'exercent l'ascite et les protéines matricielles ascitiques sur les cellules. Dans ce cadre, il a été nécessaire *i)* de mettre au point des conditions expérimentales d'étude *in vitro* de l'influence de l'ascite et des molécules matricielles qu'elle contient sur le comportement des cellules cancéreuses ovariennes dans des modèles d'études pertinents ; *ii)* d'analyser plus particulièrement l'impact d'ascites prélevées chez des patientes atteintes de tumeurs ovariennes sur l'expression d'un phénotype propice à la récurrence des cancers de l'ovaire. Nous avons focalisé notre attention sur les comportements cellulaires liés à la dissémination et sur la capacité des cellules à résister aux traitements thérapeutiques ; *iii)* dans une moindre mesure, de poursuivre la caractérisation biochimique de protéines matricielles préalablement purifiées à partir d'ascites (selon un protocole mis au point et publié par notre groupe (Carduner et al. 2013) et l'étude de leur influence sur les comportements cellulaires.

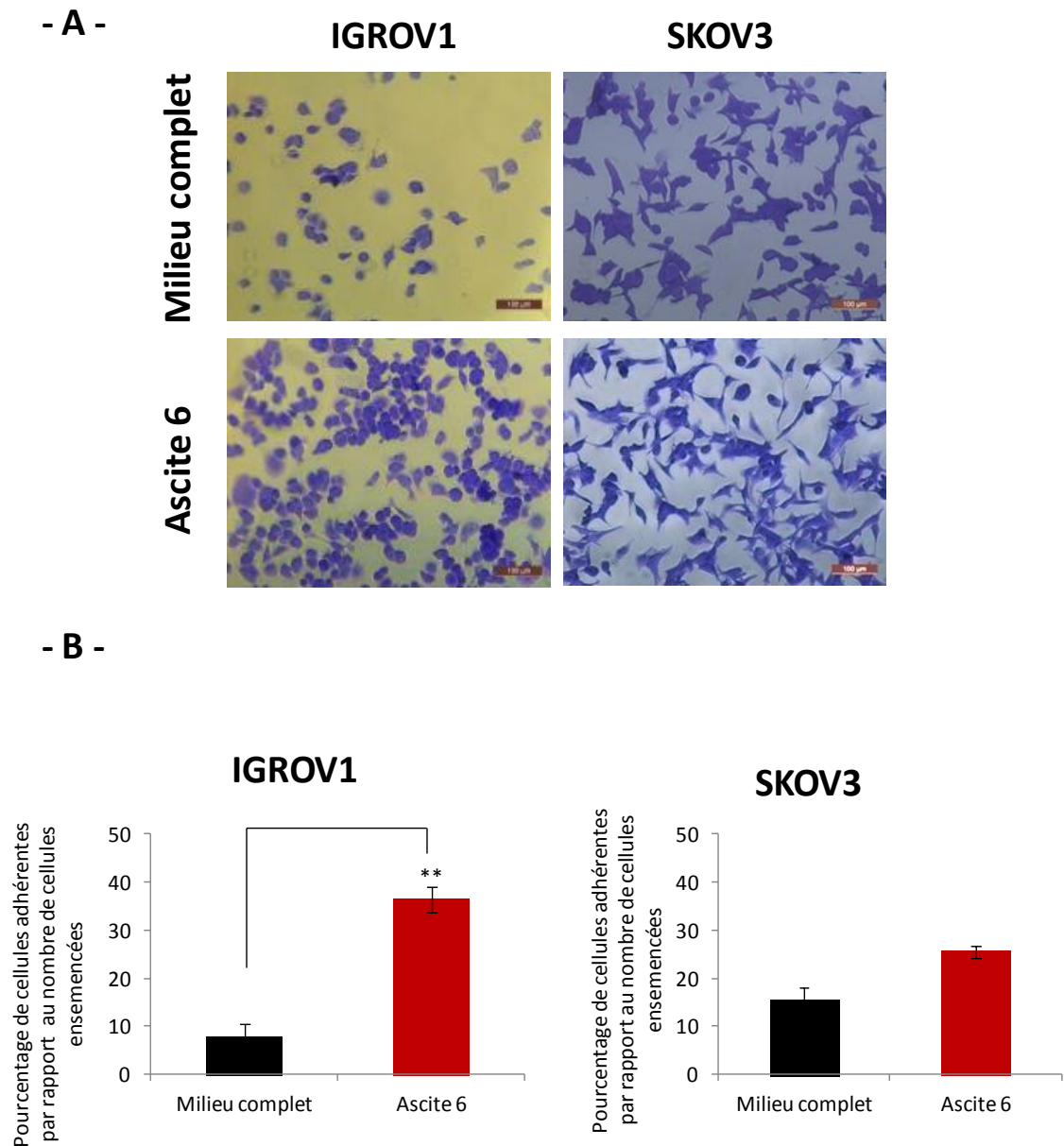


Figure 66: Impact de l'ascite sur l'adhérence cellulaire. 20 000 cellules ont été ensemencées et incubées pendant 2 h sur un revêtement de milieu complet ou d'ascite (Ascite 6). (A) La morphologie des cellules a été observée à l'issue du test d'adhérence, après fixation et coloration au cristal violet. (B) Après la lyse des cellules, l'absorbance a été mesurée à 595 nm et le pourcentage de cellules adhérentes a été estimé par rapport à un contrôle d'ensemencement. Les barres d'échelle représentent 100 μm. **p<0,01.

B. Présentation des résultats

I. Les ascites et la matrice extracellulaire ascitique favorisent la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes

L'objet de ce volet expérimental est d'estimer l'impact d'un milieu ascitique sur le comportement de deux lignées d'adénocarcinomes ovariens (en comparaison avec les conditions de culture classiques en milieu complet).

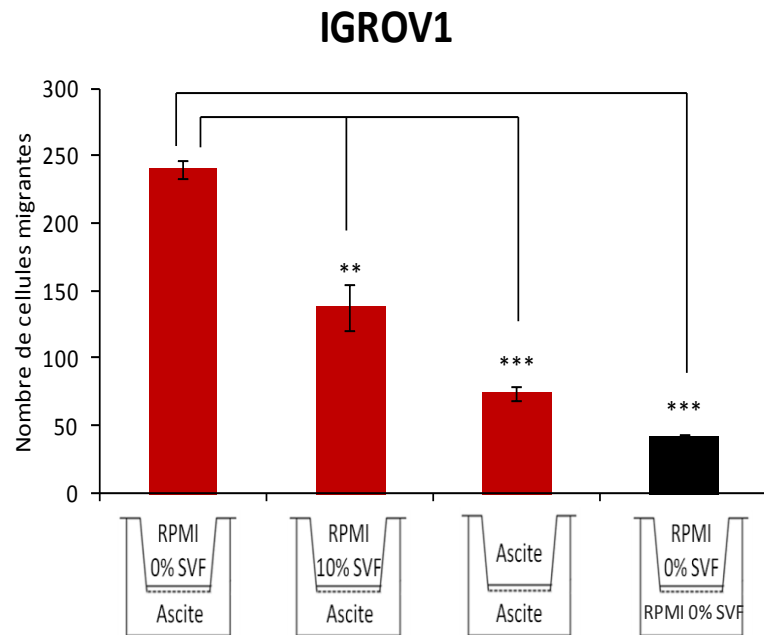
I.1. Impact de l'ascite sur l'adhérence et la migration cellulaire

Lors du processus de dissémination à travers la cavité péritonéale, les cellules cancéreuses ovariennes exfoliées du foyer primaire sont amenées à adhérer sur les parois de la cavité péritonéale, le « mésothélium péritonéal ». Ce mode de propagation atypique a lieu au sein de l'ascite présente dans la cavité péritonéale. Ainsi, la question sous-jacente à ce phénomène est : quel est l'impact de ce microenvironnement ascitique sur l'adhérence des cellules cancéreuses ?

Pour tenter de répondre à cette question, des tests d'adhérence ont été réalisés. Les cellules IGROV1 et SKOV3 (deux lignées d'adénocarcinome ovarien humain) ont étéensemencées dans des puits de plaque de culture dans lesquels de l'ascite ou du milieu de culture complet (RPMI 10 % SVF) ont été placés au préalable pour créer des revêtements (coating) au fond des puits. 2 h après l'ensemencement des cellules, les cellules adhérentes ont été fixées et le pourcentage de cellules adhérentes estimé.

L'observation des cellules lors du test d'adhérence met en évidence des différences de morphologie entre les cellules IGROV1 et SKOV3. En effet, les cellules IGROV1 présentent une morphologie épithéliale, tandis que les cellules SKOV3 présentent un phénotype similaire aux fibroblastes, ce qui illustre l'hétérogénéité des cellules cancéreuses ovariennes. Lorsque les cellules IGROV1 sont cultivées sur les revêtements de milieu complet ou d'ascite, elles conservent la même morphologie. En revanche, la proportion de cellules SKOV3 présentant une morphologie plus étalée augmente (**Figure 66A**). En termes d'adhérence et en 2 h, peu de cellules IGROV1 (8 %) sont capables d'adhérer sur un revêtement de milieu complet, alors que sur le revêtement d'ascite, plus de 30 % des cellules sont capables d'adhérer. Les cellules SKOV3 adhèrent sur les revêtements de milieu complet et d'ascite sans différence significative (16 % de cellules adhérentes sur le revêtement de milieu complet et 26 % de cellules adhérentes sur le revêtement d'ascite) (**Figure 66B**).

- A -



- B -

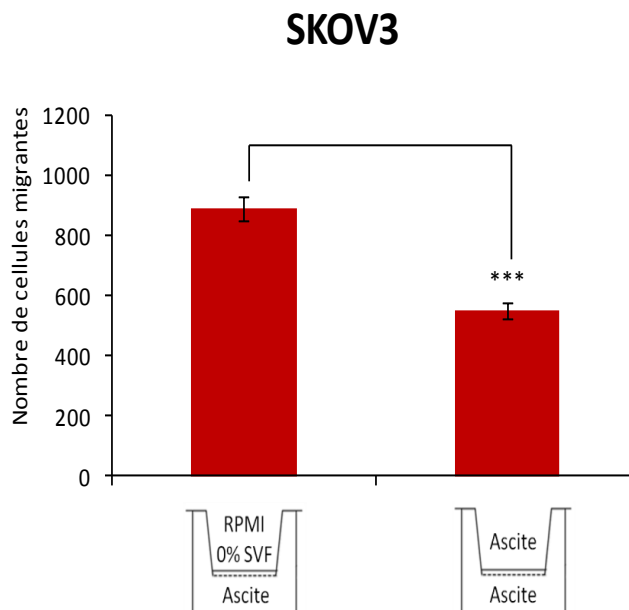


Figure 67: Impact de l'ascite sur la migration cellulaire. 50 000 cellules IGROV1 (A) ou SKOV3 (B) ont été incubées en présence de milieu seul, de milieu complet ou en ascites (moyenne des expériences réalisées avec les Ascites 6 et 8) dans les compartiments supérieurs des chambres de Boyden pendant 6 h. Au préalable, les compartiments inférieurs ont été pré-incubés en ascites. A l'issue des 6 h d'incubation, les cellules ayant migré entre les deux compartiments ont été fixées, colorées et comptées. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$

La **Figure 66** illustre l'impact d'une ascite prélevée chez une patiente atteinte d'adénocarcinome ovarien sur les capacités adhésives des cellules cancéreuses IGROV1 et SKOV3. Ce résultat reflète celui obtenu avec d'autres ascites.

Outre l'ancrage, la capacité des cellules cancéreuses ovariennes à migrer à partir de leurs sites primaires ou secondaires sur des organes ou tissus avoisinants constitue également un élément clef de la dissémination. L'ascite est-elle un microenvironnement propice à la migration cellulaire ?

La capacité des cellules à migrer en présence de milieu complet ou d'ascite a été évaluée par la technique des « chambres de Boyden » (Illustration d'une chambre de Boyden, **Figure 67**). La chimio-attractivité de l'ascite « *versus* » du milieu de culture seul (RPMI 0 % SVF) ou du milieu complet (RPMI 10 % SVF) a été testée.

Lorsque les cellules IGROV1 sontensemencées en milieu de culture seul (compartiment supérieur), 250 cellules migrent de ce milieu vers le compartiment inférieur contenant de l'ascite. Ce nombre diminue lorsque les cellules sont cultivées en milieu complet. En effet, 135 cellules sont capables de migrer du compartiment supérieur des chambres de Boyden vers le compartiment inférieur contenant de l'ascite. Enfin, 60 cellules migrent entre les 2 compartiments quand les cellules sontensemencées en ascite. Seules 42 cellules IGROV1 migrent du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur quand du milieu de culture seul se trouve dans les deux compartiments. Il s'agit dans ce cas d'une migration aléatoire. (**Figure 67A**). L'ascite, exerce donc un effet chimio-attractif sur les cellules IGROV1 et stimule leur capacité à migrer. L'ascite semble également stimuler la mobilité des cellules comme en témoigne la migration estimée en condition ascite – ascite.

La capacité à migrer des cellules SKOV3 est également influencée par l'ascite comme montré dans la **Figure 67B**. Le nombre de cellules migrantes passe de 850 à 570 lorsqu'elles sontensemencées dans le milieu de culture seul ou dans l'ascite, respectivement. L'ascite exerce un effet chimio-attractif sur les cellules SKOV3. Leur capacité à migrer est amplifiée quand elles sont attirées par ce microenvironnement.

L'ascite favorise la migration individuelle des cellules cancéreuses ovariennes, certainement par un effet chimio-attractif. Ces résultats ont pu être reproduits en utilisant différentes ascites provenant de patientes différentes. Par ailleurs, nous avons également démontré dans une étude antérieure et par vidéo-microscopie que les ascites favorisent également la migration collective des cellules (Carduner, et al. 2014b).

Conclusion I.1 : L'**ascite** peut être considérée comme un **microenvironnement permissif** favorisant l'**adhérence** et la **migration** des cellules cancéreuses ovariennes, deux **étapes clefs** de la **dissémination tumorale**.

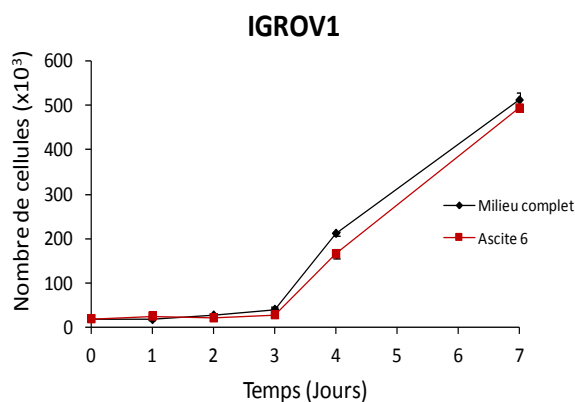
I.2. Impact de l'ascite sur la prolifération cellulaire

L'une des étapes clés de la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes est leur capacité à proliférer, que cela soit au niveau de leur site primaire ou de leur site secondaire. Ainsi, les capacités prolifératives des cellules IGROV1 et SKOV3 en condition ascitique ont été mesurées afin de déterminer si ce microenvironnement est également propice à la prolifération des cellules.

Par comptage cellulaire suite à un test d'exclusion au bleu trypan, il est démontré que les cellules IGROV1 prolifèrent aussi bien en milieu complet qu'en condition ascitique avec un temps de doublement calculé de 24 h environ (**Figure 68A**). De manière similaire, les cellules SKOV3 ont un comportement prolifératif semblable lorsqu'elles sont cultivées en ascite ou en milieu complet. Leur temps de doublement a été estimé à 30 h (**Figure 68B**).

Néanmoins, il est à noter que même si ce profil prolifératif est semblable pour la majorité des ascites testées, dans certains cas, la prolifération cellulaire peut-être ralentie et le temps de doublement diffère (delta de 2 h environ) entre les 2 conditions de culture (données non montrées).

- A -



- B -

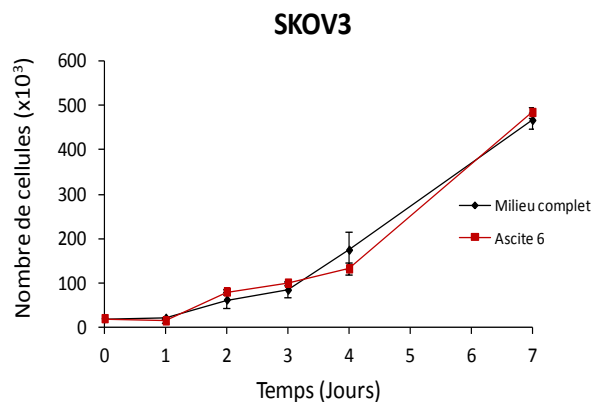
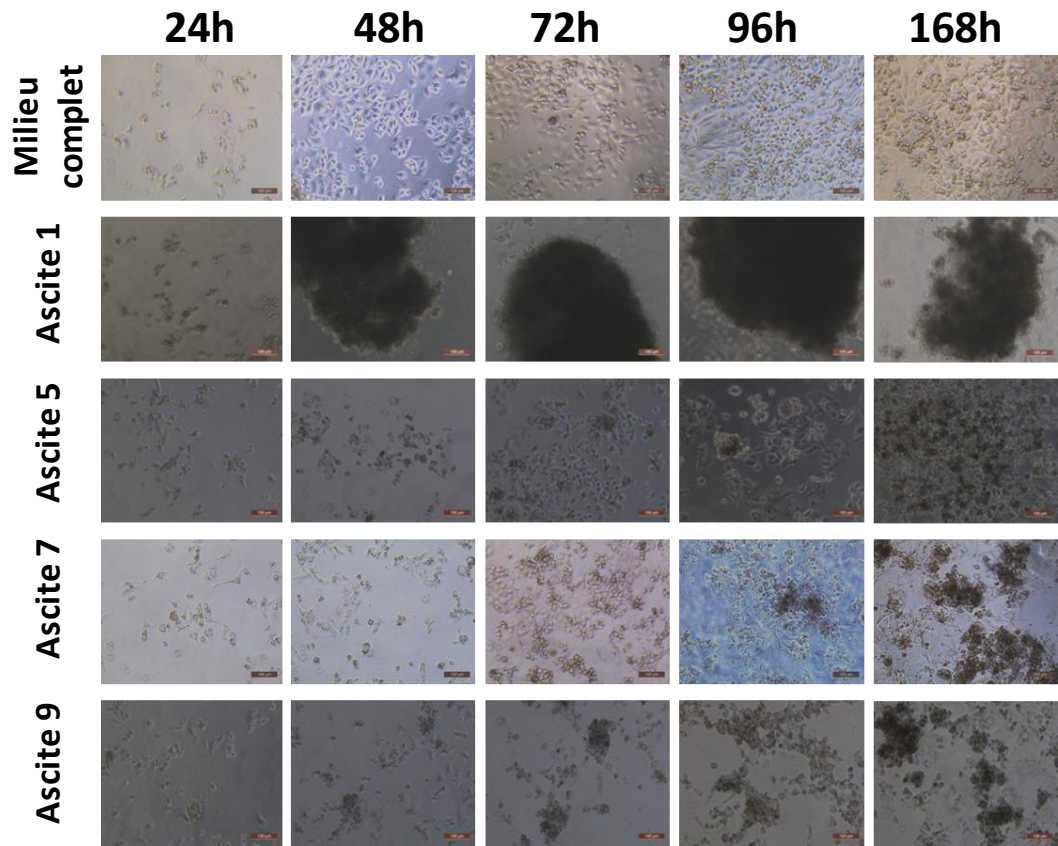


Figure 68: Impact de l'ascite sur la prolifération cellulaire. 20 000 cellules IGROV1 (A) ou SKOV3 (B) ont été ensemencées en milieu complet ou en ascite (Ascite 6) pendant 7 jours. Des comptages ont été réalisés à des temps précis afin d'évaluer la permissivité de l'ascite sur la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes.

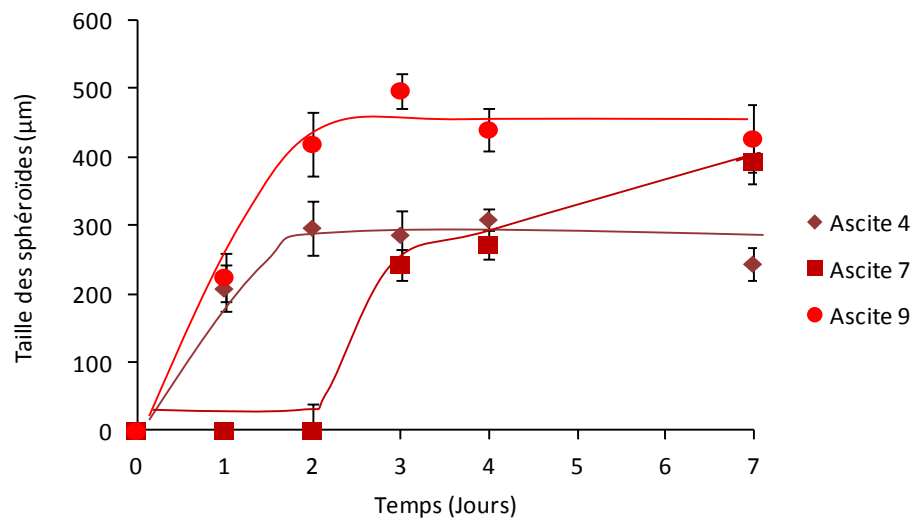
I.2.1. Formation spontanée de sphéroïdes par les cellules IGROV1

Lors des tests de prolifération, l'observation des cellules IGROV1 adhérentes cultivées en condition ascitique montre la formation d'amas multicellulaires, également appelés sphéroïdes, après 24 h de culture. Cette formation spontanée de sphéroïdes par les cellules IGROV1 a été constatée dans différents liquides d'ascites provenant de différentes patientes (**Figure 69A**).

- A -



- B -



Selon les ascites testées, la formation spontanée de sphéroïdes est plus ou moins rapide. Une fois formés, les sphéroïdes atteignent une taille limite qui diffère en fonction des ascites (**Figure 69B**). La culture de ces cellules en milieu complet ne permet pas la formation de sphéroïdes de façon spontanée dans les premiers temps de culture. Néanmoins, cette formation apparaît lorsque les cellules « arrivent » à confluence, les sphéroïdes sont néanmoins moins « compacts » et moins gros qu'en condition ascitique (**Figure 69C**).

- C -

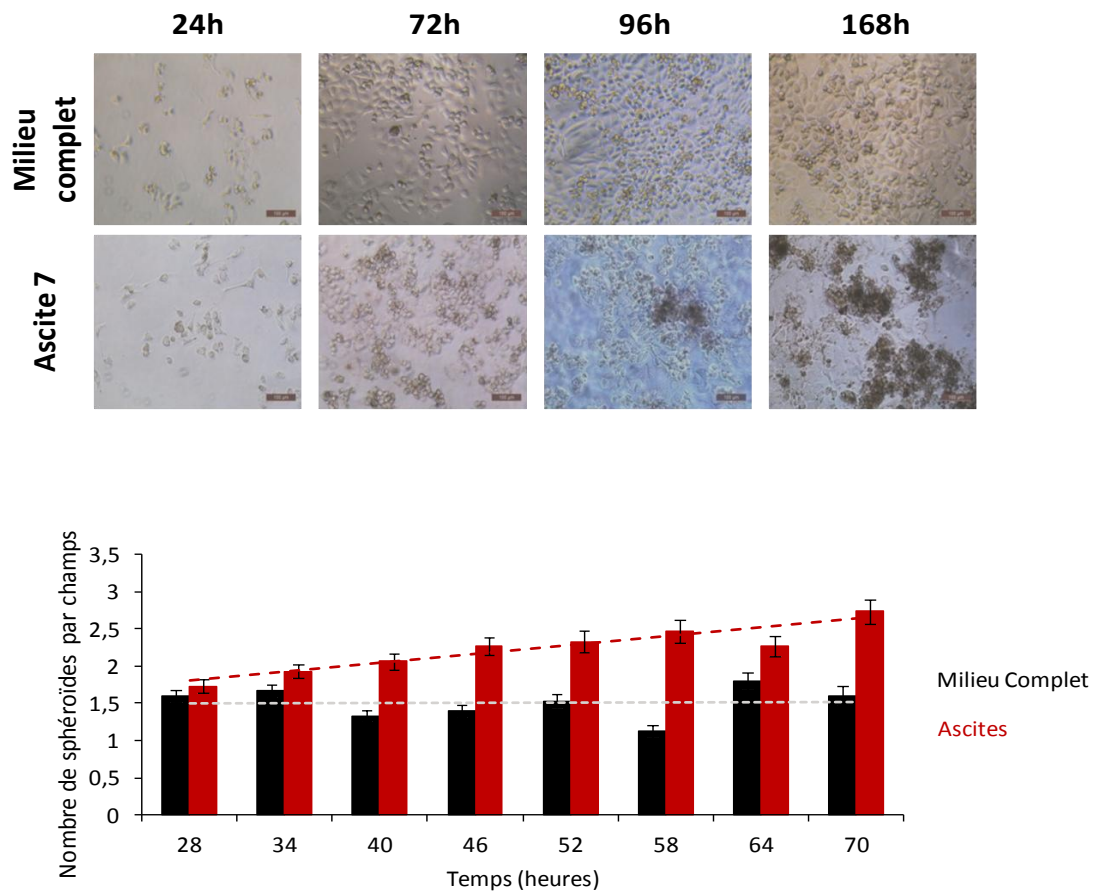


Figure 69: Impact de l'ascite sur la formation spontanée de sphéroïdes d'IGROV1. 20 000 cellules IGROV1 ont étéensemencées dans différentes ascites pendant 7 jours. La cinétique de formation des sphéroïdes a été suivie à des temps précis (A) et les tailles des sphéroïdes ont été déterminées en fonction du temps dans différentes ascites (B). La différence entre une ascite et le milieu complet est représentée en (C). Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

Il semblerait que ce comportement ne soit pas transposable à toutes les lignées cellulaires cancéreuses ovariennes, dès lors que les cellules SKOV3 ne forment pas de sphéroïdes de façon spontanée, que cela soit dans les premiers temps de culture ou lorsque les cellules « arrivent » à confluence, en condition classique de culture ou en condition ascitique. En revanche, la présence d'ascite engendre des modifications de la morphologie des cellules SKOV3.

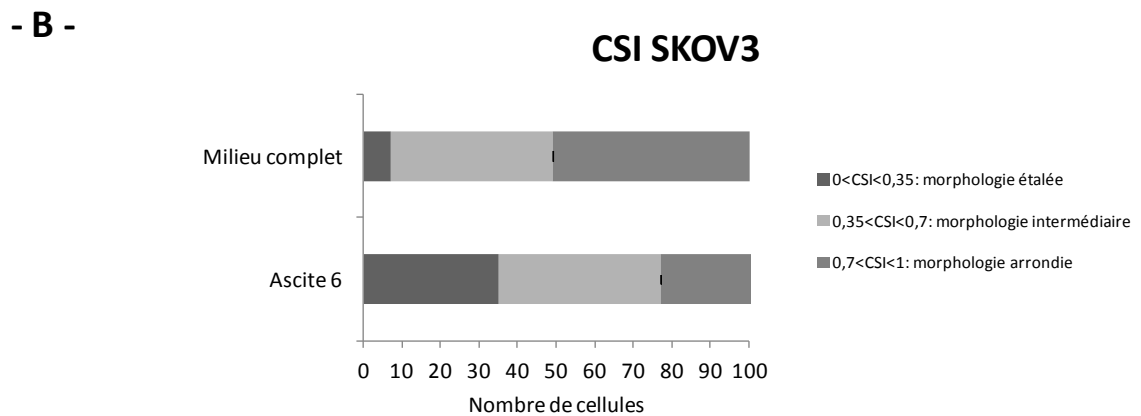
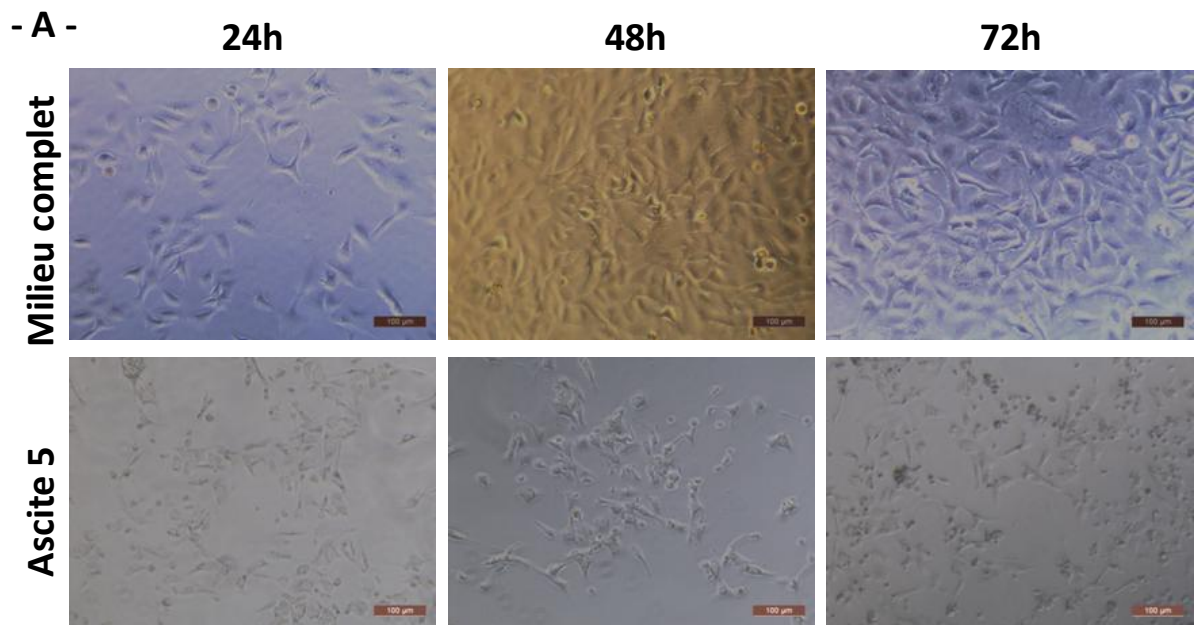


Figure 70: Impact de l'ascite sur la modification de morphologie des cellules SKOV3. 20 000 cellules SKOV3 ont étéensemencées en condition ascitique pendant 7 jours (Ascite 5). (A) Les changements de morphologie des cellules SKOV3 ont été suivis à des temps précis. (B) L'index de morphologie cellulaire a été déterminé après adhérence des cellules sur des revêtements de milieu complet ou d'ascite (Ascite 6). Les barres d'échelle représentent 100 μm .

I.2.2. Modification de la morphologie des cellules SKOV3

Les cellules SKOV3 cultivées en ascites subissent des changements morphologiques. Dès 24 h de culture, les cellules s'étalent d'avantage et forment des extensions cytoplasmiques de type cytonèmes (**Figure 70A**). Ces modifications de morphologie ont été observées dans différentes ascites tout au long des 72 h de culture.

La morphologie des cellules peut-être décrite par un index morphologique (Cell Shape Index : CSI) qui mesure le rapport de l'aire et du périmètre des cellules. Un index de morphologie compris entre 0 et 0,35 indique que les cellules sont étalées. Au contraire, un index de morphologie compris entre 0,7 et 1 indique que les cellules ont une morphologie arrondie. Entre ces deux intervalles, pour les index de morphologie compris entre 0,35 et 0,7, les cellules ont une morphologie dite intermédiaire.

Ainsi, en condition de culture classique, après 2 h d'incubation, 7 % des cellules SKOV3 ont une morphologie étalée, 20 % ont une morphologie intermédiaire et 65 % des cellules adoptent une conformation ronde. En condition ascitique, 35 % des cellules SKOV3 ont une morphologie étalée, 45 % des cellules ont une morphologie intermédiaire et 20 % sont rondes (**Figure 70B**).

Les modifications de morphologie constatées reflètent une transition épithélio-mésenchymateuses (TEM) des cellules SKOV3 en condition ascitique et confirment les travaux antérieurs du laboratoire (Carduner, et al. 2014b).

Conclusions I.2 : - L'ascite est un **microenvironnement permissif** à la **prolifération** des cellules cancéreuses ovariennes. Le **temps de doublement** des cellules est **proche** lorsqu'on compare la culture en **condition classique** ou en **condition ascitique**.

- Les ascites induisent la **formation spontanée de sphéroïdes** de cellules **IGROV1**. Les **cinétiques de formation** et les **tailles des sphéroïdes** sont **variables** et dépendent des ascites utilisées.

- Les ascites induisent une **modification de morphologie** des cellules cancéreuses **SKOV3**, confirmant un processus de **transition épithélio-mésenchymateuse** en condition ascitique.

Cette différence de comportement influencée par les ascites illustre l'hétérogénéité des cellules cancéreuses ovariennes et de leur réponse à leur microenvironnement. Tandis que les cellules IGROV1 forment des agrégats multicellulaires, les cellules SKOV3 tendent vers un phénotype mésenchymateux. Comme indiquées dans la section « Matériel et Méthodes » (Cf page 74), les différences obtenues lors de nos expérimentations, entre les cellules IGROV1 et SKOV3, peuvent provenir du fait que les cellules IGROV1 sont issues d'un foyer tumoral primaire d'une patiente, tandis que les cellules SKOV3 ont été prélevées à partir d'une ascite.

En résumé, l'ascite est un microenvironnement favorable à l'adhérence, à la migration et à la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes. La formation de sphéroïdes et la transition épithélio-mésenchymateuse induite par l'ascite sont des étapes nécessaires, ou du moins illustrant, la dissémination de ces cellules. L'ensemble de ces résultats permet de considérer l'ascite comme un microenvironnement tumoral particulier favorisant la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes.

I.3. Caractérisation du phénotype des sphéroïdes en milieu complet

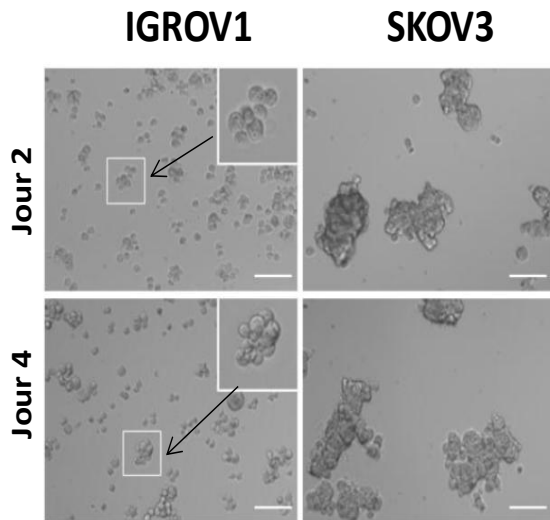
I.3.1. Obtention et caractérisation des sphéroïdes tumoraux

L'agrégation cellulaire (formation de sphéroïdes) et la transition épithélio-mésenchymateuse sont décrites comme étant des mécanismes de résistance à l'anoïkis (Taddei et al. 2012).

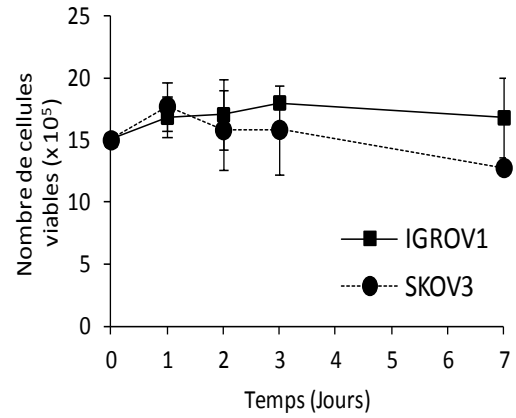
La formation spontanée de sphéroïdes par les cellules IGROV1 lorsqu'elles sont cultivées en conditions ascitiques est intrigante et intéressante dans la mesure où la formation de telles structures a également lieu lors de l'exfoliation des cellules cancéreuses à partir de l'épithélium ovarien de surface vers la cavité péritonéale. Cette formation spontanée de sphéroïdes d'IGROV1 pourrait souligner la capacité des cellules à résister à l'anoïkis tout comme la transition épithélio-mésenchymateuse observée chez les cellules SKOV3 cultivées en ascite. Ainsi, nous avons souhaité approfondir cette donnée et tenter de définir quels sont les mécanismes moléculaires permettant cette résistance.

Les cellules IGROV1 et SKOV3 ont donc été cultivées sur un substrat non-adhésif afin d'étudier leur capacité à résister à l'anoïkis. Dans ces conditions de culture les cellules forment des sphéroïdes. Afin d'étudier ces paramètres, un modèle de culture permettant la culture des cellules en condition non-adhérente a donc été mis au point par notre groupe de recherche. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture classiques dont les parois ont été préalablement recouvertes d'agarose. Ce substrat non-adhésif empêche les cellules d'adhérer sur la surface de culture. Dans ces conditions les cellules IGROV1 et SKOV3 s'organisent en amas multicellulaires (AMC) ou sphéroïdes.

- A -



- B -



- C -

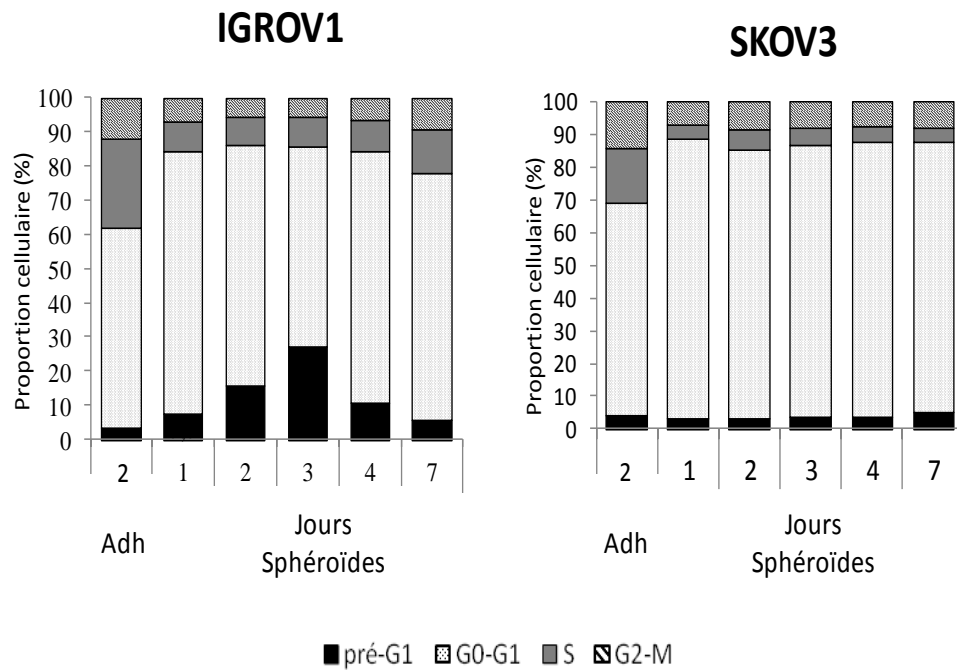


Figure 71: Obtention et caractérisation des sphéroïdes tumoraux. Un modèle de culture sur substrat non adhésif permet de cultiver les cellules cancéreuses ovariennes en condition non-adhérente. $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 ont été ensemencées en milieu de culture complet et (A) sont observées par microscopie optique, des photos sont prises à des temps précis. (B) Dans ces conditions de culture, le nombre de cellules viables est compté à des temps précis. (C) La répartition des cellules dans le cycle cellulaire est évaluée par cytométrie en flux. Adh: cellules adhérentes. Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

L. Carduner, C.R Picot, J. Leroy-Dudal, L. Blay, S. Kellouche, F. Carreiras. Cell cycle arrest or survival signaling through α integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. Exp. Cell Research, 2014

Ce modèle de culture a déjà été décrit précédemment par notre groupe (Kellouche et al. 2010). Dans ces conditions de culture, les cellules IGROV1 forment des sphéroïdes ayant une taille comprise entre 50 et 100 μm , alors que les cellules SKOV3 forment des agrégats qui peuvent atteindre 300 μm (**Figure 71A**). Dans certains cas, la majorité des cellules présentes dans le flacon de culture peuvent se regrouper et former un agrégat très volumineux. Ainsi, dans ces conditions de culture, les modèles cellulaires permettent la formation et l'obtention de sphéroïdes de cellules IGROV1 et SKOV3 en quantités suffisantes pour les étudier. Sur une période de 7 jours de culture, dans ces conditions « non-adhérentes », le nombre de cellules, IGROV1 ou SKOV3, reste stable (**Figure 71B**). Une proportion non négligeable de cellules résistent et survivent, ce qui permet de les étudier et de les caractériser.

L'étude de la répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire des cellules IGROV1 cultivées en condition non-adhérente et constituant les sphéroïdes, montre une variation du nombre de débris cellulaires et de corps apoptotiques en fonction du temps de culture (**Figure 71C**). En effet, la « quantification » du pic pré-G1 révèle une augmentation de 20 % après 3 jours de culture dans ces conditions. Toutefois, pour des durées de culture plus longues, jusqu'à 7 jours de culture, le pic pré-G1 diminue pour retrouver un niveau sensiblement identique au 1^{er} jour de culture et à la condition de culture témoin (cellules adhérentes), environ 5 %. Dans le cas des cellules SKOV3 cultivées en condition non-adhérente et formant donc des sphéroïdes, la proportion de débris cellulaires ou de corps apoptotiques, correspondant au pic pré-G1, est faible et stable tout au long de la période de culture. La proportion de cellules SKOV3 en pré-G1 dans ces conditions de culture est similaire à celle des cellules cultivées en condition de culture adhérente (**Figure 71C**).

La proportion de cellules dans les autres phases du cycle cellulaire varie également. Le pourcentage de cellules IGROV1 en phase G0/G1 augmente de 59 %, en condition adhérente, à 77 % en condition non-adhérente au 7^{ème} jour de culture. De manière similaire, cette proportion passe de 65 % en condition adhérente à 85 % au 7^{ème} jour de culture en condition non-adhérente pour les cellules SKOV3. Le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire diminue de 26 % au second jour de culture en condition adhérente, à 9 % en condition non-adhérente pour les cellules IGROV1. Dans le cas des cellules SKOV3 ces valeurs passent de 17 %, au second jour de culture en condition adhérente à 5 %, au 7^{ème} jour de culture en condition non-adhérente. Ces résultats suggèrent que les cellules IGROV1 s'adaptent aux conditions de culture inhabituelles après un laps de temps de 3 jours de culture, et résistent à la mort cellulaire malgré une absence d'ancrage. Ainsi, même si une population de cellules au sein des sphéroïdes semble s'engager vers une mort cellulaire, des cellules résistantes semblent être sélectionnées et un équilibre est ainsi créé entre la mort et la survie des cellules IGROV1 au sein des structures cellulaires de type sphéroïdes.

De plus, même si peu de cellules semblent être capables de répliquer leur ADN (Phase S), les cellules résistantes sont capables de survivre en absence d'ancrage, probablement grâce aux interactions intercellulaires qu'elles établissent. En revanche, les cellules SKOV3 ne semblent pas être affectées quand elles sont cultivées en absence d'ancrage (**Figure 71C**).

I.3.2. Caractérisation de la signalisation induite au sein des sphéroïdes tumoraux

- ***Activation du processus apoptotique (anoïkis) chez les cellules IGROV1***

Afin d'étudier les voies de signalisation de mort et de survie cellulaires activées en réponse à la perte d'ancrage des cellules, l'analyse du clivage de la protéine PARP (effecteur de l'apoptose) sur les cellules formant les sphéroïdes révélant l'activation d'une voie apoptotique a été réalisée. Ce clivage démontre la présence de cellules apoptotiques au sein des sphéroïdes (**Figure 72**).

Le clivage de la protéine PARP augmente du jour 1 au jour 4 puis diminue dans des temps de culture plus longs, dans le cas des cellules IGROV1. Aucun (ou un faible aux jours 3 et 4) clivage de la protéine PARP n'est détectable dans les cellules SKOV3 cultivées en condition non-adhérente (**Figure 72A haut**). L'activation de la caspase-3 est également un effecteur du processus apoptotique. La mesure de son activité dans les cellules IGROV1 et SKOV3 confirme les résultats observés dans les expériences précédentes (analyse du clivage de la protéine PARP). La culture de sphéroïdes de cellules IGROV1 entraîne l'activation des caspases-3 après 2 jours de culture. Ensuite, le niveau d'activité de ces protéases retourne à un état basal similaire à la condition adhérente, dans les temps plus longs. L'activité caspase-3 ne varie pas lorsque les cellules SKOV3 sont cultivées en condition non-adhérente par rapport à l'activité caspase-3 mesurée dans les cellules SKOV3 en condition adhérente (**Figure 72A bas**).

- ***Caractérisation de la signalisation de survie***

Selon la lignée cellulaire étudiée, « deux profils de signalisation » semblent donc être déclenchés :

- La formation de sphéroïdes d'IGROV1, lorsque les cellules sont cultivées sur un substrat non-adhésif, déclenche une « signalisation apoptotique » pour une partie des cellules constituant les sphéroïdes. L'apoptose engendrée par manque d'ancrage est appelée anoïkis. Après un délai de 2 jours environ, la proportion de cellules apoptotiques diminue.

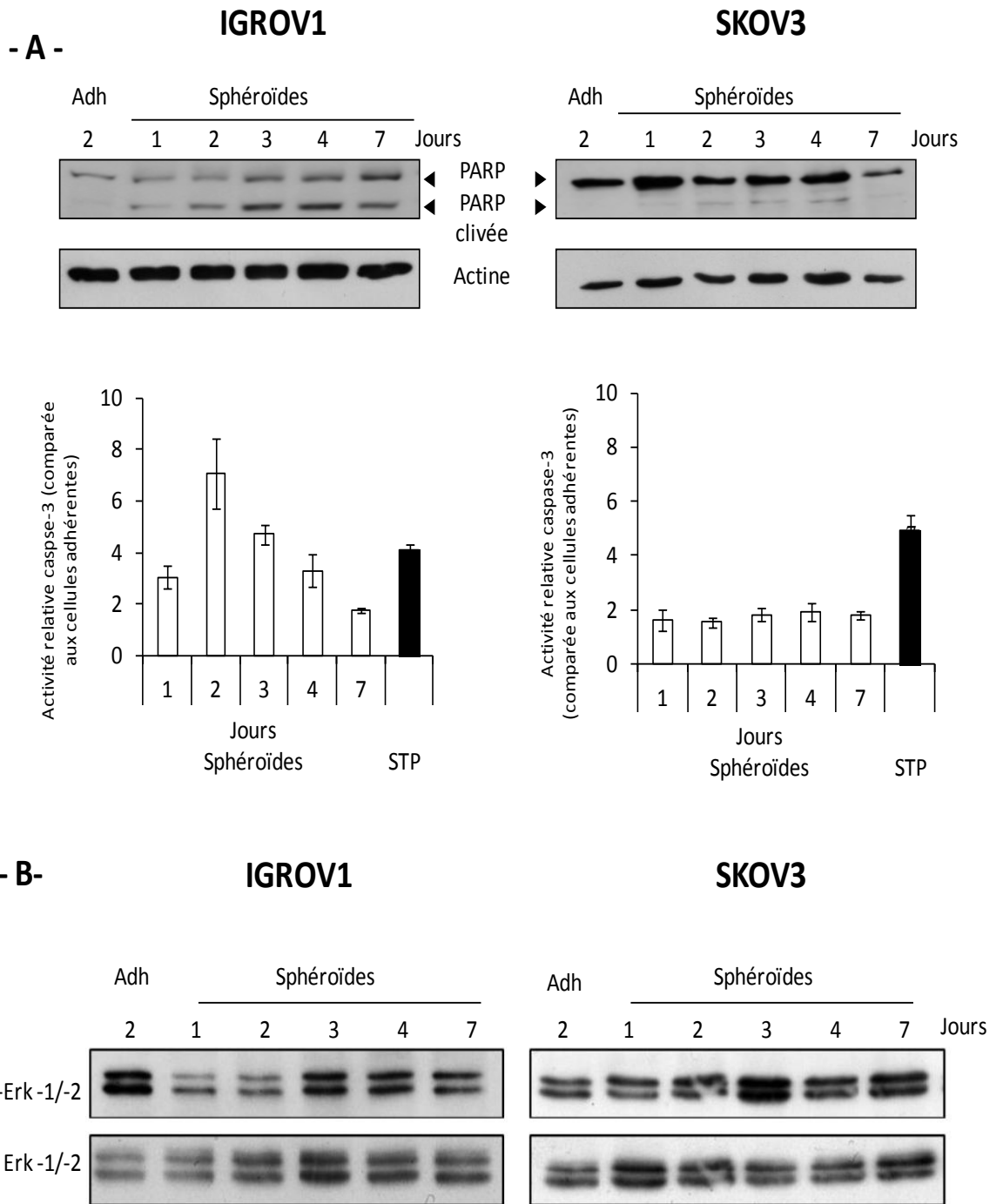


Figure 72: Caractérisation de la signalisation induite au sein des sphéroïdes tumoraux. (A) L'activation de l'apoptose est analysée en suivant le clivage de la protéine PARP par western-blot et l'activation des caspases-3, (B) tandis que la signalisation de survie est analysée en suivant la phosphorylation d'ERK-1/-2 par western-blot. Adh: cellules adhérentes, STP: staurosporine.

L. Carduner, C.R Picot, J. Leroy-Dudal, **L. Blay**, S. Kellouche, F. Carreiras. Cell cycle arrest or survival signaling through α integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. Exp. Cell Research, 2014

Le nombre total de cellules dans les boîtes de culture est stable. Il est envisageable qu'une faible fraction cellulaire meurt par apoptose tandis que les autres cellules résistent à celle-ci, prolifèrent ou ne progressent pas dans le cycle cellulaire (blocage en phase G0/G1).

- Le comportement des cellules SKOV3 en réponse à la culture en condition non-adhérente est différent. Peu de cellules SKOV3 entrent en apoptose par manque d'adhérence. On remarque que dès le jour 1 de culture en condition non-adhérente, la proportion de cellules en phase S diminue considérablement. Les cellules semblent être bloquées en phase G0/G1 du cycle (publication en annexe : (Carduner et al. 2014a)).

L'analyse de l'état de phosphorylation de Erk-1/-2 lors de la culture des cellules IGROV1 et SKOV3 suggère également deux comportements différents qui correspondent aux profils apoptotiques des cellules IGROV1 et à l'état de quiescence des cellules SKOV3. En effet, la phosphorylation de Erk-1/-2 dans les cellules IGROV1 diminue durant les 2 premiers jours de culture en condition non-adhérente, puis l'état de phosphorylation retourne à un état proche de celui des cellules cultivées en condition adhérente. L'inhibition de la phosphorylation de Erk-1/-2 dans les cellules IGROV1 conduit les cellules à l'apoptose lorsqu'elles sont cultivées en condition non-adhérente, suggérant que la résistance des cellules IGROV1 à l'anoïkis est dépendante de l'activation des MAP-Kinases (publication en annexe : (Carduner et al. 2014a)). L'état de phosphorylation de Erk-1/-2 dans les cellules SKOV3 ne varie pas lorsque les cellules sont cultivées en condition non-adhérente comparé à l'état de phosphorylation de Erk-1/-2 en condition adhérente (**Figure 72B**).

En résumé, l'absence d'adhérence conduit les cellules cancéreuses ovariennes à s'adapter. Cette adaptation implique la formation d'agrégats multicellulaires. Selon la lignée cancéreuse utilisée, deux types morphologiques d'agrégats multicellulaires distincts semblent être mis en évidence, des sphéroïdes relativement bien délimités (IGROV1) et des amas multicellulaires majoritairement moins uniformes (SKOV3). La survie de ces cellules est possible par une modification des voies de signalisation conduisant à la survie de ces cellules et/ou leur quiescence. Les résultats obtenus avec les sphéroïdes de cellules IGROV1 et en partie présentés dans ce manuscrit, révèlent l'importance des MAP-Kinases Erk-1/-2. Pour résister à la mort par apoptose engendrée par la perte d'ancrage (anoïkis), les cellules maintiennent une (des) signalisation(s) «de survie» pour compenser celle(s) de mort cellulaire engendrée(s) par la perte d'adhérence (**Figure 73** et publication en annexe). Ces résultats sont inclus dans la publication présentée en annexe et sont complétés par le fait que les signalisations « enclenchées » par les intégrines αv et l'activation des PKC convergent vers la phosphorylation d'Erk-1/-2 favorisant la survie cellulaire.

Une fois les sphéroïdes organisés, « l'arrêt » du cycle cellulaire est observé suite à la mise en place d'un état de quiescence. Ainsi, les cellules sont capables de survivre en attendant de retrouver un microenvironnement propice à leur adhérence. Les résultats de ce chapitre I-3 ont été publiés (voir publication en annexe)¹, néanmoins, l'ensemble des résultats de la publication n'est pas décrit dans le manuscrit. La **Figure 73** représente un schéma bilan d'une partie des résultats de la publication.

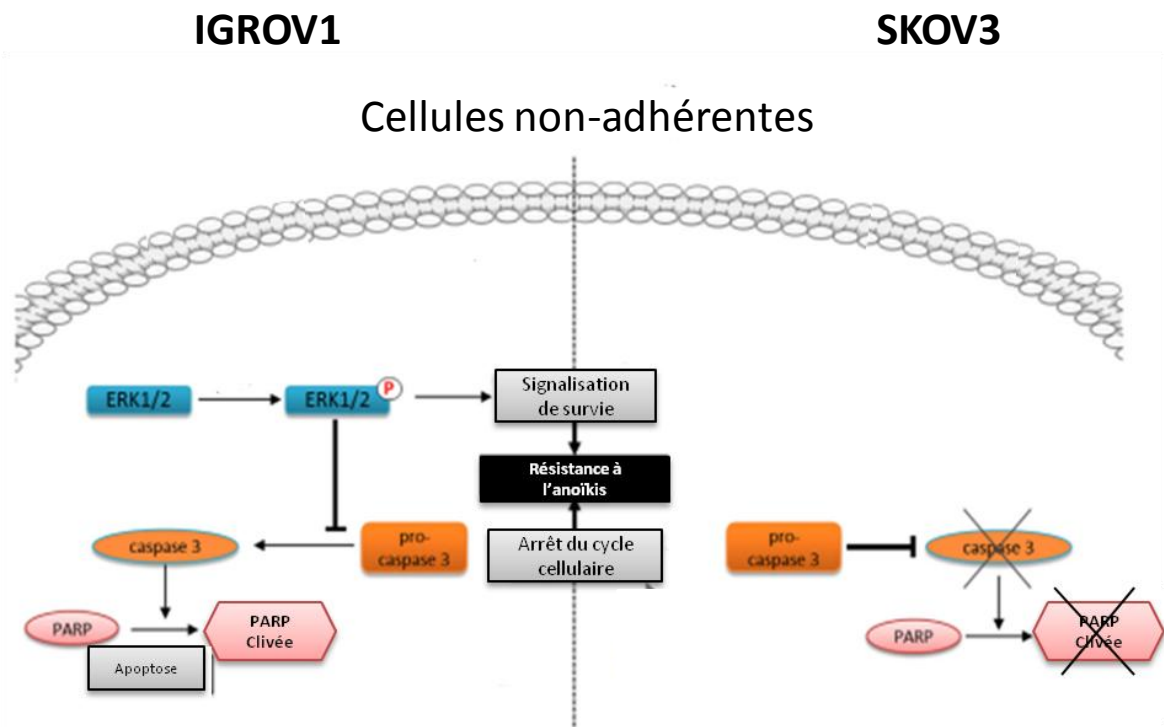


Figure 73: Schéma bilan illustrant les signalisations permettant la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses ovariennes organisées en sphéroïdes. Dans le cas des cellules IGROV1, la culture en condition non-adhérente induit une double signalisation d'apoptose et de survie. La résistance à l'anoïkis nécessite la phosphorylation d'Erk-1/-2. Une fois qu'Erk-1/-2 est activé, on observe une diminution du clivage de PARP et de l'activité caspase-3, ce qui indique que l'apoptose est inhibée. La perte d'ancrage induit une inhibition des marqueurs apoptotiques (clivage de PARP, activité des caspases-3) dans le cas des cellules SKOV3.

Conclusion I.3 : - En absence d'ancrage à un substrat adhésif, les cellules engagent un processus apoptotique (anoïkis) mais une fraction des cellules IGROV1 et SKOV3 sont capables de s'organiser en sphéroïdes et de survivre. Ce processus est induit par l'activation d'une signalisation de survie dépendante de l'activation des MAP-Kinases (Erk-1/-2).

¹ L. Carduner, C.R Picot, J. Leroy-Dudal, L. Blay, S. Kellouche, F. Carreiras. Cell cycle arrest or survival signaling through α integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. 3, 20, 329 – 342, Exp. Cell Research, 2014

I.4. Impact de l'ascite sur la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses

Comme mentionné précédemment, lors de la dissémination des cellules cancéreuses, les cellules exfoliées à partir de l'épithélium ovarien de surface se retrouvent en « suspension » au sein de la cavité abdominale et « baignent » dans l'ascite. Il est donc envisageable que ce liquide inflammatoire puisse impacter les changements cellulaires et moléculaires observés lors des cultures des modèles de sphéroïdes utilisés. Ainsi, afin de répondre à cette question et estimer l'impact des ascites sur les sphéroïdes, des cultures de cellules sur substrats non adhésifs ont été réalisées (comme précédemment) mais en condition ascitique de sorte d'obtenir des sphéroïdes « ascitiques ».

En ascites, les sphéroïdes générés pour les deux lignées cellulaires ont la même morphologie qu'en milieu de culture complet, néanmoins la taille des sphéroïdes d'IGROV1 est plus importante (environ 80 μm) (**Figure 74**).

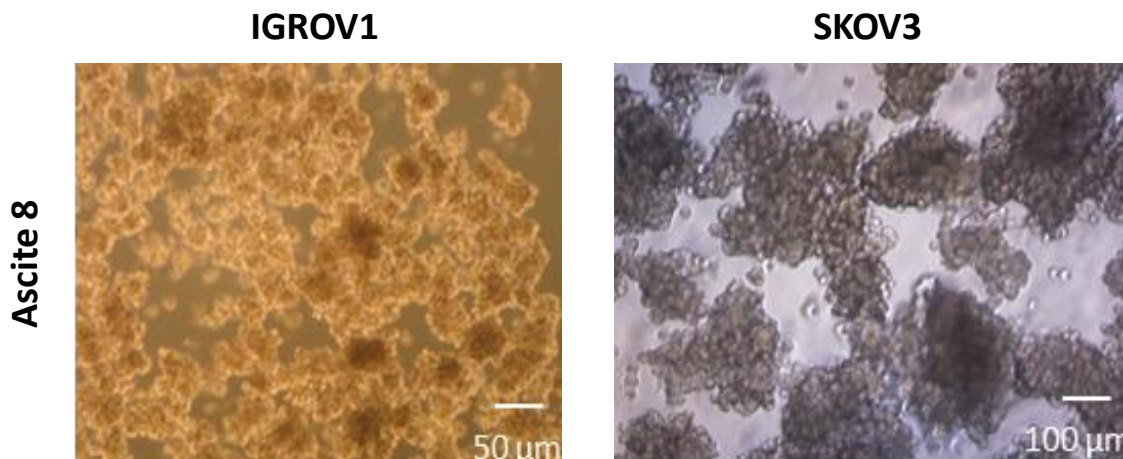


Figure 74: Impact de l'ascite sur la morphologie des sphéroïdes formés par les cellules IGROV1 et SKOV3. $1,5 \cdot 10^6$ cellules sont cultivées sur substrat non-adhésif pendant 3 jours en condition ascitique (Ascite 8). Les sphéroïdes sont observés par microscopie optique et des photos sont prises à l'issue du temps d'incubation, à savoir 15 jours de culture.

En milieu complet, les cellules IGROV1 et SKOV3 cultivées sur substrat non-adhésif génèrent des sphéroïdes tumoraux. Cependant, comme nous l'avons montré dans le paragraphe ci-dessus, une partie des cellules IGROV1 ne survivent pas dans de telles conditions de culture et déclenchent le processus d'anoïkis. En ascite, la survie des cellules IGROV1 formant ces sphéroïdes a été estimée par comptage cellulaire. Le nombre de cellules formant les sphéroïdes est stable durant les 2 premiers jours de culture et semble augmenter de 15 % (**Figure 75A**). De plus, la répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire des cellules IGROV1 formant les sphéroïdes a été suivie par cytométrie de flux au cours d'une cinétique de 4 jours. La proportion de cellules en pré-G1 varie peu entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour de culture. Une forte augmentation de la proportion de cellules en pré-G1 est observée à partir du 4^{ème} jour de culture (10 % à Jour 1 et 30 % à Jour 4).

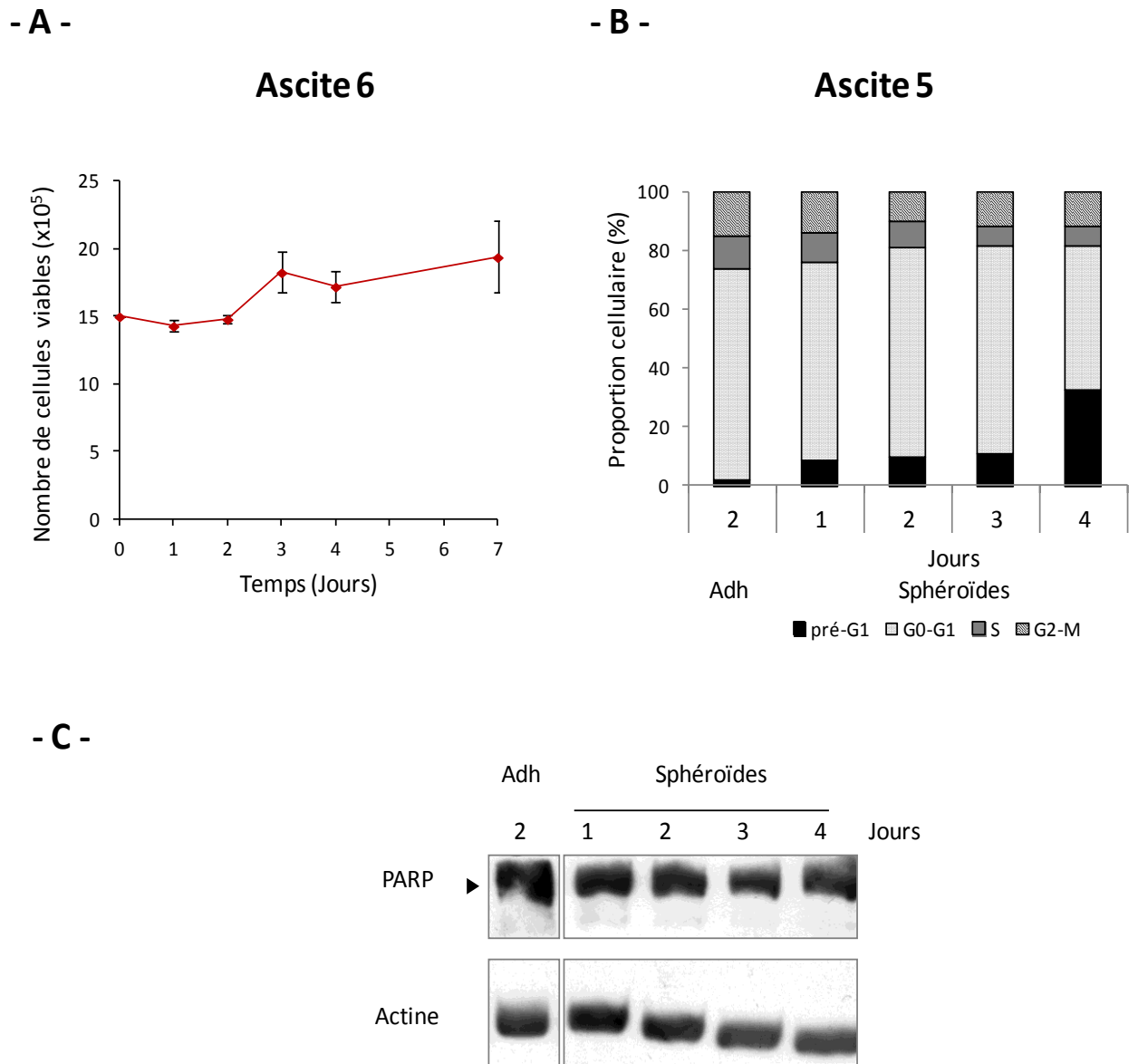


Figure 75: Impact de l'ascite sur la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses (IGROV1). $1,5 \cdot 10^6$ cellules sont cultivées sur substrat non-adhésif en condition ascitique (Ascite 6) pendant 7 jours. (A) Le nombre de cellules viables est déterminé par comptage à des temps précis. (B) La répartition des cellules dans le cycle cellulaire est analysée par cytométrie de flux. (C) La survie des cellules IGROV1 est analysée en ascite en suivant le clivage de la protéine PARP par western-Blot. Adh: Cellules adhérentes.

D'autre part, la proportion de cellules en pré-G1, en condition adhérente, reste inférieure à la proportion de cellules en pré-G1 en condition non-adhérente. En effet, seuls 2 % des cellules cultivées en condition adhérente sont en pré-G1 contre 10 % en condition non-adhérente dès le 1^{er} jour de culture (**Figure 75B**). La proportion de cellules en phase G0/G1 reste stable entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour (environ 69 %) puis diminue à partir du 4^{ème} jour (47 %). Une diminution de la prolifération est également observée à partir du 4^{ème} jour. En effet, le pourcentage de cellules en phase S passe de 11 (proportion similaire en condition adhérente après 2 jours de culture) à 6 % (**Figure 75B**).

Enfin le clivage de la protéine PARP au sein des sphéroïdes formés par les cellules IGROV1 cultivées en ascite, a été suivi par western-blot. Aucun clivage de la protéine PARP n'a été observé dans ces conditions (**Figure 75C**).

Les ascites semblent donc protéger les cellules formant les sphéroïdes de la mort cellulaire par anoïkis et favoriser leur survie dans les premiers jours de culture. L'analyse des cellules composant les sphéroïdes par cytométrie de flux révèle une diminution de la mortalité cellulaire et de la proportion de débris cellulaires lorsque les cellules cancéreuses sont cultivées en condition ascitique. De plus, l'analyse du clivage de la molécule PARP (effecteur de l'apoptose) sur les cellules formant les sphéroïdes cultivées en condition ascitique révèle que les ascites inhibent ce clivage. Cette inhibition illustre le blocage de la voie apoptotique déclenchée sur ces cellules « non-adhérentes » et indique que le processus de mort est très peu, voir pas du tout induit suite à la perte d'ancrage.

Conclusion I.4 : La culture des cellules IGROV1 et SKOV3 en **condition non-adhérente** et en **présence d'ascite** induit la **formation de sphéroïdes**. Dans ces conditions, **l'ascite protège** les cellules d'une mort cellulaire par **anoïkis**.

I.5. Caractérisation « matricielle » des sphéroïdes en milieux ascitiques

Un défaut d'ancrage cellulaire ou une perte d'adhérence des cellules entraînent classiquement la mort des cellules par anoïkis (voir chapitre I-4). Ce processus est dû à une modification des signaux de survie induit par la reconnaissance des récepteurs d'adhérence membranaires à leurs ligands matriciels. Ainsi, il nous est apparu pertinent d'analyser et de caractériser la matrice extracellulaire potentiellement présente au sein des sphéroïdes tumoraux.

Les cellules cancéreuses ovariennes formant des sphéroïdes sont-elles organisées autour d'une matrice extracellulaire, et si tel est le cas, existe-t-il des différences d'organisation entre les sphéroïdes obtenus en condition classique de culture par rapport à ceux obtenus en condition ascitique ?

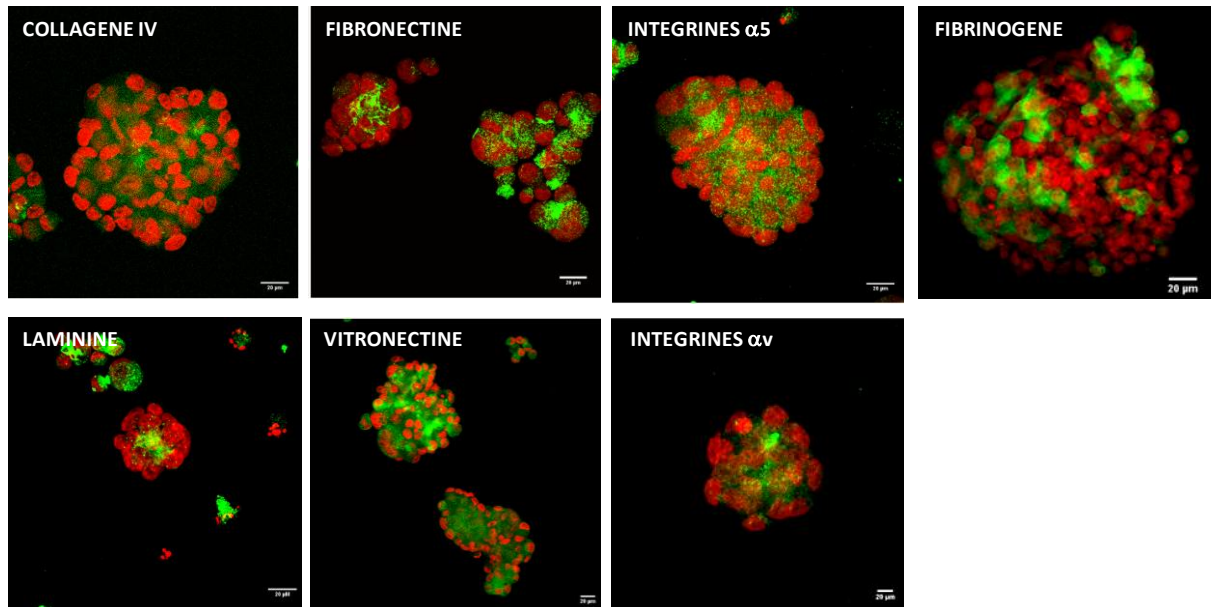
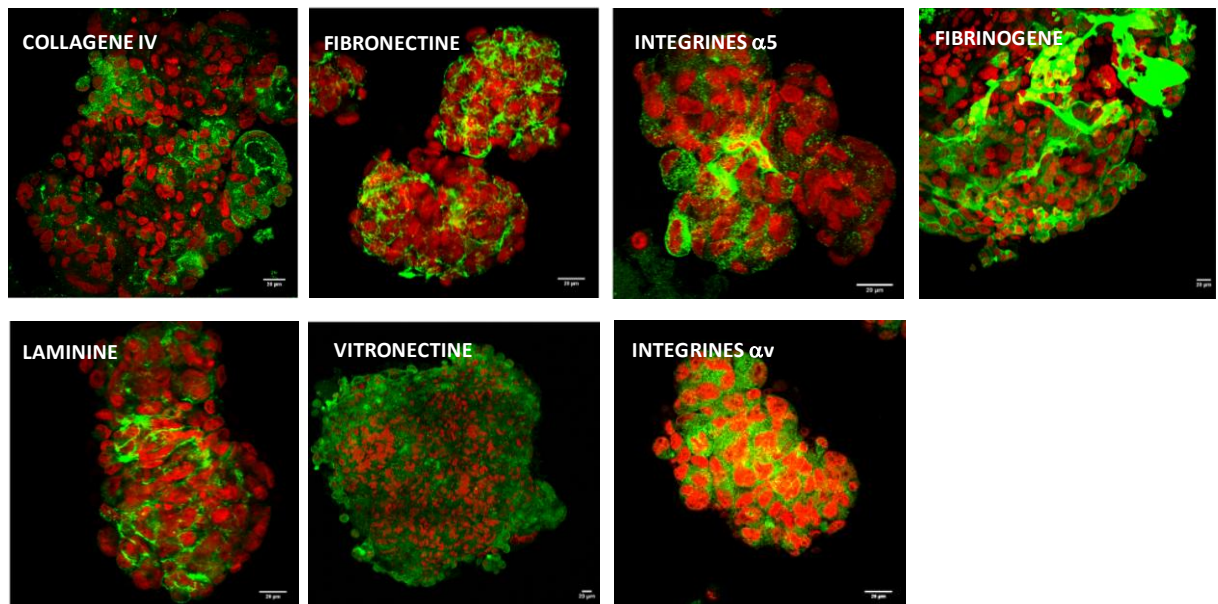
IGROV1**-A- Milieu complet****-B- Ascite 8**

Figure 76: Caractérisation « matricielle » des sphéroïdes d'IGROV1 en milieu complet et ascitique. $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 sont cultivées sur substrat non-adhésif en milieu complet (A) ou en ascites (Ascite 8) (B) pendant 15 jours. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées et incubées en présence des anticorps anti-laminine, anti-collagène IV, anti-vitronectine, anti-fibronectine, anti-fibrinogène, anti-intégrines αv et anti-intégrines $\alpha 5$. Les barres d'échelle représentent 20 μm

Ainsi, la présence de protéines de la matrice extracellulaire au sein des sphéroïdes a été recherchée. La présence de molécules matricielles comme le collagène IV et la laminine (éléments clefs des lames basales), ainsi que la fibronectine et la vitronectine a été mise en évidence (éléments matriciels impliqués dans la régulation des cellules cancéreuses ovariennes). Compte-tenu de l'origine exudative des ascites (Cf Etat de l'art, page 66), la présence de fibrinogène a également été recherchée et mise en évidence.

En milieu complet, les sphéroïdes formés par les cellules IGROV1 présentent de petites cavités « entre les cellules ». La présence peu organisée de collagène IV et de laminine est observée au sein des cavités par une analyse en microscopie confocale. La vitronectine et la fibronectine sont présentes au sein de ces cavités, mais elles sont aussi localisées en périphérie des sphéroïdes. Les cellules SKOV3 présentent également ces protéines matricielles, il semble même que les marquages des différentes protéines soit plus prononcés (**Figure 76A** et **Figure 77A** pour IGROV1 et SKOV3 respectivement). La présence de fibrinogène au sein des sphéroïdes est également à souligner.

Lorsque les cellules sont cultivées dans un microenvironnement ascitique, les cellules s'organisent sous forme d'amas cellulaires plus volumineux que les sphéroïdes identifiés en milieu complet. Le même type de localisation des protéines matricielles est visible mais les marquages semblent accentués. Le collagène IV, la laminine et la fibronectine sont présents sous forme de fibrilles ou de fins liserés autour des cellules composant ces amas cellulaires. Ces marquages pourraient « refléter » l'organisation d'une structure lame basale-like dont dépendrait l'émission de signaux de survie. La vitronectine est, comme précédemment, localisée au cœur des sphéroïdes mais aussi en périphérie (**Figure 76B** et **Figure 77B** pour IGROV1 et SKOV3 respectivement).

Globalement, les marquages de collagène IV, de laminine, de fibronectine, de vitronectine et de fibrinogène, semblent plus prononcés et ces protéines semblent être organisées lorsque les sphéroïdes sont générés en présence d'ascites. Elles se localisent à la périphérie mais aussi au cœur des agrégats (notamment pour la vitronectine et la fibronectine) au niveau des zones intercellulaires.

Par ailleurs, la localisation des intégrines α_v et α_5 , famille de récepteurs majeurs de molécules de la matrice extracellulaire et notamment de la fibronectine, vitronectine, laminine, et du fibrinogène ont également été recherchées (**Figure 76** et **Figure 77**).

Ces intégrines semblent être surexprimées au sein des sphéroïdes de cellules IGROV1 et SKOV3 et notamment au niveau intercellulaire. Les marquages sont accentués lorsque les cellules sont au sein d'un microenvironnement ascitique.

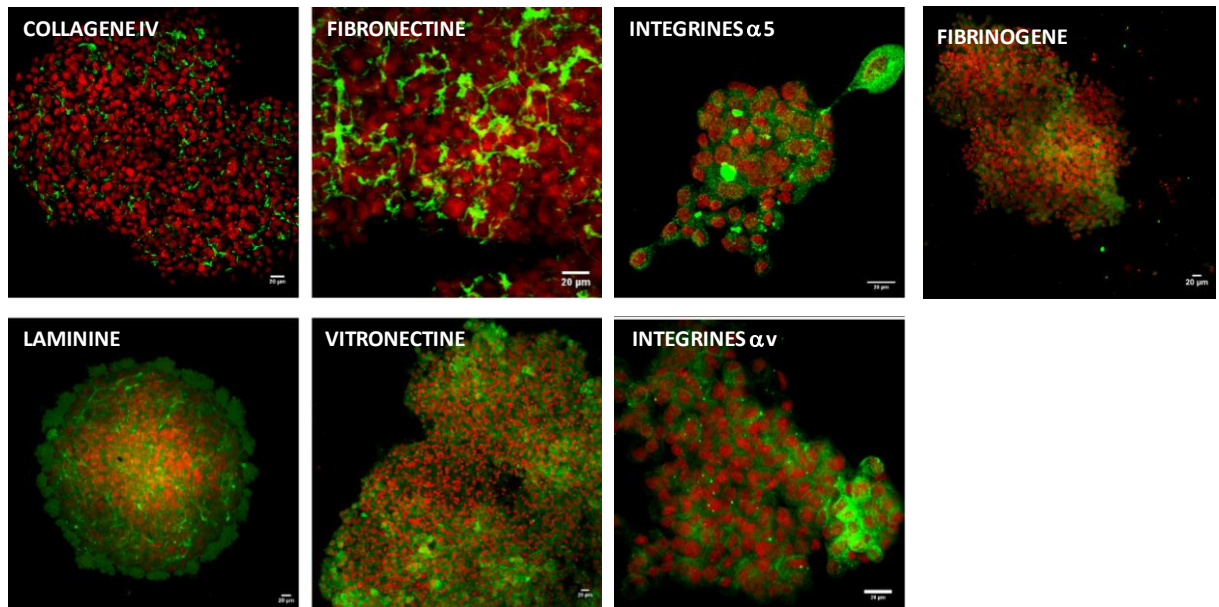
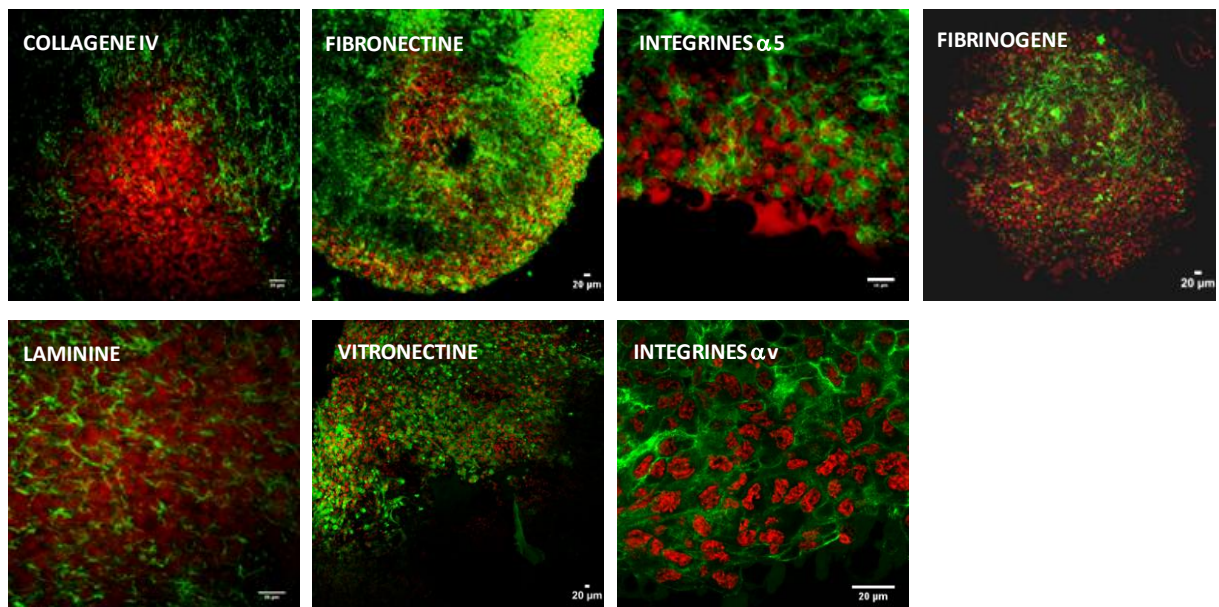
SKOV3**-A- Milieu complet****-B- Ascite 8**

Figure 77: Caractérisation « matricielle » des sphéroïdes de SKOV3 en milieu complet et ascitique. $1,5 \cdot 10^6$ cellules SKOV3 sont cultivées sur substrat non adhésif en milieu complet (A) ou en ascites (ascite 8) (B) pendant 7 jours. Les cellules sont ensuite fixées, perméabilisées, et incubées en présence des anticorps anti-laminine, anti-collagène IV, anti-vitronectine, anti-fibronectine, anti-fibrinogène, anti-intégrines αv et anti-intégrines $\alpha 5$. Les barres d'échelle représentent 20 μm

	Laminine Collagène IV	Vitronectine	Fibronectine	Fibrinogène	αv $\alpha 5$
Milieu complet	Localisation au cœur des agrégats Peu ou pas organisée	Localisation au cœur des sphéroïdes et en périphérie des cellules Peu ou pas organisée		Peu de marquage Localisation péricellulaire et en surface des agrégats	Localisation au niveau intercellulaire
Ascites	Organisation sous forme de fibrilles et de liserés autour des cellules	Localisation au cœur et en périphérie des agrégats Peu organisée	Organisation sous forme de fibrilles autour des cellules	Marquage plus prononcé Localisation en surface des sphéroïdes	Marquage plus important Localisation au niveau intercellulaire

Tableau 10: Récapitulatif de la caractérisation de la matrice extracellulaire des sphéroïdes et agrégats multicellulaires

Conclusion I.5 : L'ascite est un microenvironnement propice à la survie des cellules au sein des **sphéroïdes tumoraux**. La survie des cellules pourrait être en partie due à la **présence de protéines matricielles** (laminine, collagène IV, vitronectine, fibronectine et fibrinogène) organisées au sein de ces structures cellulaires. Ces protéines matricielles interagissant avec les **intégrines αv et $\alpha 5$** également présentes au sein des sphéroïdes, pourraient impacter les processus cellulaires précédemment étudiés comme l'**adhérence**, la **migration**, la **prolifération** et la **survie** des cellules cancéreuses ovariennes.

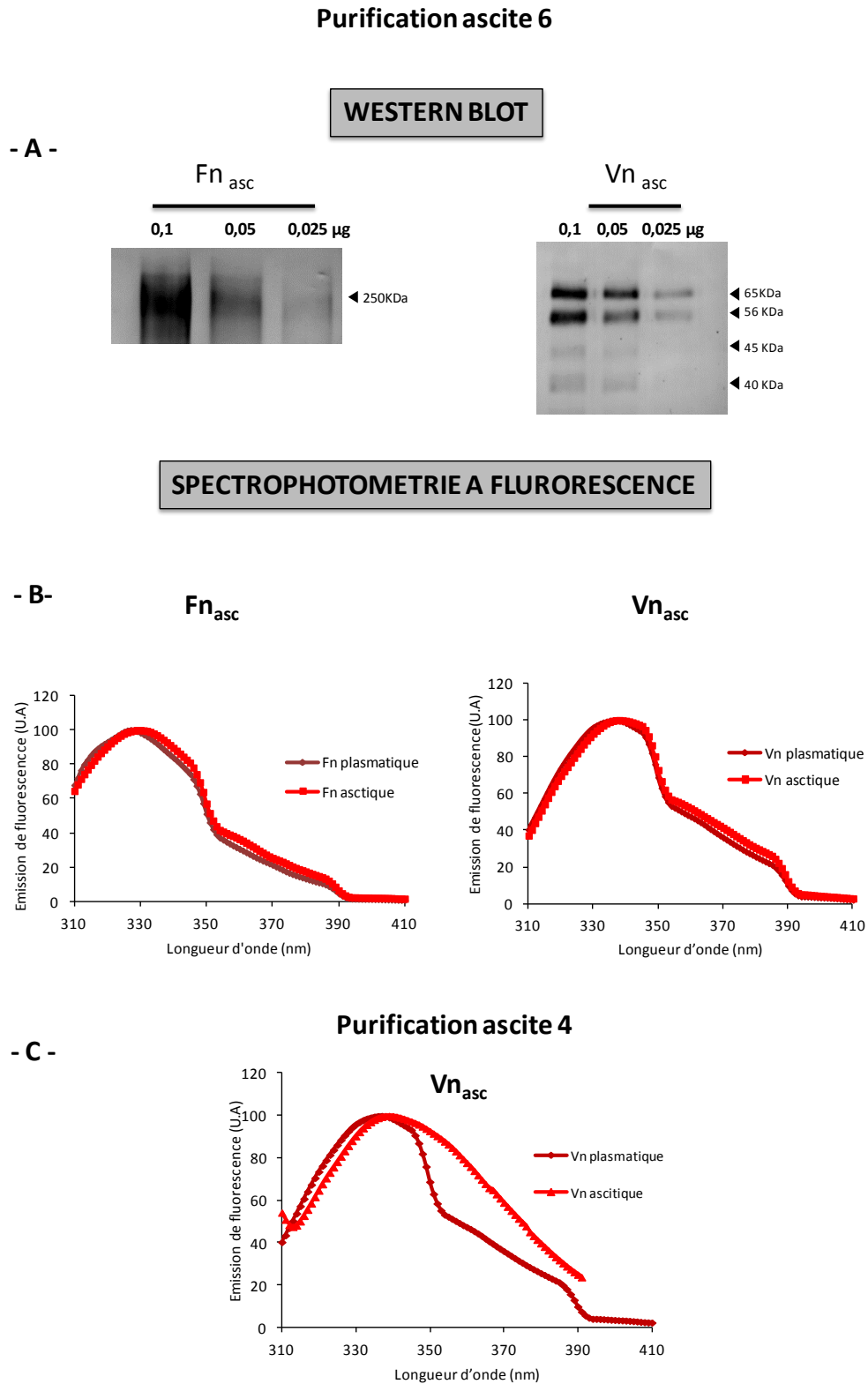


Figure 78: Caractérisation de la fibronectine et de la vitronectine purifiées à partir de liquides d'ascites. (A) Après dosage, des dépôts de Fn et de Vn ascitiques (0,1 µg) dans des gels de SDS-PAGE sont effectués pour réaliser un western-blot avec des anticorps anti-Fn et anti-Vn. (B) Les échantillons de protéines purifiées sont analysés par spectrophotométrie à fluorescence pour l'ascite 6 et (C) l'ascite 4.

I.6. Caractérisation et impact de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques sur les comportements cellulaires impliqués dans la récurrence

L'objectif de ce volet expérimental est d'évaluer l'effet des protéines matricielles purifiées à partir d'ascite sur le comportement des cellules.

I.6.1. Caractérisation de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques

Les travaux antérieurs du groupe ont montré l'influence de la fibronectine et de la vitronectine dans les cancers de l'ovaire (Kellouche et al. 2010; Heyman et al. 2008; Carreiras et al. 1999a). La présence de ces deux protéines au sein des agrégats multicellulaires de cellules IGROV1 et SKOV3 générés en conditions ascitiques contribue à renforcer le rôle de ces deux protéines dans la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes. En outre, la présence de ces deux protéines au sein des liquides d'ascites et leur caractérisation biochimiques ont été décrites dans nos travaux antérieurs (Carduner et al. 2013).

Ainsi, selon le protocole développé au sein de l'équipe, la purification de la fibronectine et de la vitronectine à partir d'un des échantillons d'ascites (ascite 6) a été réalisée après différentes étapes de chromatographie d'affinité. Après purification, les western-blots anti-fibronectine et anti-vitronectine montrent la présence de ces protéines dans les fractions obtenues après les chromatographies (**Figure 78A**). Dans le cas de la fibronectine ascitique, une bande à 250 kDa est obtenue. Dans le cas de la vitronectine, il est observé plusieurs bandes. Cependant la bande majoritaire est à 65 kDa et correspond à un fragment de la vitronectine. On remarque quelques bandes à des poids moléculaires inférieurs, il pourrait s'agir de produits de quelques fragments dégradés (**Figure 78A**).

Les spectres de fluorescence obtenus après excitation à 295 nm des fibronectines purifiées à partir de plasma sanguin et purifiées à partir de l'ascite utilisée (ascite 6) sont similaires. Le maximum d'intensité d'émission de fluorescence étant à 330 nm pour les deux protéines (plasmatiques et ascitiques). L'environnement des résidus de tryptophane de la fibronectine purifiée à partir d'ascite est donc similaire à celui des tryptophanes de la fibronectine purifiée à partir de plasma sanguin (**Figure 78B**). La vitronectine purifiée à partir d'ascite présente également le même profil d'émission de fluorescence que celui obtenu pour la vitronectine purifiée à partir de plasma sanguin. Cela indique que ces deux protéines ont une structure locale qui semble similaire (**Figure 78B**).

Toutefois, ces résultats ne s'appliquent pas à toutes les vitronectines purifiées à partir d'ascites. En effet, la vitronectine issue de la purification de l'ascite 4 a été analysée comme précédemment.

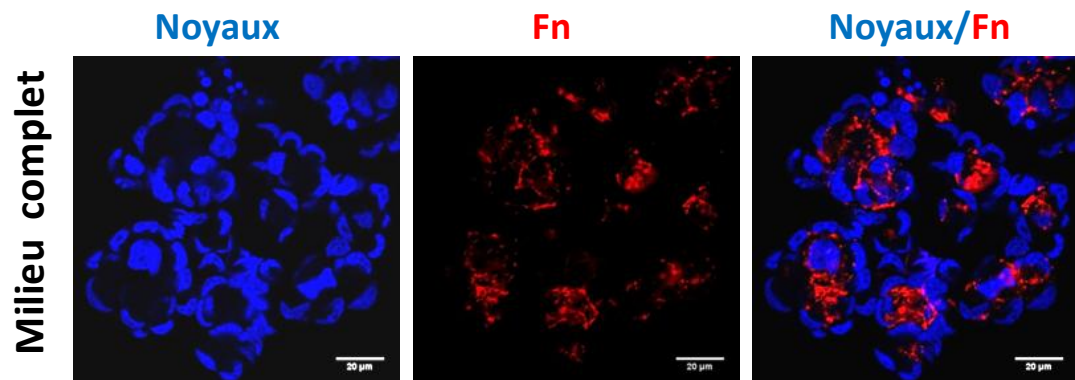
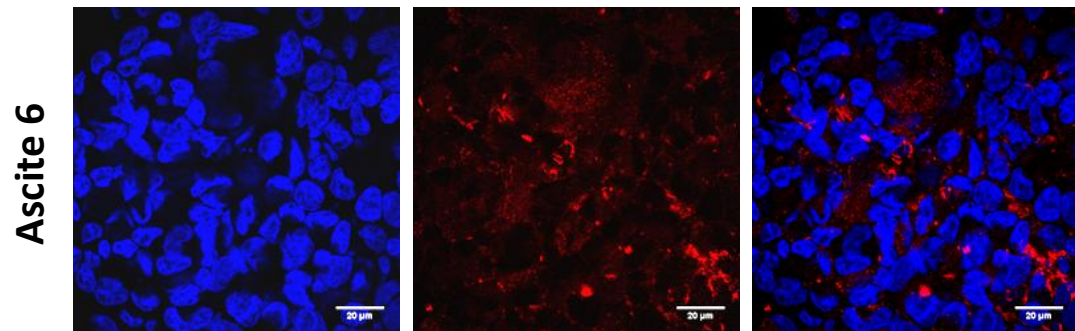
IGROV1**- A -****- B -**

Figure 79: Incorporation de MEC exogènes dans les agrégats multicellulaires formés par les cellules IGROV1. $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 sontensemencées en milieu complet (A) ou en ascites (ascite 6) (B) en présence de fibronectine plasmatique (20 µg/mL) couplé à un fluorochrome Alexa® 568 dans des boîtes de culture recouvertes d'agarose. Elles sont incubées à 37°C pendant 7 jours. Les cellules sont fixées avec du PFA puis perméabilisées. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI. Les cellules sont observées au microscope confocal. Les barres d'échelle représentent 20 µm.

Les résultats montrent un décalage du maximum d'émission de fluorescence à 340 nm au lieu de 330 nm.

Ce « shift » est caractéristique d'une modification de la conformation de la vitronectine purifiée à partir de cette ascite. Dans ce cas, la vitronectine ascitique et la vitronectine plasmatique présentent des conformations différentes (**Figure 78C**).

I.6.2. Incorporation et « utilisation » de la fibronectine exogène dans les sphéroïdes

Après avoir mis en évidence la présence de protéines de la matrice extracellulaire au sein des sphéroïdes, et notamment de collagène IV, de laminine, de fibronectine, de vitronectine et de fibrinogène, l'incorporation de certaines de ces protéines, au sein des sphéroïdes en formation, a été évaluée. La fibronectine est organisée sous forme de fibrilles au sein des sphéroïdes formés par les cellules IGROV1 cultivées en ascite. Ainsi, en utilisant de la fibronectine préalablement purifiée et greffée à une molécule fluorescente (Alexa 568) selon un protocole établi par notre équipe, il est observé que les cellules IGROV1 mises en présence de cette protéine, l'incorporent et l'organisent au sein des sphéroïdes en formation (**Figure 79**). En effet, les résultats de ce marquage montrent que la fibronectine marquée est incorporée au sein des sphéroïdes ainsi qu'en périphérie cellulaire lorsque les cellules sont cultivées en milieu complet (**Figure 79A**). Une organisation fibrillaire est observée lorsque les cellules sont en condition ascitique (**Figure 79B**). Ce résultat suggère que le contenu matriciel ascitique, et notamment la fibronectine ascitique, pourrait être incorporée par les cellules au cours de la formation des sphéroïdes

I.6.3. Impact de la fibronectine, de la vitronectine et des intégrines αv sur la survie des cellules organisées en sphéroïdes

Le comportement cellulaire est sous la dépendance de la biodisponibilité des protéines matricielles et de l'organisation de ces protéines les unes par rapport aux autres. Lorsque les cellules adhèrent sur un support, des signalisations de survie sont activées. Celles-ci sont dépendantes d'une interaction des récepteurs d'adhérence membranaires avec les protéines matricielles. Lors de la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes, les cellules s'organisent sous forme de sphéroïdes. La survie des cellules dans les sphéroïdes est-elle due à la création d'interactions entre les protéines matricielles identifiées dans les sphéroïdes et leurs récepteurs d'adhérence spécifiques ?

IGROV1 en sphéroïdes

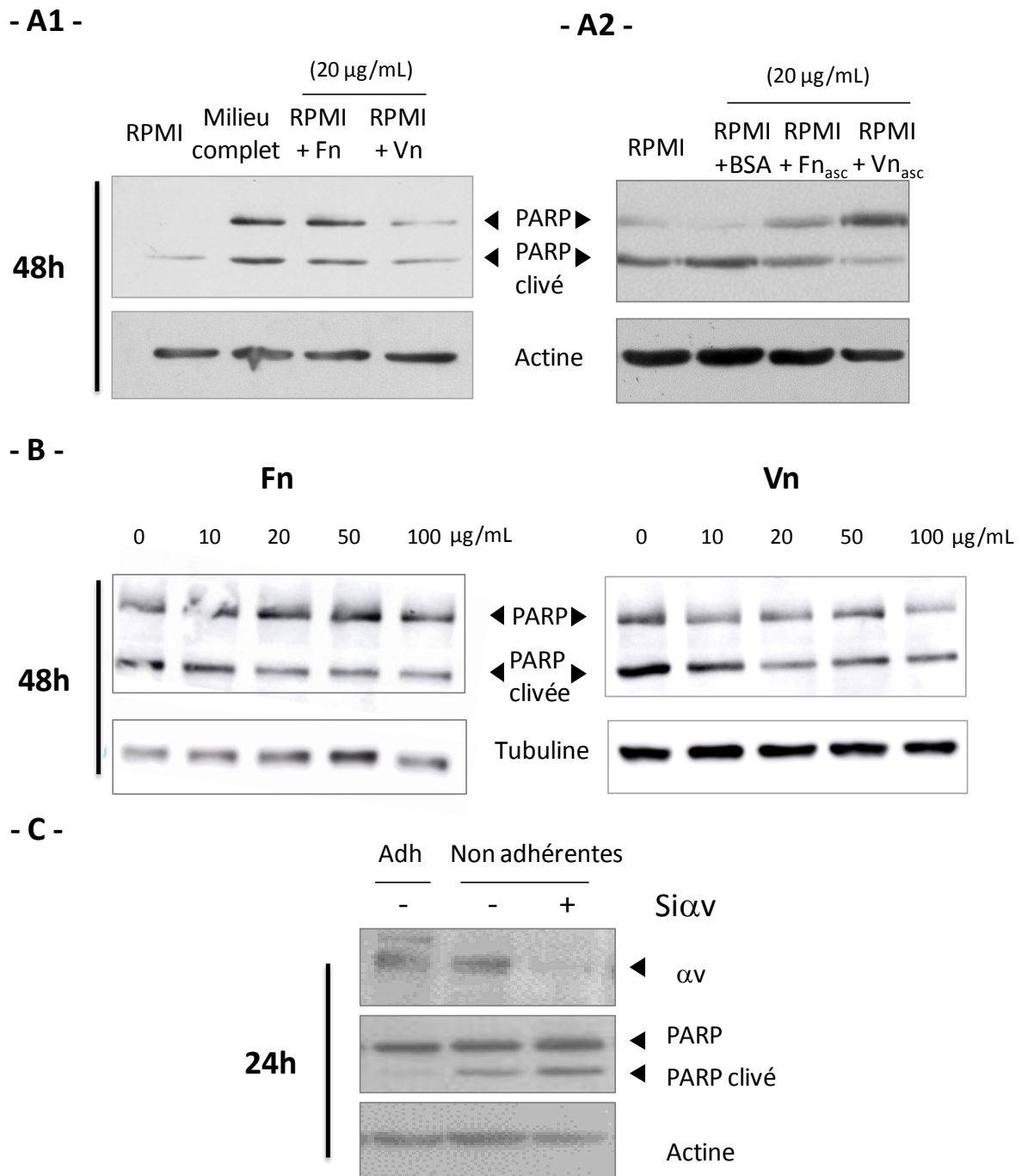


Figure 80: Impact des ligands matriciels et des récepteurs d'adhérence de type intégrine αv sur la survie des cellules organisées en sphéroïdes. $1,5 \cdot 10^6$ cellules sont cultivées sur substrat non-adhésif entre 24 et 48 h dans différentes conditions : (A) en présence de milieu sans SVF additionné de Fn ou Vn à 20 µg/mL plasmatiques ou ascitiques pendant 48h, (B) en présence de doses croissantes de Fn ou de Vn pendant 48h (C) ou après inhibition de l'expression des intégrines αv via un SiARN en milieu complet. La survie des cellules IGROV1 cultivées dans ces conditions est analysée en suivant le clivage de PARP par western-blot. Fn et Vn : fibronectine et vitronectine plasmatiques. Fn_{asc} et Vn_{asc} : fibronectine et vitronectine ascitiques.

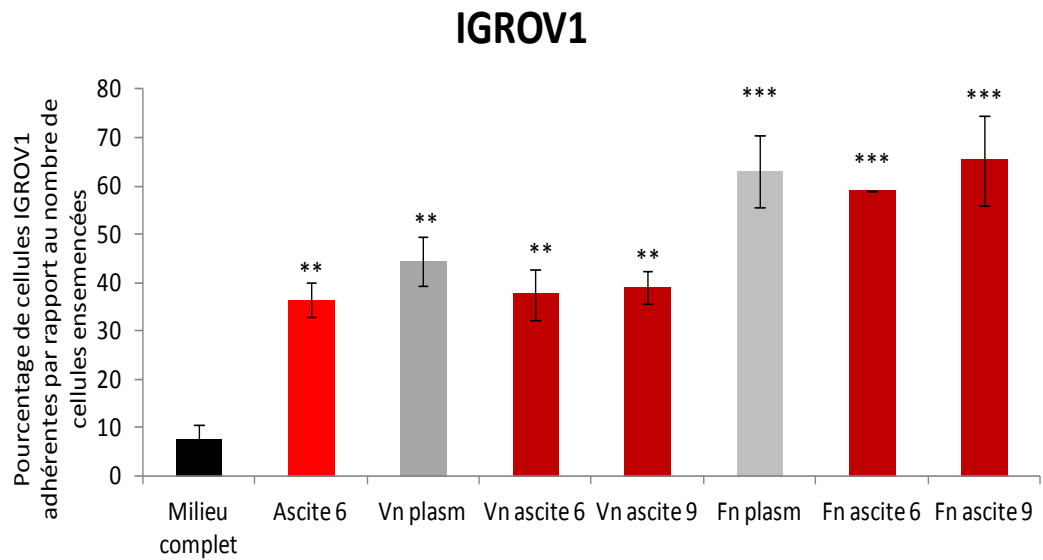
Pour répondre à cette question, les cellules IGROV1 ont été cultivées pendant 2 jours en condition non-adhérente dans le milieu de culture seul. Comme précédemment démontré, en suivant le clivage de la protéine PARP, on remarque que les cellules entrent en apoptose de manière importante. En effet, il y a absence totale de la bande PARP non clivée. La culture en milieu complet ne permet pas aux cellules non adhérentes de résister à l'apoptose. Lorsque les cellules sont cultivées dans le milieu seul additionné de fibronectine, le clivage de la protéine PARP est beaucoup moins important. La diminution de l'apoptose observée dans la condition milieu seul additionné de fibronectine, est encore plus prononcée lors de l'ajout de vitronectine au milieu de culture (**Figure 80A₁**). Un résultat similaire est obtenu quand les cellules sont incubées dans des conditions identiques en présence fibronectine et de vitronectine ascitiques (**Figure 80A₂**). En effet, le clivage de la protéine PARP diminue en présence de fibronectine ascitique, et ce clivage est encore moins prononcé en présence de vitronectine ascitique.

Ainsi, la fibronectine et la vitronectine préalablement purifiées et ajoutées au milieu de culture sans SVF permettent de diminuer la fraction de cellules IGROV1 engageant un processus apoptotique lors de leur culture en condition non-adhérente. La fibronectine et la vitronectine semblent protéger les cellules IGROV1 formant les sphéroïdes de la mort par anoïkis suite à la perte d'ancrage. La vitronectine aurait un effet plus prononcé que la fibronectine.

L'effet protecteur observé sur les cellules IGROV1 est-il dose-dépendant ? Afin d'analyser un éventuel effet-dose, les cellules ont été incubées en milieu de culture sans SVF, additionné de fibronectine ou de vitronectine à des concentrations croissantes allant de 0 à 100 µg/mL. Le clivage de la protéine PARP a été suivi par western blot. La résistance à l'anoïkis engendrée par l'ajout de fibronectine et de vitronectine semble, en effet, dose-dépendante (**Figure 80B**).

Enfin, l'influence des récepteurs d'adhérence spécifiques de la vitronectine mais aussi de la fibronectine, à savoir les intégrines de la famille α_v , a été analysée en diminuant leur expression par la technique des ARN interférence (SiARNs) en milieu complet. Comme précédemment, l'activation du processus d'apoptose a été suivie *via* le clivage de la protéine PARP par western-blot. Ce traitement conduit à une augmentation du clivage de la protéine PARP et donc une augmentation de l'apoptose des cellules IGROV1 cultivées en condition non adhérente (**Figure 80C**). La diminution de l'expression des intégrines de la famille α_v , conduit à une perte de signalisation de survie induisant l'apoptose des cellules.

- A -



- B -

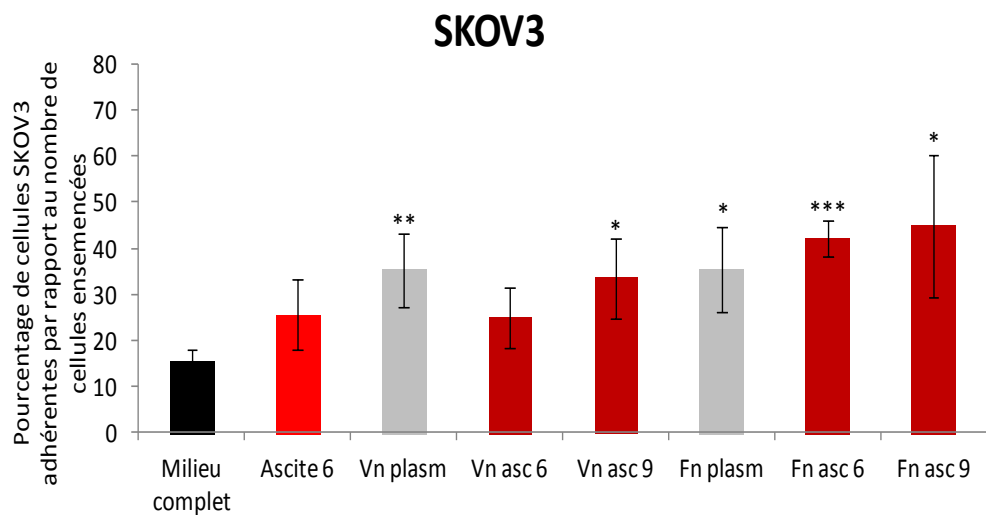


Figure 81: Impact des MEC ascitiques sur l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes. 20 000 cellules IGROV1 (A) ou SKOV3 (B) ont été ensemencées pendant 2 h sur revêtements de fibronectine (Fn) ou de vitronectine (Vn) plasmatiques ou ascitiques à 20 µg/mL. A l'issue des 2 h d'incubation, les cellules sont fixées, colorées au cristal violet puis lysées afin de mesurer l'absorbance à 595 nm et quantifier l'adhérence des cellules. Les tests statistiques sont effectués par rapport au milieu complet. Plasm: Plasmatiques, Asc: Ascitiques. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

I.6.4. Impact de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques sur l'adhérence et la migration des cellules cancéreuses ovariennes

Comme démontré précédemment, un revêtement d'ascite est propice à l'adhérence cellulaire et l'ascite stimule l'adhérence cellulaire (Cf I.1, page 94). La **Figure 81** démontre que parmi les éléments matriciels contenus dans les ascites, la vitronectine et la fibronectine sont des molécules bioactives induisant cette adhérence. Une fois purifiées à partir d'ascites et utilisées en revêtements des surfaces de culture, elles induisent une forte adhérence cellulaire.

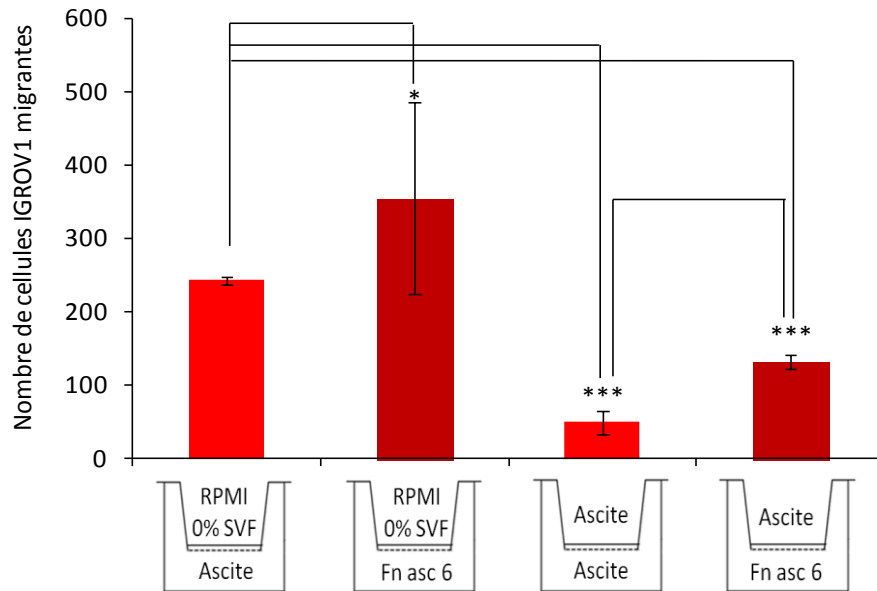
En effet, par des tests d'adhérence cellulaire, on constate que 40 % de cellules IGROV1 adhèrent sur un revêtement de vitronectine purifiée à partir d'ascites. La cinétique d'adhérence des cellules IGROV1 est identique quelle que soit la provenance de la vitronectine étudiée (plasmatique/ ascite 6/ ascite 9). L'adhérence des cellules IGROV1 sur la vitronectine purifiée à partir d'ascite ou de plasma sanguin est comparable à l'adhérence des cellules sur le revêtement d'ascite et est trois fois plus important que sur le revêtement de milieu complet. Le revêtement de fibronectine purifiée à partir d'ascite permet une adhérence plus importante des cellules IGROV1 comparée à l'adhérence de ces cellules sur les revêtements de vitronectine. Plus de 60 % de cellules adhèrent sur la fibronectine sans différence selon leur provenance (plasmatique/ ascite 6/ ascite 9) (**Figure 81A**). L'adhérence des cellules SKOV3 sur un revêtement de vitronectine ascitique représente entre 25 et 30 % des cellulesensemencées. L'adhérence mesurée est comparable à celle mesurée sur le revêtement de vitronectine plasmatique. D'autre part, la mesure d'adhérence des cellules SKOV3 montre une capacité d'adhérence légèrement supérieure sur la fibronectine purifiée à partir du plasma sanguin ou d'ascite (**Figure 81B**).

Le pouvoir chimio-attractif de la fibronectine purifiée à partir d'ascite a été testé (**Figure 82**) selon la même approche employée pour tester l'effet chimio-attractif de l'ascite (technique des chambres de Boyden, (Cf I.1 page 96)). Ainsi, les cellules ont étéensemencées en milieu de culture seul ou en ascite. Dans les compartiments inférieurs, les membranes sont en contact avec de l'ascite ou du milieu de culture sans SVF additionné de fibronectine ascitique à 20 µg/mL.

Lorsque les cellules IGROV1 sontensemencées en milieu de culture sans SVF, 250 cellules migrent vers le compartiment contenant de l'ascite. Le nombre de cellules IGROV1 migrantes passe de 250 à 300, lorsque ces cellules sontensemencées en milieu de culture seul dans le compartiment supérieur et que la fibronectine ascitique se trouve dans le compartiment inférieur. Enfin lorsque les cellules sontensemencées dans l'ascite, le pouvoir chimio-attractif de la fibronectine ascitique (présente dans le compartiment inférieur) induit la migration de plus de 130 cellules, contre 49 quand les cellules sontensemencées en ascite et migrent vers l'ascite (**Figure 82A**).

- A -

IGROV1



- B -

SKOV3

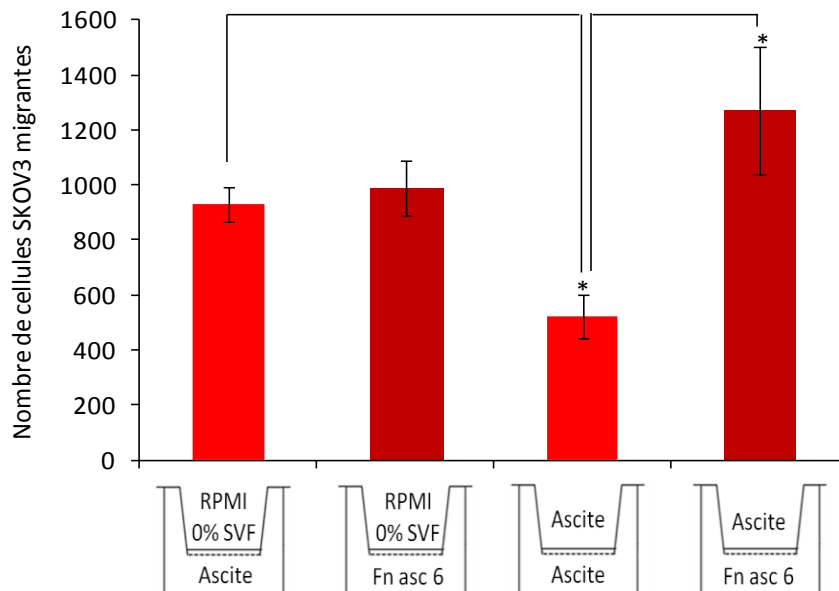


Figure 82: Impact des MEC ascitiques sur la migration des cellules cancéreuses ovariennes. Les chambres de Boyden sont placées dans les puits contenant de l'ascite ou de la fibronectine ascitique à 20 µg/mL pendant 1 h à 37°C. Les cellules IGROV1 (A) et SKOV3 (B) sont ensemencées en ascites (ascites 6 ou 8) ou en milieu RPMI 0 % SVF dans les compartiments supérieurs pendant 6 h à 37°C. A l'issue du temps d'incubation, les compartiments supérieurs sont nettoyés de sorte que seules les cellules ayant migrées à travers les pores soient fixées et colorées avant de procéder aux comptages. Fn asc 6: Fibronectine ascitique purifiée de l'ascite 6. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

Dans le cas des cellules SKOV3, le nombre de cellules migrantes à travers les chambres de Boyden est plus important lorsque la fibronectine ascitique est placée dans le compartiment inférieur. Le pouvoir chimio-attractif de l'ascite et de la fibronectine ascitique sont comparables quand les cellules sontensemencées en milieu de culture sans SVF (environ 900 cellules migrantes). Le pouvoir chimio-attractif de la fibronectine ascitique est d'autant plus marqué lorsque les cellules sont cultivées dans l'ascite (1200 cellules migrantes contre 850 lorsque les cellules sont cultivées en milieu de culture sans SVF) (**Figure 82B**).

Conclusion I.6 :

- L'**ascite** contient de la **fibronectine** et de la **vitronectine** qu'il est possible de **purifier**. Après purification, une **variabilité de conformation** des **protéines purifiées** peut-être observée en fonction de leurs origines.
- Les **protéines matricielles vitronectine et fibronectine** permettent l'**adhérence** des cellules cancéreuses ovariennes (plasmatique vs ascitique).
- La **vitronectine** et la **fibronectine ascitiques** semblent être **incorporées au sein** des **sphéroïdes** et participer à la **survie** des **sphéroïdes** formés en **condition ascitique**. Ces protéines **protègent** notamment les **cellules IGROV1** de la **mort par anoïkis**. Cet effet est **dose-dépendant** et est également **dépendant des intégrines α_v** .
- La capacité de ces **protéines ascitiques** à promouvoir l'**adhérence cellulaire** est également démontrée, ainsi que la capacité de la **fibronectine ascitique** à favoriser la **migration individuelle** des cellules cancéreuses.
- Ces éléments suggèrent que ces **molécules présentes dans les ascites** sont des **éléments bioactifs** potentiellement impliqués dans la **récidive**.

Résumé

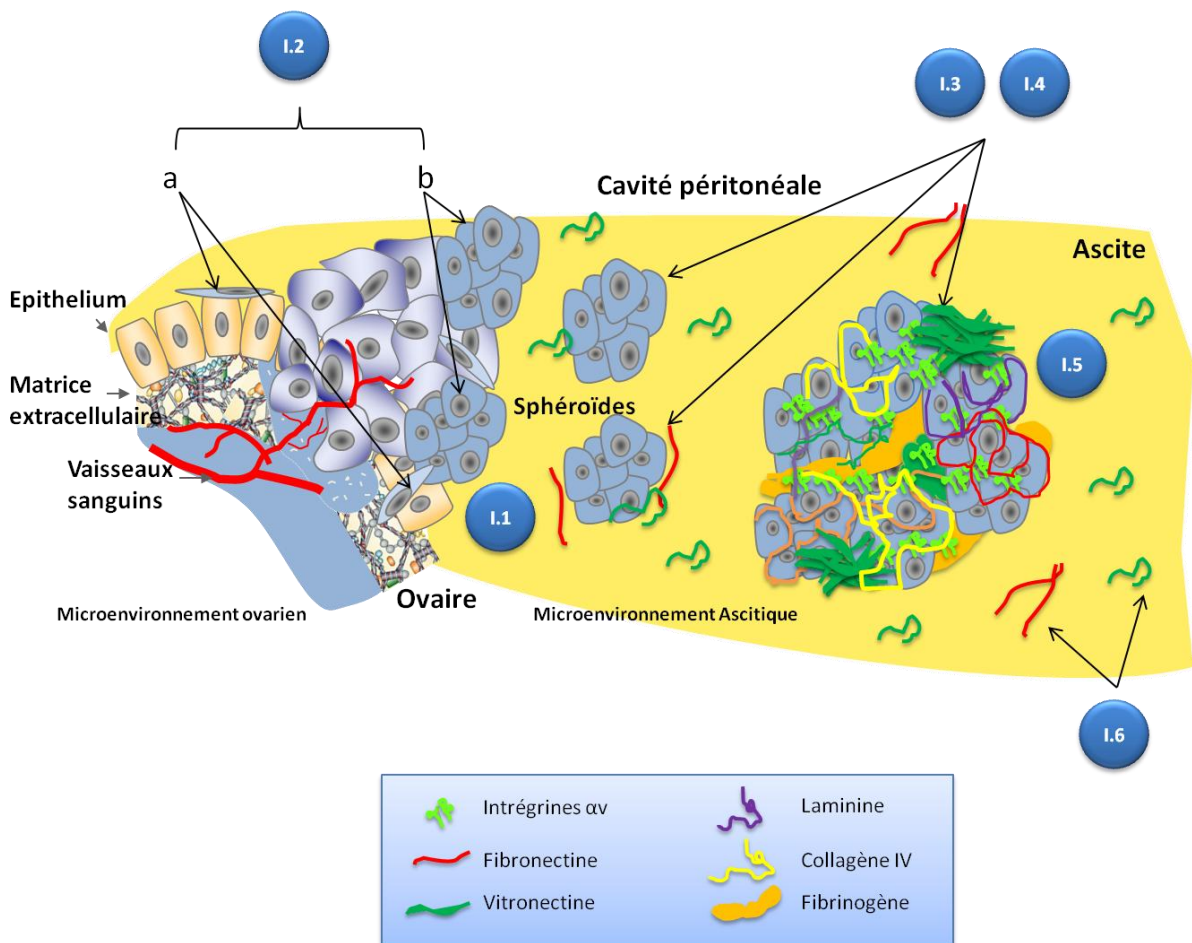


Figure 83: L'ascite est un microenvironnement permissif à la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes.

L'ascite est un microenvironnement qui favorise l'adhérence et la migration des cellules cancéreuses ovariennes (**Conclusion I.1**). Ces liquides pathologiques sont également permissifs à la prolifération de ces cellules (**Ccl I.2**). Cependant, alors que certaines lignées cellulaires changent de morphologie, comme les cellules SKOV3 (a), d'autres forment spontanément des sphéroïdes dans l'ascite, c'est le cas des cellules IGROV1 (b) (**Ccl I.2**). Les cellules placées dans des conditions de culture non-adhérente en ascite (ou en milieu de culture complet) sont capables de survivre et de résister au processus d'apoptose initié suite à la perte d'ancrage à une matrice extracellulaire (**Ccl I.3** et **I.4**). La caractérisation des sphéroïdes a permis de localiser la présence de protéines de la matrice extracellulaire organisées au sein des sphéroïdes d'IGROV1 formés dans les ascites, ainsi que l'abondance de récepteurs d'adhérences cellulaires, les intégrines de la famille αv et α5 (**Ccl I.5**). Les protéines de la matrice extracellulaire ascitique, notamment la vitronectine et la fibronectine influencent l'adhérence, la migration, la survie et l'organisation des cellules en sphéroïde (**Ccl I.6**).

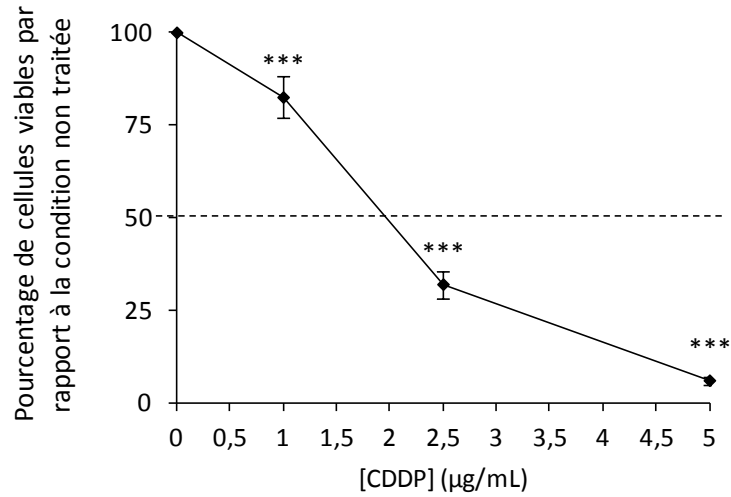
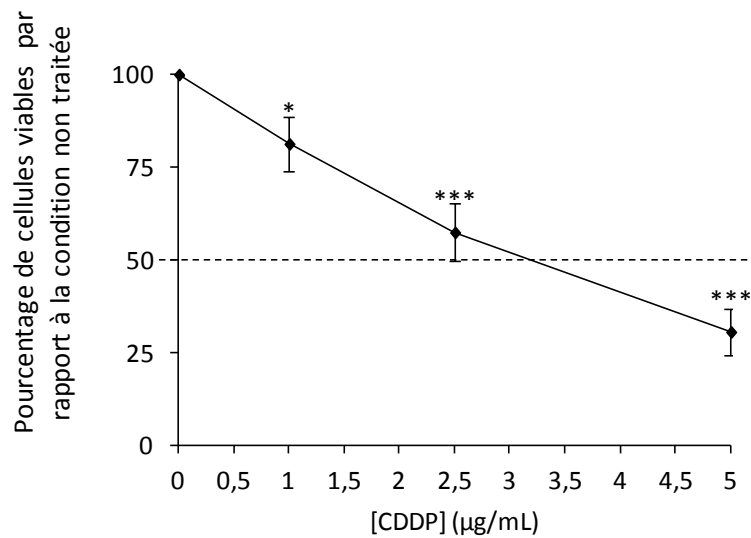
- A -**IGROV1****- B -****SKOV3**

Figure 84: Effet du cisplatine sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes en milieu complet. Les cellules IGROV1 (A) et SKOV3 (B) ont été traitées avec des doses croissantes de CDDP pendant 72 h. A l'issue de ce traitement la viabilité cellulaire a été mesurée avec le test XTT. Les tests statistiques sont effectués par rapport à la condition non traitée. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

II. Impact du microenvironnement ascitique sur la résistance des cellules cancéreuses ovariennes à la chimiothérapie

L'objet de ce volet expérimental est d'analyser la réponse des cellules cancéreuses ovariennes à deux agents chimiothérapeutiques, le cisplatine et le carboplatine. L'impact de l'ascite et la spécificité de ce microenvironnement seront analysés suite aux traitements des cellules cancéreuses ovariennes avec du cisplatine (en comparaison avec les conditions de culture classiques en milieu complet).

II.1. Effet du cisplatine sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes

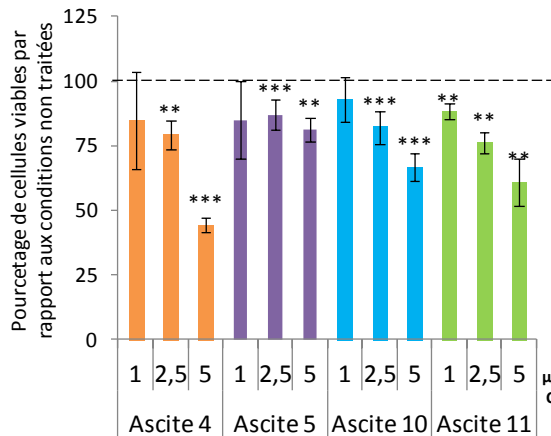
Le cisplatine (CDDP) est utilisé dans la chimiothérapie standard des cancers ovariens. En premier lieu, la viabilité des cellules IGROV1 et SKOV3 a été analysée après 72 h de traitement à différentes doses de CDDP, en milieu complet.

La viabilité des cellules IGROV1 décroît en fonction des doses croissantes de CDDP. Après 72 h de traitement, à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, le pourcentage de cellules viables est de 6 %. La concentration minimale inhibitrice (CI_{50}) du CDDP à 72 h, correspondant à la dose de CDDP pour laquelle 50 % des cellules sont viables, est de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figure 84A**). Le CDDP induit également une diminution de la viabilité des cellules SKOV3. Après 72 h de traitement à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 % de cellules SKOV3 sont viables. La CI_{50} du CDDP à 72 h pour les cellules SKOV3 est de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figure 84B**).

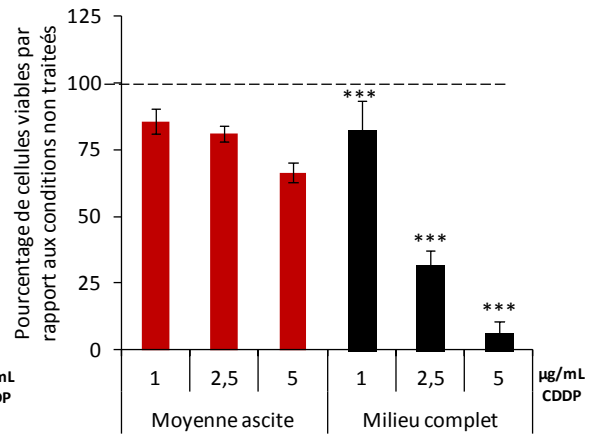
Conclusion II.1 : Le CDDP induit la **mort des cellules IGROV1 et SKOV3**, néanmoins une **fraction de la population cellulaire résiste au traitement**. Dans les conditions expérimentales réalisées, la **sensibilité au CDDP des cellules IGROV1 est plus importante** que celle des cellules **SKOV3**.

IGROV1

- A -

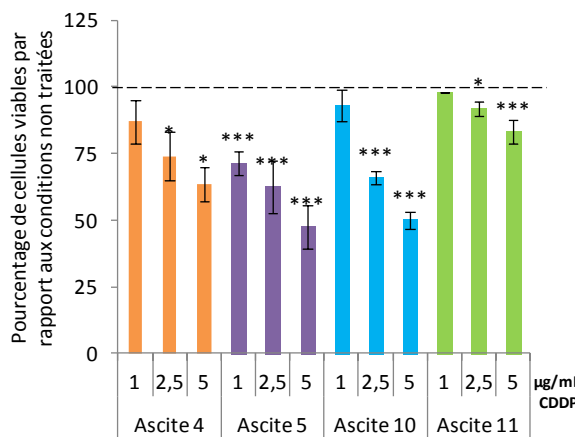


- B -

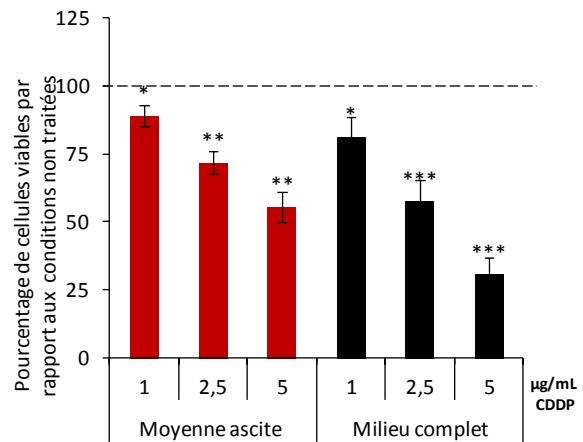


SKOV3

- C -



- D -



--- Cellules non traitées

Figure 85: Impact de l'ascite sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes traitées au cisplatine. Les cellules IGROV1 (A-B) ou SKOV3 (C-D) ont été cultivées dans différentes ascites et traitées au CDDP. La viabilité cellulaire dans les différentes ascites a été mesurée par XTT (A) et (C). Les résultats obtenus dans les ascites ont été moyennés afin de les comparer avec ceux obtenus en milieu complet (B) et (D). Les tests statistiques sont déterminés par rapport aux conditions non traitées. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

II.2. Effet de l'ascite sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes suite aux traitements avec du cisplatine

L'ascite influence de nombreux comportements cellulaires propices à la récurrence des cancers ovariens (Cf partie I). Lors des chimiothérapies, la présence d'ascite peut avoir un impact sur la réponse des cellules cancéreuses ovariennes. Afin d'estimer cet impact, les traitements au CDDP des cellules ont été réalisés en présence d'ascites et la viabilité cellulaire a été mesurée après 72 h de traitement.

Lorsque les cellules IGROV1 sont traitées au CDDP dans un microenvironnement ascitique, la viabilité cellulaire est en moyenne de 60 %. L'ascite 5 est l'ascite qui permet l'obtention d'une plus grande protection contre la mort cellulaire induite par le CDDP. Dans cette ascite, 80 % (+/-5 %) des cellules restent viables après un traitement au CDDP à 5 µg/mL. En revanche, un traitement à cette même dose, réalisé lorsque les cellules sont en présence de l'ascite 4 induit une mortalité cellulaire plus importante comparé aux traitements réalisés avec les autres ascites. En effet, seulement 44 % (+/- 3 %) des cellules restent viables à cette dose (**Figure 85A**). La viabilité des cellules IGROV1 est donc plus importante après traitement au CDDP lorsque ces traitements se font en condition ascitique plutôt qu'en condition de culture classique (**Figure 85B**). Ce résultat démontre l'effet protecteur des ascites vis-à-vis des traitements.

En condition ascitique, les traitements au CDDP des cellules SKOV3 induisent une baisse de la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante. Selon les ascites utilisées, la viabilité cellulaire en réponse au CDDP est différente. Entre 50 et 80 % de viabilité cellulaire est observée selon l'ascite utilisée (**Figure 85C**). Comme pour les cellules IGROV1, la viabilité des cellules SKOV3 est supérieure suite à un traitement au CDDP en présence d'ascite comparée à la viabilité mesurée en milieu complet (**Figure 85D**). Les ascites protègent donc également les cellules SKOV3 de la mortalité induite par le CDDP. Ces résultats démontrent l'effet protecteur des ascites vis-à-vis des traitements.

Afin d'affiner ces résultats, une analyse par cytométrie de flux a été réalisée afin d'estimer la répartition des cellules IGROV1 dans les phases du cycle cellulaire en fonction des traitements et du microenvironnement des cellules (**Figure 86**). Ainsi, l'analyse a été effectuée après traitement des cellules avec du CDDP en milieu complet ou en ascite. Tout d'abord, les profils de cytométrie de flux obtenus lorsque les cellules sont dans un microenvironnement classique (milieu complet) et ascitique sont relativement comparables. Ces résultats confortent ceux obtenus en **Figure 68** reflétant la croissance des cellules dans ces deux types de conditions.

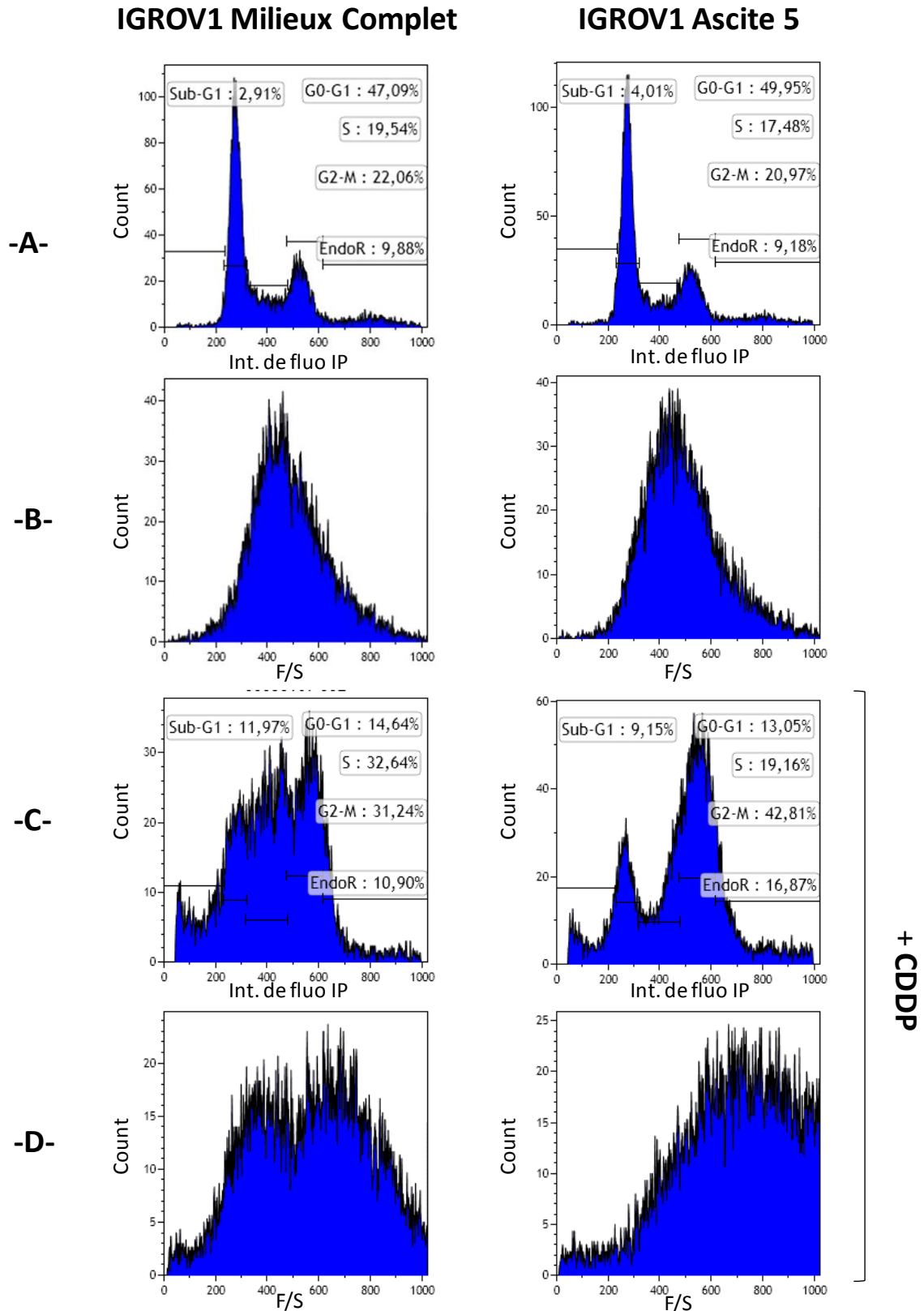


Figure 86: Impact de l'ascite sur la progression des cellules IGROV1 traitées au cisplatine dans les différentes phases du cycle cellulaire. $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 ont été cultivées en condition de culture classique ou ascitique (Ascite 5). Ces cellules ont été traitées (C, D) ou non (A, B) avec $2,5 \mu\text{g/mL}$ de cisplatine pendant 72 h. Suite à cette période de traitement, les culots cellulaires ont été fixés à l'éthanol 70 % et la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie de flux.

	Phases	Milieu complet	Ascite 5
IGROV1 non traitées	Pré-G1	2,91 %	4,01 %
	G0/G1	47,09 %	49,95 %
	S	19,54 %	17,48 %
	G2/M	22,06 %	20,97 %
IGROV1 traitées	Pré-G1	11,97 %	9,15 %
	G0/G1	14,64 %	13,05 %
	S	32,24 %	19,16 %
	G2/M	31,24 %	42,81 %

Tableau 11 : Répartition des cellules IGROV1 dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de leur microenvironnement.

La **Figure 86A** révèle 3 à 4 % de débris cellulaires et de cellules « apoptotiques (pré-G1), 47 à 50 % de cellules en G0/G1, 19 à 17 % de cellules en phase S et 22 à 21 % de cellules en G2/M pour les conditions classiques et ascitiques respectivement (**Figure 86A, Tableau 11**). Les « tailles » des cellules sont également comparables (**Figure 86B, Count/FS**). Le traitement au CDDP des cellules IGROV1 induit de fortes modifications de cette répartition :

- **En condition classique de culture (Figure 86C, Tableau 11)**, la proportion de débris cellulaires et de cellules « apoptotiques » (pré-G1 : traduisant une mort cellulaire induite par l'effet cytotoxique du CDDP) est beaucoup plus importante. Elle passe de 3 à 12 % environ ce qui reflète une mortalité cellulaire probablement, ou en partie, due au déclenchement apoptotique. Par ailleurs, la proportion de cellules en G0/G1 diminue (47 à 14 %), alors que la population cellulaire G2/M augmente (22 à 31 %). De plus, la population en phase S semble augmentée (19 à 32 %) mais ce résultat est à tempérer car de nombreuses cellules « comptées en S » sont en fait bloquées avant la progression en G2 (Point de contrôle G2/M). En termes de taille, deux populations semblent être présentes, l'une comparable à la condition non traitée et une autre dont la taille est plus volumineuse (**Figure 86D, Count/FS**). Cette augmentation de taille conforte l'hypothèse du blocage des cellules en phase S.
- **En condition ascitique (Figure 86C, Tableau 11)**, la proportion de débris cellulaires et de cellules « apoptotiques » (pré-G1) est également plus importante lorsque les cellules sont traitées au CDDP. Cependant, cette augmentation est plus négligeable qu'en condition classique de culture. Elle passe de 4 à 9 % environ ce qui reflète une mortalité cellulaire plus faible que précédemment, probablement due au déclenchement apoptotique.

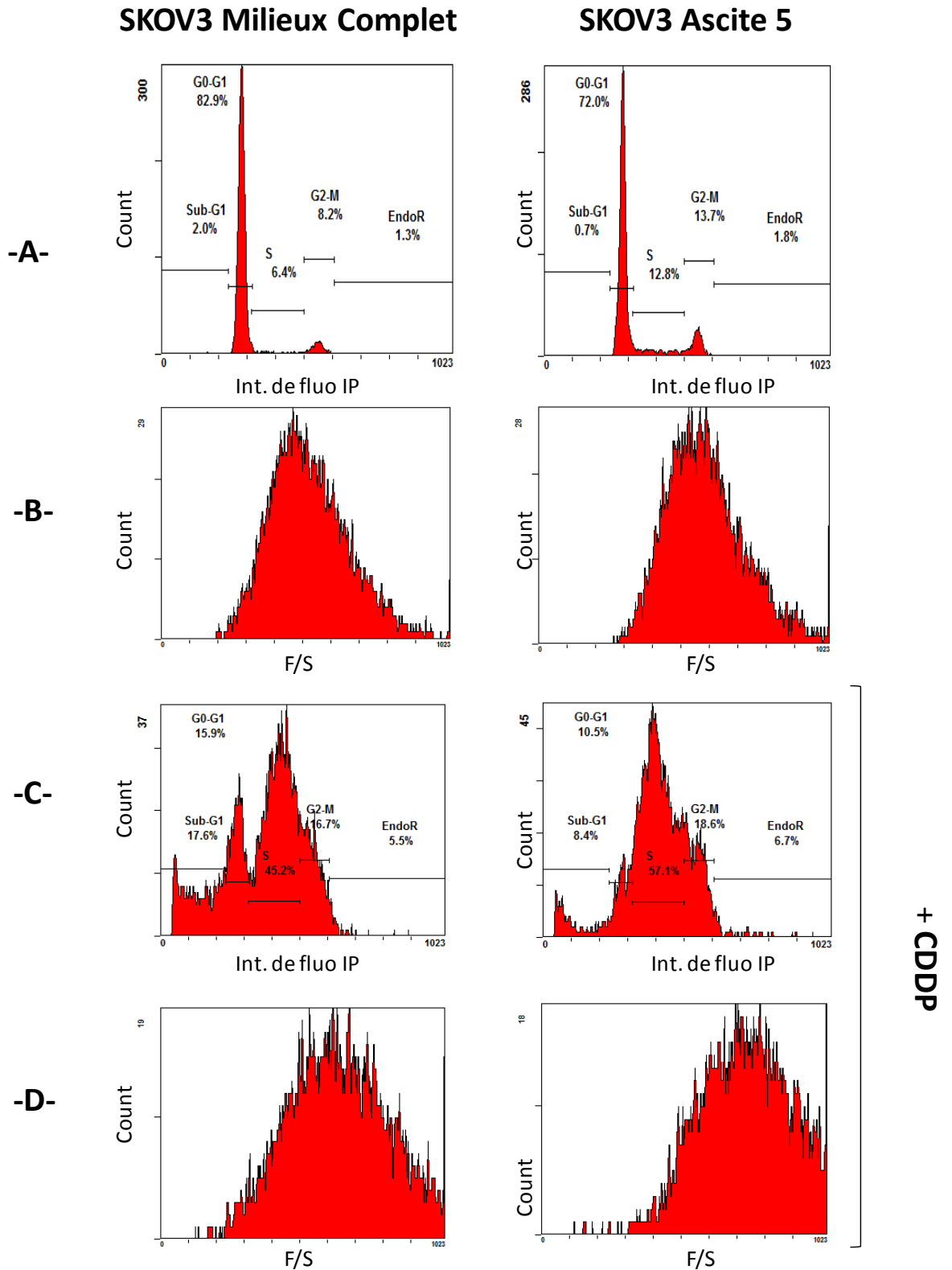


Figure 87: Impact de l'ascite sur la progression des cellules SKOV3 traitées au cisplatine dans les différentes phases du cycle cellulaire. $1,5 \cdot 10^6$ cellules SKOV3 ont été cultivées en condition de culture classique ou ascitique (Ascite 5). Ces cellules ont été traitées (C, D) ou non (A, B) avec $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cisplatine pendant 72 h. Suite à cette période de traitement, les culots cellulaires ont été fixés à l'éthanol 70 % et la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie de flux.

Par ailleurs, la proportion de cellules en G0/G1 diminue (49 à 13 %), la population en phase S semble rester stable (17 à 19 %). Le résultat le plus frappant concerne la population en G2/M qui augmente de 20 à 42 % environ traduisant un blocage probable des cellules en G2 (**Figure 86C**, **Tableau 11**). D'ailleurs, la **Figure 86D**, conforte ce blocage probable et révèle la présence de « grosses cellules ». La taille de la totalité des cellules dans ces conditions a doublée (décalage du pic sur la **Figure 86D**).

	Phases	Milieu complet	Ascite 5
SKOV3 non traitées	Pré-G1	2 %	0,7 %
	G0/G1	82,9 %	72,01 %
	S	6,04 %	12,8 %
	G2/M	8,2 %	13,7 %
SKOV3 traitées au CDDP	Pré-G1	17,6 %	8,4 %
	G0/G1	15,9 %	10,5 %
	S	45,2 %	57,1 %
	G2/M	16,7 %	18,6 %

Tableau 12: Influence du microenvironnement des cellules SKOV3 sur leur progression des cellules dans le cycle cellulaire suite à un traitement au CDDP.

Même si les cellules SKOV3 semblent moins sensibles à l'action du CDDP et que les effets sont moins prononcés, le traitement au CDDP de ces cellules engendre globalement les mêmes phénomènes, à savoir une augmentation des débris cellulaires et des cellules « apoptotiques » (**Figure 87A-D** et **Tableau 12**). L'ascite atténue également l'effet du CDDP et engendre une augmentation de taille et un blocage des cellules en G2/M.

Les traitements des cellules au CDDP en condition ascitique sont moins cytotoxiques qu'en conditions classiques de culture. La mortalité cellulaire (et notamment par apoptose) due au CDDP semble moins importante en condition ascitique. Par ailleurs, il semble qu'un blocage important des cellules au point de contrôle G2/M ait lieu dans les deux conditions (ascite et milieu).

La multitude de dommages à l'ADN due au CDDP semble engendrer ce blocage plus particulièrement en condition ascitique (mécanisme de défense de la cellule).

Les traitements au CDDP induisent une augmentation des débris cellulaires et probablement, une augmentation des cellules ayant déclenché un processus apoptotique (et donc une signalisation de mort par apoptose).

Ces observations sont confirmées par l'apparition de clivage de la protéine PARP lors des traitements au CDDP en milieu complet ou en ascite (**Figure 88**). Pour certaines ascites (ascite 5, par exemple), malgré une protection globale des cellules et le maintien d'une viabilité conséquente, en partie illustré par le pic pré-G1, le clivage de PARP, démontrant une mort par apoptose d'une partie des cellules, est révélé (**Figure 88A** et **Figure 88B**). Pour d'autres ascites (ascite 11), le suivi du clivage de la protéine PARP illustre l'effet protecteur de certaines ascites. En effet, le clivage de la protéine PARP est présent lors des traitements au CDDP en milieu complet, témoignant d'une mort par apoptose. En revanche, peu de clivage de la protéine PARP est visualisable lors de traitements au CDDP réalisés en condition ascitique (ascite 11), (**Figure 88C** et **Figure 88D**).

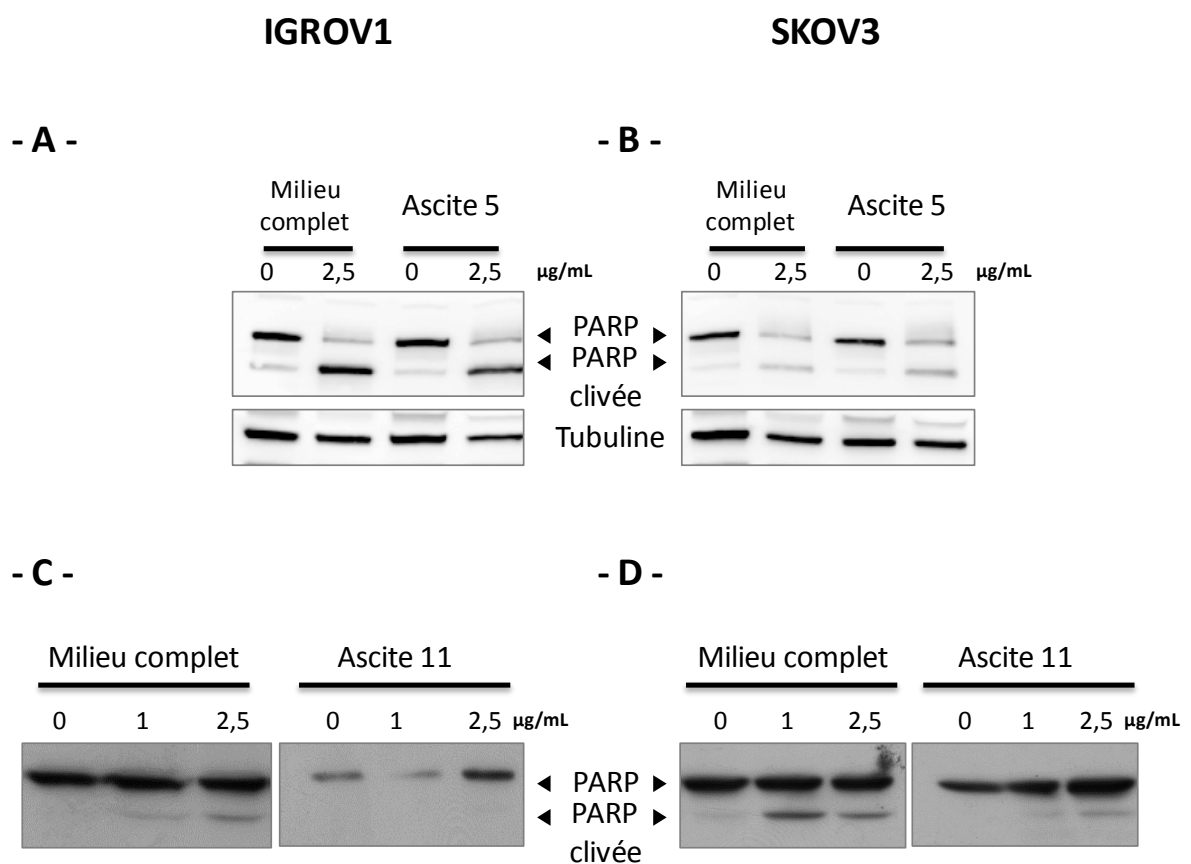


Figure 88: Influence de l'ascite sur la survie des cellules IGROV1 et SKOV3 traitées au CDDP. $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 (A, C) et SKOV3 (B, D) sont cultivées en milieu complet ou en ascites (Ascites 5 et 11) et traitées avec 2,5 µg/mL de CDDP pendant 72 h. À l'issue de ce temps de traitement, l'induction du processus d'apoptose est analysée en suivant le clivage de PARP par western-blot (A-D).

Afin d'estimer une différence de signalisation induite dans chacune des conditions utilisées (milieu complet +/- CDDP ou ascite +/- CDDP), l'expression et activation des MAP-Kinases Erk-1/-2 ont été recherchées. Les résultats représentés par la **Figure 89** ne révèlent pas de différences significatives d'expression et d'activation de ces kinases intracellulaires en fonction des différentes conditions. L'effet « protecteur » de l'ascite sur les cellules IGROV1 et SKOV3 vis-à-vis du traitement au CDDP semble donc Erk indépendant (**Figure 89**).

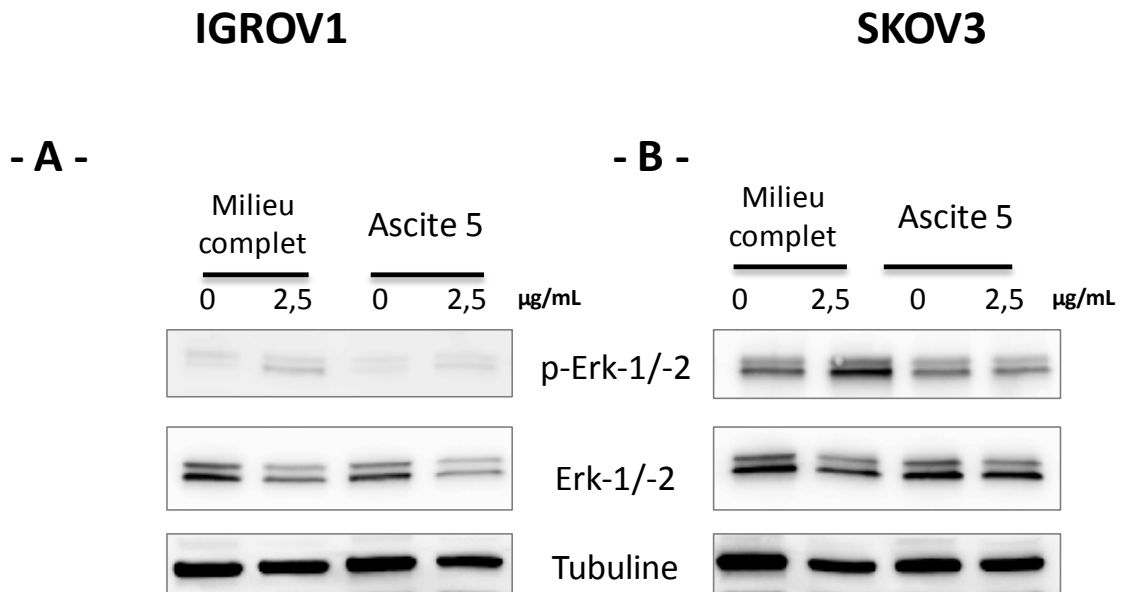
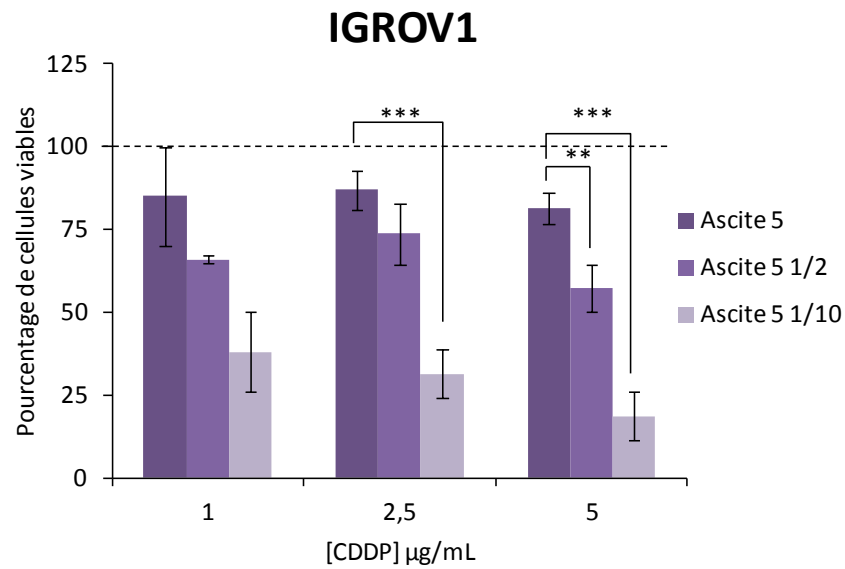


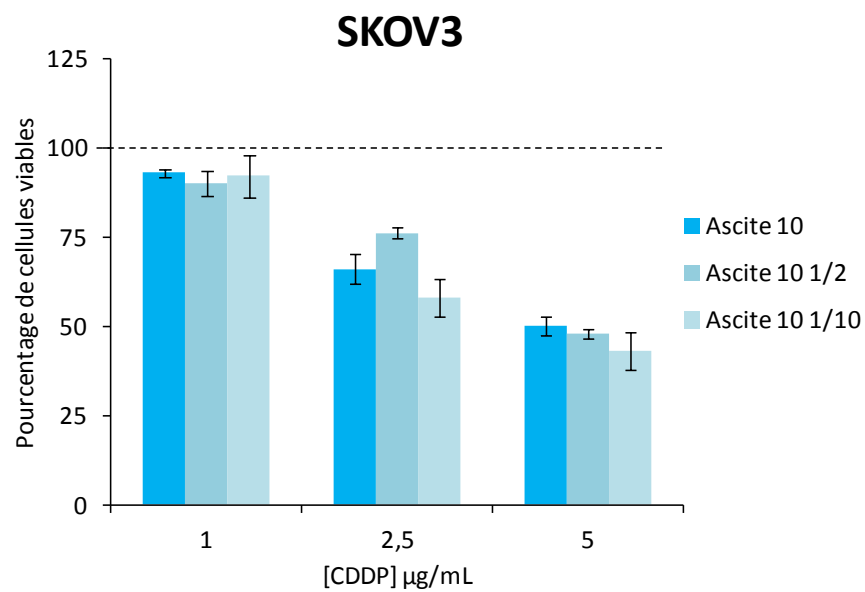
Figure 89: Influence de l'ascite sur la survie des cellules IGROV1 et SKOV3 traitées au CDDP. $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 (A) et SKOV3 (B) sont cultivées en milieu complet ou en ascite (Ascite 5) et traitées avec 2,5 µg/mL de CDDP pendant 72 h. À l'issue de ce temps de traitement, l'induction d'une signalisation de survie *via* la voie des MAP-Kinases est suivie en analysant la phosphorylation de Erk-1/-2 par western-blot.

Conclusion II.2 : - Le microenvironnement ascitique est propice à la résistance des cellules cancéreuses ovariennes aux traitements par le CDDP. Cette résistance est illustrée par des modifications de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire (blocage G2/M et diminution des proportions de cellules « apoptotiques » et de débris cellulaires en pré-G1) et semble indépendante de la voie de signalisation impliquant Erk-1/-2.

- A -



- B -



--- Cellules non traitées

Figure 90: Effet de la concentration protéique des ascites sur la viabilité cellulaire. 20 000 cellules IGROV1 (A) et SKOV3 (B) ont été cultivées en ascites (Ascites 5 ou 10) et traitées avec différentes doses de CDDP pendant 72 h. Les ascites ont été utilisées à différentes dilutions (au 1/2 et au 1/10). À l'issue de ce traitement, la viabilité des cellules est analysée avec le test XTT. Les tests statistiques sont réalisés à partir des conditions ascites non diluées. ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

II.3. Spécificité du microenvironnement ascitique sur la chimiorésistance des cellules cancéreuses ovariennes

L'étude de la composition des ascites montre qu'elles sont riches en protéines (**Tableau 13**). Or, en condition ascitique, la résistance des cellules IGROV1 et SKOV3 semble être concentration-dépendante (**Figure 90**). En effet, la sensibilité au CDDP des cellules IGROV1 est plus importante si l'ascite est préalablement diluée (1/10) dans du milieu de culture (**Figure 90A**). En revanche, cet effet n'est pas observé pour les cellules SKOV3 (**Figure 90B**).

Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle l'effet protecteur de l'ascite est dû à une forte concentration protéique, l'influence de l'ascite sur la réponse des cellules aux traitements par le CDDP, a été comparée avec celle d'un milieu ayant une teneur en protéines similaires. Le sérum de veau fœtal (SVF) présente l'avantage d'avoir une teneur en protéines importante et comparable à celle des ascites. Le Tableau 13 rapporte les concentrations en protéines et en glucose dans les différentes ascites utilisées ainsi que dans le SVF. Les concentrations protéiques des ascites sont du même ordre de grandeur, soit 36,5 mg/mL (+/-3 mg/mL). La concentration protéique du SVF est de 30 mg/mL. Les ascites testées et le SVF sont donc équivalents en concentration protéique. De façon similaire, le dosage du glucose dans ces milieux montre une équivalence entre les ascites et le SVF (1,42 mg/mL (+/-0,7 mg/mL) et 1,40 mg/mL, respectivement). Toutefois, les résultats des dosages du glucose dans les ascites sont plus hétérogènes.

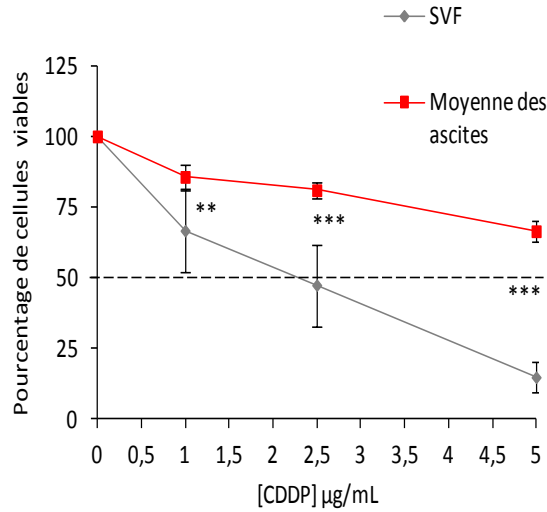
Ascites ou SVF	[Protéines] mg/mL	[Glucose] mg/mL
Ascite 1	32	1,70
Ascite 4	41	0,15
Ascite 5	47	2,05
Ascite 10	38	1,90
Ascite 11	31	1,30
SVF	30	1,40

Tableau 13: Dosage de protéines et du glucose dans les ascites et dans le SVF

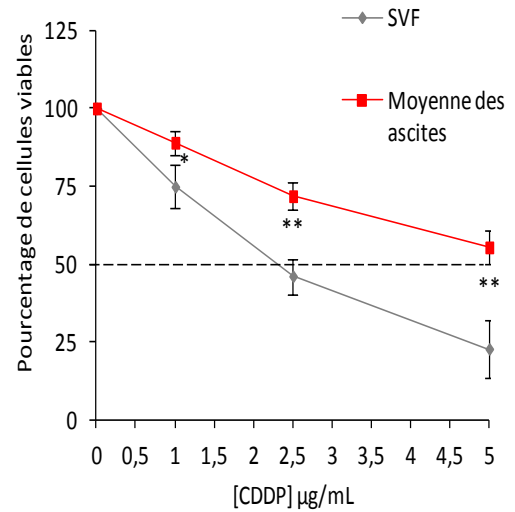
IGROV1

SKOV3

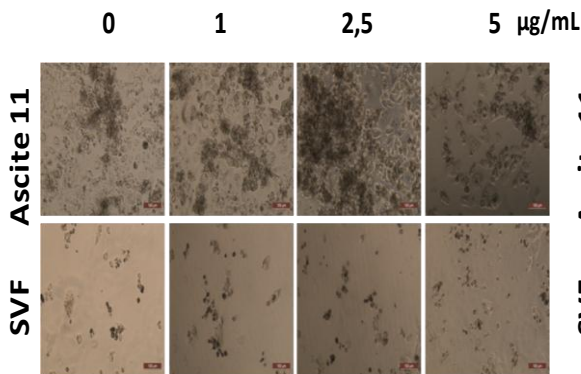
- A -



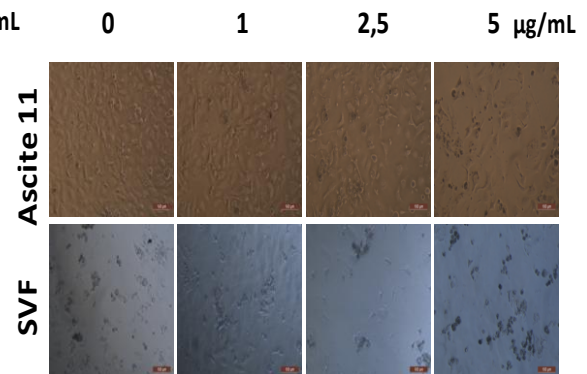
- B -



- C -



- D -



----- 50% de viabilité

Figure 91: Spécificité de l'ascite sur la chimiorésistance des cellules cancéreuses ovariennes. 20 000 cellules IGROV1 (A-C) et SKOV3 (B-D) ont été cultivées en milieu complet ou en SVF et traitées à des doses croissantes de CDDP pendant 72 h. À l'issue de ce traitement, la viabilité des cellules a été estimée par XTT (A-B) et la morphologie des cellules a été observée (C-D). Les tests statistiques ont été réalisés par rapport à la moyenne des ascites pour chaque dose. *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

Les traitements des cellules au CDDP ont été réalisés en présence d'ascite ou en présence de SVF et la viabilité cellulaire a été mesurée après 72 h de culture. Comme montré précédemment, les traitements au CDDP en ascites induisent une mortalité cellulaire dose-dépendante. En effet, à 5 µg/mL de CDDP, la viabilité des cellules IGROV1 reste supérieure à 50 % après 3 jours de traitement. Lorsque ce traitement est réalisé en présence de SVF, la mortalité est plus importante qu'en ascite. A 5 µg/mL de CDDP, seulement 10 % des cellules IGROV1 sont viables dans ces conditions (**Figure 91A**). Les traitements au CDDP des cellules SKOV3 en condition ascitique et en SVF, donnent des résultats comparables. La viabilité des cellules SKOV3 décroît de manière dose-dépendante en ascite. En présence de SVF, la viabilité des cellules SKOV3 après traitement au CDDP est inférieure à la viabilité cellulaire en présence d'ascite (**Figure 91B**).

L'analyse de la morphologie des cellules en ascite et en SVF après 72 h de culture montre que les cellules sont en « souffrance » dans le SVF et ce, même dans la condition non traitée. Le nombre de cellules présentes dans les puits de culture, en présence de SVF, est beaucoup moins important qu'en ascite. Les traitements au cisplatine amplifient cet état (**Figure 91B** et **Figure 91C**).

Bien que la teneur en protéines soit similaire en ascites et en SVF, ce dernier semble être un environnement peu propice pour la croissance des cellules et non protecteur vis-à-vis du CDDP. Ainsi, la protection de l'ascite ne semble pas être due à un effet « concentration-protéique » mais plutôt à des éléments bioactifs spécifiques contenus dans l'ascite.

Conclusion II.3 : L'effet protecteur de l'ascite contre les **agents chimiothérapeutiques** n'est pas dû à la concentration protéique des **ascites**. Cet **effet protecteur** semble être **spécifique** de la **composition** du **microenvironnement ascitique**.

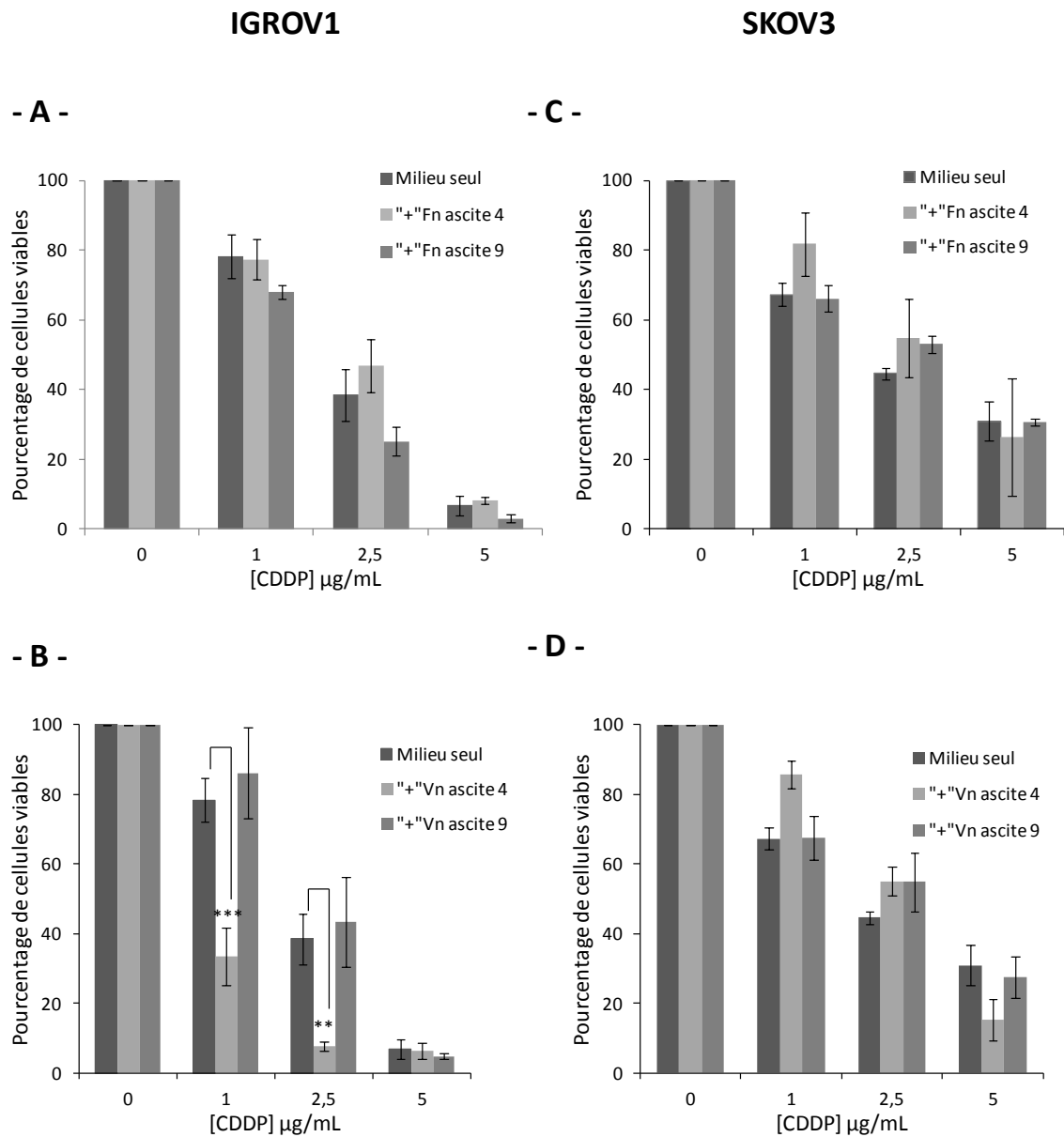


Figure 92: Impact de la MEC ascitique sur la chimiorésistance des cellules cancéreuses. 20 000 cellules IGROV1 (A-B) et SKOV3 (C-D) ont été cultivées en milieu seul ou additionné de fibronectine (Fn) (A-C) ou vitronectine (Vn) (B-D) ascitiques (purifiées à partir des ascites 4 et 9) à 20 $\mu\text{g/mL}$. Elles ont été traitées avec des doses croissantes de CDDP pendant 72 h. La viabilité cellulaire est estimée avec le test du XTT. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

II.4. Impact des protéines matricielles ascitiques sur la réponse des cellules au CDDP

La protection des ascites contre l'effet cytotoxique du CDDP semble dépendante d'éléments bioactifs contenus dans celles-ci. Parmi ces éléments, la fibronectine et la vitronectine, deux glycoprotéines matricielles qui, associées à leurs récepteurs de type intégrine α_v , semblent être majeures dans la « biologie des cancers ovariens », ont été purifiées (Cf résultats I.6.1 ; page 122). De plus, le rôle de ces deux molécules dans la formation des sphéroïdes (Cf résultats I.6.2 ; page 124) et leur effet protecteur sur la mort cellulaire induite par l'absence d'ancrage (Cf résultats I.6.3 ; page 126) suggèrent que ces deux protéines matricielles ascitiques pourraient interférer dans l'action du CDDP.

Il est donc apparu pertinent d'estimer l'influence de la fibronectine et la vitronectine ascitiques sur la chimiorésistance des cellules IGROV1 et SKOV3. Les cellules ont été incubées en présence de fibronectine ou de vitronectine, préalablement purifiées à partir d'ascite, et traitées au CDDP pendant 72 h.

La présence de fibronectine ascitique, dans le milieu de culture seul (sans SVF) et donc sans aucun autre apport potentiellement présent dans le SVF, n'influence pas la viabilité cellulaire et n'apporte aucune protection significative des cellules IGROV1 suite aux traitements de CDDP (**Figure 92A**). Concernant la vitronectine ascitique, il semble que son effet soit ascite-dépendant. La vitronectine issue de certaines ascites semble impacter la viabilité des cellules IGROV1 (**Figure 92B**). Ainsi, alors que la vitronectine purifiée à partir de l'ascite 9 n'engendre pas de modification significative de la viabilité cellulaire en réponse aux traitements au CDDP, comparativement aux traitements en milieu de culture seul, la présence de la vitronectine purifiée à partir de l'ascite 4, diminue significativement de la viabilité cellulaire (toujours par rapport au milieu de culture seul). Dans ce cas, la vitronectine ascitique semble potentialiser l'action du CDDP. De façon similaire, la présence de fibronectine ascitique, dans les mêmes conditions, n'influence pas la viabilité cellulaire et n'apporte aucune protection significative des cellules SKOV3 suite aux traitements de CDDP (**Figure 92C** et **Figure 92D**).

Aux vues des résultats obtenus, nous avons estimé la capacité des molécules ascitiques à interagir avec le CDDP.

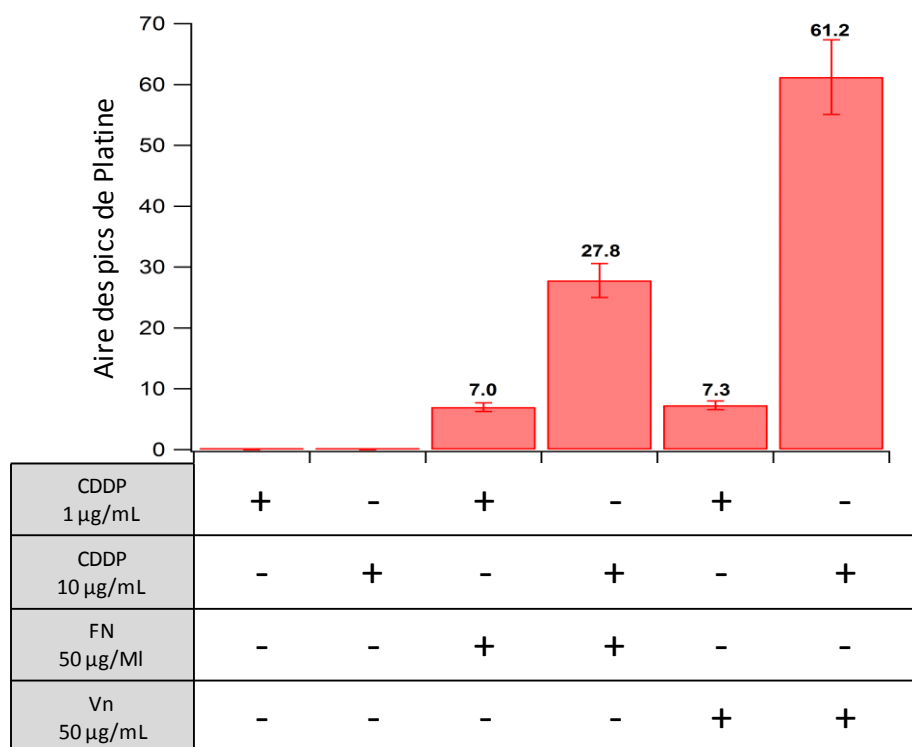
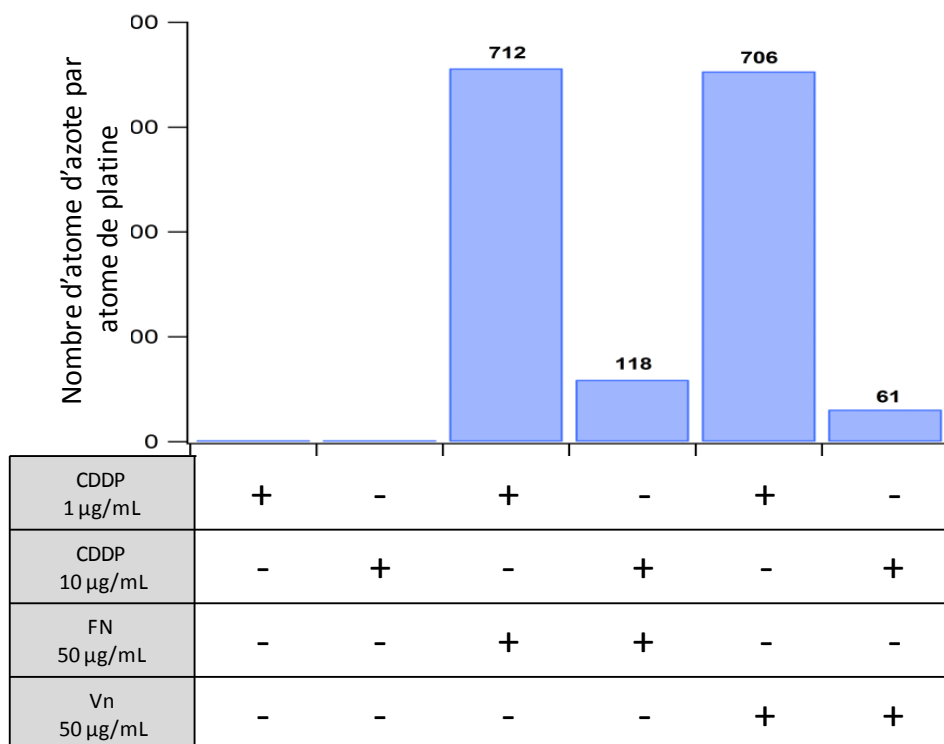
- A -**- B -**

Figure 93: Piégeage du CDDP par les protéines matricielles. 1 ou 10 µg/mL de CDDP ont été incubés seuls ou en présence de fibronectine (Fn) ou de vitronectine (Vn) à 50 µg/mL pendant 3 h à 37°C. Ensuite les solutions ont été déposées et séchées sur des lamelles en verre préalablement traitées. Les échantillons ont été analysés par XPS.

II.4.1 « Piégeage » du CDDP par la vitronectine et la fibronectine ascitiques

Des expériences préliminaires estimant la capacité des protéines matricielles fibronectine et vitronectine à « piéger » le CDDP ont été ainsi réalisées. Le CDDP a été incubé à différentes concentrations (1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en présence de vitronectine ou fibronectine (à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en milieu de culture sans SVF. Les solutions ont été analysées par la méthode de spectroscopie photoélectronique X (XPS).

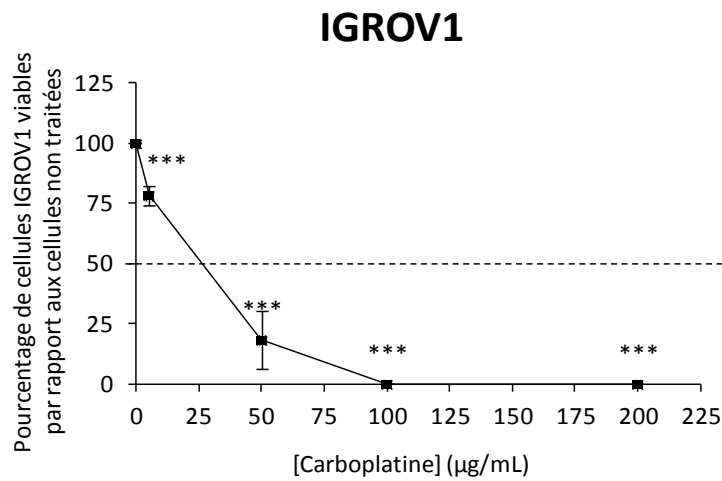
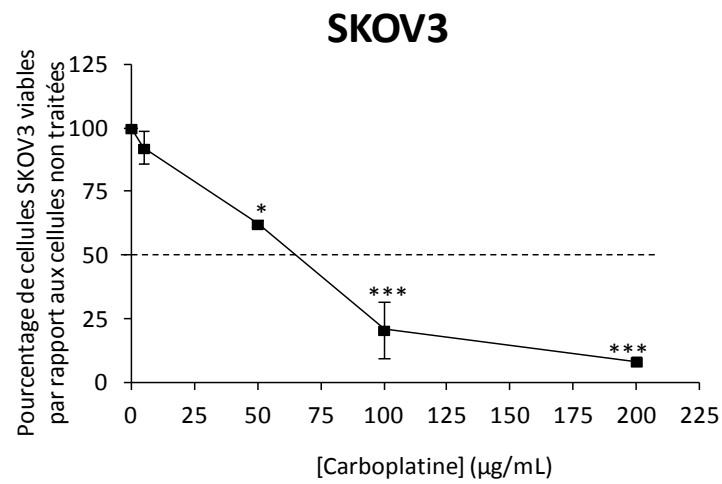
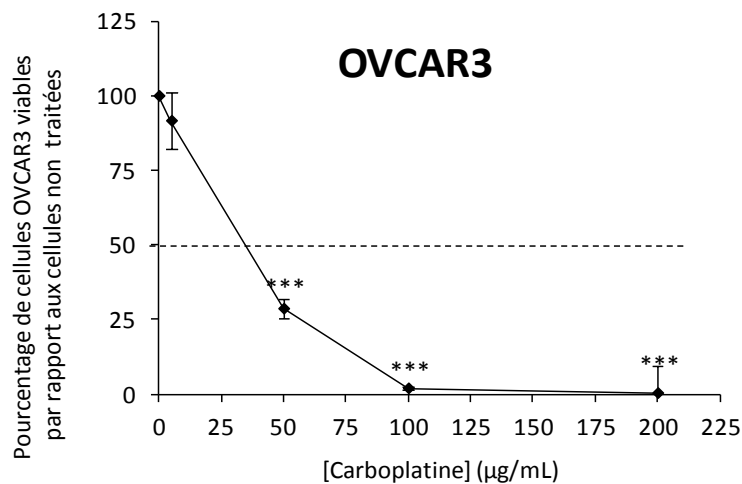
Pour une concentration de CDDP de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la quantité de CDDP fixée à la fibronectine ou la vitronectine est identique (environ 7 unités arbitraires (UA)). En revanche, avec 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CDDP, la quantité de CDDP fixée sur la vitronectine est deux fois plus importante que sur la fibronectine (61 UA et 28 UA respectivement). Ces résultats tendent à montrer que le CDDP aurait plus d'affinité pour la vitronectine que pour la fibronectine (**Figure 93A**).

La **Figure 93B**, permet de visualiser la quantité d'atome d'azote fixé par atome de platine. A faible concentration de CDDP, les valeurs sont équivalentes (700 pour chaque protéine). Des différences sont observées avec 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CDDP. On remarque qu'il y a 118 atomes d'azote par atome de platine pour la fibronectine et 61 atomes d'azote par atome de platine dans le cas de la vitronectine. Or la fibronectine est composée de 1917 atomes d'azote en moyenne, 662 atomes d'azote pour la vitronectine. Ce qui représente, 11 atomes de platine fixés par molécule de vitronectine et 16 atomes de platine fixés par molécule de fibronectine. En tenant compte du rapport entre le nombre de platine fixé et la taille des protéines, la vitronectine fixe plus d'atome de platine que la fibronectine. Ce qui révèle que le platine a plus d'affinité pour la vitronectine que pour la fibronectine.

L'analyse des échantillons de CDDP seul, à 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n'ont pas permis de détecter les atomes de platine. Ils ont pu être dégradés au moment de l'analyse. Ce contrôle indique que le CDDP seul ne peut pas être détecté par XPS. La présence de protéines l'ayant au préalable « piégé » semble être nécessaire. Il est à noter que ces expérimentations sont préliminaires et doivent être confortées.

Conclusion II.4 : - Dans les conditions expérimentales réalisées (absence totale de SVF), la **fibronectine** et la **vitronectine ascitiques ne semblent pas être** des éléments **protecteurs suffisants** vis-à-vis de l'action du CDDP. La **vitronectine**, selon l'origine de l'ascite à partir de laquelle elle a été purifiée, pourrait même **potentialiser l'action du CDDP**.

- La **fibronectine** et la **vitronectine** sont capables d'**interagir** avec le **CDDP**. Ce dernier semble avoir plus d'**affinité** pour la **vitronectine** que pour la fibronectine.

-A-**-B-****-C-**

----- 50 % de cellules viables

Figure 94: Effet du carboplatine sur les cellules cancéreuses ovariennes. 1.10^3 cellules IGROV1 (A), SKOV3 (B) et OVCAR3 (C) adhérentes ont été incubées en plaque 96 puits pendant 72 h avec des doses croissantes de carboplatine (0-200 µg/mL). La viabilité des cellules a été mesurée à l'issue de la période de traitement en utilisant le test XTT. Les tests statistiques ont été effectués par rapport à la condition non traitée. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

II.5. Réponse des cellules IGROV1, SKOV3 et OVCAR3 adhérentes au carboplatine

Le carboplatine (CA) est également utilisé dans les traitements chimiothérapeutiques des patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens. Il est notamment utilisé en combinaison avec le paclitaxel. Les réponses des cellules IGROV1, SKOV3 et OVCAR3 cultivées en condition adhérente ou sous forme de sphéroïdes, à ce dérivé du platine ont été analysées en condition classique de culture (milieu complet).

II.5.1. Effet du carboplatine sur les cellules IGROV1, SKOV3 et OVCAR3

Les cellules cultivées en condition classique de culture, ont été incubées en présence de différentes concentrations de carboplatine, entre 0 et 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pendant 72 h. A l'issue de ce temps de traitement la viabilité cellulaire a été mesurée (**Figure 94**).

La viabilité des cellules IGROV1 diminue en fonction des doses de carboplatine. Le pourcentage de cellules viables passe de 100 à 0 % entre 0 et 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La dose de carboplatine qui induit 50 % de mortalité à 72 h est de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+/- 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figure 94A**). La viabilité des cellules SKOV3 diminue au cours du traitement et cet effet est également dose-dépendant. Toutefois, le pourcentage de viabilité passe de 100 à 40 % après traitement avec 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carboplatine. La dose de CA qui induit 50 % de mortalité après 72 h de traitement est 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+/-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figure 94B**). Dans le cas des cellules OVCAR3, l'effet observé avec les deux lignées cellulaires précédentes est similaire. La viabilité cellulaire diminue en fonction des doses de carboplatine administrées. En effet, le pourcentage de cellules viables passe de 100 % à 0 % à partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carboplatine. La concentration minimale inhibitrice du carboplatine pour les cellules OVCAR3 à 72 h est de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+/-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figure 94C**).

II.5.2. Caractérisation de l'effet du carboplatine sur la survie des cellules formant des sphéroïdes

Comme démontré précédemment, l'organisation des cellules en amas multicellulaires les protège de l'anoïkis en milieu complet (Cf résultats I.3.2, page 108). Cependant, l'organisation des cellules en sphéroïdes leur permet-elle également d'être moins sensibles aux traitements à base de carboplatine?

Les cellules ont étéensemencées sur un substrat non-adhésif en milieu complet pendant 24 à 48 h. Elles ont été traitées avec différentes doses de carboplatine et la morphologie des cellules a été observée.

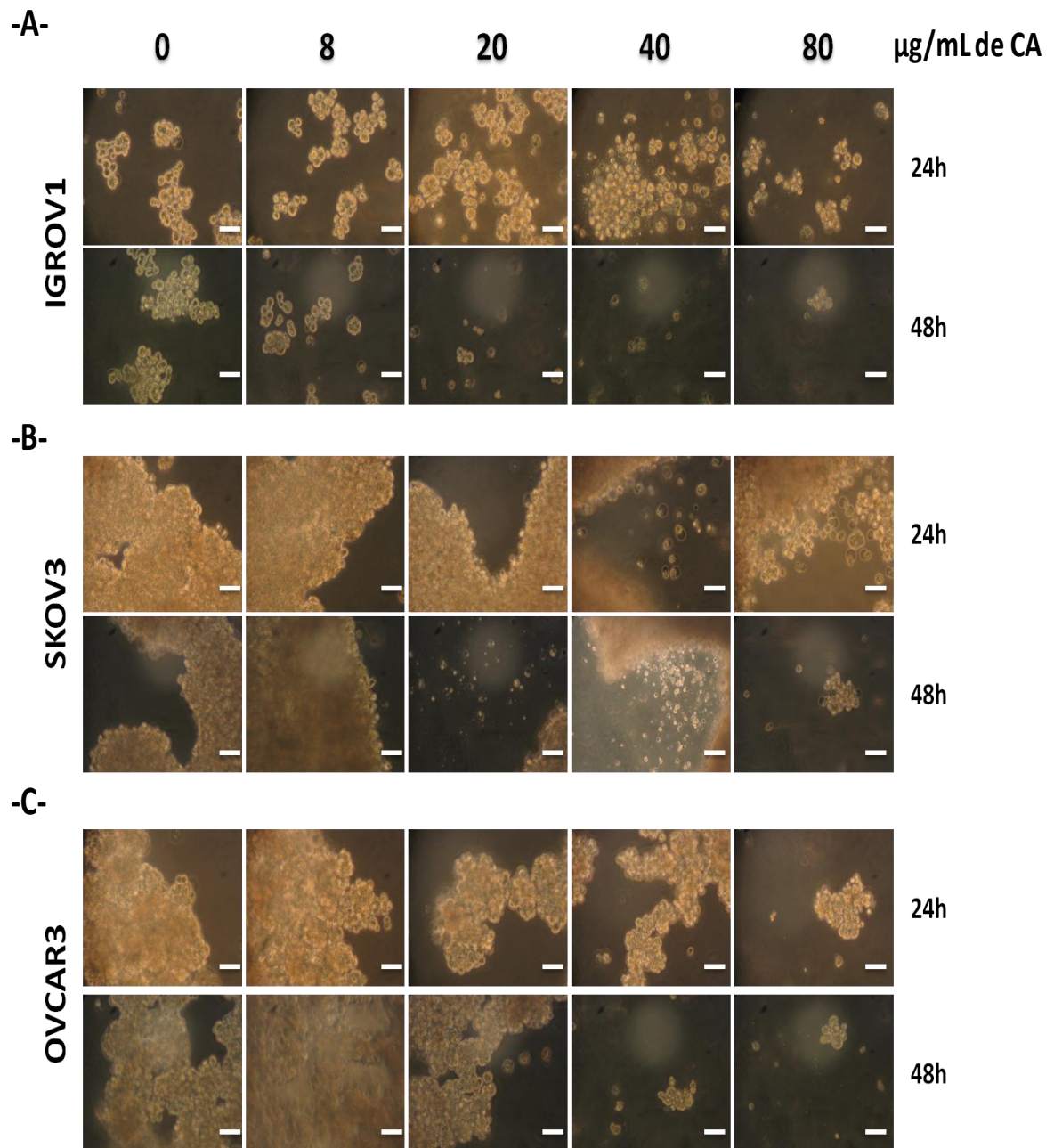


Figure 95: Effet du carboplatine sur les sphéroïdes d'IGROV1, SKOV3 et OVCAR3. $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 (A), SKOV3 (B) et OVCAR3 (C) ont étéensemencées dans des boîtes de culture recouvertes d'agarose pendant 48 h avec des doses croissantes de carboplatine (0-80 $\mu\text{g/mL}$). La morphologie des cellules et la structure des agrégats multicellulaires ont été observées toutes les 24 h.

Après 24 h de culture dans ces conditions, le traitement des cellules IGROV1 avec, notamment, 40 µg/mL de carboplatine induit une désorganisation des sphéroïdes. Des débris cellulaires sont également observés. Après 48 h de culture, à partir de 8 µg/mL de carboplatine des différences morphologiques sont remarquées : les sphéroïdes sont désorganisés, ils sont de petites tailles par rapport à la condition non traitée (environ 3 ou 5 cellules par grappe) et on peut noter la présence de débris cellulaires. Outre l'effet dose-dépendant, on note dans ce cas un effet temps-dépendant (**Figure 95A**).

Dans le cas des cellules SKOV3, après 24 h de traitement, à des doses élevées de carboplatine, les agrégats multicellulaires sont peu dissociés. Toutefois, les cellules sont en « souffrance », notamment celles localisées en périphérie des amas. Des débris cellulaires sont également observés. Après 48 h de culture, les observations sont similaires. A 80 µg/mL de carboplatine, de petits agrégats sont observés, les gros agrégats multicellulaires sont déstructurés (**Figure 95B**).

Après 24 et 48 h de traitement à différentes doses de carboplatine, la taille des sphéroïdes formés par les cellules OVCAR3 diminuent (à partir de 20 µg/mL). Une grande quantité de cellules isolées et de débris cellulaires sont présents dans le milieu de culture (**Figure 95C**).

La présence de carboplatine dans le milieu de culture n'interfère pas avec la formation des amas multicellulaires à faibles concentrations. Comparativement aux cellules adhérentes, le seuil de tolérance au carboplatine des cellules organisées en agrégats multicellulaires semble être plus élevé.

Afin de confirmer ces résultats, la viabilité des cellules formant les sphéroïdes traitées au carboplatine a été analysée. Les sphéroïdes de cellules IGROV1 et SKOV3 obtenus après 72 h de culture ont été traités avec du carboplatine à la concentration correspondant à leur CI_{50} à 72 h (25 et 80 µg/mL respectivement) (**Figure 96**).

La viabilité des cellules IGROV1 formant des sphéroïdes et traitées avec 25 µg/mL de carboplatine diminue en fonction du temps avec 28 % de cellules viables à 72 h par rapport aux cellules non traitées (**Figure 96A**). La « mortalité », ou plutôt l'activation d'un processus apoptotique au sein des sphéroïdes, a été analysée en suivant le clivage de la protéine PARP par western-blot. A partir de 48 h de traitement, un fort clivage de la protéine PARP est observé. A 72 h, la quantité de cellules obtenue ne permet pas de faire des dépôts dans les puits de SDS-PAGE (**Figure 96B**). Le traitement au carboplatine semble induire une forte mortalité suite au déclenchement d'un processus apoptotique.

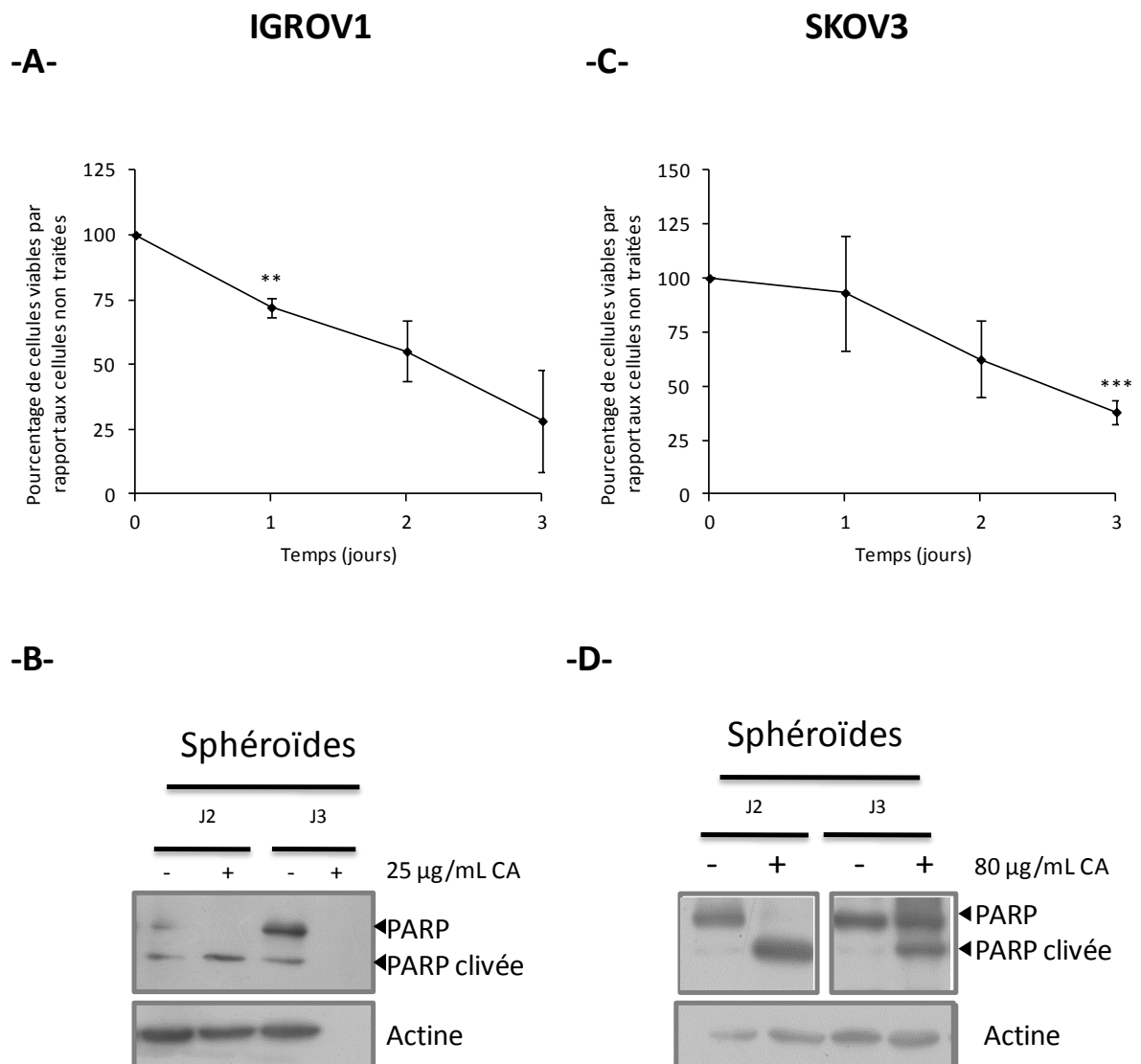


Figure 96: Effet du carboplatine sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes (au cours de la formation des grappes). $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 (A-B) et SKOV3 (C-D) ont été ensemencées en boîtes de culture recouvertes d'agarose pendant 72 h. Des doses fixes de carboplatine, 25 et 80 µg/mL respectivement, ont été ajoutées de façon concomitante. La viabilité cellulaire a été déterminée par comptage avec le test d'exclusion au bleu trypan (A et C). La mortalité des cellules a été analysée en suivant le clivage de la protéine PARP par western-blot (B et D). ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$.

Dans le cas des cellules SKOV3 traitées avec 80 µg/mL de carboplatine, le pourcentage de viabilité passe de 100 à 38 % (**Figure 96C**). D'autre part, l'analyse du clivage de la protéine PARP, révèle un fort clivage de la molécule lorsque ces cellules sont traitées (**Figure 96D**). Comme dans le cas des sphéroïdes formés par les cellules IGROV1 le carboplatine perturbe la formation des agrégats multicellulaires formés par les cellules SKOV3 et induit la mort par apoptose des cellules.

II.5.3. Effet du carboplatine sur les sphéroïdes d'IGROV1 et SKOV3 déjà formés

Au moment des traitements chimiothérapeutiques, les cellules peuvent déjà être organisées sous forme de sphéroïdes ou d'agrégats multicellulaires. Ainsi, l'influence du carboplatine sur la viabilité des cellules IGROV1 et SKOV3 après organisation en sphéroïdes ou agrégats multicellulaires a été analysée.

L'ajout de carboplatine dans le microenvironnement des cellules IGROV1 organisées en sphéroïdes depuis 24 h, induit une diminution du pourcentage de viabilité des cellules IGROV1, (100 à 47 % après 72 h de traitement au carboplatine) (**Figure 97A**). Cependant, la viabilité cellulaire est supérieure de 20 % par rapport à celle obtenue quand les cellules sont ensemencées de façon concomitante avec l'ajout de carboplatine (**Figure 96A**). En termes de mortalité, une augmentation du clivage de PARP est observée à partir de 48 h de traitement (**Figure 97B**).

La viabilité des cellules SKOV3 diminue peu au cours de la période de traitement. En effet, entre le premier et le dernier jour de traitement, le pourcentage de cellules viables passe de 100 à 95 %. Les cellules SKOV3 semblent être peu sensibles au carboplatine une fois qu'elles sont organisées en agrégats multicellulaires (**Figure 97C**). Ces résultats sont confirmés par l'analyse du clivage de la protéine PARP par western blot. Une augmentation du clivage de PARP est observée après 48 h mais celui-ci diminue après 72 h (**Figure 97D**).

Ces résultats démontrent que les cellules cancéreuses ovariennes répondent aux traitements au carboplatine. Toutefois, la sensibilité des cellules est dépendante de leur organisation (sphéroïdes, agrégats multicellulaires ou monocouches), de la durée de traitement et des doses appliquées.

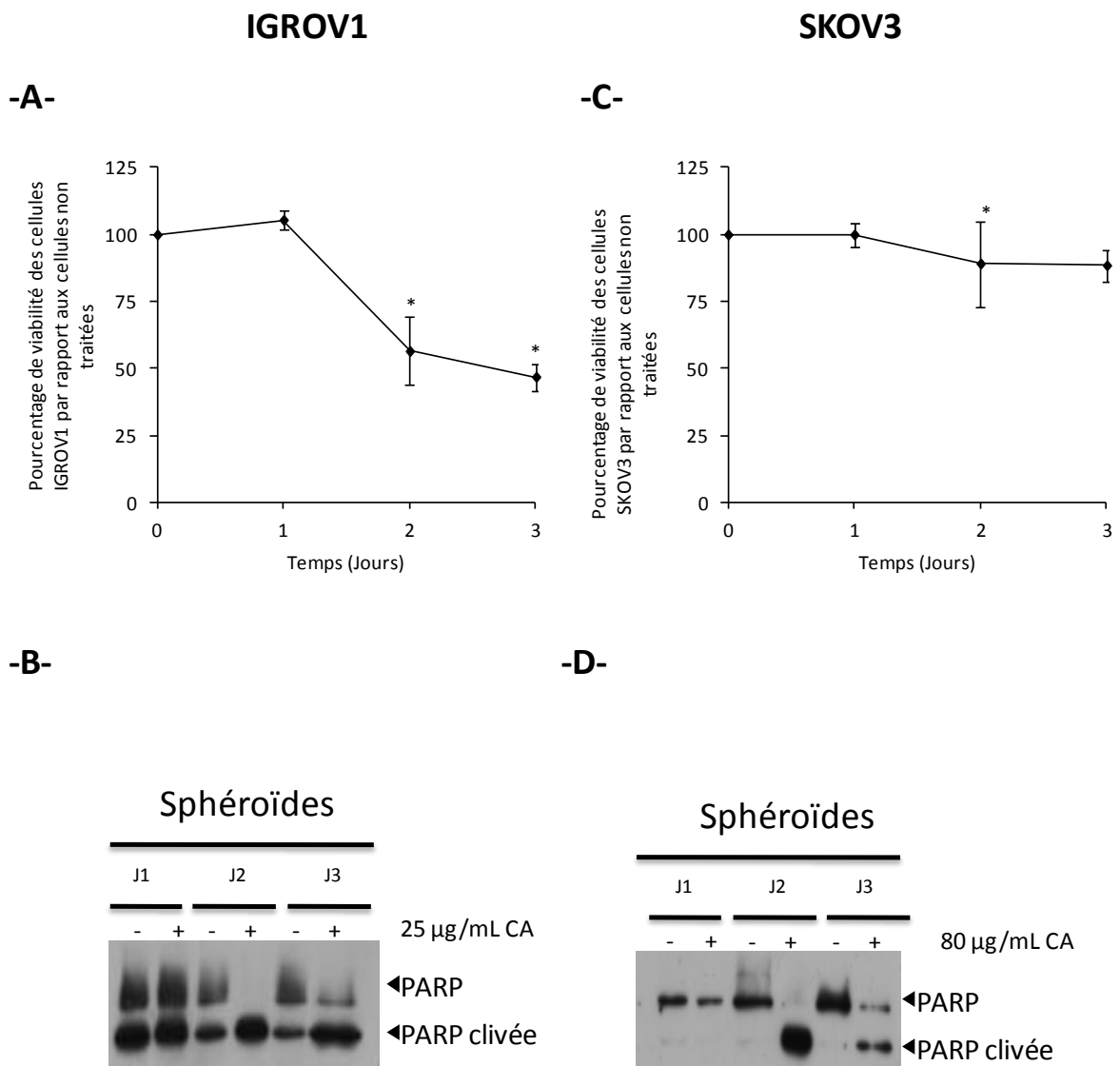


Figure 97: Effet du carboplatine sur la viabilité des cellules cancéreuses ovariennes (après formation des grappes). $1,5 \cdot 10^6$ cellules IGROV1 (A-B) et SKOV3 (C-D) ont étéensemencées en boîtes de culture recouvertes d'agarose pendant 24 h. Suite à ce temps d'incubation, des doses fixes de carboplatine, 25 et 80 µg/mL respectivement, ont été ajoutées sur les agrégats multicellulaires formés. La viabilité cellulaire a été déterminée par comptage avec le test d'exclusion au bleu trypan (A et C). La mortalité des cellules a été analysée en suivant le clivage de la protéine PARP par western-blot (B et D). * $p < 0,05$.

Une autre situation de traitement peut-être envisagée, en effet, au cours de la chimiothérapie, les cellules adhérentes aux foyers tumoraux primaires peuvent être en contact avec l'agent chimiothérapeutique pendant une période donnée avant de s'exfolier et de disséminer dans la cavité péritonéale. Quelle conséquence peut avoir un traitement de cellules adhérentes sur la formation de sphéroïdes ou d'agrégats multicellulaires ?

Afin d'analyser ce processus, les cellules cancéreuses ovariennes IGROV1 et SKOV3 ont été cultivées en condition adhérente jusqu'à atteindre un état de sub-confluence. Ensuite, les cellules ont été traitées avec des concentrations fixes de carboplatine, pendant 24 h avant d'être cultivées sur substrat non-adhésif pendant 72 h. La morphologie des cellules et l'organisation des sphéroïdes ont ensuite été observées.

Dans les premières 24 h, les cellules IGROV1 sont capables de former des sphéroïdes. Ces sphéroïdes sont stables jusqu'à 48h (donc pendant 24 h). En revanche à partir de 72 h, les sphéroïdes se désorganisent, des débris cellulaires sont présents et la majorité des cellules sont désolidarisées des sphéroïdes et se retrouvent isolées dans le milieu de culture (**Figure 98A**).

Dans le cas des cellules SKOV3, les agrégats multicellulaires formés après 24 h de culture ne sont pas similaires à ceux observés dans la condition non traitée. Les cellules sont proches les unes des autres mais ne semblent pas jointives. Après 48 h des cellules isolées sont observées et après 72 h de culture, les agrégats multicellulaires sont désorganisées, les cellules sont globalement isolées (**Figure 98B**).

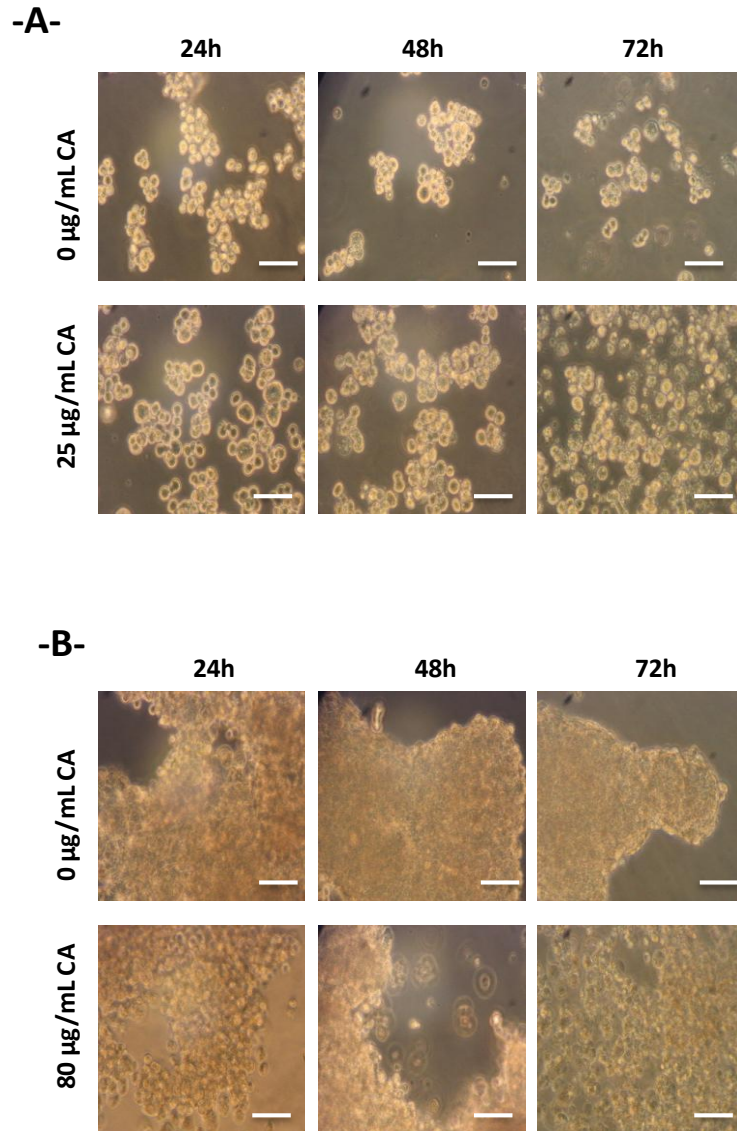
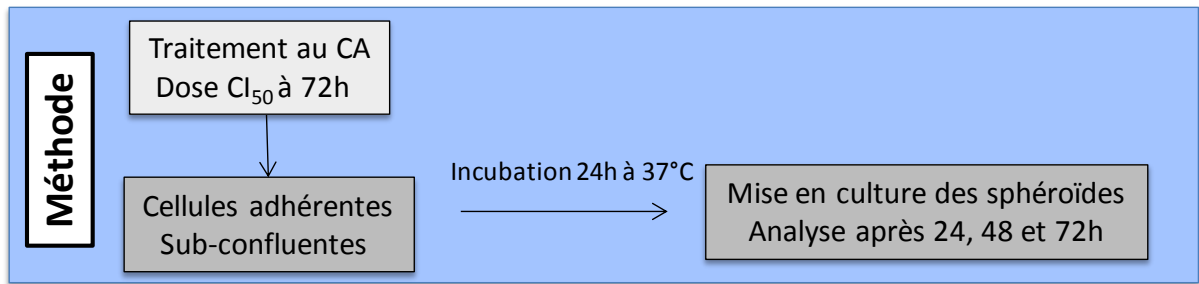


Figure 98: Effet du carboplatine sur l'organisation des cellules adhérentes avant formation des sphéroïdes. Les cellules IGROV1 (A) et SKOV3 (B) sont cultivées en condition adhérente jusqu'à 70 – 80 % de confluence. Les cellules ont été traitées avec des doses fixes de carboplatine, 25 et 80 µg/mL respectivement, pendant 24 h. Les cellules ont été ensuite rincées puis décrochées du support de culture. $1,5 \cdot 10^6$ cellules ont été cultivées en milieu complet, en condition non-adhérente pendant 72 h. La morphologie des cellules et la structure des agrégats multicellulaires ont été observées toutes les 24 h. Les barres d'échelle représentent 50 µm.

Conclusion II.5 : - Les **cellules** IGROV1, SKOV3 et OVCAR3 sont **sensibles** aux traitements à base de **carboplatine**. Les **effets** observés sont **dose-dépendants**. Cependant, les cellules **SKOV3** semblent plus **résistantes** au carboplatine que les cellules IGROV1 et OVCAR3.

- La **sensibilité** des cellules cultivées sous forme d'**agrégats multicellulaires** est **dépendante**, d'une part du **temps de traitement**, et d'autre part, de la **dose appliquée**. De plus, selon la **lignée cellulaire considérée**, la sensibilité des cellules au carboplatine, diffère.

- Le **carboplatine** semble **perturber** la **formation** et la **stabilité** des **sphéroïdes tumoraux**. Ce dérivé du platine semble également induire une **forte mortalité** suite au **déclenchement** d'un **processus apoptotique**.

- L'**organisation** des cellules en **sphéroïdes** ou **agrégats multicellulaires** semble **protéger** les cellules de l'effet cytotoxique du carboplatine. Cependant cet **effet** est **limité** dans le **temps**.

- Le **prétraitement** de **cellules** cancéreuses ovariennes **adhérentes** avec du **carboplatine** semble **perturber** la **formation**, la **stabilité** et l'**organisation** des **sphéroïdes tumoraux**. D'autre part, la **viabilité** des **cellules** semble également **compromise**.

Résumé

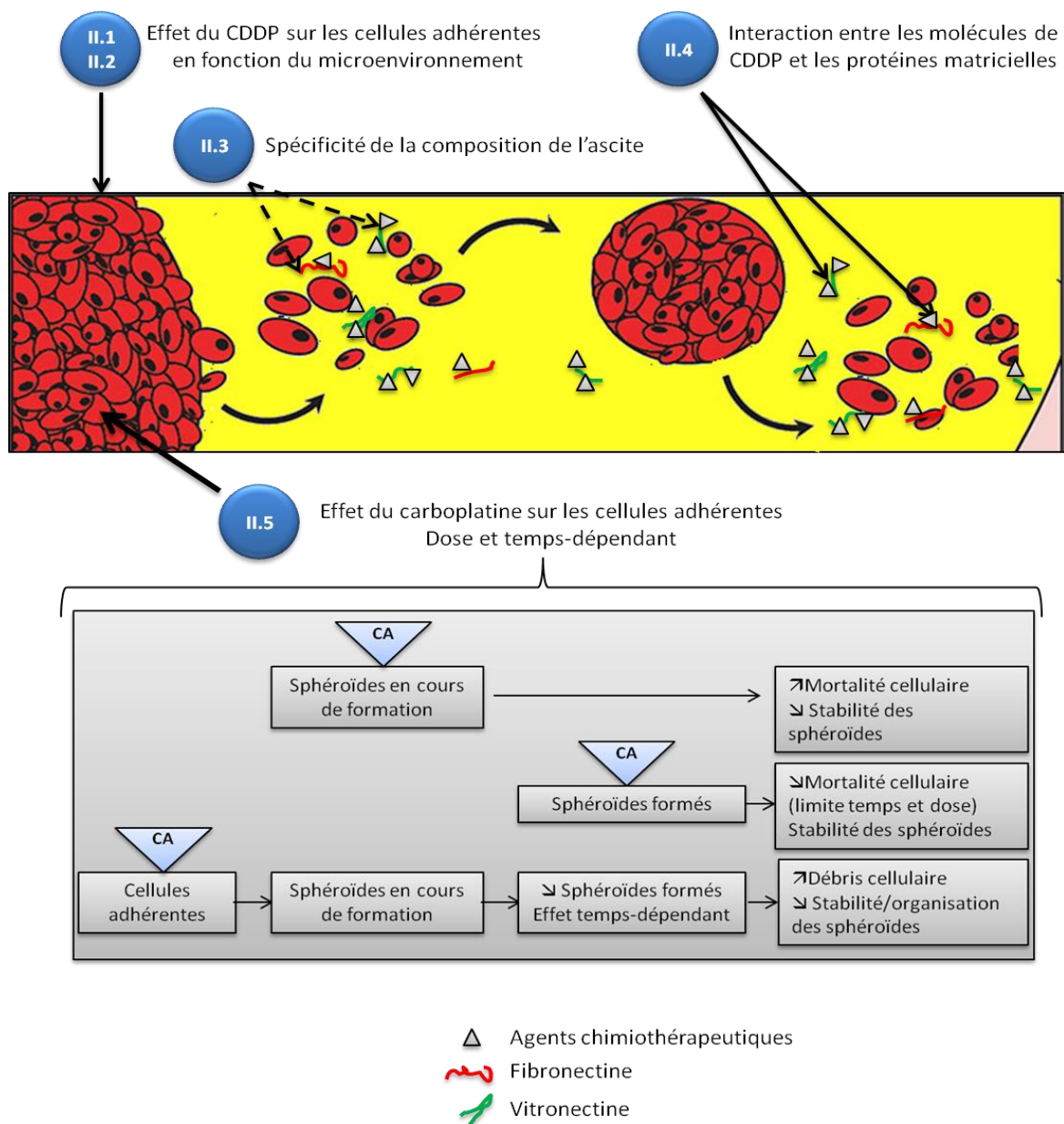


Figure 99: L'ascite influence la sensibilité des cellules cancéreuses ovariennes aux traitements à base de platine. Modifié de (Peart et al. 2015)

Les cellules cancéreuses ovariennes sont sensibles aux traitements à base de cisplatine (Ccl: II.1). Cependant, si ces cellules se trouvent dans un microenvironnement tel que l'ascite, la sensibilité de ces cellules vis-à-vis du cisplatine diminue (Ccl: II.2). L'effet protecteur de l'ascite ne semble pas être dû à la teneur en protéines mais plutôt à la spécificité de sa composition (Ccl: II.3). Bien que les protéines matricielles vitronectine et fibronectine ne semblent pas exercer un effet protecteur contre l'effet cytotoxique du cisplatine, ces protéines interagissent avec cet agent chimiothérapeutique avec plus ou moins d'affinité (Ccl: II.4). Les cellules cancéreuses ovariennes sont également sensibles au carboplatine (CA). En fonction de l'organisation des cellules, de la durée de traitement, des doses appliquées, les cellules peuvent être plus résistantes à ce dérivé du platine (Ccl : II.5).

Discussion - Perspectives

Discussion

Comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents à la récurrence des cancers de l'ovaire : un enjeu pour la prise en charge des patientes.

75 % des adénocarcinomes ovariens sont diagnostiqués à des stades avancés. Les taux de survie à 5 ans des patientes présentant un cancer de stade III-IV est inférieur à 27% (Kipps, Tan, and Kaye 2013). La prise en charge thérapeutique est basée sur une chirurgie cytoréductrice suivie d'une chimiothérapie à base de dérivés du platine (cisplatine ou carboplatine) en combinaison avec des taxanes (paclitaxel) (McGuire et al. 1996; Piccart et al. 2000). Bien que la réponse initiale des patientes au traitement soit correcte (de l'ordre de 80%), plus de trois quart des patientes vont présenter des récurrences. La propension des cellules cancéreuses ovariennes à disséminer dans la cavité abdominale et à développer une résistance aux chimiothérapies concourent à la récurrence de la pathologie (Ahmed and Stenvers 2013; Kipps, Tan, and Kaye 2013).

Le mode de dissémination des cellules cancéreuses ovariennes est atypique. En effet, les cellules cancéreuses ovariennes issues du foyer tumoral primaire empruntent préférentiellement la voie transcoelomique et très rarement la voie hématogène, avant de former des foyers tumoraux secondaires notamment au niveau du tissu mésothélial du péritoine et du grand épiploon (Tan, Agarwal, and Kaye 2006; Lengyel 2010). Ce mode de dissémination implique l'établissement de fortes interactions par les cellules cancéreuses (entre les cellules et entre les cellules et les différents microenvironnements rencontrés) et aussi des étapes de dé-/ré-adhérence, migration et prolifération. Les cellules cancéreuses sont exfoliées du foyer primaire et se retrouvent en suspension dans la cavité péritonéale, sous forme isolées ou organisées en amas multicellulaires, appelés sphéroïdes (Sodek et al. 2012).

En outre, au moment du diagnostic, plus d'un tiers des cas présente une accumulation d'ascite dans la cavité abdominale et la plupart des patientes ont des ascites au moment de la récurrence. La présence de ce liquide inflammatoire est considérée comme un facteur de morbidité et est de mauvais pronostic (Ahmed and Stenvers 2013; Kipps, Tan, and Kaye 2013). Dans une étude limitée aux patientes atteintes d'un adénocarcinome de stades III-IV, le taux de survie à 5 ans des femmes ne présentant pas d'ascites est de 45 % alors qu'il est de 5 % pour celles présentant des ascites (Puls et al. 1996).

L'accumulation d'ascite dans la cavité abdominale résulte d'une rupture de l'équilibre entre production et résorption du liquide péritonéal, produit continuellement, suite à une augmentation de la perméabilité des vaisseaux lymphatiques sous l'action de facteurs tumoraux. De plus, cette accumulation est amplifiée par l'obstruction des canaux de drainage par les cellules cancéreuses

métastatiques (Byrne et al. 2003). Ainsi, l'accumulation d'ascite peut apparaître comme une conséquence du développement tumoral. Cependant, les courants ascitiques favorisent l'exfoliation des cellules cancéreuses à partir de l'ovaire et dictent leurs voies de dissémination intrapéritonéale (Sodek et al. 2012; Dong et al. 2013). D'un point de vue clinique, la présence d'ascite est associée avec la dissémination intrapéritonéale des cancers ovariens et contribue également au développement de la tumeur.

Les cellules cancéreuses ovariennes sont immergées dans ce liquide inflammatoire. A ce titre, l'ascite constitue un microenvironnement tumoral particulier. En effet, elle présente l'opportunité unique, en raison de son caractère fluide, d'être accessible par ponction. L'ascite offre ainsi la perspective d'en cartographier les composants cellulaires et moléculaires à des fins prédictives ou thérapeutiques (Ahmed and Stenvers 2013).

Ainsi l'objectif de ces travaux a été de documenter les mécanismes et les comportements cellulaires par lesquels les cellules cancéreuses ovariennes acquièrent un phénotype propice à la récurrence, en s'attachant à l'influence de l'ascite.

L'ascite constitue-t-elle un microenvironnement permissif pour les cellules cancéreuses ovariennes ?

Au cours de leur dissémination, les cellules cancéreuses ovariennes sont sous l'influence de différents microenvironnements. D'abord adhérentes sur le foyer tumoral primaire (microenvironnement ovarien), elles sont exfoliées dans la cavité péritonéale, avant d'adhérer sur le mésothélium péritonéal (microenvironnement mésothélial) et d'y former des foyers tumoraux secondaires. A chaque étape de dissémination, les cellules cancéreuses ovariennes sont potentiellement sous l'influence du microenvironnement ascitique qui immerge les organes de la cavité abdomino-pelvienne. Les résultats présentés montrent que l'ascite influence l'adhérence des deux lignées cellulaires cancéreuses ovariennes utilisées. En effet, les cellules IGROV1 et SKOV3 adhèrent sur des revêtements d'ascite. A la différence des cellules SKOV3 qui adhèrent autant sur les revêtements de milieu complet et d'ascite (mais avec une morphologie plus mésenchymateuse sur le revêtement d'ascite), l'adhérence des cellules IGROV1 est augmentée sur le revêtement d'ascite par rapport au revêtement de milieu complet. Plusieurs études s'intéressant au contenu de la fraction soluble des ascites y ont identifié des cytokines susceptibles de promouvoir l'adhérence cellulaire (Gortzak-Uzan et al. 2008; Matte et al. 2012). Nos résultats suggèrent que les différents facteurs ascitiques peuvent également se déposer sur le support de culture et conserver un effet bioactif sous forme de « films » enchevêtrés.

De plus, l'ascite exerce un effet chimioattractif sur les cellules cancéreuses ovariennes et stimule leur migration individuelle. Ces résultats complètent ceux de la littérature démontrant l'effet stimulateur des ascites sur la migration collective des cellules cancéreuses ovariennes (Meunier et al. 2010; Carduner et al. 2014b). Toutefois, les propriétés pro-migratoires des ascites seraient patientes-dépendantes (Puiffe et al. 2007).

D'autre part, les cellules IGROV1 et SKOV3 sont également capables de proliférer en ascite. Toutefois, au cours de cette prolifération, il s'opère des modifications phénotypiques propres à chaque lignée cellulaire. Les cellules IGROV1 adhérentes forment spontanément des sphéroïdes quand elles sont cultivées dans l'ascite, alors même qu'elles n'ont pas atteint un état de confluence. Les sphéroïdes formés sont similaires à ceux observés *in vivo*, chez les patientes, en terme de taille (50-100µm) et de morphologie (Burlison et al. 2006; Shield et al. 2009), même si d'une ascite à l'autre, les cinétiques de formation et la taille des sphéroïdes varient. Si les sphéroïdes sont généralement décrits comme l'agrégation de cellules individuelles, J. Pease et ses collaborateurs ont suggéré que les sphéroïdes pouvaient également bourgeonner à partir de monocouches cellulaires en condition classique de culture (Pease, Brewer, and Tirnauer 2012). Nos données suggèrent que l'ascite favoriserait le bourgeonnement spontané de sphéroïdes, un des mécanismes suspectés impliquant la stimulation de la contractilité cellulaire (Sodek et al. 2012).

En condition ascitique, les cellules SKOV3 adhérentes ne forment pas spontanément des sphéroïdes. Cette capacité différentielle des cellules cancéreuses ovariennes à former spontanément des sphéroïdes a été précédemment décrite (Casey et al. 2001), les SKOV3 ne formant des sphéroïdes que dans certaines conditions expérimentales (Pan et al. 2014). En revanche, elles s'étalent davantage et présentent des extensions cytoplasmiques de type cytonèmes (Koizumi et al. 2012). Ces changements morphologiques ont été caractérisés par un index justifiant la transition d'une morphologie arrondie à une morphologie étalée. Ces éléments arguent en faveur d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), comme suggéré par nos travaux antérieurs (Carduner et al. 2014b). La TEM confère aux cellules des caractéristiques plus agressives permettant aux cellules de disséminer facilement (Thiery et al. 2009).

Ces réponses différentes des cellules IGROV1 et SKOV3 vis-à-vis du microenvironnement ascitique peuvent être liées à l'origine des cellules. Les cellules IGROV1 proviennent du foyer tumoral primaire d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome ovarien, alors que les cellules SKOV3 ont été isolées à partir d'une ascite d'une autre patiente également atteinte d'un adénocarcinome ovarien (Bénard et al. 1985; Shaw et al. 2004). De plus, ces cellules présentent des phénotypes différents dans le spectre épithélio-mésenchymateux: les cellules IGROV1 présentent un phénotype épithélial

intermédiaire tandis que les cellules SKOV3 ont un phénotype mésenchymateux intermédiaire (Huang et al. 2013; Carduner et al. 2014b). Ce dernier est généralement associé avec des capacités migratoires accrues, en accord avec nos résultats indiquant que la migration individuelle des cellules SKOV3 est supérieure à celle des cellules IGROV1.

L'ensemble de ces éléments indiquent que les ascites constituent un microenvironnement permissif pour les cellules cancéreuses ovariennes notamment en termes d'adhérence, de migration, de prolifération. Les ascites pourraient exacerber les propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses ovariennes liées à leur phénotype dans le spectre épithélio-mésenchymateux (formation de sphéroïdes ou migration mésenchymateuse) et en conséquence favoriser l'expression de profils d'agressivités cellulaires différents (Huang et al. 2013).

La résistance à l'anoïkis contribue t-elle à la dissémination ?

Les cellules cancéreuses présentent des propriétés caractéristiques d'échappement aux mécanismes régulant l'homéostasie tissulaire (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011), notamment en s'adaptant à leur microenvironnement (Merlo et al. 2006). Une des barrières lors de la dissémination transcoelomique est l'absence d'ancrage à la matrice extracellulaire des cellules cancéreuses lorsqu'elles sont exfoliées dans la cavité abdominale (Sodek et al. 2012). Cette perte d'ancrage induit une mort cellulaire par apoptose, l'anoïkis (Stupack and Cheresch 2002). L'agrégation cellulaire et l'engagement d'une transition EM sont deux mécanismes permettant de surpasser l'anoïkis (Taddei et al. 2012).

Au sein du laboratoire, nous avons développé un modèle de culture cellulaire en condition non-adhérente (Kellouche et al. 2010). Lorsque les cellules IGROV1 et SKOV3 sont cultivées dans ces conditions, elles forment des sphéroïdes similaires à ceux observés dans les liquides d'ascites *in vitro* en termes de dimension et de morphologie (Burlison et al. 2004; Shield et al. 2009).

Les sphéroïdes constituent un obstacle à la prise en charge thérapeutique des patientes et peuvent initier la récurrence de la pathologie (Burlison et al. 2006). Invisibles à l'œil nu, ils peuvent adhérer à la paroi péritonéale sous forme de petits nodules et échapper à l'intervention chirurgicale (Ahmed and Stenvers 2013). D'autre part, sous cette organisation, les cellules peuvent présenter des caractéristiques de cellules souches cancéreuses (Ahmed and Stenvers 2013). Ainsi, les sphéroïdes peuvent être considérés comme des réservoirs de la pathologie susceptible d'initier sa récurrence (Latifi et al. 2012).

Lorsque les cellules IGROV1 et SKOV3 sont cultivées en condition non-adhérente, la formation de sphéroïdes s'accompagne d'une résistance à l'anoïkis. En effet, la population cellulaire reste

stable au cours de la culture en condition non-adhérente. Toutefois, le phénotype de résistance à l'anoïkis ne s'exprime pas de façon similaire pour les deux lignées cellulaires. Alors que les cellules SKOV3 semblent s'engager dans un processus de quiescence (proportion de cellules en pré-G1 faible, constant et identique aux cellules adhérentes, expression de p130Rb), un équilibre entre apoptose et survie s'établit au sein des cellules IGROV1 précédant une entrée en quiescence. La proportion de cellules apoptotiques IGROV1 augmente au cours des 3 premiers jours de culture puis diminue. Le suivi du clivage de PARP et de l'activité des caspases-3 confirme l'engagement d'un processus apoptotique jusqu'au troisième jour de culture. L'analyse de l'expression de Mcl-1 indique qu'elle augmente tout au long de la période de culture des cellules IGROV1 en absence d'ancrage. Il a été démontré que les cellules cancéreuses ovariennes surexprimant les protéines Mcl-1 et Bcl-X_L sont hautement résistantes au processus d'apoptose (Simonin et al. 2009; Brotin et al. 2010). Ainsi le processus apoptotique activé au sein des cellules IGROV1 serait transitoire et permettrait la sélection de cellules résistantes à l'anoïkis. Cette adaptation nécessite une activation ou une sur-régulation de signalisation de survie. Dans notre modèle, la signalisation de survie permettant la résistance à l'anoïkis semble dépendante de l'activation des MAP-Kinases dont les protéines Erk-1/-2. M. Tang et ses collaborateurs ont également constaté une augmentation de l'expression de Ras dans des cellules cultivées en condition non-adhérente (Tang et al. 2010).

Après 4 jours de culture en absence d'ancrage, les cellules IGROV1 entrent en quiescence. Cette entrée en quiescence a été décrite comme un mécanisme de résistance aux conditions hostiles du microenvironnement (Guadamillas, Cerezo, and Del Pozo 2011). En outre, la capacité de résister à l'anoïkis en entrant en quiescence est une caractéristique des cellules souches cancéreuses et a été décrite à partir de sphéroïdes isolés dans les ascites de patientes (Correa et al. 2012; Nam et al. 2012). Les mécanismes différents enclenchés au sein des cellules IGROV1 et SKOV3 en réponse à la perte d'ancrage soulignent l'hétérogénéité des cancers ovariens.

D'autre part, nos résultats indiquent que l'ascite induit la formation de sphéroïdes plus volumineux et favorise la survie de ces sphéroïdes en condition non-adhérente. Les ascites renferment de nombreux facteurs bioactifs susceptibles d'activer des voies de survie cellulaire comme la voie PI3-Kinase dans des cellules adhérentes (Lane et al. 2007). Cependant les mécanismes par lesquels les ascites concourent à la résistance à l'anoïkis restent à explorer.

Quelle est la contribution de la matrice extracellulaire ascitique ?

Les ascites ont une composition complexe. Elles sont constituées d'une fraction soluble acellulaire et d'une population hétérogène de cellules. Entre autres facteurs solubles, les ascites contiennent des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines. Ils sont impliqués dans la

prolifération ou encore l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes (Schutyser et al. 2002). Cependant l'implication de protéines matricielles ascitiques reste méconnue voir non étudiée.

Au sein des sphéroïdes, les cellules interagissent les unes avec les autres directement ou *via* des ponts de matrices extracellulaires (Sodek et al. 2012). Pour exemple, l'ajout de fibronectine ou de vitronectine favorise la formation de sphéroïdes en condition classique de culture (Casey et al. 2001; Kellouche et al. 2010). Lorsque les sphéroïdes se forment en milieu ascitique, nos résultats montrent une densification des molécules matricielles de fibronectine, vitronectine, laminine et collagène IV au sein des sphéroïdes. L'organisation de ces protéines matricielles évolue d'un dépôt fin et parfois diffus (en milieu de culture classique) à des fibres et lisérés accumulés autour des cellules. Cette organisation de la laminine et du collagène IV suggère l'organisation d'une matrice de type membrane-basale like (Kalluri 2003). Une régulation fine entre dépôt et turnover des molécules matricielles est essentielle au maintien de l'homéostasie tissulaire (Sodek et al. 2012) et des modifications de la composition et de l'organisation de la matrice extracellulaire influencent profondément les comportements cellulaires (Hakkinen et al. 2011; Schlie-Wolter, Ngezahayo, and Chichkov 2013). Ces modifications de l'organisation des molécules matricielles au sein des sphéroïdes en microenvironnement ascitique s'accompagnent d'une densification des intégrines au niveau des contacts cellules-cellules. L'abondance et la biodisponibilité des intégrines au sein des agrégats 3D serait un déterminant majeur de la signalisation pro-survie (Sodek et al. 2012).

D'autre part, les cellules structurées sous forme de sphéroïdes sont capables d'incorporer des protéines matricielles solubles au sein de leur matrice extracellulaire. L'incorporation des protéines matricielles dans un microenvironnement cellulaire est une étape clef de la régulation des comportements cellulaires constatés (Mao and Schwarzbauer 2005). Parmi les molécules matricielles ascitiques, nos résultats démontrent que les ascites contiennent de la fibronectine et de la vitronectine. Ces dernières peuvent avoir extravasé à partir des vaisseaux lymphatiques, ou bien être synthétisées par les cellules cancéreuses ovariennes et mésothéliales (Ruoslahti 1984; Preissner and Seiffert 1998; Carreiras et al. 1999a; Heyman et al. 2008; Reuning 2011).

Ces protéines sont purifiées à partir d'un même échantillon ascitique selon un protocole établi (Carduner et al. 2013) et leurs caractéristiques biochimiques ont été analysées. Si les profils biochimiques des protéines ascitiques sont similaires, ou globalement comparables, avec les protéines plasmatiques, probablement car les ascites sont des exsudats de protéines sériques (Byrne et al. 2003), des différences conformationnelles dans le repliement local des protéines ont pu être décelées selon les ascites testées.

Les cellules IGROV1 et SKOV3 adhèrent sur la vitronectine et la fibronectine ascitiques. De plus, l'incorporation des protéines matricielles dans les sphéroïdes est associée à une diminution de la mortalité des cellules en condition non-adhérente. L'incorporation de la vitronectine permet une résistance plus importante à l'anoikis que la fibronectine. Cela conforte le rôle de la vitronectine et de la fibronectine au cours de la dissémination des cancers ovariens puisque ces deux molécules matricielles favorisent également la migration des cellules cancéreuses ovariennes et leur ancrage à l'endothélium et au mésothélium (Carreiras et al. 1999b; Hapke et al. 2003; Leroy-Dudal et al. 2005; Heyman et al. 2008; Kenny et al. 2014).

L'ascite contribue-t-elle à la chimiorésistance des cellules cancéreuses ovariennes ?

Outre la dissémination, la récurrence des cancers ovariens est due à l'acquisition d'une résistance aux traitements. Selon les cas, les cancers sont dits réfractaires, résistants, partiellement sensibles ou sensibles au cisplatine. Les mécanismes de résistance des cellules au platine sont largement étudiés. Ils sont variés et incluent une faible accumulation des composés dans les cellules, une augmentation de l'expulsion des agents chimiothérapeutiques, une faible activation des complexes actifs, une fixation sur des cibles non nucléaires ou une augmentation des réparations des dommages sur l'ADN. Les cellules deviennent alors moins sensibles ou résistantes aux agents chimiothérapeutiques et résistent à l'apoptose (Galluzzi et al. 2014).

En condition adhérente, les cellules IGROV1 sont plus sensibles au cisplatine (CDDP) que les cellules SKOV3. Quand ces cellules sont cultivées en condition ascitique, elles résistent à l'effet cytotoxique du cisplatine et ce pour toutes les ascites testées. D. Lane et ses collaborateurs ont testé 6 ascites au cours d'une étude et ont montré que 5 d'entre elles induisaient l'inhibition de la mort cellulaire de cellules cancéreuses ovariennes induite par TRAIL ; cet effet protecteur est dépendant de l'activation d'Akt et l'intégrine $\alpha\beta 5$ est impliquée dans ce processus (Lane et al. 2007). La voie PI3-Kinase/Akt est fréquemment activée et surexprimée dans les cancers ovariens et joue un rôle important et la croissance et l'invasion de ces cancers (Cheaib, Auguste, and Leary 2015; Mabuchi et al. 2015). Nous avons montré que l'effet protecteur de l'ascite diminue en fonction de la dilution de ce liquide. Toutefois, cet effet n'est pas concentration-protéique dépendant. En effet, les cellules ne prolifèrent pas en sérum de veau fœtal, un milieu ayant la même teneur en protéines que les ascites testées. De façon analogue, des fluides péritonéaux non ascitiques ne sont pas protecteurs sur des cellules cancéreuses ovariennes traitées par TRAIL, contrairement à des fluides ascitiques (Lane et al. 2010a). La voie de signalisation Erk-1/-2 est activée au sein des cellules cancéreuses ovariennes résistantes aux traitements par TRAIL. La culture des cellules en ascites induit la phosphorylation des protéines Erk-1/-2. L'activation de cette voie de signalisation entraîne la surexpression de la protéine

Mcl-1 (Goncharenko-Khaider et al. 2012), également impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses ovariennes à l'apoptose. Tous ces éléments indiquent que de multiples voies de signalisations, notamment PI3-Kinase/Akt et MAP-Kinase/Erk-1/-2 pourraient être impliquées dans la résistance des cellules au cisplatine. Au cours du processus d'adaptation à la culture en condition non-adhérente, la quantité de protéines p-Erk-1/-2 augmente au sein des cellules IGROV1. On pourrait supposer que cette voie de signalisation favorise également la perte de sensibilité de ces cellules aux traitements au cisplatine.

Les sphéroïdes présents dans les ascites résistent à la chimiothérapie. Nos résultats ont montré qu'en fonction de l'étape de traitement, la réponse cellulaire aux traitements à base de carboplatine diffère. Le carboplatine a été ajouté soit au cours de la formation des grappes, soit après la formation des grappes, soit sur les cellules adhérentes avant culture en suspension. Dans le premier cas, les sphéroïdes se forment dans les premiers jours de culture, mais ne sont pas stables au cours du temps, ils se désorganisent et les cellules meurent. Dans le second cas, la stabilité des sphéroïdes et la viabilité cellulaire est dépendante des lignées cellulaires et de la morphologie des grappes. Les cellules IGROV1 forment des sphéroïdes de petite taille (environ 50 μm) alors que les cellules SKOV3 forment des sphéroïdes plus gros (100 μm environ). On peut imaginer que la taille des sphéroïdes impacte sur la pénétration de l'agent chimiothérapeutique et que son effet cytotoxique est limité à la périphérie (Ahmed and Stenvers 2013). Dans le cas des cellules IGROV1 avec des sphéroïdes de petites tailles, le composé parvient à déstabiliser les sphéroïdes dans le temps.

Seule une faible quantité de cisplatine parvient à pénétrer dans les cellules et à atteindre la cible privilégiée, l'ADN. Les résultats préliminaires obtenus par XPS, suggèrent que la fibronectine et la vitronectine ascitiques pourraient interférer avec l'action du cisplatine. Les résultats montrent que ces deux protéines ascitiques sont capables d'interagir avec le cisplatine à faible et à forte concentrations et que l'affinité du platine pour la vitronectine est supérieure à celle du platine pour la fibronectine.

Les cellules ont été traitées avec du cisplatine en présence de fibronectine ou de vitronectine purifiées à partir de 2 ascites différentes. Même si les résultats sont à approfondir, il semble que les fibronectines ascitiques utilisées n'induisent pas de différence en termes de viabilité par rapport à la condition milieu seul. Des résultats similaires sont obtenus pour l'une des vitronectines ascitiques tandis que pour l'autre, il est observé une diminution de la viabilité cellulaire. Cette diminution est statistiquement significative par rapport au milieu de culture seul. Ces résultats laissent suggérer que cette vitronectine pourrait potentialiser l'effet cytotoxique du cisplatine sur les cellules cancéreuses

ovariennes. Dans ce cas, quel serait le mécanisme d'action de ce processus ? Où sont localisés la vitronectine et le cisplatine ? Il y a-t-il implication des intégrines αv ?

Perspectives

Ces travaux de thèse décrivent l'ascite comme un microenvironnement permissif à l'adhérence et à la migration des cellules cancéreuses ovariennes. L'ascite est un microenvironnement particulier. Riche en protéines, elle favorise la prolifération de ces cellules et induit des modifications phénotypiques telles que la formation spontanée de sphéroïdes, la résistance à l'anoïkis, ainsi qu'une transition épithélio-mésenchymateuse. Ce microenvironnement comporte des molécules bioactives capables d'induire ces modifications. La résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses ovariennes, après une phase d'adaptation, nécessite l'activation des MAP-Kinases, certainement par une voie PKC dépendante. Nos travaux ont montré que l'activation de cette voie de signalisation dépend des intégrines αv . Bien que d'autres voies de signalisation semblent être impliquées dans la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses ovariennes (voie TRAIL, par exemple), différents travaux supportent l'idée que la résistance des cellules cancéreuses ovariennes à ce type de mort cellulaire est possible par l'existence d'une matrice-like environnant les sphéroïdes. La présence de fibronectine et de vitronectine au sein des ascites tumoraux ovariens permet de comprendre, en partie, comment l'ascite protège davantage les cellules d'une mort par anoïkis. Néanmoins, les mécanismes de résistance des cellules cancéreuses à l'anoïkis en condition ascitique ne sont pas encore complètement compris. Nous avons montré que les protéines matricielles ascitiques (ie la fibronectine et la vitronectine) sont incorporées au sein des sphéroïdes, permettant ainsi leur survie dépendante des intégrines αv . Les études biochimiques réalisées sur ces protéines matricielles ascitiques montrent qu'elles ont des conformations structurales pouvant varier par rapport à celles isolées du plasma sanguin. Ces différences sont-elles suffisantes pour induire une résistance à l'anoïkis exacerbée en condition ascitique ? L'origine de ces différences n'est pas connue. Le protocole de purification des protéines matricielles plasmatiques et ascitiques est relativement proche et ne semble pas entraîner des modifications des protéines matricielles purifiées. La création d'une ascitothèque (au sein du centre de lutte contre le cancer François Baclesse, à Caen) avec l'enregistrement d'un nombre important de données cliniques concernant les patientes dont sont issues les ascites est un véritable atout pour apporter une réponse à nos questions. L'étroite collaboration entre notre groupe de travail et le centre François Baclesse (Caen), permettra à terme, de vérifier s'il existe une corrélation entre des différences quantitatives et/ou qualitatives des protéines matricielles ascitiques et le bilan clinique des patientes.

D'un point de vue moléculaire, les différences structurales de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques par rapport aux protéines plasmatiques peuvent être liées à différents

paramètres. Même si ces différences ne semblent pas être dues au protocole de purification, l'augmentation du nombre d'échantillons permettra de lever ce doute. La présence de ces protéines matricielles dans le liquide d'ascite est due à plusieurs facteurs. En effet, l'ascite est un liquide exsudatif qui s'accumule dans l'abdomen suite à l'obstruction des vaisseaux lymphatiques. D'autre part, les protéines matricielles ascitiques peuvent également être synthétisées par les cellules cancéreuses ovariennes retrouvées dans les ascites. Ainsi, une fois ces protéines présentes dans l'ascite, elles peuvent subir certaines modifications post-traductionnelles, de type oxydative, glycosylative, ou même être modifiée par des produits de type Amadori pour former des AGE (Advance Glycation EndProducts). Des études biochimiques particulières de type spectrométrie de masse, étude de glycosylation, etc, permettraient certainement d'identifier l'existence de telles modifications.

Les modèles d'étude utilisés au cours de ces travaux ont des origines différentes. Les cellules IGROV1 proviennent du foyer tumoral primaire d'un adénocarcinome, tandis que les cellules SKOV3 ont été isolées dans une ascite de patiente. Nos études ont montré que selon l'origine des cellules cancéreuses ovariennes, celles-ci avaient des résistances différentes face aux agents chimiothérapeutiques. Cette résistance est accrue lorsque les cellules sont dans un microenvironnement ascitique. La résistance à la mort cellulaire nécessite l'activation de voies de signalisation de survie. L'ascite est propice à la résistance des cellules cancéreuses ovariennes à l'anoïkis ainsi qu'aux traitements par le cisplatine. Cependant, nous avons pu montrer que si la première est Erk-1/-2 dépendante, la seconde ne l'est pas. Deux mécanismes moléculaires distincts confèrent aux cellules cancéreuses ovariennes leur résistance à l'un ou l'autre des processus. De même, les protéines matricielles ascitiques qui semblent être impliquées dans la résistance à l'anoïkis ne sont pas des éléments protecteurs vis-à-vis de l'action du cisplatine. Quel(s) est (sont) les éléments clefs de l'ascite favorisant cette résistance ? Nos premières analyses ont montré qu'il ne s'agissait pas d'un effet « protéique » (due à une concentration importante de protéines dans les ascites). Toutefois, le fait que la fibronectine et la vitronectine soient capables d'interagir avec le cisplatine et que ces protéines matricielles se retrouvent au cœur et en périphérie des sphéroïdes, est intrigant. Nous pouvons penser que cette interaction permettrait de cibler les cellules cancéreuses ovariennes et ainsi induire leur mort. Est-ce que la signalisation de survie des cellules induite par l'ascite empêche l'activation des voies apoptotiques induite par le cisplatine ? Pour permettre de répondre à ces questions, les expériences de spectroscopie photoélectronique X sont nécessaires. L'analyse du « piégeage » des platines par les protéines matricielles ascitiques et sa comparaison avec celui réalisé en présence des protéines matricielles plasmatique sera un élément déterminant à cette réponse.

Les sphéroïdes favorisent la dissémination des cellules cancéreuses à travers la cavité péritonéale et leur résistance à la chimiothérapie. Sous cette organisation, les cellules ont une résistance accrue à l'anoïkis. Nos travaux montrent qu'en ascite, l'organisation et la localisation des protéines matricielles diffèrent par rapport à la condition de culture classique. D'autre part, le marquage des intégrines $\alpha 5$ semble être colocalisé avec celui de la fibronectine dans les deux conditions. En effet, les intégrines $\alpha 5$ semblent être surexprimées en ascites et localisées majoritairement en périphérie des cellules. La fibronectine a une organisation fibrillaire en ascites et est péricellulaire. C'est également le cas des marquages αv et vitronectine. Ces résultats mettent en exergue le rôle des interactions entre les protéines matricielles ascitiques et leurs récepteurs d'adhérence spécifiques. Partant du principe que les ligands matriciels confèrent aux cellules les signaux de survie leur permettant de résister à l'anoïkis, cibler leurs récepteurs, dans les ascites, pourrait constituer une piste de recherche intéressante. Quel serait l'effet du blocage des intégrines αv et $\alpha 5$, exprimées par les « sphéroïdes ascitiques », sur la formation des sphéroïdes, l'adhérence, la migration ou la survie des cellules cancéreuses ovariennes ?

Dans une perspective de soins de la patiente, nos études ont montré que le microenvironnement ascitique modifie la réponse cellulaire durant le processus tumoral, et la réponse aux agents chimiothérapeutiques. De nombreuses autres molécules chimiques (ou naturelles) existent et entrent dans les traitements des cancers ovariens. Il est important que les études de cytotoxicité, de résistance et d'efficacité prennent en compte ce microenvironnement. Le mode d'action particulier des sels de platine fait de ces molécules de puissants agents pour lutter contre les cancers ovariens. D'autres molécules, avec des modes d'action différents, existent. La combinaison de celles-ci avec les sels de platine en milieu ascitique devront être le point fort des études anti-cancéreuses dans les années à venir.

Conclusion

L'ascite est un microenvironnement tumoral complexe et unique. Il est permissif à de nombreux comportements cellulaires propices à la dissémination et à la résistance aux traitements chimiothérapeutiques des cellules cancéreuses ovariennes. Ces deux processus sont des facteurs clefs dans la récurrence des cancers ovariens. L'originalité de ce sujet repose sur l'exploitation d'une ascitothèque provenant de différents centres hospitaliers et de fibronectine et vitronectine purifiées à partir de d'ascites différentes. Les résultats obtenus sont encourageants et incitent à explorer plus amplement la potentielle utilisation des protéines matricielles comme marqueurs prédictifs et/ou cibles thérapeutiques des cancers de l'ovaire.

Références bibliographiques

- A**Abubaker, Khalid, Ardian Latifi, Rod Luwor, Simon Nazaretian, Hongjian Zhu, Michael A Quinn, Erik W Thompson, Jock K Findlay, and Nuzhat Ahmed. 2013. "Short-Term Single Treatment of Chemotherapy Results in the Enrichment of Ovarian Cancer Stem Cell-like Cells Leading to an Increased Tumor Burden." *Molecular Cancer* 12 (January): 24. doi:10.1186/1476-4598-12-24.
- Afratis, Nikos, Chrisostomi Gialeli, Dragana Nikitovic, Theodore Tsegenidis, Evgenia Karousou, Achilleas D Theocharis, Mauro S Pavão, George N Tzanakakis, and Nikos K Karamanos. 2012. "Glycosaminoglycans: Key Players in Cancer Cell Biology and Treatment." *The FEBS Journal* 279 (7): 1177–97. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08529.x.
- Aghajanian, Carol, Stephanie V. Blank, Barbara A. Goff, Patricia L. Judson, Michael G. Teneriello, Amreen Husain, Mika A. Sovak, Jing Yi, and Lawrence R. Nycum. 2012. "OCEANS: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Chemotherapy with or without Bevacizumab in Patients with Platinum-Sensitive Recurrent Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal, or Fallopian Tube Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 30 (17): 2039–45.
- Ahmad, Saeed. 2010. "Platinum-DNA Interactions and Subsequent Cellular Processes Controlling Sensitivity to Anticancer Platinum Complexes." *Chemistry and Biodiversity* 7 (3): 543–66. doi:10.1002/cbdv.200800340.
- Ahmed, Ahmed, Dariush Etemadmoghadam, Jillian Temple, Andy G Lynch, Mohamed Riad, Raghwa Sharma, Colin Stewart, et al. 2010. "Driver Mutations in TP53 Are Ubiquitous in High Grade Serous Carcinoma of the Ovary." *The Journal of Pathology* 221 (1): 49–56. doi:10.1002/path.2696.
- Ahmed, Nuzhat, and Kaye L Stenvers. 2013. "Getting to Know Ovarian Cancer Ascites: Opportunities for Targeted Therapy-Based Translational Research." *Frontiers in Oncology* 3 (January): 256. doi:10.3389/fonc.2013.00256.
- Ahmed, Nuzhat, Khalid Abubaker, and Jock K Findlay. 2014. "Ovarian Cancer Stem Cells: Molecular Concepts and Relevance as Therapeutic Targets." *Molecular Aspects of Medicine* 39 (October): 110–25. doi:10.1016/j.mam.2013.06.002.
- Ahmed, Nuzhat, F. Pansino, R. Clyde, P. Murthi, M.A. Quinn, G.E. Rice, M.V. Agrez, S. Mok, and M.S. Baker. 2002. "Overexpression of v 6 Integrin in Serous Epithelial Ovarian Cancer Regulates Extracellular Matrix Degradation via the Plasminogen Activation Cascade." *Carcinogenesis* 23 (2): 237–44. doi:10.1093/carcin/23.2.237.
- An, Juan, Jin Lv, Aimin Li, Junxiao Qiao, Liang Fang, Zihua Li, Bo Li, Wei Zhao, Huoming Chen, and Liying Wang. 2015. "Constitutive Expression of Bcl-2 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Mammary Epithelial Cells." *BMC Cancer* 15 (January): 476. doi:10.1186/s12885-015-1485-5.
- Andrews, P A, S C Mann, H H Huynh, and K D Albright. 1991. "Role of the Na⁺, K⁽⁺⁾-Adenosine Triphosphatase in the Accumulation of Cis-diamminedichloroplatinum(II) in Human Ovarian Carcinoma Cells." *Cancer Research* 51 (14): 3677–81.
- Arnaout, M A, B Mahalingam, and J-P Xiong. 2005. "Integrin Structure, Allostery, and Bidirectional Signaling." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21 (January): 381–410. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151217.
- Asselin, E, G B Mills, and B K Tsang. 2001. "XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-Dependent Cleavage during Cisplatin-Induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells." *Cancer Research* 61 (5): 1862–68.
- Auersperg, Nelly. 2013. "The Origin of Ovarian Cancers- Hypotheses and Controversies." *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 5 (June): 709–19. doi:10.2741/S401.
- Auersperg, Nelly, Alice S T Wong, Kyung-chul Choi, Sung Keun Kang, and Peter C K Leung. 2001. "Ovarian Surface Epithelium: Biology , Endocrinology ,." *Endocrine Reviews* 22 (2): 255–88.
- Aziz-Seible, Razia S, and Carol A Casey. 2011. "Fibronectin: Functional Character and Role in Alcoholic Liver Disease." *World Journal of Gastroenterology* 28 (17): 2482–99.

- B**andiera, Elisabetta, Roberta Franceschini, Claudia Specchia, Eliana Bignotti, Chiara Trevisiol, Massimo Gion, Sergio Pecorelli, Alessandro Davide Santin, and Antonella Ravaggi. 2012. "Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Serum Determination in Women with Ovarian Cancer." *ISRN Obstetrics and Gynecology*. doi:10.5402/2012/245756.
- Banerjee, Susana, and Stanley B Kaye. 2013. "New Strategies in the Treatment of Ovarian Cancer: Current Clinical Perspectives and Future Potential." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (5): 961–68. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2243.
- Bapat, Sharmila A, Avinash M Mali, Chaitanyananda B Koppikar, and Nawneet K Kurrey. 2005. "Stem and Progenitor-like Cells Contribute to the Aggressive Behavior of Human Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer Research* 65 (8): 3025–29. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3931.
- Barbolina, Maria V, Natalie M Moss, Suzanne D Westfall, Yueying Liu, Rebecca J Burkhalter, Françoise Marga, Gabor Forgacs, Laurie G Hudson, and M Sharon Stack. 2009. "Microenvironmental Regulation of Ovarian Cancer Metastasis." *Cancer Treatment and Research* 149 (January): 319–34. doi:10.1007/978-0-387-98094-2_15.
- Barcellos-Hoff, M H. 1998. "The Potential Influence of Radiation-Induced Microenvironments in Neoplastic Progression." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3 (2): 165–75.
- Bell, D, A Berchuck, M Birrer, J Chien, D. W Cramer, F Dao, R Dhir, et al. 2011. "Integrated Genomic Analyses of Ovarian Carcinoma." *Nature* 474 (7353): 609–15. doi:10.1038/nature10166.
- Bellon, S F, J H Coleman, and S J Lippard. 1991. "DNA Unwinding Produced by Site-Specific Intrastrand Cross-Links of the Antitumor Drug Cis-diamminedichloroplatinum(II)." *Biochemistry* 30 (32): 8026–35.
- Belotti, Dorina, Catia Calcagno, Angela Garofalo, Daniela Caronia, Elena Riccardi, Raffaella Giavazzi, and Giulia Taraboletti. 2008. "Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Organ-Specific Host Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Ovarian Cancer Invasion." *Molecular Cancer Research : MCR* 6 (4): 525–34. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0366.
- Belotti, Dorina, Paola Paganoni, Luigi Manenti, Angela Garofalo, Sergio Marchini, Giulia Taraboletti, and Raffaella Giavazzi. 2003. "Matrix Metalloproteinases (MMP9 and MMP2) Induce the Release of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Ovarian Carcinoma Cells: Implications for Ascites Formation." *Cancer Res.* 63 (17): 5224–29.
- Bénard, J, J Da Silva, M C De Blois, P Boyer, P Duvillard, E Chiric, and G Riou. 1985. "Characterization of a Human Ovarian Adenocarcinoma Line, IGROV1, in Tissue Culture and in Nude Mice." *Cancer Research* 45 (10): 4970–79.
- Bishop, James F., Joanna Dewar, Guy C. Toner, Jennifer Smith, Martin H.N. Tattersall, Ian N. Olver, Stephen Ackland, et al. 1999. "Initial Paclitaxel Improves Outcome Compared With CMFP Combination Chemotherapy as Front-Line Therapy in Untreated Metastatic Breast Cancer." *J. Clin. Oncol.* 17 (8): 2355.
- Blankenberg, Francis G. 2009. "Imaging the Molecular Signatures of Apoptosis and Injury with Radiolabeled Annexin V." *Proceedings of the American Thoracic Society* 6 (5): 469–76. doi:10.1513/pats.200901-001AW.
- Bonomi, Philip, KyungMann Kim, Diane Fairclough, David Cella, John Kugler, Eric Rowinsky, Michael Jiroutek, and David Johnson. 2000. "Comparison of Survival and Quality of Life in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Two Dose Levels of Paclitaxel Combined With Cisplatin Versus Etoposide With Cisplatin: Results of an Eastern Cooperative Oncology Group Trial." *J. Clin. Oncol.* 18 (3): 623 – .
- Bottcher, R., and R. Fassler. 2014. "Membrane Tension Drives Ligand-Independent Integrin Signaling." *The EMBO Journal* 33 (21). European Molecular Biology Organization: 2439–41. doi:10.15252/embj.201489886.
- Braicu, E-I, J Sehouli, R Richter, K Pietzner, C Denkert, and C Fotopoulou. 2011. "Role of Histological Type on Surgical Outcome and Survival Following Radical Primary Tumour Debulking of Epithelial Ovarian, Fallopian

- Tube and Peritoneal Cancers." *British Journal of Cancer* 105 (12): 1818–24. doi:10.1038/bjc.2011.455.
- Brotin, Emilie, Matthieu Meryet-Figuière, Karin Simonin, Raphaël E Duval, Marie Villedieu, Johanne Leroy-Dudal, Ester Saison-Behmoaras, Pascal Gauduchon, Christophe Denoyelle, and Laurent Poulain. 2010. "Bcl-XL and MCL-1 Constitute Pertinent Targets in Ovarian Carcinoma and Their Concomitant Inhibition Is Sufficient to Induce Apoptosis." *International Journal of Cancer* 126 (4): 885–95. doi:10.1002/ijc.24787.
- Brown, R, C Clugston, P Burns, A Edlin, P Vasey, B Vojtěšek, and S B Kaye. 1993. "Increased Accumulation of p53 Protein in Cisplatin-Resistant Ovarian Cell Lines." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 55 (4): 678–84.
- Bruckert, Franz, Emmanuel Décavé, Daniel Garrivier, Pierre Cosson, Yves Bréchet, Bertrand Fourcade, and Michel Satre. 2002. "Dictyostelium Discoideum Adhesion and Motility under Shear Flow: Experimental and Theoretical Approaches." *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 23 (7-8): 651–58.
- Burleson, Kathryn M, Matthew P Boente, Stefan E Pambuccian, and Amy P N Skubitz. 2006. "Disaggregation and Invasion of Ovarian Carcinoma Ascites Spheroids." *Journal of Translational Medicine* 4 (January): 6. doi:10.1186/1479-5876-4-6.
- Burleson, Kathryn M, Rachael C Casey, Keith M Skubitz, Stephan E Pambuccian, Theodore R Oegema, and Amy P N Skubitz. 2004. "Ovarian Carcinoma Ascites Spheroids Adhere to Extracellular Matrix Components and Mesothelial Cell Monolayers." *Gynecologic Oncology* 93 (1): 170–81. doi:10.1016/j.ygyno.2003.12.034.
- Byers, L J, J L Osborne, L F Carson, J R Carter, A F Haney, J B Weinberg, and S Ramakrishnan. 1995. "Increased Levels of Laminin in Ascitic Fluid of Patients with Ovarian Cancer." *Cancer Letters* 88 (1): 67–72.
- Byrne, Annette T, Leorah Ross, Joceyln Holash, Mikiye Nakanishi, Limin Hu, Judith I Hofmann, George D Yancopoulos, and Robert B Jaffe. 2003. "Vascular Endothelial Growth Factor-Trap Decreases Tumor Burden, Inhibits Ascites, and Causes Dramatic Vascular Remodeling in an Ovarian Cancer Model." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9 (15): 5721–28.
- C**ampbell, Iain D, and Martin J Humphries. 2011. "Integrin Structure, Activation, and Interactions." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (3). doi:10.1101/cshperspect.a004994.
- Carduner, Ludovic, Rémy Agniel, Sabrina Kellouche, Cédric R Picot, Cécile Blanc-Fournier, Johanne Leroy-Dudal, and Franck Carreiras. 2013. "Ovarian Cancer Ascites-Derived Vitronectin and Fibronectin: Combined Purification, Molecular Features and Effects on Cell Response." *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (10): 4885–97. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.023.
- Carduner, Ludovic, C R. Picot, Johanne Leroy-Dudal, L Blay, S Kellouche, and Franck Carreiras. 2014. "Cell Cycle Arrest or Survival Signaling through α Integrins, Activation of PKC and ERK1/2 Lead to Anoikis Resistance of Ovarian Cancer Spheroids." *Experimental Cell Research* 320 (2): 329–42. doi:10.1016/j.yexcr.2013.11.011. **(a)**
- Carduner, Ludovic, Johanne Leroy-Dudal, C R Picot, O Gallet, Franck Carreiras, and S Kellouche. 2014. "Ascites-Induced Shift along Epithelial-Mesenchymal Spectrum in Ovarian Cancer Cells: Enhancement of Their Invasive Behavior Partly Depend on α Integrins." *Clinical & Experimental Metastasis* 31 (6): 675–88. doi:10.1007/s10585-014-9658-1. **(b)**
- Carreiras, Franck, Y Denoux, C Staedel, M Lehmann, F Sichel, and P Gauduchon. 1996. "Expression and Localization of Alpha v Integrins and Their Ligand Vitronectin in Normal Ovarian Epithelium and in Ovarian Carcinoma." *Gynecologic Oncology* 62 (2): 260–67. doi:10.1006/gyngo.1996.0225.
- Carreiras, Franck, S Cruet, C Staedel, F Sichel, and P Gauduchon. 1999. "Human Ovarian Adenocarcinoma Cells Synthesize Vitronectin and Use It to Organize Their Adhesion." *Gynecologic Oncology* 72 (3): 312–22. doi:10.1006/gyngo.1998.5262. **(a)**
- Carreiras, Franck, V Rigot, S Cruet, F Andre, P Gauduchon, and J Marvaldi. 1999. "Migration Properties of the Human Ovarian

- Adenocarcinoma Cell Line IGROV1: Importance of alpha(v)beta3 Integrins and Vitronectin." *International Journal of Cancer* 80 (2): 285–94. (b)
- Carreiras, Franck, Bénédicte Thiébot, Johanne Leroy-Dudal, Sylvie Maubant, Marie-France Breton, and Halima Darbeida. 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." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 99 (6): 800–808. doi:10.1002/ijc.10433.
- Casey, R C, Kathryn M Burleson, K M Skubitz, S E Pambuccian, T R Oegema, L E Ruff, and A P Skubitz. 2001. "Beta 1-Integrins Regulate the Formation and Adhesion of Ovarian Carcinoma Multicellular Spheroids." *The American Journal of Pathology* 159 (6): 2071–80.
- Chamaraux, F., O. Ali, S. Keller, F. Bruckert, and B. Fourcade. 2008. "Physical Model for Membrane Protrusions during Spreading." *Physical Biology* 5 (3): 036009. doi:10.1088/1478-3975/5/3/036009.
- Chan, Wood-Yee, Kwok-Kuen Cheung, John O. Schorge, Lee-Wen Huang, William R. Welch, Debra a. Bell, Ross S. Berkowitz, and Samuel C. Mok. 2000. "Bcl-2 and p53 Protein Expression, Apoptosis, and p53 Mutation in Human Epithelial Ovarian Cancers." *The American Journal of Pathology* 156 (2). American Society for Investigative Pathology: 409–17. doi:10.1016/S0002-9440(10)64744-X.
- CheaiB, Bianca, Aurélie Auguste, and Alexandra Leary. 2015. "The PI3K/Akt/mTOR Pathway in Ovarian Cancer: Therapeutic Opportunities and Challenges." *Chinese Journal of Cancer* 34 (1): 4–16. doi:10.5732/cjc.014.10289.
- Chen, Lifeng, Lizhi Liang, Xiaojian Yan, Naihua Liu, Lihua Gong, Shishi Pan, Feng Lin, Qian Zhang, Hongqin Zhao, and Feiyun Zheng. 2013. "Survivin Status Affects Prognosis and Chemosensitivity in Epithelial Ovarian Cancer." *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 23 (2): 256–63. doi:10.1097/IGC.0b013e31827ad2b8.
- Cherny, R C, M A Honan, and P Thiagarajan. 1993. "Site-Directed Mutagenesis of the Arginine-Glycine-Aspartic Acid in Vitronectin Abolishes Cell Adhesion." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (13): 9725–29.
- Christie, Daniel R, Faheem M Shaikh, John A Lucas, and Susan L Bellis. 2008. "ST6Gal-I Expression in Ovarian Cancer Cells Promotes an Invasive Phenotype by Altering Integrin Glycosylation and Function." *Journal of Ovarian Research* 1 (1): 3. doi:10.1186/1757-2215-1-3.
- Chu, Yongli, Yuanxian Yang, Meihua Lin, and Zehua Wang. 2002. "Detection of Laminin in Serum and Ascites from Patients with Epithelial Ovarian Tumor." *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban* 22 (1): 58–59, 68.
- Cibula, D., M. Widschwendter, O. Májek, and L. Dusek. 2011. "Tubal Ligation and the Risk of Ovarian Cancer: Review and Meta-Analysis." *Human Reproduction Update* 17 (1): 55–67. doi:10.1093/humupd/dmq030.
- Correa, Rohann J M, Teresa Peart, Yudith Ramos Valdes, Gabriel E DiMattia, and Trevor G Shepherd. 2012. "Modulation of AKT Activity Is Associated with Reversible Dormancy in Ascites-Derived Epithelial Ovarian Cancer Spheroids." *Carcinogenesis* 33 (1): 49–58. doi:10.1093/carcin/bgr241.
- Cruet, S, C Salamanca, G W Mitchell, and N Auersperg. 1999. "alphavbeta3 and Vitronectin Expression by Normal Ovarian Surface Epithelial Cells: Role in Cell Adhesion and Cell Proliferation." *Gynecologic Oncology* 75 (2): 254–60. doi:10.1006/gyno.1999.5572.
- D**avidson, Ben, I Goldberg, A Berner, J M Nesland, V Givant-Horwitz, M Bryne, B Risberg, et al. 2001. "Expression of Membrane-Type 1, 2, and 3 Matrix Metalloproteinases Messenger RNA in Ovarian Carcinoma Cells in Serous Effusions." *American Journal of Clinical Pathology* 115 (4): 517–24. doi:10.1309/B1YX-L8DB-TGY1-7905.
- Davis, Alison, Anna V Tinker, and Michael Friedlander. 2014. "'Platinum Resistant' Ovarian Cancer: What Is It, Who to Treat and How to Measure Benefit?" *Gynecologic*

- Oncology* 133 (3): 624–31. doi:10.1016/j.ygyno.2014.02.038.
- Dhillon, A S, S Hagan, O Rath, and W Kolch. 2007. "MAP Kinase Signalling Pathways in Cancer." *Oncogene* 26 (22): 3279–90. doi:10.1038/sj.onc.1210421.
- Donahue, B A, M Augot, S F Bellon, D K Treiber, J H Toney, S J Lippard, and J M Essigmann. 1990. "Characterization of a DNA Damage-Recognition Protein from Mammalian Cells That Binds Specifically to Intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA Adducts of the Anticancer Drug Cisplatin." *Biochemistry* 29 (24): 5872–80.
- Dong, Ying, Carson Stephens, Carina Walpole, Joakim E Swedberg, Glen M Boyle, Peter G Parsons, Michael A McGuckin, Jonathan M Harris, and Judith A Clements. 2013. "Paclitaxel Resistance and Multicellular Spheroid Formation Are Induced by Kallikrein-Related Peptidase 4 in Serous Ovarian Cancer Cells in an Ascites Mimicking Microenvironment." *PLoS One* 8 (2): e57056. doi:10.1371/journal.pone.0057056.
- E**isenkop, S M, and N M Spirtos. 2001. "The Clinical Significance of Occult Macroscopically Positive Retroperitoneal Nodes in Patients with Epithelial Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 82 (1): 143–49. doi:10.1006/gy.2001.6232.
- Esko, Jeffrey D, Koji Kimata, and Ulf Lindahl. 2009. "Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Evans, Rachel, Irene Patzak, Lena Svensson, Katia De Filippo, Kristian Jones, Alison McDowall, and Nancy Hogg. 2009. "Integrins in Immunity." *Journal of Cell Science* 122 (Pt 2): 215–25. doi:10.1242/jcs.019117.
- Eyre, David. 2002. "Collagen of Articular Cartilage." *Arthritis Research* 4 (1): 30–35.
- Eyre, David, Mary Ann Weis, and Jiann-Jiu Wu. 2008. "Advances in Collagen Cross-Link Analysis." *Methods* 45 (1): 65–74. doi:10.1016/j.ymeth.2008.01.002.
- F**athalla, M F. 1971. "Incessant Ovulation--a Factor in Ovarian Neoplasia?" *Lancet* 2 (7716): 163. doi:10.1016/S0140-6736(71)92335-X.
- Feki, Anis, Philip Berardi, Geoff Bellingan, Attila Major, Karl Heinz Krause, Patrick Petignat, Rubab Zehra, Shazib Pervaiz, and Irmgard Irminger-Finger. 2009. "Dissemination of Intraperitoneal Ovarian Cancer: Discussion of Mechanisms and Demonstration of Lymphatic Spreading in Ovarian Cancer Model." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 72 (1): 1–9. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.12.003.
- Felding-Habermann, B, and D Cheresch. 1993. "Vitronectin and Its Receptors." *Current Opinion in Cell Biology* 5 (5): 864–68. doi:10.1016/0955-0674(93)90036-P.
- Ferrandina, G, F Legge, E Martinelli, F O Ranelletti, G F Zannoni, L Lauriola, M Gessi, V Gallotta, and G Scambia. 2005. "Survivin Expression in Ovarian Cancer and Its Correlation with Clinico-Pathological, Surgical and Apoptosis-Related Parameters." *British Journal of Cancer* 92 (2): 271–77. doi:10.1038/sj.bjc.6602332.
- Fontana, Laura, Yan Chen, Petra Prijatelj, Takao Sakai, Reinhard Fässler, Lynn Y Sakai, and Daniel B Rifkin. 2005. "Fibronectin Is Required for Integrin α v β 6-Mediated Activation of Latent TGF- β Complexes Containing LTBP-1." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (13): 1798–1808. doi:10.1096/fj.05-4134com.
- Franzke, Claus-Werner, Kaisa Tasanen, Hauke Schumann, and Leena Bruckner-Tuderman. 2003. "Collagenous Transmembrane Proteins: Collagen XVII as a Prototype." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 22 (4): 299–309.
- Freire-de-Lima, Leonardo, Kirill Gelfenbeyn, Yao Ding, Ulla Mandel, Henrik Clausen, Kazuko Handa, and Sen-Itiroh Hakomori. 2011. "Involvement of O-Glycosylation Defining Oncofetal Fibronectin in Epithelial-Mesenchymal Transition Process." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (43): 17690–95. doi:10.1073/pnas.1115191108
- Fuertes, Miguel A, Carlos Alonso, and José M Pérez. 2003. "Biochemical Modulation of

- Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance." *Chemical Reviews* 103 (3): 645–62. doi:10.1021/cr020010d.
- Fuller, Emily Suzanne, and Viive Maarika Howell. 2014. "Culture Models to Define Key Mediators of Cancer Matrix Remodeling." *Frontiers in Oncology* 4 (March): 57. doi:10.3389/fonc.2014.00057.
- G**ajjar, Ketan, Gemma Ogden, M. I. Mujahid, and Khalil Razvi. 2012. "Symptoms and Risk Factors of Ovarian Cancer: A Survey in Primary Care." *ISRN Obstetrics and Gynecology*.
- Galluzzi, L Senovilla, I Vitale, J Michels, I Martins, O Kepp, M Castedo, and G Kroemer. 2012. "Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance." *Oncogene* 31 (15). Macmillan Publishers Limited: 1869–83. doi:10.1038/onc.2011.384.
- Galluzzi, I Vitale, J Michels, C Brenner, G Szabadkai, A Harel-Bellan, M Castedo, and G Kroemer. 2014. "Systems Biology of Cisplatin Resistance: Past, Present and Future." *Cell Death and Disease* 5 (5): e1257. doi:10.1038/cddis.2013.428.
- Gaytán, M, C Morales, C Bellido, J E Sánchez-Criado, and F Gaytán. 2007. "Macrophages in Human Fallopian Tube and Ovarian Epithelial Inclusion Cysts." *Journal of Reproductive Immunology* 73 (1): 66–73. doi:10.1016/j.jri.2006.06.002.
- Geiger, Benjamin, Joachim P Spatz, and Alexander D Bershadsky. 2009. "Environmental Sensing through Focal Adhesions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (1). Nature Publishing Group: 21–33. doi:10.1038/nrm2593.
- Gifford, Gillian, Jim Paul, Paul A Vasey, Stanley B Kaye, and Robert Brown. 2004. "The Acquisition of hMLH1 Methylation in Plasma DNA after Chemotherapy Predicts Poor Survival for Ovarian Cancer Patients." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (13): 4420–26. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0732.
- Glud, Eva, Susanne K Kjaer, Birthe L Thomsen, Claus Høgdall, Lise Christensen, Estrid Høgdall, Johannes E Bock, and Jan Blaakaer. 2004. "Hormone Therapy and the Impact of Estrogen Intake on the Risk of Ovarian Cancer." *Archives of Internal Medicine* 164 (20): 2253–59. doi:10.1001/archinte.164.20.2253.
- Goff, Barbara a., Lynn S. Mandel, Charles W. Drescher, Nicole Urban, Shirley Gough, Kristi M. Schurman, Joshua Patras, Barry S. Mahony, and M. Robyn Andersen. 2007. "Development of an Ovarian Cancer Symptom Index: Possibilities for Earlier Detection." *Cancer* 109 (2): 221–27. doi:10.1002/cncr.22371.
- Gómez-Ruiz, Santiago, Danijela Maksimović-Ivanić, Sanja Mijatović, and Goran N Kaluđerović. 2012. "On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy." *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2012 (January): 140284. doi:10.1155/2012/140284.
- Goncharenko-Khaider, Nadzeya, Isabelle Matte, Denis Lane, Claudine Rancourt, and Alain Piché. 2012. "Ovarian Cancer Ascites Increase Mcl-1 Expression in Tumor Cells through ERK1/2-Elk-1 Signaling to Attenuate TRAIL-Induced Apoptosis." *Molecular Cancer* 11 (January): 84. doi:10.1186/1476-4598-11-84.
- Gortzak-Uzan, Limor, Alex Ignatchenko, Andreas I Evangelou, Mahima Agochiya, Kevin A Brown, Peter St Onge, Inga Kireeva, et al. 2008. "A Proteome Resource of Ovarian Cancer Ascites: Integrated Proteomic and Bioinformatic Analyses to Identify Putative Biomarkers." *Journal of Proteome Research* 7 (1). American Chemical Society: 339–51. doi:10.1021/pr0703223.
- Graves, Laura E, Edgardo V Ariztia, Jason R Navari, Heather J Matzel, M Sharon Stack, and David A Fishman. 2004. "Proinvasive Properties of Ovarian Cancer Ascites-Derived Membrane Vesicles." *Cancer Research* 64 (19): 7045–49. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1800.
- Guadamillas, Marta C, Ana Cerezo, and Miguel A Del Pozo. 2011. "Overcoming Anoikis--Pathways to Anchorage-Independent Growth in Cancer." *Journal of Cell Science* 124 (Pt 19): 3189–97. doi:10.1242/jcs.072165.

- Hakkinen, Kirsi M, Jill S Harunaga, Andrew D Doyle, and Kenneth M Yamada. 2011. "Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices." *Tissue Engineering. Part A* 17 (5-6): 713–24. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0273.
- Hanahan, D, and J Folkman. 1996. "Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis." *Cell* 86 (3). Elsevier: 353–64. doi:10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- Hanahan, Douglas, and Robert Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell*.
- Hapke, Sandra, Horst Kessler, Birgit Lubber, Anke Benge, Peter Hutzler, Heinz Höfler, Manfred Schmitt, and Ute Reuning. 2003. "Ovarian Cancer Cell Proliferation and Motility Is Induced by Engagement of Integrin alpha(v)beta3/Vitronectin Interaction." *Biological Chemistry* 384 (7): 1073–83. doi:10.1515/BC.2003.120.
- Heintz, Apm P, F Odicino, P Maisonneuve, U Beller, J L Benedet, W T Creasman, H Y Ngan, M Sideri, and S Pecorelli. 2006. "Carcinoma of the Ovary." *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 95: 161–92. doi:10.1016/S0020-7292(06)60033-7.
- Hemmings, Brian A, and David F Restuccia. 2012. "PI3K-PKB/Akt Pathway." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (9): a011189. doi:10.1101/cshperspect.a011189.
- Hengstler, J G, J Lange, A Kett, N Dornhöfer, R Meinert, M Arand, P G Knapstein, R Becker, F Oesch, and B Tanner. 1999. "Contribution of c-erbB-2 and Topoisomerase IIalpha to Chemoresistance in Ovarian Cancer." *Cancer Research* 59 (13): 3206–14.
- Hennessy, Bryan T, Robert L Coleman, and Maurie Markman. 2009. "Ovarian Cancer." *The Lancet* 374 (9698). Elsevier: 1371–82. doi:10.1016/S0140-6736(09)61338-6.
- Herzog, Thomas J, David Spetzler, Nick Xiao, Ken Burnett, Todd Maney, Andreas Voss, Sandeep Reddy, et al. 2016. "Impact of Molecular Profiling on Overall Survival of Patients with Advanced Ovarian Cancer." *Oncotarget*, November. doi:10.18632/oncotarget.7835.
- Heyman, Loraine, Sabrina Kellouche, Julien Fernandes, Soizic Dutoit, Laurent Poulain, and Franck Carreiras. 2008. "Vitronectin and Its Receptors Partly Mediate Adhesion of Ovarian Cancer Cells to Peritoneal Mesothelium in Vitro." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 29 (4): 231–44. doi:10.1159/000152941.
- Higby, D J, H J Wallace, D J Albert, and J F Holland. 1974. "Diaminodichloroplatinum: A Phase I Study Showing Responses in Testicular and Other Tumors." *Cancer* 33 (5): 1219–1215. doi:10.1002/1097-0142(197405)33:5<1219::AID-CNCR2820330505>3.0.CO;2-U.
- Holmes, R. 1967. "Preparation from Human Serum of an Alpha-One Protein Which Induces the Immediate Growth of Unadapted Cells in Vitro." *The Journal of Cell Biology* 32 (2): 297–308.
- Hu, Min, and Kornelia Polyak. 2008. "Microenvironmental Regulation of Cancer Development." *Current Opinion in Genetics & Development* 18 (1): 27–34. doi:10.1016/j.gde.2007.12.006.
- Huang, R Y-J, M K Wong, T Z Tan, K T Kuay, A H C Ng, V Y Chung, Y-S Chu, et al. 2013. "An EMT Spectrum Defines an Anoikis-Resistant and Spheroidogenic Intermediate Mesenchymal State That Is Sensitive to E-Cadherin Restoration by a Src-Kinase Inhibitor, Saracatinib (AZD0530)." *Cell Death & Disease* 4 (January): e915. doi:10.1038/cddis.2013.442.
- Huang, X, J Wu, S Spong, and D Sheppard. 1998. "The Integrin alphavbeta6 Is Critical for Keratinocyte Migration on Both Its Known Ligand, Fibronectin, and on Vitronectin." *Journal of Cell Science* 111 (Pt 1 (August): 2189–95.
- Huang, R Y-J, M K Wong, T Z Tan, K T Kuay, A H C Ng, V Y Chung, Y-S Chu, et al. 2013. "An EMT Spectrum Defines an Anoikis-Resistant and

- Spheroidogenic Intermediate Mesenchymal State That Is Sensitive to E-Cadherin Restoration by a Src-Kinase Inhibitor, Saracatinib (AZD0530)." *Cell Death & Disease* 4 (January): e915. doi:10.1038/cddis.2013.442.
- Hynes, Richard O. 1990. *Fibronectins*. Springer Series in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4612-3264-3.
- Hynes, Richard O. 2009. "The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils." *Science (New York, N.Y.)* 326 (5957): 1216–19. doi:10.1126/science.1176009.
- Hynes, Richard O, and Alexandra Naba. 2012. "Overview of the Matrisome—an Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (1): a004903. doi:10.1101/cshperspect.a004903.
- Hynes, Richard O, and K M Yamada. 1982. "Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins." *The Journal of Cell Biology* 95 (2 Pt 1): 369–77.
- Iozzo, Renato V, and Liliana Schaefer. 2015. "Proteoglycan Form and Function: A Comprehensive Nomenclature of Proteoglycans." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 42 (March): 11–55. doi:10.1016/j.matbio.2015.02.003.
- Ishida, Seiko, Jaekwon Lee, Dennis J Thiele, and Ira Herskowitz. 2002. "Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin Mediated by the Copper Transporter Ctr1 in Yeast and Mammals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22): 14298–302. doi:10.1073/pnas.162491399.
- Iwanicki, Marcin P, Rachel A Davidowitz, Mei Rosa Ng, Achim Besser, Taru Muranen, Melissa Merritt, Gaudenz Danuser, Tan A Ince, Tan Ince, and Joan S Brugge. 2011. "Ovarian Cancer Spheroids Use Myosin-Generated Force to Clear the Mesothelium." *Cancer Discovery* 1 (2): 144–57. doi:10.1158/2159-8274.CD-11-0010.
- Izumi, M, K M Yamada, and M Hayashi. 1989. "Vitronectin Exists in Two Structurally and Functionally Distinct Forms in Human Plasma." *Biochimica et Biophysica Acta* 990 (2): 101–8.
- Jazaeri, Amir A, Christopher S Awtrey, Gadiseti V R Chandramouli, Yao Eric Chuang, Javed Khan, Christos Sotiriou, Olga Aprelikova, et al. 2005. "Gene Expression Profiles Associated with Response to Chemotherapy in Epithelial Ovarian Cancers." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (17): 6300–6310. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2682.
- Jeon, Eun Su, Hyun Jung Moon, Mi Jeong Lee, Hae Young Song, Young Mi Kim, Mong Cho, Dong-Soo Suh, et al. 2008. "Cancer-Derived Lysophosphatidic Acid Stimulates Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Myofibroblast-like Cells." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (3): 789–97. doi:10.1634/stemcells.2007-0742.
- Ji, Fang, You Wang, Lihua Qiu, Shu Li, Jing Zhu, Zhou Liang, Yinsheng Wan, and Wen Di. 2013. "Hypoxia Inducible Factor 1 α -Mediated LOX Expression Correlates with Migration and Invasion in Epithelial Ovarian Cancer." *International Journal of Oncology* 42 (5): 1578–88. doi:10.3892/ijo.2013.1878.
- Jiang, Xiuxian, Sarah J Morland, Andrew Hitchcock, Eric J Thomas, and Ian G Campbell. 1998. "Allelo Typing of Endometriosis of a Common Lineage1 with Adjacent Ovarian Carcinoma Reveals Evidence of a Common Lineage." *Cancer Research* 58 (12): 1707–12.
- Jones, Siân, Tian-Li Wang, Robert J Kurman, Kentaro Nakayama, Victor E Velculescu, Bert Vogelstein, Kenneth W Kinzler, Nickolas Papadopoulos, and Ie-Ming Shih. 2012. "Low-Grade Serous Carcinomas of the Ovary Contain Very Few Point Mutations." *The Journal of Pathology* 226 (3): 413–20. doi:10.1002/path.3967.
- Jordan, Mary Ann, and Leslie Wilson. 2004. "Microtubules as a Target for Anticancer Drugs." *Nature Reviews Cancer* 4 (4): 253–65. doi:10.1038/nrc1317.
- Kadler, Karl E, Clair Baldock, Jordi Bella, and Raymond P Boot-Handford. 2007. "Collagens at a Glance." *Journal of Cell Science* 120 (Pt

- 12): 1955–58. doi:10.1242/jcs.03453.
- Kalluri, Raghu. 2003. “Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis.” *Nature Reviews. Cancer* 3 (6): 422–33. doi:10.1038/nrc1094.
- Kalluri, Raghu, and Michael Zeisberg. 2006. “Fibroblasts in Cancer.” *Nature Reviews. Cancer* 6 (5). Nature Publishing Group: 392–401. doi:10.1038/nrc1877.
- Kampan, Nirmala Chandralega, Mutsa Tatenda Madondo, Orla M McNally, Michael Quinn, and Magdalena Plebanski. 2015. “Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer.” *BioMed Research International* 2015 (January). doi:10.1155/2015/413076.
- Kanchanawong, Pakorn, Gleb Shtengel, Ana M Pasapera, Ericka B Ramko, Michael W Davidson, Harald F Hess, and Clare M Waterman. 2010. “Nanoscale Architecture of Integrin-Based Cell Adhesions.” *Nature* 468 (7323): 580–84. doi:10.1038/nature09621.
- Karst, Alison M, and Ronny Drapkin. 2010. “Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution.” *Journal of Oncology* 2010: 932371. doi:10.1155/2010/932371.
- Keller, Gordon. 2005. “Embryonic Stem Cell Differentiation: Emergence of a New Era in Biology and Medicine.” *Genes & Development* 19 (10): 1129–55. doi:10.1101/gad.1303605.
- Kellouche, Sabrina, Julien Fernandes, Johanne Leroy-Dudal, Olivier Gallet, Soizic Dutoit, Laurent Poulain, and Franck Carreiras. 2010. “Initial Formation of IGROV1 Ovarian Cancer Multicellular Aggregates Involves Vitronectin.” *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 31 (2): 129–39. doi:10.1007/s13277-010-0017-9.
- Kenny, Hilary A, Swayamjot Kaur, Lisa M Coussens, and Ernst Lengyel. 2008. “The Initial Steps of Ovarian Cancer Cell Metastasis Are Mediated by MMP-2 Cleavage of Vitronectin and Fibronectin.” *The Journal of Clinical Investigation* 118 (4): 1367–79. doi:10.1172/JCI33775.
- Kenny, Hilary A, and Ernst Lengyel. 2009. “MMP-2 Functions as an Early Response Protein in Ovarian Cancer Metastasis.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (5): 683–88.
- Kenny, Hilary A, Chun-Yi Chiang, Erin A White, Elizabeth M Schryver, Mohammed Habis, Iris L Romero, Andras Ladanyi, et al. 2014. “Mesothelial Cells Promote Early Ovarian Cancer Metastasis through Fibronectin Secretion.” *The Journal of Clinical Investigation* 124 (10): 4614–28. doi:10.1172/JCI74778.
- Khaider, Nadzeya Goncharenko, Denis Lane, Isabelle Matte, Claudine Rancourt, and Alain Piché. 2012. “Targeted Ovarian Cancer Treatment: The TRAILS of Resistance.” *American Journal of Cancer Research* 2 (1): 75–92.
- Kim, H S, T H Kim, H H Chung, and Y S Song. 2014. “Risk and Prognosis of Ovarian Cancer in Women with Endometriosis: A Meta-Analysis.” *British Journal of Cancer* 110 (7): 1878–90. doi:10.1038/bjc.2014.29.
- Kindelberger, David W, Yonghee Lee, Alexander Miron, Michelle S Hirsch, Colleen Feltmate, Fabiola Medeiros, Michael J Callahan, et al. 2007. “Intraepithelial Carcinoma of the Fimbria and Pelvic Serous Carcinoma: Evidence for a Causal Relationship.” *The American Journal of Surgical Pathology* 31 (2): 161–69. doi:10.1097/01.pas.0000213335.40358.47.
- Kipps, Emma, David S P Tan, and Stan B Kaye. 2013. “Meeting the Challenge of Ascites in Ovarian Cancer: New Avenues for Therapy and Research.” *Nature Reviews. Cancer* 13 (4). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.: 273–82. doi:10.1038/nrc3432.
- Koizumi, Kazuhisa, Kazunori Takano, Akiko Kaneyasu, Haruko Watanabe-Takano, Emi Tokuda, Tomoyuki Abe, Naoki Watanabe, Tadaomi Takenawa, and Takeshi Endo. 2012. “RhoD Activated by Fibroblast Growth Factor Induces Cytoskeleton-like Cellular Protrusions through mDia3C.” *Molecular Biology of the Cell* 23 (23): 4647–61. doi:10.1091/mbc.E12-04-0315.
- Kostourou, Vassiliki, and Vassilis Papalazarou. 2014. “Non-Collagenous ECM Proteins in Blood Vessel Morphogenesis and Cancer.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (8): 2403–13. doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.018.

- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, and Catherine Brenner. 2007. "Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death." *Physiological Reviews* 87 (1): 99–163. doi:10.1152/physrev.00013.2006.
- Kurman, Rj, and Im Shih. 2010. "The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer—a Proposed Unifying Theory." *The American Journal of Surgical Pathology* 34 (3): 433–43. doi:10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79.The.
- Kurman Robert J., Shih le-Ming. 2011. "Molecular Pathogenesis and Extraovarian Origin of Epithelial Ovarian Cancer. Shifting the Paradigm." *Human Pathol* 42 (7): 918–31. doi:10.1016/j.humpath.2011.03.003.Molecular.
- Kuzmanov, Uros, Nianxin Jiang, Christopher R Smith, Antoninus Soosaipillai, and Eleftherios P Diamandis. 2009. "Differential N-Glycosylation of Kallikrein 6 Derived from Ovarian Cancer Cells or the Central Nervous System." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 8 (4): 791–98. doi:10.1074/mcp.M800516-MCP200.
- L'Espérance, Sylvain, Magdalena Bachvarova, Bernard Tetu, Anne-Marie Mes-Masson, and Dimcho Bachvarov. 2008. "Global Gene Expression Analysis of Early Response to Chemotherapy Treatment in Ovarian Cancer Spheroids." *BMC Genomics* 9 (January): 99. doi:10.1186/1471-2164-9-99.
- Laemmli, U. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259): 680–85. doi:10.1038/227680a0.
- Landen, Charles N, Tae-Jin Kim, Yvonne G Lin, William M Merritt, Aparna A Kamat, Liz Y Han, Whitney A Spanuth, et al. 2008. "Tumor-Selective Response to Antibody-Mediated Targeting of α v β 3 Integrin in Ovarian Cancer." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 10 (11): 1259–67.
- Lane, Denis, Isabelle Matte, Perrine Garde-Granger, Claude Laplante, Alex Carignan, Claudine Rancourt, and Alain Piché. 2015. "Inflammation-Regulating Factors in Ascites as Predictive Biomarkers of Drug Resistance and Progression-Free Survival in Serous Epithelial Ovarian Cancers." *BMC Cancer* 15 (January): 492. doi:10.1186/s12885-015-1511-7.
- Lane, Denis, Isabelle Matte, Claudine Rancourt, and Alain Piché. 2010. "The Prosurvival Activity of Ascites against TRAIL Is Associated with a Shorter Disease-Free Interval in Patients with Ovarian Cancer." *Journal of Ovarian Research* 3 (1). doi:10.1186/1757-2215-3-1.
- Larue, Lionel, and Alfonso Bellacosa. 2005. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Development and Cancer: Role of Phosphatidylinositol 3' kinase/AKT Pathways." *Oncogene* 24 (50): 7443–54. doi:10.1038/sj.onc.1209091.
- Latifi, Ardian, Rodney B Luwor, Maree Bilandzic, Simon Nazaretian, Kaye Stenvers, Jan Pyman, Hongjian Zhu, et al. 2012. "Isolation and Characterization of Tumor Cells from the Ascites of Ovarian Cancer Patients: Molecular Phenotype of Chemoresistant Ovarian Tumors." *PLoS One* 7 (10): e46858. doi:10.1371/journal.pone.0046858.
- Ledermann, J. A., and R. S. Kristeleit. 2010. "Optimal Treatment for Relapsing Ovarian Cancer." *Annals of Oncology* 21 (Supplement 7): vii218–22. doi:10.1093/annonc/mdq377.
- Lee, Sooyong, Seunghee Yoon, and Dong-Hyun Kim. 2007. "A High Nuclear Basal Level of ERK2 Phosphorylation Contributes to the Resistance of Cisplatin-Resistant Human Ovarian Cancer Cells." *Gynecologic Oncology* 104 (2): 338–44. doi:10.1016/j.ygyno.2006.08.040.
- Lee, Y, A Miron, R Drapkin, M R Nucci, F Medeiros, A Saleemuddin, J Garber, et al. 2007. "A Candidate Precursor to Serous Carcinoma That Originates in the Distal Fallopian Tube." *The Journal of Pathology* 211 (1): 26–35. doi:10.1002/path.2091.
- Lengyel, Ernst. 2010. "Ovarian Cancer Development and Metastasis." *The American Journal of Pathology* 177 (3): 1053–64. doi:10.2353/ajpath.2010.100105.
- Leroy-Dudal, Johanne, Loraine Heyman, Pascal Gauduchon, and Franck Carreiras. 2005. "Adhesion of Human Ovarian Adenocarcinoma IGROV1 Cells to Endothelial Cells Is Partly Mediated by the α v β 3 Integrins-Vitronectin Adhesive System and Induces an Alteration of Endothelial

- Integrity." *Cell Biology International* 29 (6): 482–88. doi:10.1016/j.cellbi.2005.01.008.
- Levanon, Keren, Christopher Crum, and Ronny Drapkin. 2008. "New Insights into the Pathogenesis of Serous Ovarian Cancer and Its Clinical Impact." *Journal of Clinical Oncology* 26 (32): 5284–93. doi:10.1200/JCO.2008.18.1107.
- Li, Meng, Curt Balch, John S Montgomery, Mikyoung Jeong, Jae Hoon Chung, Pearly Yan, Tim H M Huang, Sun Kim, and Kenneth P Nephew. 2009. "Integrated Analysis of DNA Methylation and Gene Expression Reveals Specific Signaling Pathways Associated with Platinum Resistance in Ovarian Cancer." *BMC Medical Genomics* 2 (January): 34. doi:10.1186/1755-8794-2-34.
- Liao, Jianqun, Feng Qian, Nana Tchabo, Paulette Mhaweche-Fauceglia, Amy Beck, Zikun Qian, Xinhui Wang, et al. 2014. "Ovarian Cancer Spheroid Cells with Stem Cell-like Properties Contribute to Tumor Generation, Metastasis and Chemotherapy Resistance through Hypoxia-Resistant Metabolism." *PLoS One* 9 (1). Public Library of Science: e84941. doi:10.1371/journal.pone.0084941.
- Littlepage, Laurie E, Mikala Egeblad, and Zena Werb. 2005. "Coevolution of Cancer and Stromal Cellular Responses." *Cancer Cell* 7 (6): 499–500. doi:10.1016/j.ccr.2005.05.019.
- Lössner, Daniela, Claudia Abou-Ajram, Anke Benge, and Ute Reuning. 2008. "Integrin α v β 3 Mediates Upregulation of Epidermal Growth-Factor Receptor Expression and Activity in Human Ovarian Cancer Cells." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (12): 2746–61. doi:10.1016/j.biocel.2008.05.014.
- M**abuchi, Seiji, Hiromasa Kuroda, Ryoko Takahashi, and Tomoyuki Sasano. 2015. "The PI3K/AKT/mTOR Pathway as a Therapeutic Target in Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 137 (1): 173–79. doi:10.1016/j.ygyno.2015.02.003.
- Macciò, Antonio, and Clelia Madeddu. 2012. "Inflammation and Ovarian Cancer." *Cytokine* 58 (2): 133–47. doi:10.1016/j.cyto.2012.01.015.
- Maffini, Maricel V, Ana M Soto, Janine M Calabro, Angelo A Ucci, and Carlos Sonnenschein. 2004. "The Stroma as a Crucial Target in Rat Mammary Gland Carcinogenesis." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 8): 1495–1502. doi:10.1242/jcs.01000.
- Mao, Yong, and Jean E Schwarzbauer. 2005. "Fibronectin Fibrillogenesis, a Cell-Mediated Matrix Assembly Process." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 24 (6): 389–99. doi:10.1016/j.matbio.2005.06.008.
- Mathot, Lucy, and Johan Steninger. 2012. "Behavior of Seeds and Soil in the Mechanism of Metastasis: A Deeper Understanding." *Cancer Science* 103 (4): 626–31. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02195.x.
- Matte, Isabelle, Denis Lane, Claude Laplante, Claudine Rancourt, and Alain Piché. 2012. "Profiling of Cytokines in Human Epithelial Ovarian Cancer Ascites." *American Journal of Cancer Research* 2 (5): 566–80.
- Maubant, Sylvie, Séverine Cruet-Hennequart, Laurent Poulain, Franck Carreiras, François Sichel, José Luis, Cathy Staedel, and Pascal Gauduchon. 2002. "Altered Adhesion Properties and α v β 3 Integrin Expression in a Cisplatin-Resistant Human Ovarian Carcinoma Cell Line." *International Journal of Cancer* 97 (2): 186–94.
- McGuire, William, William J. HOSKINS, Mark F. Brady, Paul R. Kucera, Edward E. Partridge, Katherine Y. Look, Daniel L. Clarke-Pearson, and Martin Davidson. 1996. "Cyclophosphamide and Cisplatin Compared with Paclitaxel and Cisplatin in Patients with Stage III and Stage IV Ovarian Cancer." *The New England Journal of Medicine* 334 (1): 1–6.
- McGuire, William, Eric Rowinsky, Neil Rosenshein, Francis Grumbine, David Ettinger, Deborah K Armstrong, and Ross C. Donehower. 1989. "Taxol: A Unique Antineoplastic Agent with Significant Activity in Advanced Ovarian Epithelial Neoplasms." *Annals of Internal Medicine* 111 (4): 273. doi:10.7326/0003-4819-111-4-273.
- McLean, Karen, Yusong Gong, Yunjung Choi, Ning Deng, Kun Yang, Shoumei Bai, Lourdes Cabrera, et al. 2011. "Human Ovarian Carcinoma-associated Mesenchymal Stem

- Cells Regulate Cancer Stem Cells and Tumorigenesis via Altered BMP Production." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (8): 3206–19. doi:10.1172/JCI45273.
- Merlo, Lauren M F, John W Pepper, Brian J Reid, and Carlo C Maley. 2006. "Cancer as an Evolutionary and Ecological Process." *Nature Reviews. Cancer* 6 (12). Nature Publishing Group: 924–35. doi:10.1038/nrc2013.
- Menzin, A W, J R Loret de Mola, W B Bilker, J E Wheeler, S C Rubin, and R F Feinberg. 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 (1): 152–58.
- Meunier, Liliane, Marie-Line Puiffe, Cécile Le Page, Abdelali Filali-Mouhim, Mario Chevrette, Patricia N Tonin, Diane M Provencher, and Anne-Marie Mes-Masson. 2010. "Effect of Ovarian Cancer Ascites on Cell Migration and Gene Expression in an Epithelial Ovarian Cancer in Vitro Model." *Translational Oncology* 3 (4): 230–38. Miki, Yoshio, Jeff Swensen, Donna Shattuck-Eidens, P. Andrew Futreal, Keith Harshman, Sean Vahram Tavtigian, Qingyun Liu, et al. 1994. "A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1." *Science* 266 (5182).
- Milis, L, C A Morris, M C Sheehan, J A Charlesworth, and B A Pussell. 1993. "Vitronectin-Mediated Inhibition of Complement: Evidence for Different Binding Sites for C5b-7 and C9." *Clinical and Experimental Immunology* 92 (1): 114–19.
- Mitsiades, Constantine S, Nicholas Mitsiades, and Michael Koutsilieris. 2004. "The Akt Pathway: Molecular Targets for Anti-Cancer Drug Development." *Current Cancer Drug Targets* 4 (3): 235–56.
- Moretti, Federico A, Anil K Chauhan, Alessandra Iaconcig, Fabiola Porro, Francisco E Baralle, and Andrés F Muro. 2007. "A Major Fraction of Fibronectin Present in the Extracellular Matrix of Tissues Is Plasma-Derived." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (38): 28057–62. doi:10.1074/jbc.M611315200.
- Murphy-Ullrich, Joanne E, and E Helene Sage. 2014. "Revisiting the Matricellular Concept." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 37 (July): 1–14. doi:10.1016/j.matbio.2014.07.005.
- N**aba, Alexandra, Karl R Clauser, Sebastian Hoersch, Hui Liu, Steven A Carr, and Richard O Hynes. 2012. "The Matrisome: In Silico Definition and in Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices." *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11 (4): M111.014647. doi:10.1074/mcp.M111.014647.
- Nam, Eun Ji, Maria Lee, Ga Won Yim, Jae Hoon Kim, Sunghoon Kim, Sang Wun Kim, and Young Tae Kim. 2012. "MicroRNA Profiling of a CD133(+) Spheroid-Forming Subpopulation of the OVCAR3 Human Ovarian Cancer Cell Line." *BMC Medical Genomics* 5 (January): 18. doi:10.1186/1755-8794-5-18.
- Neskey, David M, Anthony Ambesi, Kevin M Pumiglia, and Paula J McKeown-Longo. 2008. "Endostatin and Anastellin Inhibit Distinct Aspects of the Angiogenic Process." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 27 (January): 61. doi:10.1186/1756-9966-27-61.
- No, Jae Hong, Yong-Tark Jeon, Yong-Beom Kim, and Yong-Sang Song. 2011. "Quantitative Detection of Serum Survivin and Its Relationship with Prognostic Factors in Ovarian Cancer." *Gynecologic and Obstetric Investigation* 71 (2): 136–40. doi:10.1159/000316049.
- O**hta, Tsuyoshi, Masahide Ohmichi, Tadashi Hayasaka, Seiji Mabuchi, Maki Saitoh, Jun Kawagoe, Kazuhiro Takahashi, et al. 2006. "Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Increases Efficacy of Cisplatin in in Vivo Ovarian Cancer Models." *Endocrinology* 147 (4). Endocrine Society: 1761–69. doi:10.1210/en.2005-1450.
- Okamura, Hitoshi, Hidetaka Katabuchi, Makoto Nitta, and Hideyuki Ohtake. 2006. "Structural Changes and Cell Properties of Human Ovarian Surface Epithelium in Ovarian Pathophysiology." *Microscopy Research and Technique* 69 (6): 469–81. doi:10.1002/jemt.20306.
- Olson, T A, D Mohanraj, L F Carson, and S Ramakrishnan. 1994. "Vascular Permeability Factor Gene Expression in Normal and

- Neoplastic Human Ovaries." *Cancer Res* 54 (1): 276–80.
- P**age-McCaw, Andrea, Andrew J Ewald, and Zena Werb. 2007. "Matrix Metalloproteinases and the Regulation of Tissue Remodelling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (3): 221–33. doi:10.1038/nrm2125.
- Paget, S. 1889. "The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. 1889." *Cancer Metastasis Reviews* 8 (2): 98–101.
- Pan, Yinghong, Gordon Robertson, Lykke Pedersen, Emilia Lim, Anadulce Hernandez-Herrera, Amy C Rowat, Sagar L Patil, et al. 2014. "miR-509-3p Is Clinically Significant and Strongly Attenuates Cellular Migration and Multi-Cellular Spheroids in Ovarian Cancer." *Oncotarget*, November. doi:10.18632/oncotarget.8412.
- Pankov, R. 2002. "Fibronectin at a Glance." *Journal of Cell Science* 115 (20): 3861–63. doi:10.1242/jcs.00059.
- Partridge, E, and M Barnes. 1999. "Epithelial Ovarian Cancer: Prevention, Diagnosis, and Treatment." *CA Cancer J Clin.* 49 (5): 297–320.
- Pasquet, Marlene, Muriel Golzio, Eliane Mery, Arash Rafii, Nadia Benabbou, Pezhman Mirshahi, Isabelle Hennebelle, et al. 2010. "L." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 126 (9): 2090–2101. doi:10.1002/ijc.24886.
- Peart, Teresa, Yudith Ramos Valdes, Rohann J M Correa, Elena Fazio, Monique Bertrand, Jacob McGee, Michel Préfontaine, Akira Sugimoto, Gabriel E DiMattia, and Trevor G Shepherd. 2015. "Intact LKB1 Activity Is Required for Survival of Dormant Ovarian Cancer Spheroids." *Oncotarget* 6 (26): 22424–38. doi:10.18632/oncotarget.4211.
- Pease, Jillian C, Molly Brewer, and Jennifer S Tirnauer. 2012. "Spontaneous Spheroid Budding from Monolayers: A Potential Contribution to Ovarian Cancer Dissemination." *Biology Open* 1 (7): 622–28. doi:10.1242/bio.2012653.
- Perego, P, M Giarola, S C Righetti, R Supino, C Caserini, D Delia, M A Pierotti, T Miyashita, J C Reed, and F Zunino. 1996. "Association between Cisplatin Resistance and Mutation of p53 Gene and Reduced Bax Expression in Ovarian Carcinoma Cell Systems." *Cancer Research* 56 (3): 556–62.
- Persons, Diane L., Eugenia M. Yazlovitskaya, Wei Cui, and Jill C. Pelling. 1999. "Cisplatin-Induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Ovarian Carcinoma Cells: Inhibition of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity Increases Sensitivity to Cisplatin." *Clin. Cancer Res.* 5 (5): 1007–14. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/5/5/1007.long>.
- Petrie, Ryan J., Andrew D. Doyle, and Kenneth M. Yamada. 2009. "Random versus Directionally Persistent Cell Migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (8): 538–49. doi:10.1038/nrm2729.
- Peyssonaux, Carole, and Alain Eychène. 2001. "The Raf/MEK/ERK Pathway: New Concepts of Activation." *Biology of the Cell* 93 (1-2): 53–62. doi:10.1016/S0248-4900(01)01125-X.
- Piccart, M J, K Bertelsen, K James, J Cassidy, C Mangioni, E Simonsen, G Stuart, et al. 2000. "Randomized Intergroup Trial of Cisplatin-Paclitaxel versus Cisplatin-Cyclophosphamide in Women with Advanced Epithelial Ovarian Cancer: Three-Year Results." *Journal of the National Cancer Institute* 92 (9): 699–708. doi:10.1093/jnci/92.9.699.
- Piek, Jurgen, P J van Diest, R P Zweemer, J W Jansen, R J Poort-Keesom, F H Menko, J J Gille, et al. 2001. "Dysplastic Changes in Prophylactically Removed Fallopian Tubes of Women Predisposed to Developing Ovarian Cancer." *The Journal of Pathology* 195 (4): 451–56. doi:10.1002/path.1000.
- Piek, Jurgen, René H.M. Verheijen, Peter Kenemans, Leon F. Massuger, Hans Bulten, and Paul J. van Diest. 2003. "BRCA1/2-Related Ovarian Cancers Are of Tubal Origin: A Hypothesis." *Gynecologic Oncology* 90 (2): 491. doi:10.1016/S0090-8258(03)00365-2.
- Pizarro, Ana M, and Peter J Sadler. 2009. "Unusual DNA Binding Modes for Metal Anticancer Complexes." *Biochimie* 91 (10): 1198–1211. doi:10.1016/j.biochi.2009.03.017.
- Plotnikov, Alexander, Eldar Zehorai, Shiri Procaccia, and Rony Seger. 2011. "The MAPK Cascades: Signaling Components, Nuclear Roles and

- Mechanisms of Nuclear Translocation." *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 (9): 1619–33. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.12.012.
- Podor, Thomas J, Stephanie Campbell, Paul Chindemi, Denise M Foulon, David H Farrell, Philip D Walton, Jeffrey I Weitz, and Cynthia B Peterson. 2002. "Incorporation of Vitronectin into Fibrin Clots. Evidence for a Binding Interaction between Vitronectin and Gamma A/gamma' Fibrinogen." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (9): 7520–28. doi:10.1074/jbc.M109677200.
- Poulouin, L. 2002. "Caractérisation de la fibronectine du plasma sanguin et de son fragment de 60kDa (Purification, stabilité et analyse qualitative des glycosylations)." *Protein Expression and Purification* 17 (1): 146–52. doi:10.1006/prep.1999.1103.
- Poulouin, L, O Gallet, M Rouahi, and J M Imhoff. 1999. "Plasma Fibronectin: Three Steps to Purification and Stability." *Protein Expression and Purification* 17 (1): 146–52. doi:10.1006/prep.1999.1103.
- Pradeep, Sunila, Seung W. Kim, Sherry Y. Wu, Masato Nishimura, Pradeep Chaluvally-Raghavan, Takahito Miyake, Chad V. Pecot, et al. 2014. "Hematogenous Metastasis of Ovarian Cancer: Rethinking Mode of Spread." *Cancer Cell* 26 (1): 77–91. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.002.
- Preissner, K T. 1991. "Structure and Biological Role of Vitronectin." *Annual Review of Cell Biology* 7 (January). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 275–310. doi:10.1146/annurev.cb.07.110191.001423.
- Preissner, Klaus T, and Dietmar Seiffert. 1998. "Role of Vitronectin and Its Receptors in Haemostasis and Vascular Remodeling." *Thrombosis Research* 89 (1). Elsevier: 1–21. doi:10.1016/S0049-3848(97)00298-3.
- Puiffe, Marie-Line, Cécile Le Page, Abdelali Filali-Mouhim, Magdalena Zietarska, Véronique Ouellet, Patricia N Tonin, Mario Chevrette, Diane M Provencher, and Anne-Marie Mes-Masson. 2007. "Characterization of Ovarian Cancer Ascites on Cell Invasion, Proliferation, Spheroid Formation, and Gene Expression in an in Vitro Model of Epithelial Ovarian Cancer." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 9 (10): 820–29.
- Puls, L E, T Duniho, J E Hunter, R Kryscio, D Blackhurst, and H Gallion. 1996. "The Prognostic Implication of Ascites in Advanced-Stage Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 61 (1): 109–12.
- R**ao, S, N E Krauss, J M Heerding, C S Swindell, I Ringel, G A Orr, and S B Horwitz. 1994. "3'-(p-Azidobenzamido)taxol Photolabels the N-Terminal 31 Amino Acids of Beta-Tubulin." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (5): 3132–34.
- Rebbeck, Timothy R., Noah D. Kauff, and Susan M. Domchek. 2009. "Meta-Analysis of Risk Reduction Estimates Associated with Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 Mutation Carriers." *Journal of the National Cancer Institute* 101 (2): 80–87. doi:10.1093/jnci/djn442.
- Reheman, A, P Gross, H Yang, P Chen, D Allen, V Leytin, J Freedman, and H Ni. 2005. "Vitronectin Stabilizes Thrombi and Vessel Occlusion but Plays a Dual Role in Platelet Aggregation." *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 3 (5): 875–83. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01217.x.
- Reuning, Ute. 2011. "Integrin $\alpha\beta 3$ Promotes Vitronectin Gene Expression in Human Ovarian Cancer Cells by Implicating Rel Transcription Factors." *Journal of Cellular Biochemistry* 112 (7): 1909–19. doi:10.1002/jcb.23111.
- Ricciardelli, Carmela, and Raymond J Rodgers. 2006. "Extracellular Matrix of Ovarian Tumors." *Seminars in Reproductive Medicine* 24 (4): 270–82. doi:10.1055/s-2006-948556.
- Richardson, D L, F J Backes, J D Hurt, L G Seamon, L J Copeland, J M Fowler, D E Cohn, and D M O'Malley. 2010. "Which Factors Predict Bowel Complications in Patients with Recurrent Epithelial Ovarian Cancer Being Treated with Bevacizumab?" *Gynecologic Oncology* 118 (1): 47–51. doi:10.1016/j.ygyno.2010.01.011.
- Rizvi, Imran, Umut A Gurkan, Savas Tasoglu, Nermina Alagic, Jonathan P Celli, Lawrence B Mensah, Zhiming Mai, Utkan Demirci, and Tayyaba Hasan. 2013. "Flow Induces Epithelial-Mesenchymal Transition, Cellular Heterogeneity and Biomarker Modulation in 3D Ovarian Cancer Nodules." *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (22): E1974–83. doi:10.1073/pnas.1216989110.
- Rosenberg, Barnett, L Vancamp, and T Krigas. 1965. "Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli By Electrolysis Products From a Platinum Electrode." *Nature* 205: 698–99. doi:10.1038/205698a0.
- Rosenberg, Barnett, L VanCamp, James E Trosko, and V H Mansour. 1969. "Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents." *Nature* 222 (5191): 385–86. doi:10.1038/222385a0.
- Rosenberg, Barnett, and L. VanCamp. 1970. "The Successful Regression of Large Solid Sarcoma 180 Tumors by Platinum Compounds." *Cancer Research* 30 (6): 1799–1802.
- Roupa, Zoi, Efthimios Faros, Vasilios Raftopoulos, Georgios Tzavelas, Evangelia Kotrotsiou, Penelope Sotiropoulou, Evridiki Karanikola, Evdoxia Skifta, and Alexandros Ardavanis. 2004. "Serum CA 125 Combined with Transvaginal Ultrasonography for Ovarian Cancer Screening." *In Vivo (Athens, Greece)* 18 (6): 831–36.
- Ruoslahti, E. 1984. "Fibronectin in Cell Adhesion and Invasion." *Cancer Metastasis Reviews* 3 (1): 43–51.
- S**akai, Wataru, Elizabeth M Swisher, Beth Y Karlan, Mukesh K Agarwal, Jake Higgins, Cynthia Friedman, Emily Villegas, et al. 2008. "Secondary Mutations as a Mechanism of Cisplatin Resistance in BRCA2-Mutated Cancers." *Nature* 451 (7182): 1116–20. doi:10.1038/nature06633.
- Samimi, Goli, Nissi M Varki, Sharon Wilczynski, Roohangiz Safaei, David S Alberts, and Stephen B Howell. 2003. "Increase in Expression of the Copper Transporter ATP7A during Platinum Drug-Based Treatment Is Associated with Poor Survival in Ovarian Cancer Patients." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9 (16 Pt 1): 5853–59.
- Sato, Keiji, Kentaro Yomogida, Takayuki Wada, Tetuya Yorihuzi, Yoshitake Nishimune, Nobuko Hosokawa, and Kazuhiro Nagata. 2002. "Type XXVI Collagen, a New Member of the Collagen Family, Is Specifically Expressed in the Testis and Ovary." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37678–84. doi:10.1074/jbc.M205347200.
- Sawada, Kenjiro, Anirban K Mitra, A Reza Radjabi, Vinay Bhaskar, Emily O Kistner, Maria Tretiakova, Sujatha Jagadeeswaran, et al. 2008. "Loss of E-Cadherin Promotes Ovarian Cancer Metastasis via Alpha 5-Integrin, Which Is a Therapeutic Target." *Cancer Research* 68 (7): 2329–39. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5167.
- Schlie-Wolter, Sabrina, Anaclet Ngezahayo, and Boris N Chichkov. 2013. "The Selective Role of ECM Components on Cell Adhesion, Morphology, Proliferation and Communication in Vitro." *Experimental Cell Research* 319 (10): 1553–61. doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.016.
- Schutysse, Evemie, Sofie Struyf, Paul Proost, Ghislain Opdenakker, Genevieve Laureys, Bruno Verhasselt, Lieven Peperstraete, et al. 2002. "Identification of Biologically Active Chemokine Isoforms from Ascitic Fluid and Elevated Levels of CCL18/pulmonary and Activation-Regulated Chemokine in Ovarian Carcinoma." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (27): 24584–93. doi:10.1074/jbc.M112275200.
- Schwartz, I, D Seger, and S Shaltiel. 1999. "Vitronectin." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (5): 539–44.
- Schwarzbauer, Jean E. 1991. "Fibronectin: From Gene to Protein." *Current Opinion in Cell Biology* 3 (5): 786–91. doi:10.1016/0955-0674(91)90051-Y.
- Scott, Lewis E, Devin B Mair, Jiten D Narang, Kirubel Feleke, and Christopher A Lemmon. 2015. "Fibronectin Fibrillogenesis Facilitates Mechano-Dependent Cell Spreading, Force Generation, and Nuclear Size in Human Embryonic Fibroblasts." *Integrative Biology : Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 7 (11): 1454–65. doi:10.1039/c5ib00217f.
- Sehouli, Jalid, Filiz Senyuva, Christina Fotopoulou, Ulf Neumann, Carsten Denkert, Lichtenegger Werner, and Oskay-Ozcelik Gülten. 2009. "Intra-Abdominal Tumor Dissemination Pattern and Surgical Outcome in 214 Patients with Primary Ovarian Cancer." *Journal of Surgical Oncology* 99 (7): 424–27.

- doi:10.1002/jso.21288.
- Seidman, Jeffrey D, Iren Horkayne-Szakaly, Moutaz Haiba, Charles R Boice, Robert J Kurman, and Brigitte M Ronnett. 2004. "The Histologic Type and Stage Distribution of Ovarian Carcinomas of Surface Epithelial Origin." *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 23 (1): 41–44.
- Seiffert, D. 1997. "Constitutive and Regulated Expression of Vitronectin." *Histology and Histopathology* 12 (3): 787–97.
- Selvakumaran, Muthu, Debra A Pisarcik, Rudi Bao, Anthony T Yeung, and Thomas C Hamilton. 2003. "Enhanced Cisplatin Cytotoxicity by Disturbing the Nucleotide Excision Repair Pathway in Ovarian Cancer Cell Lines." *Cancer Research* 63 (6): 1311–16.
- Seong, Jihye, Ning Wang, and Yingxiao Wang. 2013. "Mechanotransduction at Focal Adhesions: From Physiology to Cancer Development." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17 (5): 597–604. doi:10.1111/jcmm.12045.
- Shahbazian, David, Philippe P Roux, Virginie Mieulet, Michael S Cohen, Brian Raught, Jack Taunton, John W B Hershey, John Blenis, Mario Pende, and Nahum Sonenberg. 2006. "The mTOR/PI3K and MAPK Pathways Converge on eIF4B to Control Its Phosphorylation and Activity." *The EMBO Journal* 25 (12): 2781–91. doi:10.1038/sj.emboj.7601166.
- Shaw, Tanya J, Mary K Senterman, Kerri Dawson, Colleen A Crane, and Barbara C Vanderhyden. 2004. "Characterization of Intraperitoneal, Orthotopic, and Metastatic Xenograft Models of Human Ovarian Cancer." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 10 (6): 1032–42. doi:10.1016/j.ymthe.2004.08.013.
- Sheehan, M, C A Morris, B A Pussell, and J A Charlesworth. 1995. "Complement Inhibition by Human Vitronectin Involves Non-Heparin Binding Domains." *Clinical and Experimental Immunology* 101 (1): 136–41.
- Shen-Gunther, Jane, and Robert S. Mannel. 2002. "Ascites as a Predictor of Ovarian Malignancy." *Gynecologic Oncology* 87 (1). Elsevier: 77–83.
- doi:10.1006/gyno.2002.6800.
- Sher, Ifat, Sirin A Adham, James Petrik, and Brenda L Coomber. 2009. "Autocrine VEGF-A/KDR Loop Protects Epithelial Ovarian Carcinoma Cells from Anoikis." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 124 (3): 553–61. doi:10.1002/ijc.23963.
- Shield, Kristy, M Leigh Ackland, Nuzhat Ahmed, and Gregory E Rice. 2009. "Multicellular Spheroids in Ovarian Cancer Metastases: Biology and Pathology." *Gynecologic Oncology* 113 (1): 143–48. doi:10.1016/j.ygyno.2008.11.032.
- Shih, Ie-Ming, and Robert J. Kurman. 2004. "Ovarian Tumorigenesis." *The American Journal of Pathology* 164 (5). American Society for Investigative Pathology: 1511–18. doi:10.1016/S0002-9440(10)63708-X.
- Siddik, Zahid H. 2003. "Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance." *Oncogene* 22 (47): 7265–79. doi:10.1038/sj.onc.1206933.
- Simonin, Karin, Emilie Brotin, Sandrine Dufort, Soizic Dutoit, Didier Goux, Monique N'diaye, Christophe Denoyelle, Pascal Gauduchon, and Laurent Poulain. 2009. "Mcl-1 Is an Important Determinant of the Apoptotic Response to the BH3-Mimetic Molecule HA14-1 in Cisplatin-Resistant Ovarian Carcinoma Cells." *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (11): 3162–70. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0493.
- Singer, Gad, Robert Oldt Iii, Yoram Cohen, Brant G Wang, David Sidransky, Robert J Kurman, and Ie-ming Shih. 2003. "Mutations in BRAF and KRAS Characterize the Development of Low-Grade Ovarian Serous Carcinoma." *Journal of the National Cancer Institute* 95 (6): 6–8.
- Singer, Gad, Robert Stöhr, Leslie Cope, Reiko Dehari, Arndt Hartmann, Deng-Fan Cao, Wang Tian-, Robert Kurman, and Ie-Ming Shih. 2005. "Patterns of p53 Mutations Separate Ovarian Serous Borderline Tumors and Low- and High-Grade Carcinomas and Provide Support for a New Model of Ovarian Carcinogenesis: A Mutational Analysis with Immunohistochemical Correlation." *American Journal of Surgical Pathology* 29 (2): 218–24. doi:10.1097/01.pas.0000146025.91953.8d.

- Sjoquist, K. M., M. L. Friedlander, R. L. O'Connell, M. Voysey, M. T. King, M. R. Stockler, A. M. Oza, K. Gillies, J. K. Martyn, and P. N. Butow. 2013. "Hope, Quality of Life, and Benefit From Treatment in Women Having Chemotherapy for Platinum-Resistant/Refractory Recurrent Ovarian Cancer: The Gynecologic Cancer Intergroup Symptom Benefit Study." *The Oncologist* 18 (11). AlphaMed Press: 1221–28. doi:10.1634/theoncologist.2013-0175.
- Socol, Marius, Christine Lefrou, Franz Bruckert, Didier Delabouglise, and Marianne Weidenhaupt. 2010. "Synchronization of Dictyostelium Discoideum Adhesion and Spreading Using Electrostatic Forces." *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* 79 (2): 198–210. doi:10.1016/j.bioelechem.2010.04.003.
- Sodek, Katharine L, K Joan Murphy, Theodore J Brown, and Maurice J Ringuette. 2012. "Cell-Cell and Cell-Matrix Dynamics in Intraperitoneal Cancer Metastasis." *Cancer Metastasis Reviews* 31 (1-2): 397–414. doi:10.1007/s10555-012-9351-2.
- Solass, Wiebke, Reinhold Kerb, Thomas Mürdter, Urs Giger-Pabst, Dirk Strumberg, Clemens Tempfer, Jürgen Zieren, Matthias Schwab, and Marc André Reymond. 2014. "Intraperitoneal Chemotherapy of Peritoneal Carcinomatosis Using Pressurized Aerosol as an Alternative to Liquid Solution: First Evidence for Efficacy." *Annals of Surgical Oncology* 21 (2): 553–59. doi:10.1245/s10434-013-3213-1.
- Soto, Ana M, and Carlos Sonnenschein. 2004. "The Somatic Mutation Theory of Cancer: Growing Problems with the Paradigm?" *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 26 (10): 1097–1107. doi:10.1002/bies.20087.
- Soto, Ana M., and Carlos Sonnenschein. 2011. "The Tissue Organization Field Theory of Cancer: A Testable Replacement for the Somatic Mutation Theory." *BioEssays* 33 (5): 332–40. doi:10.1002/bies.201100025.
- Sottile, Jane, and Denise C Hocking. 2002. "Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions." *Molecular Biology of the Cell* 13 (10): 3546–59. doi:10.1091/mbc.E02-01-0048.
- Sottile, Jane, and S Wiley. 1994. "Assembly of Amino-Terminal Fibronectin Dimers into the Extracellular Matrix." *J Biol Chem* 269 (25): 17192–98.
- Stockmann, A, S Hess, P Declerck, R Timpl, and K T Preissner. 1993. "Multimeric Vitronectin. Identification and Characterization of Conformation-Dependent Self-Association of the Adhesive Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (30): 22874–82.
- Strobel, T, and S A Cannistra. 1999. "Beta1-Integrins Partly Mediate Binding of Ovarian Cancer Cells to Peritoneal Mesothelium in Vitro." *Gynecologic Oncology* 73 (3): 362–67. doi:10.1006/gyno.1999.5388.
- Stuart, Gavin C E, Henry Kitchener, Monica Bacon, Andreas duBois, Michael Friedlander, Jonathan Ledermann, Christian Marth, Tate Thigpen, and Edward Trimble. 2011. "2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GFIG) Consensus Statement on Clinical Trials in Ovarian Cancer: Report from the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference." *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* 21 (4): 750–55.
- Stupack, Dwayne G, and David A Cheresch. 2002. "Get a Ligand, Get a Life: Integrins, Signaling and Cell Survival." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 19): 3729–38.
- T**addei, ML, E Giannoni, T Fiaschi, and P Chiarugi. 2012. "Anoikis: An Emerging Hallmark in Health and Diseases." *The Journal of Pathology* 226 (2): 380–93. doi:10.1002/path.3000.
- Tan, David S P, Roshan Agarwal, and Stanley B Kaye. 2006. "Mechanisms of Transcoelomic Metastasis in Ovarian Cancer." *The Lancet Oncology* 7 (11): 925–34. doi:10.1016/S1473-2045(06)70939-1.
- Tang, Maggie K S, Hong Y Zhou, Judy W P Yam, and Alice S T Wong. 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 (New York, N.Y.)* 12 (2): 128–38.

- Tapia, Gonzalo, and Ivan Diaz-Padilla. 2013. *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update*. Edited by Ivan Diaz-Padilla. InTech. doi:10.5772/56234.
- Thakar, Rahul G, Qian Cheng, Shyam Patel, Julia Chu, Mansoor Nasir, Dorian Liepmann, Kyriakos Komvopoulos, and Song Li. 2009. "Cell-Shape Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation." *Biophysical Journal* 96 (8): 3423–32. doi:10.1016/j.bpj.2008.11.074.
- Theocharis, Achilleas D., Spyros S. Skandalis, Chrysostomi Gialeli, and Nikos K. Karamanos. 2015. "Extracellular Matrix Structure." *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
- Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y J Huang, and M Angela Nieto. 2009. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease." *Cell* 139 (5): 871–90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
- To, Wing S, and Kim S Midwood. 2011. "Plasma and Cellular Fibronectin: Distinct and Independent Functions during Tissue Repair." *Fibrogenesis & Tissue Repair* 4 (1): 21. doi:10.1186/1755-1536-4-21.
- Todd, Ryan C, and Stephen J Lippard. 2009. "Inhibition of Transcription by Platinum Antitumor Compounds." *Metallomics: Integrated Biometal Science* 1 (4): 280–91. doi:10.1039/b907567d.
- Torre, Lindsey a, Freddie Bray, Rebecca L Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-tieulent, and Ahmedin Jemal. 2015. "Global Cancer Statistics, 2012" 65 (2): 87–108. doi:10.3322/caac.21262.
- Tressel, T, J B McCarthy, J Calaycay, T D Lee, K Legesse, J E Shively, and H Pande. 1991. "Human Plasma Fibronectin. Demonstration of Structural Differences between the A- and B-Chains in the III CS Region." *The Biochemical Journal* 274 (Pt 3 (March): 731–38.
- V**asey, Paul A, Gordon C Jayson, Alan Gordon, Hani Gabra, Rob Coleman, Ronnie Atkinson, David Parkin, James Paul, Andrea Hay, and Stan B Kaye. 2004. "Phase III Randomized Trial of Docetaxel-Carboplatin versus Paclitaxel-Carboplatin as First-Line Chemotherapy for Ovarian Carcinoma." *Journal of the National Cancer Institute* 96 (22): 1682–91. doi:10.1093/jnci/djh323.
- Villedieu, M, M-H Louis, S Dutoit, E Brotin, H Lincet, F Duigou, C Staedel, P Gauduchon, and L Poulain. 2007. "Absence of Bcl-xL down-Regulation in Response to Cisplatin Is Associated with Chemoresistance in Ovarian Carcinoma Cells." *Gynecologic Oncology* 105 (1). Elsevier: 31–44. doi:10.1016/j.ygyno.2006.12.011.
- Vivanco, Igor, and Charles L Sawyers. 2002. "The Phosphatidylinositol 3-Kinase AKT Pathway in Human Cancer." *Nature Reviews. Cancer* 2 (7): 489–501. doi:10.1038/nrc839.
- W**ang, Peng-Hui, Wen-Ling Lee, Chi-Mou Juang, Yu-Hui Yang, Wan-Hsia Lo, Chung-Ru Lai, Shie-Liang Hsieh, and Chiou-Chung Yuan. 2005. "Altered mRNA Expressions of Sialyltransferases in Ovarian Cancers." *Gynecologic Oncology* 99 (3): 631–39. doi:10.1016/j.ygyno.2005.07.016.
- Welsh, Carey, Roger Day, Claire McGurk, John R W Masters, Richard D Wood, and Beate Köberle. 2004. "Reduced Levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA Repair Proteins in Testis Tumor Cell Lines." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 110 (3): 352–61. doi:10.1002/ijc.20134.
- Whatcott, Clifford, Haiyong Han, Richard G Posner, and Daniel D Von Hoff. 2013. "Tumor-Stromal Interactions in Pancreatic Cancer." *Critical Reviews in Oncogenesis* 18 (1-2): 135–51.
- Wierzbicka-Patynowski, Iwona, and Jean E Schwarzbauer. 2003. "The Ins and Outs of Fibronectin Matrix Assembly." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 16): 3269–76. doi:10.1242/jcs.00670.
- Williams, Jennifer, Peter C Lucas, Kent A Griffith, Milheon Choi, Sarah Fogoros, Yuan Hu, and J Rebecca Liu. 2005. "Expression of Bcl-xL in Ovarian Carcinoma Is Associated with Chemoresistance and Recurrent Disease." *Gynecologic Oncology* 96 (2): 287–95. doi:10.1016/j.ygyno.2004.10.026.
- Witz, C A, I A Montoya-Rodriguez, S Cho, V E Centonze, L F Bonewald, and R S Schenken. 2001. "Composition of the Extracellular Matrix of the Peritoneum." *Journal of the*

Society for Gynecologic Investigation 8 (5): 299–304.

Xu, Baiyao, Guanbin Song, Yang Ju, Xian Li, Yuanhui Song, and Sachi Watanabe. 2012. "RhoA/ROCK, Cytoskeletal Dynamics, and Focal Adhesion Kinase Are Required for Mechanical Stretch-Induced Tenogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." *Journal of Cellular Physiology* 227 (6): 2722–29. doi:10.1002/jcp.23016.

Yamada, M, E O'Regan, R Brown, and P Karran. 1997. "Selective Recognition of a Cisplatin-DNA Adduct by Human Mismatch Repair Proteins." *Nucleic Acids Research* 25 (3): 491–96.

Yang, Shen-Hsi, Andrew D Sharrocks, and Alan J Whitmarsh. 2013. "MAP Kinase Signalling Cascades and Transcriptional Regulation." *Gene* 513 (1): 1–13. doi:10.1016/j.gene.2012.10.033.

Yatohgo, T, M Izumi, H Kashiwagi, and M Hayashi. 1988. "Novel Purification of Vitronectin from Human Plasma by Heparin Affinity Chromatography." *Cell Structure and Function* 13 (4): 281–92.

Yu, Y, C-H Xiao, L-D Tan, Q-S Wang, X-Q Li, and Y-M Feng. 2014. "Cancer-Associated Fibroblasts Induce Epithelial-Mesenchymal Transition of

Breast Cancer Cells through Paracrine TGF- β Signalling." *British Journal of Cancer* 110 (3): 724–32. doi:10.1038/bjc.2013.768.

Zacharakis, Dimitrios, Nikolaos Thomakos, Ioannis Biliatis, Alexandros Rodolakis, Maria Simou, Georgios Daskalakis, Aris Bamias, and Aris Antsaklis. 2013. "Ultrasonographic Markers and Preoperative CA-125 to Distinguish between Borderline Ovarian Tumors and Stage I Ovarian Cancer." *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 92 (3): 285–92. doi:10.1111/aogs.12046.

Zamble, D B, D Mu, J T Reardon, A Sancar, and S J Lippard. 1996. "Repair of Cisplatin--DNA Adducts by the Mammalian Excision Nuclease." *Biochemistry* 35 (31): 10004–13. doi:10.1021/bi960453+.

Zeimet, A G, D Reimer, S Sopper, M Boesch, A Martowicz, J Roessler, A M Wiedemair, et al. 2012. "Ovarian Cancer Stem Cells." *Neoplasma* 59 (6): 747–55. doi:10.4149/neo_2012_094.

Zhang, Wei, Hsin Chih Yang, Qi Wang, Zhi Jun Yang, Hong Chen, Su Mei Wang, Zhong Mian Pan, Bu Jian Tang, Qingdi Quentin Li, and Li Li. 2011. "Clinical Value of Combined Detection of Serum Matrix Metalloproteinase-9, Heparanase, and Cathepsin for Determining Ovarian Cancer Invasion and Metastasis." *Anticancer Research* 31 (10): 3423–28.

Annexes

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

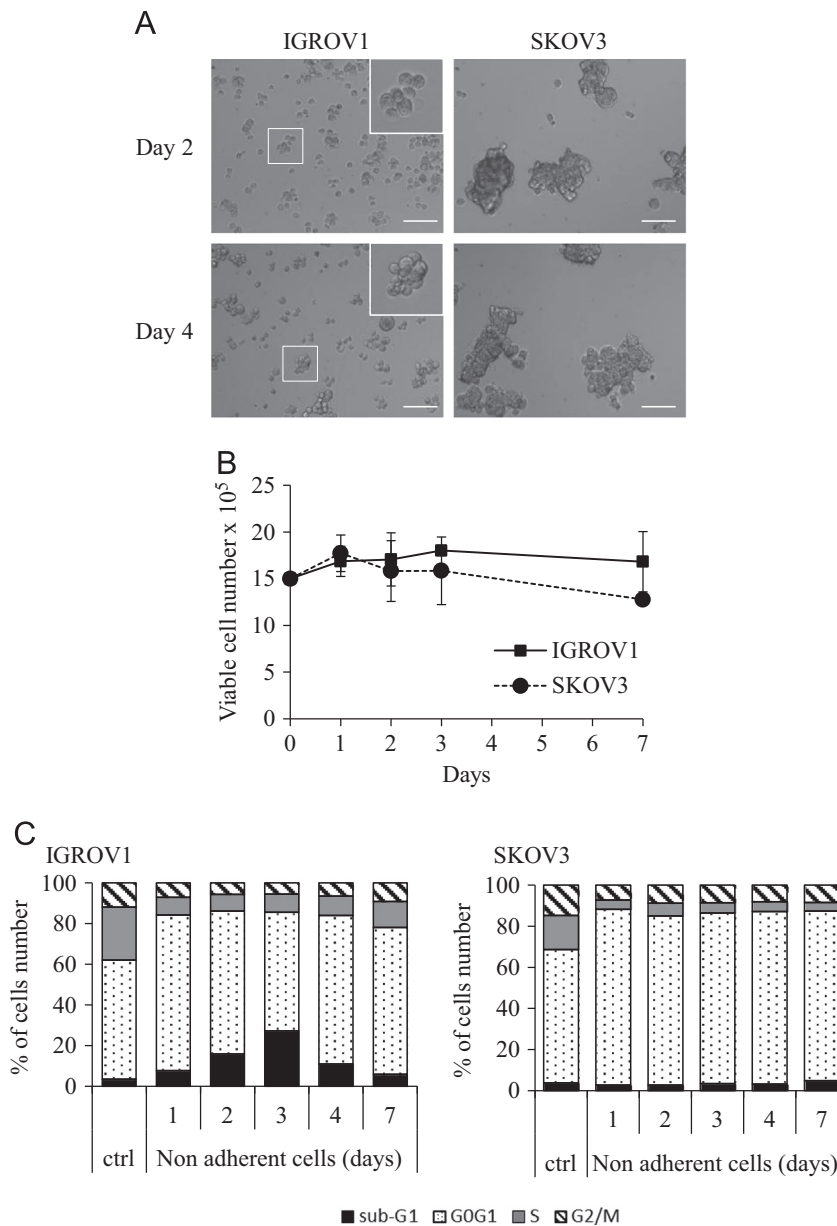


Fig. 1 – Formation and viability of ovarian carcinoma spheroids. (A) IGROV1 and SKOV3 ovarian cancer cells were grown under non-adherent conditions at 37 °C. Light micrographs were taken on days 2 and 4 (scale bar 100 μ m). Inset: high magnification of IGROV1 spheroids. (B, C) IGROV1 and SKOV3 spheroid 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

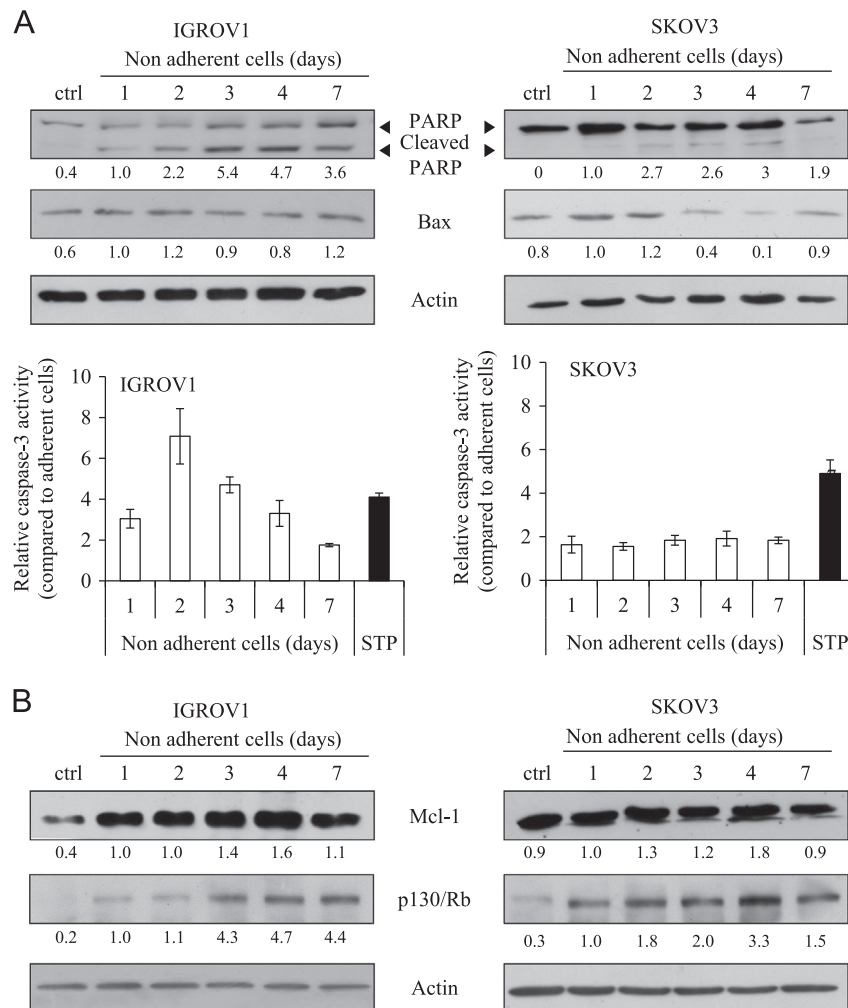


Fig. 2 – Non-adherent growth conditions induce modification of pro- and anti-apoptotic marker expression. (A) IGROV1 and SKOV3 spheroids were assayed for Bax, full length- and cleaved-PARP by western blotting, with actin as a loading control. Caspase-3 activity was measured using a colorimetric assay 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

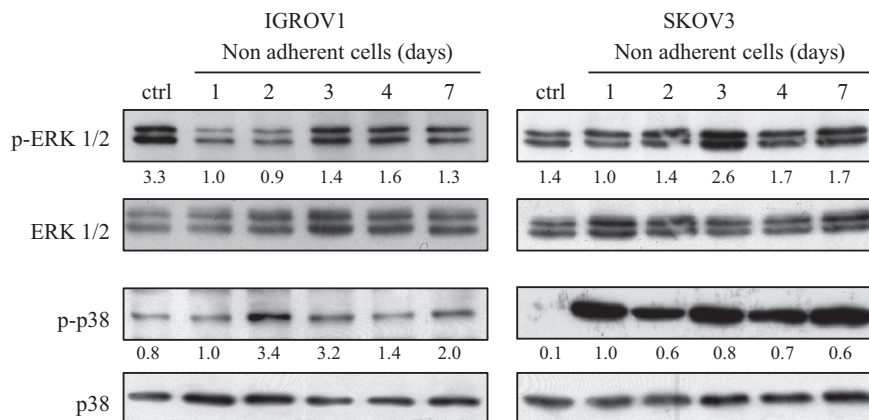


Fig. 3 – ERK1/2 and p38 signaling pathways activation under non-adherent growth conditions. IGROV1 and SKOV3 spheroids were assayed for ERK1/2, p38 and their phosphorylated form expression by western blotting. Relative band intensities of p-ERK1/2 and p-p38 normalized to non-phosphorylated ERK1/2 and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

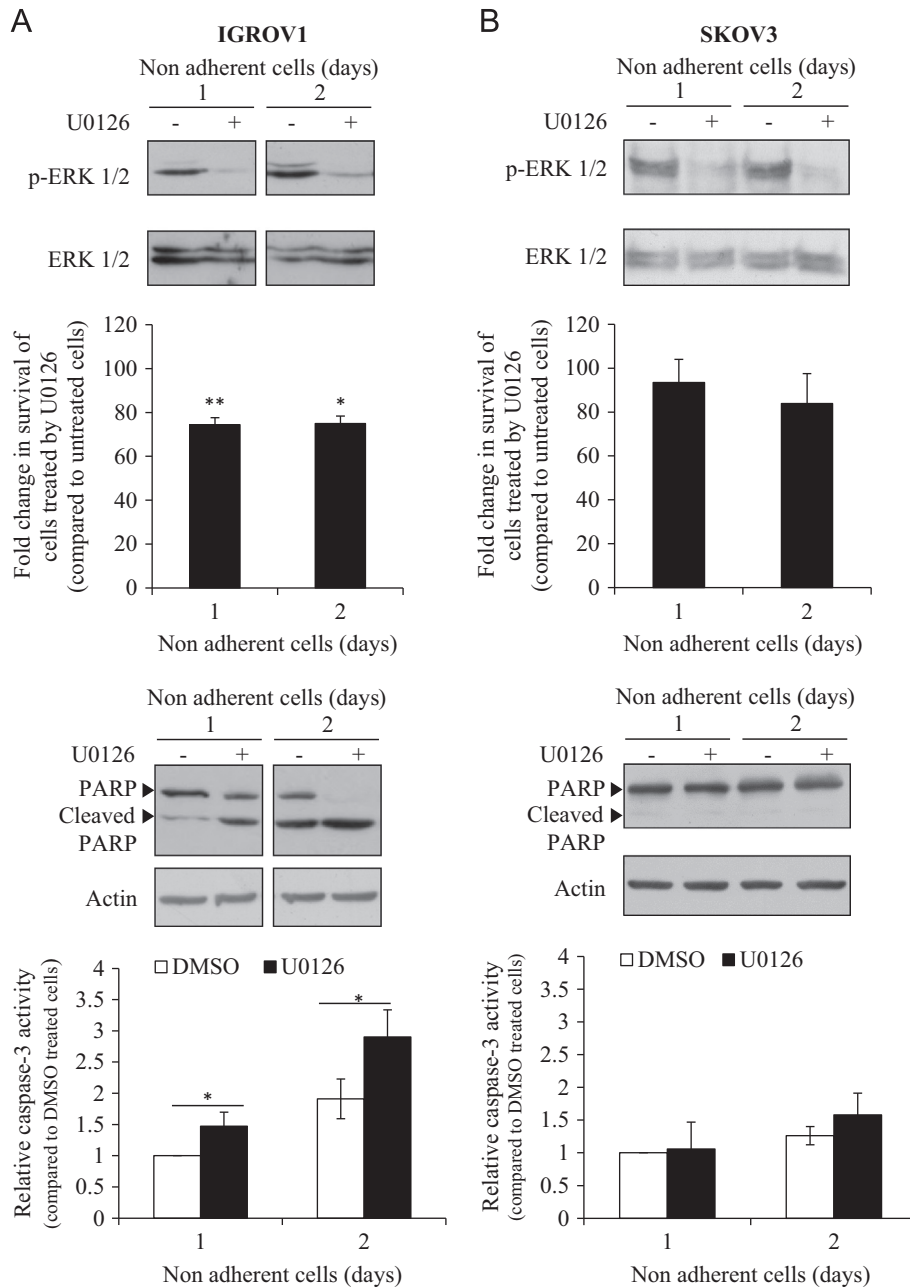


Fig. 4 – ERK1/2 phosphorylation requirement for survival of IGROV1 ovarian cancer spheroids. IGROV1 (A) or SKOV3 (B) cells were treated with 10 μ M U0126 (+), an inhibitor of ERK1/2 phosphorylation, or DMSO (–) as a control, for 1–2 days of non-adherent culture. Inhibition of ERK1/2 activation was verified 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

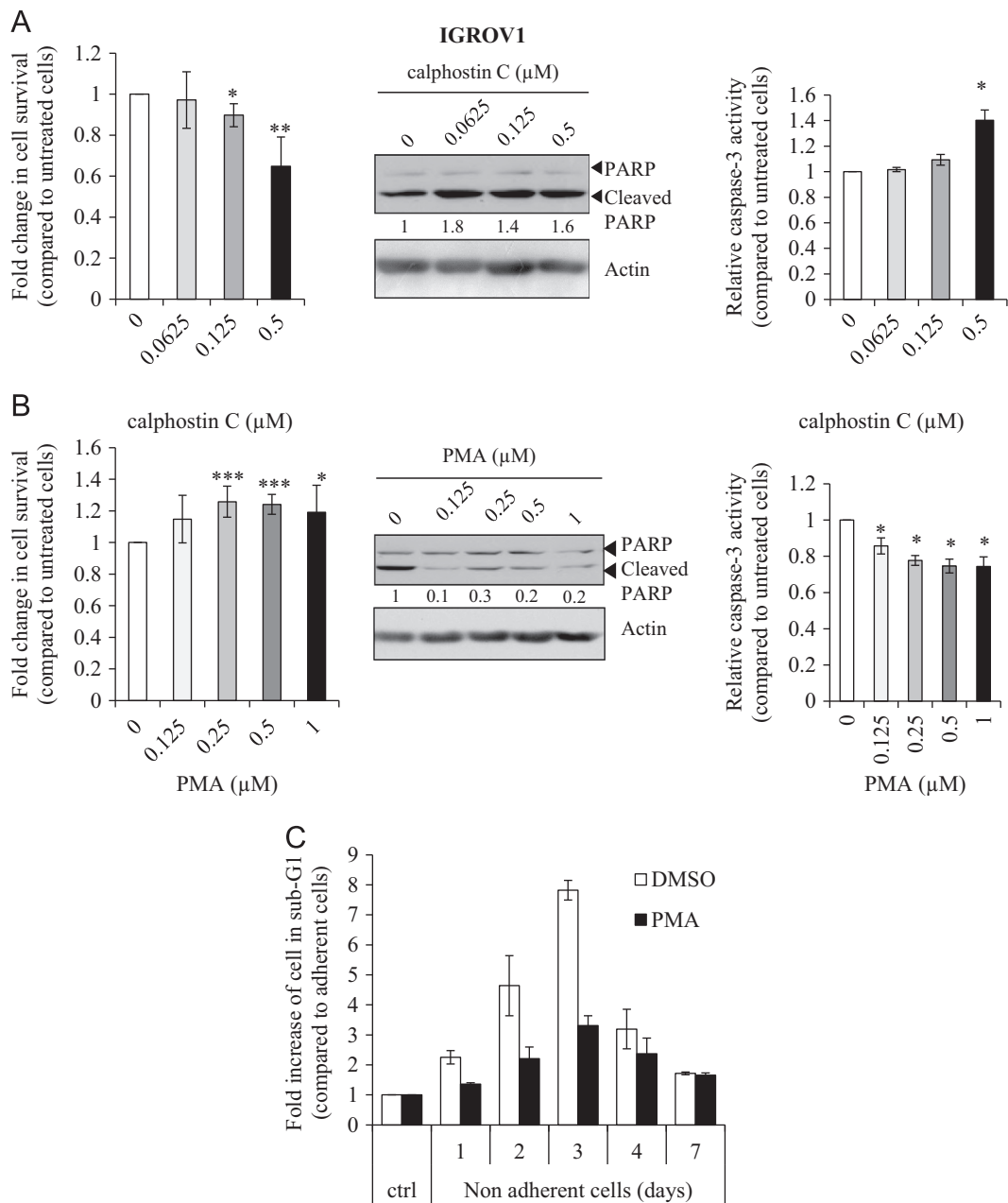


Fig. 5 – PKC involvement in IGROV1 anoikis resistance. (A, B) IGROV1 cell viability was assayed in the presence of calphostin C (A) or PMA (B) during the initial steps of spheroid formation (2 days of non-adherent culture). The resulting aggregates were gently collected to determine cell viability. Apoptosis 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

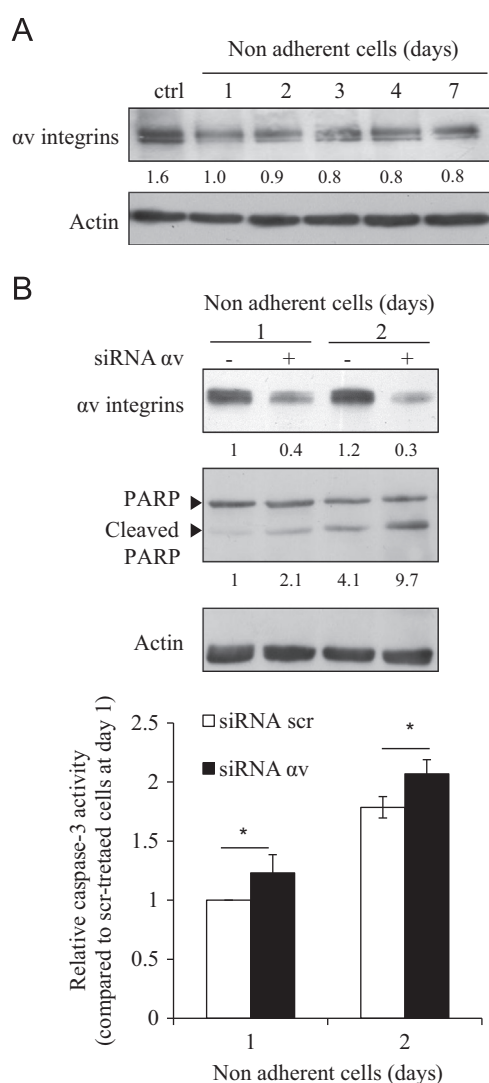


Fig. 6 – Importance of αv integrin expression in IGROV1 spheroid anoikis resistance. (A) Expression of αv integrins in different aged IGROV1 spheroids or adherent cells (ctrl) was analyzed by western blotting, with actin as a loading control. **(B)** Effect of αv integrins knock-down on 1 or 2 day IGROV1 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].

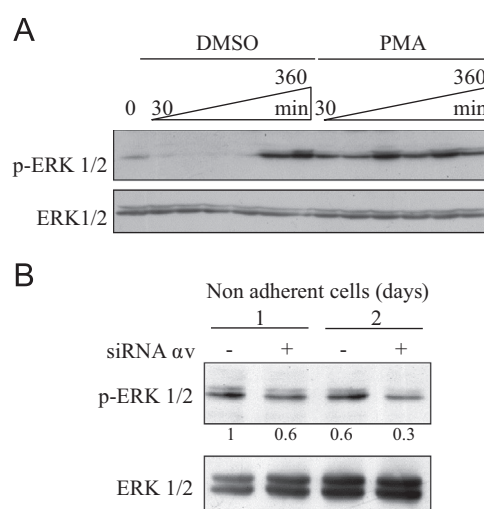


Fig. 7 – PKC and αv integrins converge towards ERK1/2 activation. (A) During the initial steps of spheroids formation (0–360 min), IGROV1 cells were treated with 1 μ M PMA or DMSO. ERK1/2 and its phosphorylated forms were analyzed by western blotting. **(B)** ERK1/2 phosphorylation analyzed by western 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

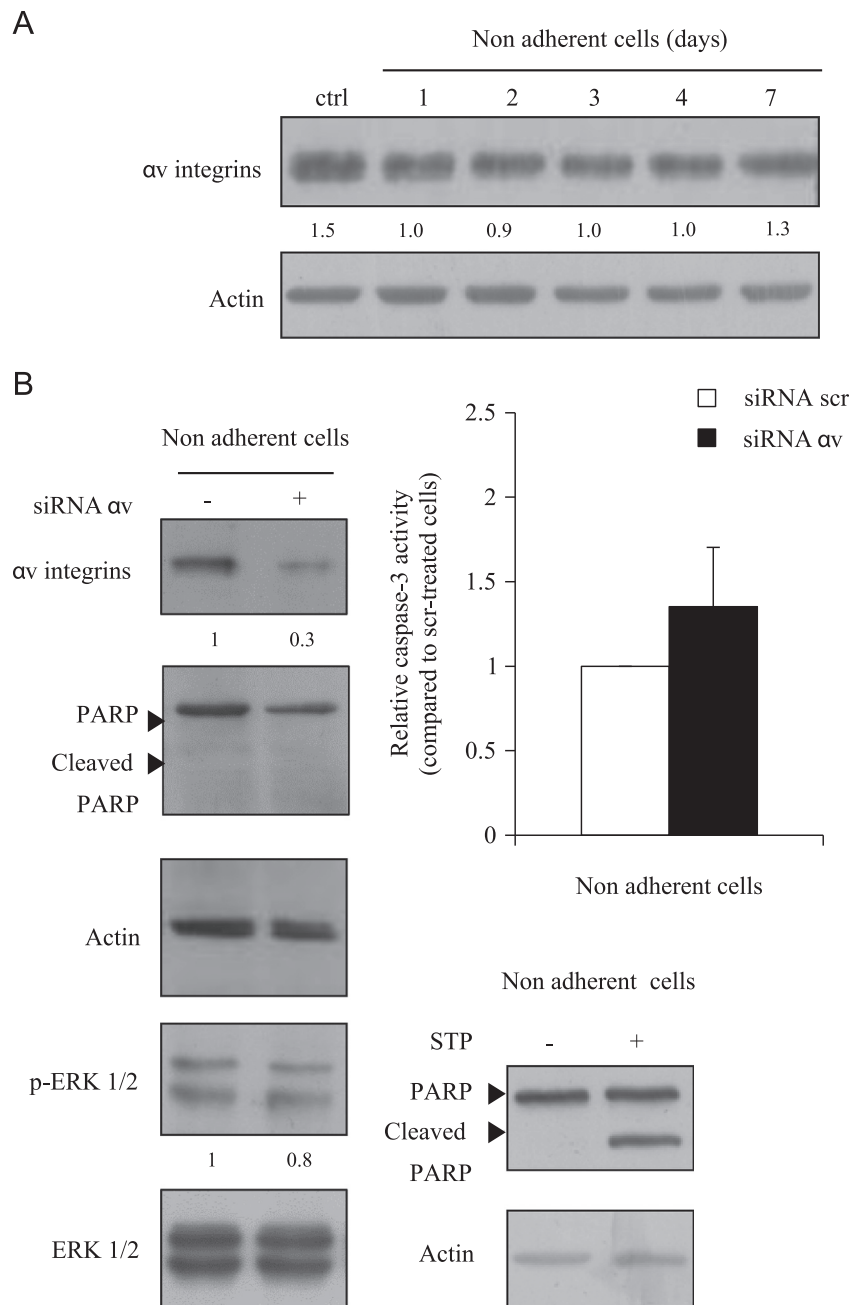


Fig. 8 – α v integrin expression in SKOV3 cells is not associated with ERK1/2 activation or sign of apoptosis. (A) Expression of α v integrins in differently aged SKOV3 spheroids or adherent cells (ctrl) was analyzed by western blotting, with actin as a loading control. (B) Effect of α v integrin knock-down on 2 day SKOV3 spheroid survival. Adherent cells were transfected with siRNA α v integrins (α v) or siRNA scramble (scr). The cells were grown under non-adherent culture conditions over 2 days. Silencing efficiency was controlled by anti- α v 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 α v 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 α v 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

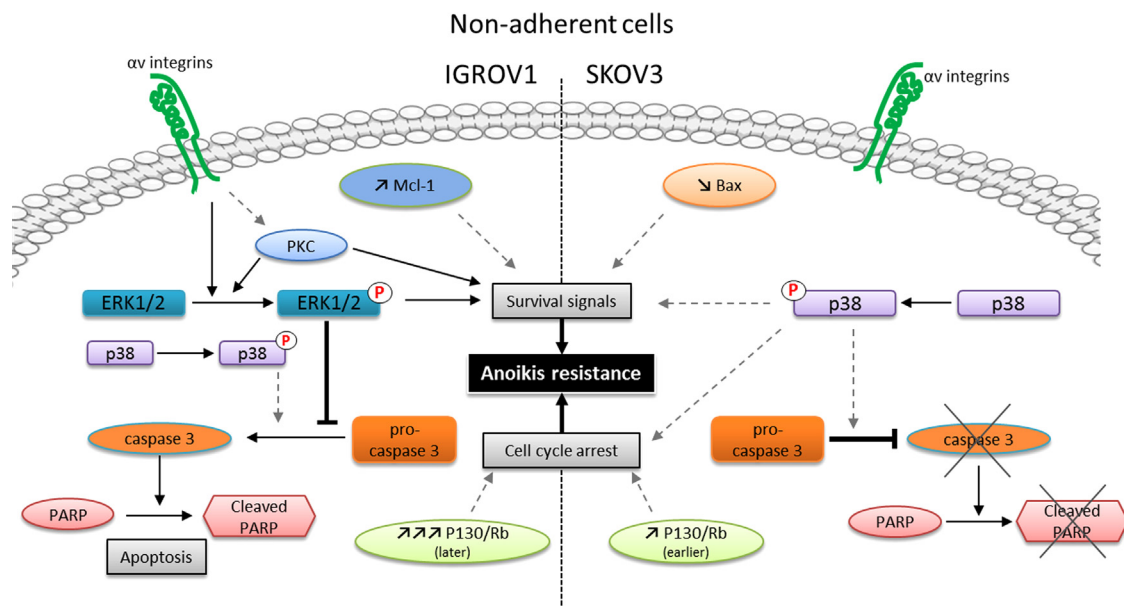


Fig. 9 – Schematic model illustrating anoikis resistance of ovarian cancer cells organized into spheroids. In IGROV1 cells, loss of anchorage induces a dual signaling between apoptosis and survival. Anoikis resistance needs ERK1/2 phosphorylation, which is dependent on PKC activation and α v integrin 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, Morozevich 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.

Etude de l'impact de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques sur la récurrence des carcinomes ovariens

Les cancers de l'ovaire représentent la première cause de mortalité due aux cancers gynécologiques dans les pays développés. La plupart de ces cancers sont diagnostiqués à des stades tardifs quand les cellules cancéreuses ovariennes ont disséminé et colonisé les parois de la cavité abdominale. En conséquence, ces cancers sont associés à un sombre pronostic.

Plus d'un tiers des patientes présentent une accumulation de liquide d'ascite au moment du diagnostic. L'ascite est un fluide exsudatif ayant une composante cellulaire et également une composante liquide acellulaire, constituant un réservoir dynamique de molécules bioactives. Malgré une réponse efficace aux traitements standards, les taux de récurrence de cette pathologie restent élevés. L'acquisition d'une chimiorésistance et le mode de propagation atypique des cellules cancéreuses sont deux éléments importants impliqués dans la récurrence des cancers ovariens.

Le rôle de l'ascite et plus particulièrement de la composante matricielle ascitique, dans le processus de dissémination et dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses ovariennes reste peu étudié et constitue le cœur de ce travail de thèse.

L'objectif des travaux a été d'étudier l'influence de l'ascite et de deux glycoprotéines matricielles purifiées à partir d'échantillons d'ascites sur les comportements cellulaires propices à la dissémination et à la récurrence des cancers ovariens. De plus, l'influence de l'ascite sur la réponse des cellules aux traitements à base de platine a également été recherchée et estimée.

L'étude démontre que l'ascite est un microenvironnement propice à la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes et que la fibronectine et la vitronectine ascitiques ainsi que leurs récepteurs d'adhérence spécifiques sont des éléments qui participent à la régulation de cette dissémination. L'ascite exerce également un effet protecteur contre l'effet cytotoxique des agents chimiothérapeutiques.

Ces résultats mettent en perspectives l'intérêt potentiel de la fibronectine et de la vitronectine ascitiques comme outils diagnostiques et/ou cibles thérapeutiques des cancers ovariens et nous engageant à approfondir l'étude de ces deux molécules et de leurs conséquences sur la progression de la maladie.

Mots-clés : Cancers ovariens, ascites, dissémination, chimiorésistance, récurrence, microenvironnement tumoral

Study of the impact of ascites derived fibronectin and vitronectin on the recurrence of ovarian carcinomas.

Ovarian cancers are the leading cause of death among gynaecological cancers in western countries. Most of these cancers are diagnosed at a late stage, when ovarian cancer cells have spread and colonized the walls of the abdominal cavity. Therefore, these cancers are associated to a poor prognosis.

More than one third of the patients show an accumulation of ascites at the time of the diagnosis. Ascites are exudative fluids composed of a cellular and also an acellular fraction. In fact, ascites constitute a dynamic reservoir of bioactive molecules. Even if the response of ovarian cancers to the current first-line therapy, that consists in debulking surgery followed by chemotherapy, is satisfactory, the rate of recurrence remains important. The gain of a chemoresistance and the atypical widespread of cancer cells are two important factors involved in the recurrence of the ovarian cancers.

The role of ascites and more particularly, of the ascitic matrix components on the dissemination process and on the chemoresistance of the ovarian cancer cells remain poorly studied and is the aim of this work.

The objective of this study was to investigate the influence of ascites and of two matrix glycoproteins purified from samples of ascites *i)* on the cells behavior convenient to the dissemination and the recurrence of the ovarian cancers and *ii)* on the response of cells to therapeutic treatments with platinum.

This study suggests that ascites are a permissive microenvironment to the dissemination of ovarian cancer cells and that ascitic fibronectin and vitronectin as well as their specific receptors are actors which participate to the regulation of this dissemination. Ascites also protect ovarian cancer cells against the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs.

These results illustrate the potential interest of ascites derived fibronectin and vitronectin as diagnosis tools and/or therapeutic targets for ovarian cancers and encourage us to deepen the study of these two molecules and their consequences in the progress of the disease.

Keywords: Ovarian cancer, ascites, widespread, chemoresistance, recurrence, tumor microenvironment