



**HAL**  
open science

# Effets des cellules stromales mésenchymateuses dans la chimiorésistance des cancers ovariens par sécrétion de chimiokines et polarisation des macrophages

Augustin Le Naour

► **To cite this version:**

Augustin Le Naour. Effets des cellules stromales mésenchymateuses dans la chimiorésistance des cancers ovariens par sécrétion de chimiokines et polarisation des macrophages. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30301 . tel-01929836

**HAL Id: tel-01929836**

**<https://theses.hal.science/tel-01929836>**

Submitted on 21 Nov 2018

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

**Augustin LE NAOUR**

le vendredi 27 octobre 2017

**Titre :**

Effets des cellules stromales mésenchymateuses dans la chimiorésistance des cancers ovariens par sécrétion de chimiokines et polarisation des macrophages

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Cancérologie

**Unité de recherche :**

INSERM U1037 : Equipe 13 du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse. Pr. H. Avet-Loiseau

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Directrice de Thèse : Professeur Bettina COUDERC

Co-directeur de Thèse : Professeur Jean-Pierre DELORD

**Jury :**

Dr. Florence APARAILLY (DR INSERM) - Rapporteur

Dr. Christophe DENOYELLE (MCU) - Rapporteur

Pr. Cyril TOUBOUL (PU-PH) - Rapporteur

Pr. Daniel CUSSAC (PU) - Examineur

Pr. Bettina COUDERC (PU) - Directrice de Thèse

Pr. Jean-Pierre DELORD (PU-PH) - Co-directeur de Thèse

Dr. Agnès COSTE (MCU) - Membre invité

Dr. Gwénaél FERRON (chirurgien oncologue) - Membre invité

## Remerciements

Je remercie vivement le Professeur **Daniel Cussac** d'avoir accepté, au pied levé, de présider ma soutenance de thèse.

Je tiens à remercier le Docteur **Florence Apparailly**, le Docteur **Christophe Denoyelle** et le Professeur **Cyril Touboul** d'avoir accepté de juger mon travail de Thèse.

Je tiens à remercier également le Docteur **Christophe Denoyelle** pour son accueil lors de mon séjour chez vous. Les échanges téléphoniques et notre rencontre à Caen ont toujours été très agréables grâce à ta gentillesse et ta bonne humeur. Je remercie aussi tous les membres de ton équipe pour leur gentillesse et leur accueil, et plus particulièrement **Emilie** et votre directeur d'équipe **Laurent Poulain**.

Je remercie également le docteur **Gwénaél Ferron**. Ton goût pour la recherche, ta gentillesse, ton humour et ton accessibilité font qu'il est toujours agréable d'échanger avec toi, que ce soit pour le côté professionnel et médical, où tu es un puits de connaissances, ou pour tout autre type de sujets.

Je remercie l'équipe d'**Agnès Coste** de me recevoir toujours avec gentillesse et bonne humeur lorsque je viens faire des manips. Merci beaucoup **Agnès** pour tes conseils, ta gentillesse et j'espère pouvoir continuer à travailler avec toi et ton équipe. Je remercie bien sûr **Mélissa** d'être toujours aussi sympathique, souriante, serviable. On a pu se soutenir lorsque nos manips ne fonctionnaient pas mais aussi s'enthousiasmer sur celles qui marchent !! Merci **Momo**, pour ta joie de vivre communicative et ta gentillesse. Merci à tous les autres membres de l'équipe, **Bernard, Julia, Khaddouj, Lise, Mouna, etc.**

Je remercie le **Pr. Jean-Pierre Delord**, d'avoir accepté de m'accueillir dans l'équipe lors de mon M2, puis d'avoir co-dirigé ma thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement la directrice de cette thèse, le **Pr. Bettina Couderc**. Bettina, sans flatterie, personne ne peut rêver mieux comme directrice de thèse que toi. Toujours agréable, souriante, drôle, on ne s'ennuie jamais avec toi. Tu m'as fait confiance et tu m'as laissé une grande liberté, tout en m'apportant toutes tes connaissances, tes réflexions, ta science et ton aide. Je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi. J'espère qu'on pourra continuer à travailler ensemble de près ou de loin. Mon rêve serait d'être dirigé tout au long de ma carrière professionnelle par des personnes comme toi, mais malheureusement, tu es inimitable !

Merci également aux docteurs **Isabelle Ader-Perarnau** et **Victorine Douin** pour leur bienveillance, leurs conseils et leur gentillesse que j'ai pu apprécier lors des comités de thèse.

Je remercie les directeurs d'équipes qui m'ont accueilli durant ma thèse. Merci aux Professeurs **Hervé Avet-Loiseau** et **Etienne Chatelut** de m'avoir laissé toute liberté pour avancer sur notre thématique, pour leurs conseils et leur aide.

Je remercie toute l'équipe de pharmaco dirigée par Etienne Chatelut (**Ben, Fabienne, Isa H, Isa L, Sabrina, Sotheara, Thierry, Mélanie, Cécile**). Une mention particulière bien sûr pour **Quentin, Diane et Benoît**. Ces pauses-café me manqueront avec les mots-croisés et l'humour toujours limite. Benoît, tu es un peu mon mentor, tu m'as accompagné et aidé lors de mon M2, toujours dans la bonne humeur et avec beaucoup de pédagogie. J'espère trouver des personnes comme vous dans mes futures expériences professionnelles.

Je remercie également l'équipe 13 du CRCT dirigée par Hervé Avet-Loiseau. Merci de nous avoir bien intégrés lorsque nous vous avons rejoints il y a un an. Merci à **Andréa** (pour tes expressions pas toujours bien maîtrisées), **Céline, Hélène, Jill, Julien C, Julien** (Minikeum, je ne te remercie pas pour ton image de « face de bouc » ;)), **Laura « Dos Santos », Laure, Léa, Ludovic, Manon, Marianne, Marie** (MVMJJ, nos chambrages quotidiens vont me manquer), **Nadège** (pour la solidarité Lot-et-Garonnaise), **Sab** (la syndicaliste qui veut faire diminuer la consommation de gel), **Sahar, Seb** (Gégé !), **T'choupi, Virginie**.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet, le professeur **François Couderc** pour sa gentillesse et ses conseils, **Alejandra, Claire, Eliane, Hubert, Muriel, Verena, etc.**

Mes remerciements vont aussi à tous ceux que j'ai rencontrés pendant mon internat, **Alice, Avédis, Camille, Cédric, Chloé, Clothilde, Estelle, Flavie, Gabriel, Laure, Loïc, Magdalena, Marie-Anne, Renaud, Valérie, etc.**

Je remercie bien sûr mes amis « miramontais » **Ben, Ludo, Tebi, Marbout, et Yannou**, pour tous ces bons moments passés qui permettent de bien décompresser. Je suis heureux que l'on soit resté si proches depuis tant d'années.

Merci aux amis du lycée, **Ahmed, Anaïs, Axel, Greg, Julie et Pierro**. Cela me fait énormément plaisir que l'on soit tous resté en contact malgré notre dispersion géographique.

Je remercie également **Cha, Dimi, Fifou, Kékette, Mali, Pizzi, Yannou, etc.**

Merci à tous mes amis handballeurs et plus particulièrement à ceux de la chinoiserie, **Arnaud, Clacla, Colin, Fab, Flo, G, Hubert, JB, Matt, Momo, Plouf, Poupouy, Sergio**.

Et que dire de mes amis de la fac de pharma de Bordeaux **Alex, Bobo, Borgy, Caro, Ciçou, Elsa, Manu, Sam, Shopie, Thomas**? Merci pour toutes ces années de fac exceptionnelles !!!

Mes remerciements vont également à ma famille. **Papa et maman**, merci pour votre soutien durant toutes ces années, mais ça y est j'arrive à la fin des études (enfin presque, il y aura encore une autre thèse ...). Vous êtes des modèles pour moi. Et même si chez les Le Naour il ne faut pas montrer ses sentiments, je vous aime. Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. **Julien** et **Lisa**, merci pour tous ces moments partagés. Vous êtes des personnes au top, je suis fier de mon frère et de ma sœur ! **Mamie Lili**, grâce à toi, et **papi** qui me manque, je ne risquais pas de mourir de faim pendant mes années d'études, en repartant toujours avec des provisions et des bons plats (pâtés, compotes, œufs, quiches, ...). Sans oublier **Papi Robert, Mamie Yvette** et toute notre immense famille (**Aurore, Baguepi,**

**oncles, tantes, cousins, cousines, etc.**), je vous remercie pour ces bons moments lors des repas de famille.

Merci également à ma belle-famille de m'avoir accueilli si gentiment dans votre famille. Merci à **Aymeric, Claudine, Coco, Dan, Dodo, J-P, Jim, Kévin, Kro, Logan, Maud, Océane, Pascal, Pauline, Sandrine, mamie Suzon, Tatie, mon p'tit Titi, Seb, Sissi, Véro, Yaya, et à bébé Axel.**

Je terminerai, en remerciant les personnes de mon microenvironnement. Merci **Marion** de m'accompagner et de me soutenir tous les jours. Et surtout, tu as porté la plus belle chose qui me soit jamais arrivé, notre petit **Evan**, qui a révolutionné notre vie en la remplissant de bonheur. Je vous remercie tous les deux de remplir ma vie de joie et d'amour chaque jour.

# Effets des cellules stromales mésenchymateuses dans la chimiorésistance des cancers ovariens par sécrétion de chimiokines et polarisation des macrophages

|  |    |
|--|----|
| Table des Figures :  | 10 |
| Table des Tableaux.....  | 12 |
| Résumé de la thèse .....   | 13 |
| Résumé vulgarisé en Français .....   | 14 |
| Titre et résumé de la thèse en anglais :.....  | 15 |
| Protumoral effect of mesenchymal stromal cells in ovarian cancer by cytokine secretions and activation of the innate immune response ..... | 15 |
| Résumé vulgarisé en Anglais .....  | 16 |
| Nomenclature des gènes.....  | 17 |
| Disciplines :.....   | 17 |
| Mots clés : .....  | 17 |
| Intitulé et adresse du laboratoire .....   | 17 |
| Tableau des acronymes et abréviations .....  | 18 |
| I) INTRODUCTION .....  | 22 |
| A) Le cancer ovarien .....   | 22 |
| 1) Anatomie et physiologie ovarienne.....  | 22 |
| a) Anatomie ovarienne .....  | 22 |
| b) Physiologie ovarienne .....   | 22 |
| 2) Epidémiologie des cancers ovariens .....  | 23 |
| a) Incidence et mortalité .....  | 23 |
| b) Facteurs de risques et de protection .....  | 24 |
| (i) Les facteurs génétiques.....   | 24 |
| (ii) Les facteurs hormonaux.....   | 24 |
| (iii) Les facteurs comportementaux, environnementaux et professionnels.....  | 25 |
| 3) Types histologiques.....  | 25 |
| a) Les tumeurs épithéliales .....  | 26 |
| (i) Les carcinomes séreux.....   | 26 |
| ❖ Les carcinomes séreux de bas grade .....   | 26 |
| ❖ Les carcinomes séreux de haut grade .....  | 26 |
| (ii) Les carcinomes mucineux .....   | 27 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| (iii) | Les carcinomes endométrioïdes .....                            | 27 |
| (iv)  | Les carcinomes à cellules claires .....                        | 28 |
| (v)   | Les tumeurs de Brenner .....                                   | 28 |
| (vi)  | Les tumeurs séro-mucineuses .....                              | 28 |
| (vii) | Les carcinomes indifférenciés .....                            | 29 |
| b)    | Les tumeurs germinales .....                                   | 29 |
| (i)   | Les dysgerminomes ovariens .....                               | 29 |
| (ii)  | Les tumeurs non dysgerminomateuses .....                       | 29 |
| ❖     | Les tumeurs vitellines .....                                   | 30 |
| ❖     | Les tératomes .....  | 30 |
| ❖     | Les carcinomes embryonnaires .....                             | 30 |
| ❖     | Les choriocarcinomes .....                                     | 30 |
| ❖     | Les tumeurs germinales mixtes .....                            | 31 |
| c)    | Les tumeurs des cordons sexuels et du stroma gonadique .....   | 31 |
| (i)   | Les tumeurs stromales pures .....                              | 31 |
| ❖     | Les fibrosarcomes ovariens .....                               | 31 |
| ❖     | Les tumeurs à cellules stéroïdes .....                         | 31 |
| (ii)  | Les tumeurs des cordons sexuels pures .....                    | 32 |
| ❖     | Les tumeurs de la granulosa .....                              | 32 |
| ❖     | Les tumeurs à cellules de Sertoli .....                        | 32 |
| ❖     | Les tumeurs des cordons sexuels avec des tubules annelés ..... | 32 |
| (iii) | Les tumeurs mixtes stromales/cordons sexuels .....             | 33 |
| ❖     | Les tumeurs à cellules de Sertoli-Leydig .....                 | 33 |
| ❖     | Les tumeurs des cordons sexuels sans autre spécificité .....   | 33 |
| 4)    | Oncogénèse des carcinomes ovariens .....                       | 34 |
| a)    | Les différentes théories de l'oncogénèse ovarienne .....       | 34 |
| b)    | Les tumeurs de type I .....                                    | 35 |
| c)    | Les tumeurs de type II .....                                   | 36 |
| 5)    | Stadification .....  | 37 |
| a)    | Stade I .....  | 38 |
| a)    | Stade II .....   | 38 |
| b)    | Stade III .....  | 39 |
| c)    | Stade IV .....   | 40 |
| 6)    | Traitements .....  | 40 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| a)    | Principes des traitements .....  | 41 |
| (i)   | La chirurgie.....  | 41 |
| (ii)  | La chimiothérapie : molécules utilisées et mécanismes d'action .....                           | 41 |
| ❖     | Le carboplatine : famille des sels de platine ou organoplatines .....                          | 42 |
| ❖     | Le paclitaxel : famille des poisons du fuseau .....  | 42 |
| ❖     | Le bévacizumab : famille des anti-angiogéniques.....   | 43 |
| ❖     | La gemcitabine : famille des antimétabolites.....  | 43 |
| ❖     | La doxorubicine et le topotécan : famille des inhibiteurs de topoisomérase.....                | 43 |
| ❖     | La trabectédine.....   | 44 |
| ❖     | L'olaparib : famille des inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase .....                   | 45 |
| b)    | Les résistances à la chimiothérapie .....  | 45 |
| (i)   | Les mécanismes généraux de la résistance aux chimiothérapies .....                             | 46 |
| ❖     | La résistance pharmacocinétique.....   | 46 |
| ❖     | La résistance pharmacodynamique.....   | 46 |
| ❖     | La résistance en amont de la cible .....   | 46 |
| ❖     | La résistance au niveau de la cible .....  | 47 |
| ❖     | La résistance en aval de la cible .....  | 47 |
| (ii)  | La classification des rechutes : sensibles / résistantes / réfractaires.....                   | 48 |
| c)    | Le primo-traitement.....   | 50 |
| d)    | Le traitement de la récurrence précoce.....  | 51 |
| e)    | Le traitement de la récurrence tardive .....   | 51 |
| (i)   | Les traitements de la première récurrence tardive en présence de mutation de <i>BRCA</i> ..... | 52 |
| (ii)  | Les traitements de la première récurrence tardive en absence de mutation de <i>BRCA</i> .....  | 54 |
| (iii) | Les traitements de la deuxième récurrence tardive.....   | 55 |
| B)    | Le microenvironnement .....  | 56 |
| 1)    | Les cellules immunitaires et leur ciblage .....  | 57 |
| a)    | Les lymphocytes T cytotoxiques.....  | 57 |
| (i)   | Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires.....  | 58 |
| ❖     | Les inhibiteurs de CTLA4.....  | 58 |
| ❖     | Les inhibiteurs ciblant l'axe PD-L1/PD-1.....  | 58 |
| (ii)  | Les anticorps avec de multiples cibles spécifiques .....                                       | 59 |
| b)    | Les macrophages .....  | 59 |



|       |   |    |
|-------|---|----|
| (i)   | Rôle des macrophages .....  | 60 |
| (ii)  | Polarisation des macrophages M1/M2 et cancer .....  | 61 |
| ❖     | Les macrophages M1.....   | 61 |
| ❖     | Les macrophages M2.....   | 62 |
| (iii) | Les macrophages des os : les ostéoclastes .....   | 63 |
| (iv)  | Le ciblage des macrophages et des ostéoclastes.....   | 64 |
| c)    | Le système immunitaire en général.....  | 64 |
| (i)   | Les cytokines .....   | 65 |
| (ii)  | Les vaccins anti-tumoraux.....  | 65 |
| (iii) | Les médicaments immuno-modulateurs .....  | 66 |
| 2)    | Les cellules non-immunitaires et leur ciblage.....  | 68 |
| a)    | Les cellules endothéliales.....   | 68 |
| (i)   | Les cellules endothéliales vasculaires .....  | 68 |
| (ii)  | Les cellules endothéliales lymphatiques.....  | 69 |
| b)    | Les fibroblastes .....  | 69 |
| c)    | Les autres cellules non immunitaires .....  | 72 |
| C)    | Les cellules stromales mésenchymateuses.....  | 73 |
| 1)    | Caractéristiques .....  | 73 |
| 2)    | Cellules stromales mésenchymateuses et cancer .....   | 73 |
| a)    | Attraction des cellules tumorales vers la moelle osseuse ou constitution de niche métastatique.....                           | 74 |
| b)    | Recrutement des MSC au niveau du site tumoral .....   | 74 |
| c)    | Phénotype des MSC associées au cancer (CA-MSc).....   | 74 |
| d)    | Le rôle pro-tumoral des MSC.....  | 75 |
| 3)    | Rôle des cellules stromales mésenchymateuses dans la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies.....               | 76 |
| a)    | Mécanismes de résistance nécessitant un contact direct avec les cellules tumorales  | 77 |
| (i)   | Modification de l'expression de canaux à la surface cellulaire des cellules tumorales .....                                   | 78 |
| (ii)  | Résistance aux médicaments induite par l'adhérence cellulaire .....   | 81 |
| (iii) | Acquisition de la résistance <i>via</i> l'activation de la voie NF- $\kappa$ B .....  | 81 |
| (iv)  | Acquisition de la résistance <i>via</i> l'activation de la voie (Wnt)/ $\beta$ -caténine .....                                | 82 |
| (v)   | Effet des MSC sur la transcription, au sein des cellules tumorales, de gènes impliqués dans la résistance au traitement ..... | 82 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| (vi)   | Arrêt du cycle cellulaire, état de quiescence .....   | 83  |
| b)     | Mécanismes de résistance liés à la sécrétion de facteurs solubles .....   | 86  |
| (i)    | Acquisition de résistance impliquant l'axe SDF-1 / CXCR4.....   | 87  |
| (ii)   | Acquisition de la résistance impliquant la sécrétion d'IL-6 par les MSC .....   | 90  |
| ❖      | MSC et IL-6.....  | 92  |
| ❖      | Activation des voies STAT3 via l'IL-6 sécrétée par les MSC.....   | 93  |
| (iii)  | Acquisition d'une résistance par activation de la voie PI3K / Akt dans les cellules tumorales .....   | 94  |
| (iv)   | Acquisition de résistance <i>via</i> la sécrétion d'acides gras par les MSC.....  | 95  |
| (v)    | Acquisition de résistance <i>via</i> la sécrétion de GDF-15 par les MSC.....  | 96  |
| (vi)   | Acquisition de la résistance <i>via</i> la supplémentation en acides aminés par les MSC   | 96  |
| (vii)  | Acquisition de résistance <i>via</i> des exosomes dérivés de MSC.....   | 97  |
| (viii) | Augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques dans les cellules tumorales .....  | 98  |
| II)    | RESULTATS .....   | 101 |
| A)     | Rôle des ascites dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes.....  | 101 |
| B)     | Isolement et identification de cellules du microenvironnement tumoral ovarien : Mise en évidence de la présence de CA-MSC .....                               | 104 |
| 1)     | Isolement de cellules du microenvironnement tumoral ovarien .....   | 104 |
| 2)     | Etude de marqueurs exprimés par les cellules isolées.....   | 105 |
| 3)     | Capacité des CA-MSC à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes.....   | 106 |
| a)     | Analyse transcriptionnelle de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSC.....   | 107 |
| b)     | Analyse colorimétrique de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSC.....   | 109 |
| C)     | Effet <i>in vitro</i> des CA-MSC sur la sensibilité de cellules tumorales ovariennes au carboplatine .....  | 111 |
| D)     | Mise en place d'un modèle de CA-MSC « induites ».....   | 114 |
| 1)     | Méthode permettant l'obtention de CA-MSC « induites » .....   | 115 |
| 2)     | Analyse de l'expression membranaire des marqueurs de MSC sur les cellules issues de notre modèle de CA-MSC « induites » .....                                 | 115 |
| 3)     | Etude <i>in vitro</i> de l'effet des facteurs sécrétés par des CA-MSC « induites » sur la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au carboplatine ..... | 116 |
| 4)     | Capacité des CA-MSC « induites » à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes   | 118 |

|    |   |     |
|----|---|-----|
| a) | Analyse transcriptionnelle de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSC « induites ».....  | 118 |
| b) | Analyse colorimétrique de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSC « induites ».....  | 119 |
| 5) | Etude de l'expression par les CA-MSC « induites » de protéines surexprimées dans les fibroblastes associés au cancer .....                                      | 121 |
| E) | Rôle <i>in vivo</i> des MSC dans la résistance des cellules tumorales ovariennes au traitement par carboplatine .....   | 122 |
| 1) | Modèle expérimental d'adénocarcinome ovarien totalement murin.....  | 122 |
| 2) | Modèle expérimental d'adénocarcinome ovarien réalisé chez la souris avec des CTO et des MSC humaines.....   | 124 |
| F) | Identification des facteurs sécrétés par les CA-MSC impliqués dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes.....                                   | 127 |
| 1) | Identifications de facteurs potentiels par analyse transcriptomique.....  | 127 |
| 2) | Analyse de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B .....   | 128 |
| 3) | Validation de la surexpression des chimiokines identifiées au niveau transcriptionnel et protéique dans les CA-MSC.....   | 129 |
| a) | Validation de l'augmentation de la transcription des chimiokines dans les CA-MSC « induites ».....  | 129 |
| b) | Analyse de la sécrétion de chimiokines par les CA-MSC et CA-MSC « induites »  | 130 |
| G) | Implication des chimiokines identifiées dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes induite par les CA-MSC .....                                 | 132 |
| 1) | Etude rétrospective de la concentration sérique en chimiokines au moment du diagnostic chez les patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien .....              | 132 |
| 2) | Etude de la concentration en chimiokines dans l'ascite avant traitement dans un modèle expérimental murin .....   | 135 |
| 3) | Etude de l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 par les cellules tumorales ovariennes .....   | 137 |
| 4) | Effet <i>in vitro</i> de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sur la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au carboplatine.....                   | 138 |
| 5) | Effet de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 dans un modèle expérimental murin sur la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au carboplatine..... | 139 |
| a) | Etude <i>in vivo</i> du développement tumoral avant sacrifice des souris .....  | 139 |
| b) | Etude <i>in vivo</i> de la dissémination tumorale dans la cavité abdominale.....  | 141 |
| H) | Interaction entre les CA-MSC et les macrophages .....   | 144 |
| 1) | Effet des CA-MSC sur la polarisation des macrophages .....  | 144 |

|      |   |     |
|------|---|-----|
| a)   | Identification de facteurs surexprimés par les CA-MSC « induites » pouvant interagir avec les macrophages .....   | 144 |
| b)   | Effet des sécrétions des CA-MSC sur le phénotype des macrophages .....  | 145 |
| c)   | Effet des sécrétions des CA-MSC sur l'activité cytotoxique des macrophages vis-à-vis des cellules tumorales ovariennes.....   | 146 |
| 2)   | Etude du rôle des MSC sur la polarisation des macrophages dans des modèles expérimentaux murins.....  | 148 |
| a)   | Rôle des MSC dans la polarisation des macrophages : étude dans un modèle expérimental totalement murin.....   | 148 |
| (i)  | Analyse transcriptionnelle du phénotype des macrophages péritonéaux .....   | 148 |
| (ii) | Analyse fonctionnelle des macrophages péritonéaux.....  | 150 |
| b)   | Rôle des MSC dans la polarisation des macrophages : étude dans un modèle expérimental murin/humain .....  | 151 |
| (i)  | Analyse transcriptionnelle du phénotype des macrophages péritonéaux .....   | 151 |
| (ii) | Analyse fonctionnelle des macrophages péritonéaux.....  | 153 |
| 3)   | Rôle des chimiokines se liant à CXCR1 et CXCR2 dans la polarisation des macrophages .....   | 154 |
| a)   | Effet <i>in vitro</i> de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sur l'activité cytotoxique des macrophages humains vis-à-vis des cellules tumorales ovariennes. | 154 |
| b)   | Rôle des chimiokines se liant à CXCR1 et CXCR2 et de leur inhibition dans la polarisation des macrophages issus de modèles expérimentaux murins.....                | 156 |
| (i)  | Concentration en chimiokines dans le liquide de lavage péritonéal.....  | 156 |
| (ii) | Effet <i>in vivo</i> de l'inhibition de CXCR1 et CXCR2 sur la polarisation des macrophages.....   | 158 |
| ❖    | Effet de la reparixin sur le phénotype des macrophages péritonéaux .....  | 159 |
| ❖    | Effet de la reparixin sur la production de ROS par les TAM .....  | 159 |
| ❖    | Effet de la reparixin sur la concentration intrapéritonéale en chimiokines.....   | 160 |
| III) | DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....  | 161 |
| A)   | L'impact de l'ascite dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes .....   | 161 |
| B)   | Isolement des cellules stromales dans le cancer ovarien.....  | 162 |
| C)   | Le phénotype des CA-MSC du cancer ovarien .....   | 162 |
| D)   | Le rôle des MSC dans les cancers .....  | 164 |
| E)   | Le rôle des CA-MSC dans la chimiorésistance des cancers ovariens.....   | 165 |
| F)   | L'identification du rôle des chimiokines dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes.....  | 166 |
| G)   | Les CA-MSC peuvent polariser les macrophages en phénotype pro-tumoral .....   | 169 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| H)  | Les chimiokines influencent la polarisation des macrophages en phénotype pro-tumoral   | 170 |
| I)  | L'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 induit un effet direct sur les CTO en les chimiosensibilisant et indirect en repolarisant les macrophages vers un phénotype anti-tumoral..... | 171 |
| J)  | Conclusion générale .....  | 172 |
| IV) | Matériel et méthodes .....   | 174 |
| A)  | Culture cellulaire .....   | 174 |
| B)  | Récupération des CA-MSC issues de patientes .....  | 174 |
| C)  | Obtention des milieux conditionnés et des ascites .....  | 174 |
| D)  | Test de viabilité cellulaire .....   | 175 |
| 1)  | Test de chimiosensibilité des IGROV-1 au carboplatine .....  | 175 |
| 2)  | Test de co-culture entre les macrophages et les CTO .....  | 175 |
| E)  | Analyse de l'expression de marqueurs membranaires par cytométrie en flux.....  | 175 |
| F)  | Analyse protéique par Western Blot .....   | 176 |
| 1)  | Cinétique de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les MSC .....   | 176 |
| 2)  | Expression de CXCR1 et CXCR2 par les cellules tumorales .....  | 176 |
| 3)  | Extraction protéique et analyse par Western Blot.....  | 176 |
| G)  | Analyse transcriptionnelle.....  | 177 |
| 1)  | Extraction de l'ARN.....   | 177 |
| 2)  | Analyse transcriptionnelle par technologie Nanostring .....  | 177 |
| 4)  | Analyse de la transcription par RT-qPCR.....   | 177 |
| H)  | Différenciation des MSC en adipocyte et en ostéoclastes.....   | 179 |
| 1)  | Coloration « Nile Red » après induction adipocytaire .....   | 179 |
| 2)  | Coloration de la minéralisation par « alizarine rouge » après induction ostéoblastique   | 180 |
| 3)  | Coloration de la minéralisation par « Fast violet » après induction ostéoblastique   | 180 |
| I)  | Etude des concentrations en CXCL1, CXCL2 et IL-8 par ELISA .....   | 180 |
| J)  | Etude de la polarisation des macrophages en présence de milieu conditionné de CA-<br>MSC « induites » par analyse transcriptionnelle .....   | 180 |
| K)  | Expériences <i>in vivo</i> .....   | 181 |
| 1)  | Organisation des expériences <i>in vivo</i> .....  | 181 |
| a)  | Modèle expérimental murin utilisant les cellules SKOV-3 et des MSC.....  | 181 |
| b)  | Modèle expérimental murin utilisant les cellules ID8luc et des MSC murines   | 181 |
| c)  | Modèle expérimental murin utilisant les cellules SKOV-3luc et des MSC.....   | 181 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 2)  | Suivi de l'activité luciférase par IVIS .....  | 181 |
| 3)  | Sacrifice des souris.....  | 182 |
| 4)  | Lavage péritonéal .....  | 182 |
| 5)  | Luminescence des organes .....   | 182 |
| 6)  | Isolement des macrophages issus du lavage péritonéal pour analyse transcriptionnelle et de leur production de ROS.....                                     | 182 |
| 7)  | Mesure de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).....  | 182 |
| L)  | Analyses statistiques .....  | 183 |
| V)  | ANNEXES .....  | 184 |
|     | Publication 1 : Article en cours de soumission en premier nom .....  | 184 |
|     | Le Naour A., Mevel R., Thibault B., Courtais E., Chantalat E., Delord J-P., Couderc B., Guillermet-Guibert J. & Martinez A.....                            | 184 |
|     | Effect of combined inhibition of p110 alpha PI3K isoform and STAT3 pathway in ovarian cancer platinum-based resistance.....                                | 184 |
|     | Publication 2 : Revue bibliographique publiée dans un chapitre de livre .....  | 206 |
|     | Le Naour A. & Couderc B. ....  | 206 |
|     | Role of MSCs in Antitumor Drug Resistance.....   | 206 |
|     | in <i>Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators</i> 295–333 (Elsevier, 2017).<br>.....   | 206 |
|     | Publication 3 en cours de soumission en co-auteur :.....   | 245 |
|     | Thibault B., Genre L., Le Naour A., Broca C., Barbier M., Vuagniaux G., Delord JP., Wiedermann N. & Couderc B.....   | 245 |
|     | DEBIO 1143, an IAP inhibitor, reverses ovarian cancer cells carboplatin resistance and triggers apoptotic or necroptotic cell death.....                   | 245 |
|     | Publication 4 en cours de révision en co-auteur dans Oncotarget.....   | 271 |
|     | Mery E., Golzio M., Guillermet S., Lanore D., Le Naour A., Thibault B., Tilkin-Mariamé AF., Bellard E., Delord JP., Querleu D., Ferron G. & Couderc B..... | 271 |
|     | Fluorescence-guided surgery for cancer patients: a proof of concept study on human xenografts and spontaneous tumors in pets. ....                         | 271 |
|     | Publication 5 soumise en co-auteur dans <i>Annals of Plastic Surgery</i> :.....  | 308 |
|     | Ferron G., Le Naour A., Mezghani B., Martinez A., Martinez Gomez C., Boulet B., Couderc B. & Gangloff D.....   | 308 |
|     | Contribution of Acellular Dermal Matrices in abdominal wall reconstruction in Surgical Oncology. A change of paradigm. ....                                | 308 |
| VI) | BIBLIOGRAPHIE .....  | 331 |

## Table des Figures :

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1 : Fréquences des tumeurs malignes selon leur type histologique et leurs anomalies génétiques associées.....   | 34  |
| Figure 2 : taux de réponse à la chimiothérapie de la récurrence et survie globale en fonction de la durée de l'intervalle libre sans platine .....   | 49  |
| Figure 3 : Stratégie thérapeutique de la première rechute tardive avec mutation de <i>BRCA</i> selon les recommandations proposées par un groupe d'experts français <sup>52</sup> .....      | 53  |
| Figure 4 : Stratégie thérapeutique de la première rechute tardive sans mutation de <i>BRCA</i> selon les recommandations proposées par un groupe d'experts français <sup>52</sup> .....      | 54  |
| Figure 5 : Stratégie thérapeutique de la deuxième rechute tardive selon les recommandations d'un groupe d'experts français <sup>52</sup> .....   | 55  |
| Figure 6 : Les interactions entre les cellules tumorales et les MSC modifient le phénotype de ces deux types cellulaires conduisant à une augmentation de la chimiorésistance tumorale... .. | 87  |
| Figure 7 : Les sécrétions des MSC et les mécanismes de chimiorésistance induits dans les cellules tumorales.....   | 92  |
| Figure 8 : Sensibilité au carboplatine des cellules tumorales ovariennes IGROV-1 en présence d'ascites.....  | 103 |
| Figure 9 : Cellules isolées de biopsies tumorales de patientes atteintes de carcinome ovarien .....  | 105 |
| Figure 10 : Expression membranaire de marqueurs caractéristiques de MSC d'une culture de cellules isolées de tumeurs ovariennes.....   | 105 |
| Figure 11 : Schéma de la différenciation des MSC en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes .....   | 107 |
| Figure 12 : Evaluation de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des BM-MSc et des CA-MSc.....   | 108 |
| Figure 13 : Analyse colorimétrique de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des BM-MSc et des CA-MSc .....   | 109 |
| Figure 14 : Protocole de l'expérience évaluant la chimiorésistance des CTO.....  | 111 |
| Figure 15 : Sensibilité au carboplatine des CTO IGROV-1 et SKOV-3 en présence de milieu conditionné de CA-MSc .....  | 112 |
| Figure 16 : Schéma de la méthode permettant l'obtention de CA-MSc « induites ».....  | 114 |
| Figure 17 : Expression membranaire des marqueurs caractéristiques des MSC.....   | 116 |
| Figure 18 : Effet des CA-MSc « induites » sur la résistance des cellules IGROV-1 et SKOV-3 au carboplatine .....   | 117 |
| Figure 19 : Evaluation de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des BM-MSc et des CA-MSc "induites" .....                               | 119 |
| Figure 20 : Analyse colorimétrique de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des BM-MSc et des CA-MSc "induites" .....  | 120 |
| Figure 21 : Expression d' $\alpha$ -SMA dans les CA-MSc "induites" .....   | 121 |
| Figure 22 : Effet des MSC sur la résistance des CTO ID8luc au carboplatine dans un modèle expérimental totalement murin.....   | 123 |
| Figure 23 : Effet des MSC sur la résistance des CTO SKOV-3 au carboplatine dans un modèle expérimental murin/humain .....  | 125 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 24 : Analyse transcriptomique comparant des BM-MSc et des CA-MSc "induites" par des cellules IGROV-1 .....  | 127 |
| Figure 25 : Etude de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans des MSc mises en présence de sécrétions de cellules tumorales ovariennes .....                          | 129 |
| Figure 26 : Analyse de la transcription des chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8 dans les BM-MSc et les CA-MSc "induites" .....  | 130 |
| Figure 27 : Analyse de la sécrétion des chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8 par les BM-MSc, les CA-MSc et les CA-MSc "induites" .....                                       | 131 |
| Figure 28 : Concentrations sériques en chimiokines au moment du diagnostic en fonction du statut sensible ou résistant des patientes .....                               | 134 |
| Figure 29 : Corrélation entre la concentration en ligands des récepteurs CXCR1 et CXCR2 en fonction des mois avant récurrence .....                                      | 135 |
| Figure 30 : Concentration en CXCL1 dans le liquide de lavage péritonéal des souris avant traitement.....   | 136 |
| Figure 31 : Analyse protéomique de l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 par les lignées cellulaires tumorales ovariennes .....                                     | 137 |
| Figure 32 : Sensibilité au carboplatine des CTO IGROV-1 en présence de milieu conditionné de CA-MSc et co-traitées par un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 ..... | 138 |
| Figure 33 : Evaluation de la progression tumorale par bioluminescence dans un modèle expérimental murin/humain .....   | 140 |
| Figure 34 : Etude de la dissémination péritonéale par mesure de la bioluminescence dans des organes de la cavité abdominale.....   | 141 |
| Figure 35 : analyse de la transcription de l'IL-6 et de LIF dans les CA-MSc "induites" .....   | 145 |
| Figure 36 : Effet des sécrétions des CA-MSc "induites" sur la transcription des gènes marqueurs d'une polarisation M2 dans des monocytes humains primaires .....         | 146 |
| Figure 37 : Effets des monocytes sur la viabilité des cellules tumorales ovariennes.....   | 147 |
| Figure 38 : Phénotypes des macrophages péritonéaux dans un modèle expérimental murin de cancer ovarien .....   | 149 |
| Figure 39 : Production des dérivés réactifs de l'oxygène par les macrophages péritonéaux issus d'un modèle expérimental totalement murin de cancer ovarien .....         | 150 |
| Figure 40 : Phénotypes des macrophages péritonéaux dans un modèle expérimental murin/humain de cancer ovarien .....  | 151 |
| Figure 41 : Production des dérivés réactifs de l'oxygène par les macrophages péritonéaux issus d'un modèle expérimental murin/humain de cancer ovarien.....              | 153 |
| Figure 42 : Effet de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sur l'activité cytotoxique des monocytes en présence des sécrétions des CA-MSc.....                      | 155 |
| Figure 43 : Concentration en chimiokines dans le liquide de lavage péritonéal dans un modèle expérimental murin/humain .....   | 156 |



## Table des Tableaux

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 1: Incidences et mortalités projetés et part dans l'incidence et la mortalité des cancers ovariens par tranches d'âge en France métropolitaine en 2015 <sup>7</sup> .....          | 23  |
| Tableau 2 : Classification FIGO 2014 des cancers ovariens comparée à la classification TNM .....   | 39  |
| Tableau 3 : Répartition des patientes au moment du diagnostic, taux de survie et de récurrence en fonction du stade .....  | 40  |
| Tableau 4 : Classification des rechutes selon la durée de l'intervalle libre sans platine avant récurrence .....   | 48  |
| Tableau 5 : Caractéristiques des macrophages selon leur polarisation .....   | 63  |
| Tableau 6 : Molécules ciblant les cellules immunitaires développées en oncologie .....   | 67  |
| Tableau 7 : Molécules ciblant les cellules stromales non-immunitaires développées en oncologie .....   | 71  |
| Tableau 8 : Différents mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales nécessitant un contact direct avec les MSC .....  | 80  |
| Tableau 9 : Résistance des cellules tumorales induite par les MSC par arrêt du cycle cellulaire .....  | 86  |
| Tableau 10 : Résistance des cellules tumorales induite par les MSC <i>via</i> la voie de signalisation SDF-1/CXCR4 .....   | 90  |
| Tableau 11 : Rôle de la voie de signalisation IL-6 / STAT3 dans la chimiorésistance des cellules tumorales induite par les MSC .....   | 94  |
| Tableau 12 : Différents mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales impliquant des facteurs sécrétés par les MSC .....   | 98  |
| Tableau 13 : Rôle des protéines anti-apoptotiques dans la chimiorésistance des cellules tumorales induite par les MSC .....  | 100 |
| Tableau 14 : Caractéristiques des tumeurs et des ascites utilisées pour évaluer la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au traitement par carboplatine en présence d'ascite ..... | 102 |
| Tableau 15 : Caractéristiques de la cohorte de patientes, et de leur tumeur, utilisée dans l'étude rétrospective de la concentration sérique en chimiokines .....                          | 133 |
| Tableau 16 : Liste des amorces humaines et murines utilisées pour les qPCR réalisées avec du SYBR green .....  | 178 |
| Tableau 17 : Liste des références des sondes TaqMan humaines utilisées pour les qPCR évaluant la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des MSC .....                              | 179 |

## Résumé de la thèse

Le cancer ovarien est la 1<sup>ère</sup> cause de décès par cancer gynécologique. A ce jour, le traitement le plus efficace consiste en une exérèse la plus complète possible de la tumeur associée à une chimiothérapie à base de sel de platine et de taxanes. Cependant, la survie globale des patientes à 5 ans reste faible (environ 40%), due à un fort taux de récurrence et au développement d'une résistance aux traitements. Les interactions entre les cellules tumorales ovariennes (CTO) et le microenvironnement semblent être impliquées dans la progression de la maladie et l'acquisition de cette chimiorésistance.

Parmi les cellules du microenvironnement tumoral, nous avons pu isoler des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) à partir de biopsies de carcinome ovarien. Ces MSC associées au cancer (CA-MSC) ont la capacité d'induire une résistance des CTO au traitement par carboplatine. Afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant des MSC à sécréter des facteurs pro-tumoraux, dans un contexte de cancer ovarien, nous avons mis en place un modèle à partir de MSC issues de donneurs ne présentant pas de cancer. Nous avons observé que la présence d'un environnement tumoral ovarien modifie le phénotype de MSC de moelle osseuse (BM-MSC) physiologiques, en entraînant notamment la sécrétion par ces CA-MSC « induites » de facteurs chimioprotecteurs pour les CTO.

Parmi les facteurs sécrétés, nous avons identifié des chimiokines telles que CXCL1, CXCL2 et IL-8 comme des cibles thérapeutiques intéressantes pour lutter contre la résistance à la chimiothérapie. En effet, les CA-MSC et les CA-MSC « induites » sécrètent plus de CXCL1, CXCL2 et d'IL-8 que les BM-MSC. En outre, l'inhibition des récepteurs de ces chimiokines (CXCR1 et CXCR2) sensibilise les CTO au carboplatine, même en présence des sécrétions des CA-MSC et des CA-MSC « induites ».

Ces expériences *in vitro* ont été confirmées *in vivo* dans un modèle expérimental murin. En effet, la co-injection à des souris immunodéprimées de MSC avec des CTO humaines entraîne une protection des CTO vis-à-vis du carboplatine comparée à l'injection de CTO seules. Le co-traitement avec un inhibiteur de CXCR1 et de CXCR2 a permis de sensibiliser les CTO au carboplatine et d'empêcher la chimiorésistance induite par les MSC. En effectuant une étude rétrospective évaluant la concentration de ces chimiokines au moment du diagnostic, nous avons confirmé que les patientes qui seront a posteriori « résistantes » au carboplatine ont une concentration sérique de ces chimiokines qui est plus élevée que les patientes du groupe « sensibles » au carboplatine.

Outre leur rôle direct dans l'acquisition de la chimiorésistance, les chimiokines comme CXCL1, CXCL2 et IL-8 peuvent être impliquées dans la régulation du système immunitaire. Nous avons montré que les CA-MSC étaient capables de modifier le phénotype des macrophages vers un phénotype M2 décrit comme pro-tumoral. En effet, ces macrophages ainsi polarisés ont un pouvoir cytotoxique dirigé contre les CTO inférieur aux macrophages non stimulés. L'ajout d'un inhibiteur de CXCR1 et de CXCR2 restaure le pouvoir cytotoxique initial des macrophages, même en présence des sécrétions des CA-MSC.

Ainsi nos travaux suggèrent que les CA-MSc pourraient provenir de MSC physiologiques qui, au contact d'un environnement tumoral ovarien, vont acquérir un phénotype capable d'induire la sécrétion de facteurs chimioprotecteurs pour les CTO et de polariser les macrophages vers un phénotype moins cytotoxique pour les CTO. Ces deux phénomènes pro-tumoraux peuvent être inhibés par l'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs de CXCR1 et de CXCR2. Ainsi ces récepteurs des chimiokines, semblent être des cibles thérapeutiques intéressantes afin de sensibiliser les CTO au carboplatine et traiter plus efficacement la tumeur. Ceci pourrait permettre d'éviter les récurrences des cancers ovariens qui sont, à l'heure actuelle, observées chez plus de 70% des patientes.

## Résumé vulgarisé en Français

Le cancer de l'ovaire est la 4ème cause de décès par cancer féminin. Le traitement le plus efficace associe une chirurgie à une chimiothérapie à base de carboplatine. Cependant, la survie des patientes reste faible, due à un fort taux de récurrence et au développement d'une résistance à la chimiothérapie. Les interactions entre les cellules tumorales ovariennes (CTO) et les cellules environnantes semblent être impliquées dans l'acquisition de cette chimiorésistance.

Parmi les cellules de l'environnement tumoral, nous avons pu isoler des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) à partir de biopsies tumorales issues de patientes atteintes de cancer ovarien. Des expériences *in vivo* chez la souris et *in vitro* ont montré que les MSC de cancer ovarien produisaient des molécules qui protègent les CTO de la chimiothérapie. Ces MSC pouvaient également modifier des cellules du système immunitaire, les macrophages, favorisant alors le développement tumoral. Le blocage des récepteurs des facteurs produits par les MSC a permis d'améliorer l'efficacité du carboplatine sur les CTO. Ceci pourrait améliorer le traitement des cancers ovariens.

## Titre et résumé de la thèse en anglais :

### Protumoral effect of mesenchymal stromal cells in ovarian cancer by cytokine secretions and activation of the innate immune response

Ovarian cancer is the leading cause of gynecological cancer death. To date, the most effective treatment consists of the complete excision of the tumor associated with chemotherapy based on platinum salts and taxanes. However, the 5-year overall survival remains low (close to 40%) due to a high rate of recurrence and development of resistance to treatments. Disease progression and the acquisition of this chemoresistance seem to be due to interactions between ovarian tumor cells (OTC) and the microenvironment.

Amidst the cells of the tumor microenvironment, we were able to isolate mesenchymal stromal cells (MSC) from tumor biopsies of patients with ovarian adenocarcinoma. These cancer-associated MSC (CA-MSC) have the ability to induce resistance to carboplatin in OTC. In order to understand the mechanisms leading to the secretion of pro-tumoral factors by the CA-MSC in the context of ovarian cancer, we have developed a model based on the *in vitro* MSC culture of from healthy donors in tumor conditioning media. We have observed that an ovarian tumor environment modifies the physiological phenotype of bone marrow MSC (BM-MSC), leading in particular to the secretion by these "induced" CA-MSC of chemoprotective factors for OTC. Among these secreted factors, we have identified chemokines such as CXCL1, CXCL2 and IL-8 as therapeutic targets in order to control drug resistance. In fact, CA-MSC and "induced" CA-MSC secrete more CXCL1, CXCL2 and IL-8 than BM-MSC and the use of an inhibitor of their receptors (CXCR1 and CXCR2) sensitized OTC to carboplatin even in the presence of CA-MSC and « induced » CA-MSC secretions. These *in vitro* experiments have been confirmed in an experimental mouse model *in vivo*. Indeed, the co-injection of MSC with OTC yielded a greater protection of OTC to carboplatin compared with the OTC injection alone. Co-treatment with a CXCR1 and CXCR2 inhibitor resulted in sensitization of OTC to carboplatin and prevention of MSC-induced chemoresistance.

We conducted a retrospective study evaluating the concentration of these chemokines at the time of diagnosis. We thus showed that patients who are *a posteriori* "resistant" to carboplatin have a higher concentration of chemokines than patients belong to the "sensitive" group to carboplatin.

In addition to their direct role concerning the acquisition of chemoresistance, chemokines such as CXCL1, CXCL2 and IL-8 may be involved in the immune system regulation. In this context, we showed that CA-MSC were able to modify the phenotype of macrophages into a M2 phenotype described in literature to have a pro-tumoral activity. Indeed, these polarized macrophages present a lower cytotoxic capacity against OTC than unstimulated macrophages. CXCR1 and CXCR2 inhibitor restores the initial cytotoxic activity of macrophages even in the presence of CA-MSC secretions.

Thus, our work suggests that CA-MSC could originate from physiological MSC which, in contact with an ovarian tumor environment, acquire a phenotype capable of inducing the secretion of chemoprotective factors for CTO and of polarizing macrophages into a less cytotoxic phenotype for OTC. These two pro-tumoral mechanisms can be inhibited by the use of CXCR1 and CXCR2 receptor inhibitors emphasizing the role of these chemokines in the development of a chemoresistance and showing how important is to go further is this study. Finally, these chemokines receptors seem to be therapeutic targets in order to sensitize OTC to carboplatin and to potentialize actual treatments. This could prevent the recurrence of ovarian cancers that are presently observed in more than 70% of patients.

## Résumé vulgarisé en Anglais

Ovarian cancer is the 4<sup>th</sup> leading cause of female cancer death. To date, the most effective treatment is surgery associated with chemotherapy based on carboplatin. However, the overall survival of patients remains low due to a high rate of recurrence and development of carboplatin resistance. Interactions between ovarian tumor cells (OTC) and surrounding cells appear to be involved in disease progression and the acquisition of this chemoresistance.

Amidst the cells of the tumor microenvironment, we were able to isolate mesenchymal stromal cells (MSC) from tumor biopsies from patients with ovarian cancer. These cancer-associated MSC (CA-MSC) have the ability to induce chemoresistance of OTC. *In vivo* experiments in mice and *in vitro* analysis showed that CA-MSC produced molecules that induce OTC chemoresistance. CA-MSC could also modify cells of the immune system, especially macrophages, which are able to promote the cancer development. The inhibition of the chemokines activity produced by CA-MSC has improved the efficiency of carboplatin on OTC showing this as a promising therapeutic in order to prevent the recurrence of ovarian cancers which is currently observed in more than 70% of patients.

## **Nomenclature des gènes**

La nomenclature des gènes utilisée dans ce manuscrit respecte la nomenclature du « Hugo gene nomenclature committee » selon la publication :

Hester M. Wain, Elspeth A. Bruford, Ruth C. Lovering, Michael J. Lush, Mathew W. Wright and Sue Povey. Guidelines for Human Gene Nomenclature. Genomics 79(4):464-470 (2002)

et ses mises à jour post-publication.

## **Disciplines :**

- Cancérologie
- Biologie cellulaire
- Biologie moléculaire

## **Mots clés :**

- Cancer
- Traitements
- Ovaire
- Chimiorésistance
- Cellules Stromales Mésoenchymateuses
- Microenvironnement tumoral
- Résistance
- Adénocarcinome ovarien
- Macrophages
- Immunothérapie

## **Intitulé et adresse du laboratoire**

Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopôle  
1, avenue Irène Joliot-Curie 31059 TOULOUSE Cedex 9  
INSERM U1037 : Equipe 13 du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT)

## Tableau des acronymes et abréviations

| Acronymes et abréviations | Définition   |
|---------------------------|--|
| <b>ABL</b>                | Abelson  |
| <b>ADCC</b>               | Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps           |
| <b>ADN</b>                | Acide DésoxyriboNucléique  |
| <b>ADP</b>                | Adénosine DiPhosphate  |
| <b>ADPh</b>               | Phagocytose cellulaire Dépendante des Anticorps                        |
| <b>ALK</b>                | Anaplastic Lymphoma Kinase   |
| <b>AMM</b>                | Autorisation de Mise sur le Marché                                     |
| <b>ARN</b>                | Acide RiboNucléique  |
| <b>ARNm</b>               | Acide RiboNucléique messenger  |
| <b>ATF2</b>               | Activating Transcription Factor 2                                      |
| <b>ADSC</b>               | Cellules Souches/Stromales Mésoenchymateuses dérivées du Tissu Adipeux |
| <b>ATP</b>                | Adénosine TriPhosphate   |
| <b>ATU</b>                | Autorisation Temporaire d'Utilisation                                  |
| <b>BAD</b>                | Bcl-2-Associated Death promoter  |
| <b>Bcl-2</b>              | B-cell lymphoma-2  |
| <b>Bcl-xL</b>             | B-cell lymphoma-extra Large  |
| <b>BCR</b>                | Breakpoint cluster region  |
| <b>BER</b>                | Réparation par Excision de Bases                                       |
| <b>bFGF</b>               | basic-Fibroblast Growth Factor   |
| <b>BH3</b>                | Bcl-2 Homology 3   |
| <b>BIM</b>                | Bcl-2 Interacting Mediator of cell death                               |
| <b>BiTE</b>               | Bispecific T cell Engager  |
| <b>BM</b>                 | Bone Marrow = moelle osseuse   |
| <b>BMP</b>                | Bone Morphogenetic Protein   |
| <b>BRCA</b>               | BReast and ovarian CAncer susceptibility protein                       |
| <b>Breg</b>               | Lymphocytes B régulateurs  |
| <b>BTG2</b>               | B-cell Translocation Gene 2  |
| <b>BTK</b>                | tyrosine kinase de Bruton  |
| <b>CA-MSC</b>             | Cellules Souches/Stromales Mésoenchymateuses Associées au Cancer       |
| <b>CAF</b>                | Fibroblaste associé au cancer  |
| <b>CCL5</b>               | Chemokine (C-C motif) Ligand 5   |
| <b>CCNDBP1</b>            | Cyclin D-Type Binding-Protein 1  |
| <b>CDC</b>                | Cytotoxicité Dépendante du Complément                                  |
| <b>CDK</b>                | Cyclin-Dependent Kinases   |
| <b>cIAP</b>               | cellular-Inhibitor of Apoptosis Protein                                |
| <b>CK</b>                 | Cytokératine   |
| <b>COX</b>                | Cyclooxygenase   |
| <b>CSF-1</b>              | Colony Stimulating Factor 1 = M-CSF                                    |
| <b>CSF-1R</b>             | Récepteur au Colony Stimulating Factor 1                               |
| <b>CTLA4</b>              | Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4                            |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>CTO</b>                      | Cellules Tumorales Ovariennes   |
| <b>CXCL</b>                     | Chemokine (C-X-C motif) Ligand  |
| <b>CXCR</b>                     | Chemokine (C-X-C motif) Receptor  |
| <b>CYP17</b>                    | 17alpha-hydroxylase/C17,20-lyase  |
| <b>DDIT3</b>                    | DNA-Damage-Inducible Transcript 3   |
| <b>DLP</b>                      | Doxorubicine Liposomale Pégylée   |
| <b>DM1</b>                      | N2'-Deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)-Maytansine  |
| <b>EGF</b>                      | Epidermal Growth Factor   |
| <b>EGFR</b>                     | Epidermal Growth Factor Receptor  |
| <b>EML4</b>                     | Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4  |
| <b>EpCAM</b>                    | Molécule d'Adhésion Cellulaire Epithéliale  |
| <b>ERCC1</b>                    | Excision Repair Cross-Complementation group 1   |
| <b>ERK</b>                      | Extracellular signal-Regulated Kinases  |
| <b>Fc</b>                       | Fragment constant   |
| <b>FGF</b>                      | Fibroblast Growth Factor  |
| <b>FIGO</b>                     | Fédération Internationale de Gynécologie-Obstétrique  |
| <b>FKBP12</b>                   | FK506 Binding Protein 12  |
| <b>FLT-3</b>                    | Fms-Like Tyrosine kinase 3  |
| <b>FSH</b>                      | Hormone FolliculoStimulante Hypophysaire  |
| <b>5-FU</b>                     | 5-Fluoro-Uracile  |
| <b>GADD</b>                     | Growth Arrest and DNA Damage  |
| <b>GDF-15</b>                   | Growth Differentiation Factor 15  |
| <b>GM-CSF</b>                   | Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor  |
| <b>GnRH</b>                     | Hormone entraînant la libération de Gonadotrophines   |
| <b>HDAC</b>                     | Histones Désacétylases  |
| <b>HER</b>                      | Human Epidermal growth factor Receptor  |
| <b>hERG1</b>                    | human Ether-à-go-go Related Gene 1  |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha  |
| <b>hMSC</b>                     | Cellules Souches/Stromales Mésoenchymateuses humaines   |
| <b>Hospicells</b>               | Cellules stromales assimilées à des CA-MSC isolées d'ascite de patiente atteinte d'adénocarcinome ovarien   |
| <b>HS-5</b>                     | Lignée cellulaire stromale immortalisée issue de moelle osseuse avec une morphologie et un phénotype de MSC |
| <b>hTERT</b>                    | human Telomerase Reverse Transcriptase  |
| <b>IDO</b>                      | Indoleamine 2,3-Dioxygénase   |
| <b>IFN</b>                      | Interféron  |
| <b>Ig</b>                       | Immunoglobuline   |
| <b>IGF</b>                      | Insulin-like Growth Factor  |
| <b>IGFR</b>                     | Insulin-like Growth Factor Receptor   |
| <b>IKZF1</b>                    | Ikaros  |
| <b>IKZF3</b>                    | Aiolos  |
| <b>IL</b>                       | InterLeukine  |
| <b>IMiD</b>                     | Médicaments Immuno-Modulateurs  |
| <b>iNOS</b>                     | Oxyde Nitrique Synthase inductible  |
| <b>ITK</b>                      | Inhibiteur de Tyrosine Kinase   |



|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| <b>JAK</b>                           | Janus Kinase   |
| <b>JAK1</b>                          | Janus Kinase 1   |
| <b>JAK2</b>                          | Janus Kinase 2   |
| <b>LAL</b>                           | Leucémies Aiguës Lymphoblastiques  |
| <b>LAM</b>                           | Leucémies Aiguës Myéloïdes   |
| <b>LEF1</b>                          | Lymphoid Enhancer-binding Factor 1   |
| <b>LH</b>                            | Hormone Lutéinisante Hypophysaires   |
| <b>LH-RH</b>                         | Hormone entraînant la Libération de gonadotrophines  |
| <b>LIF</b>                           | Leukemia Inhibitory Factor   |
| <b>LMC</b>                           | Leucémie Myéloïde Chronique  |
| <b>LLC</b>                           | Leucémie Lymphoïde Chronique   |
| <b>LPS</b>                           | Lipopolysaccharides  |
| <b>LTc</b>                           | Lymphocytes T cytotoxiques   |
| <b>MAPK</b>                          | Mitogen-Activated Protein Kinase   |
| <b>MARCKS</b>                        | Myristoylated Alanine-Rich protein Kinase C Substrate  |
| <b>MC</b>                            | Milieu Conditionné   |
| <b>Mcl-1</b>                         | Myeloid cell leukemia 1  |
| <b>M-CSF</b>                         | Macrophage- Colony Stimulating Factor = CSF-1  |
| <b>MDR</b>                           | Multi-Drug Resistance  |
| <b>MEC</b>                           | Matrice Extra-Cellulaire   |
| <b>MEK</b>                           | Mitogen-activated protein kinase kinase  |
| <b>miARN</b>                         | micro Acide RiboNucléique  |
| <b>MM</b>                            | Myélome Multiple   |
| <b>MMP</b>                           | MétalloProtéase Matricielle  |
| <b>MS-5</b>                          | Lignée cellulaire stromale murine ayant une morphologie mésenchymateuse et capable de se différencier en adipocyte   |
| <b>MSC</b>                           | Cellules Souches/Stromales Mésenchymateuses  |
| <b>mTOR</b>                          | Mammalian Target Of Rapamycin  |
| <b>MUC-1</b>                         | Mucine 1   |
| <b>NADPH oxydase</b>                 | Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxydase  |
| <b>NF-κB</b>                         | Nuclear Factor-kappa B   |
| <b>NHEJ</b>                          | Jonction des Extrémités Non Homologues   |
| <b>NK</b>                            | Natural Killer   |
| <b>NPM</b>                           | Nucleophosmin  |
| <b>ORF</b>                           | Open Reading Frame   |
| <b><i>p210<sup>BCR-ABL</sup></i></b> | Protéine de fusion de 210 KiloDaltons obtenue après juxtaposition du gène Abelson ( <i>ABL</i> ) à une partie du gène <i>BCR</i> (breakpoint cluster region) |
| <b>PARP</b>                          | Poly(ADP-Ribose) Polymérase  |
| <b>PGE2</b>                          | ProstaGlandine E2  |
| <b>PD-1</b>                          | Programmed cell Death-1  |
| <b>PDGF</b>                          | Platelet-Derived Growth Factor   |
| <b>PDGFR</b>                         | Platelet-Derived Growth Factor Receptors   |
| <b>PD-L1</b>                         | Programmed cell Death- Ligand 1  |
| <b>Pgp</b>                           | P-glycoprotéine  |
| <b>PI3K</b>                          | PhosphoInositide 3-Kinases   |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>PIK3CA</b>  | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3 -Kinase Catalytic Subunit Alpha |
| <b>PIP3</b>    | phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate                              |
| <b>qRT-PCR</b> | quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction            |
| <b>RANK</b>    | Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B                            |
| <b>RANKL</b>   | Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand                     |
| <b>RAR</b>     | Récepteur à l'Acide Rétinoïque  |
| <b>RASGRP1</b> | RAS Guanyl Releasing Protein 1  |
| <b>Rel</b>     | V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog                |
| <b>RTK</b>     | Récepteur à activité Tyrosine Kinase                                    |
| <b>S1P</b>     | Sphingosine-1-Phosphate   |
| <b>SCF</b>     | Skp, Cullin, F-box containing complex                                   |
| <b>SDF-1</b>   | Stromal cell-Derived Factor 1   |
| <b>siRNA</b>   | small interfering RiboNucleic acid                                      |
| <b>SKP2</b>    | S-phase Kinase-associated Protein 2                                     |
| <b>Smac</b>    | Second mitochondria-derived activator of caspases                       |
| <b>STAT</b>    | Signal Transducers and Activators of Transcription                      |
| <b>TAF</b>     | Fibroblastes Associés aux Tumeurs                                       |
| <b>TAM</b>     | Macrophages Associés aux Tumeurs  |
| <b>TCR</b>     | Récepteur aux cellules T  |
| <b>TGF-β</b>   | Transforming Growth Factor beta   |
| <b>TNF</b>     | Facteur de Nécrose Tumorale   |
| <b>Treg</b>    | Lymphocyte T régulateur   |
| <b>TXAS</b>    | ThromboXane A Synthase  |
| <b>TYK2</b>    | Tyrosine Kinase 2   |
| <b>VCAM-1</b>  | Vascular Cell Adhesion Molecule-1                                       |
| <b>VEGF</b>    | Vascular Endothelial Growth Factor                                      |
| <b>VEGFR</b>   | Récepteur au VEGF   |
| <b>VLA4</b>    | Very Late Antigen-4   |
| <b>Wnt</b>     | Wingless-type MMTV integration site family                              |
| <b>XIAP</b>    | X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein                                 |

## I) INTRODUCTION

### A) Le cancer ovarien

#### 1) Anatomie et physiologie ovarienne

##### a) Anatomie ovarienne

Les ovaires font partie de l'appareil reproducteur de la femme. Ce sont des organes pairs et symétriques localisés dans la cavité pelvienne. Les ovaires sont les seuls organes situés dans la cavité péritonéale sans être recouvert de péritoine. Ils sont situés de part et d'autre de l'utérus auquel ils sont reliés *via* les trompes de Fallope<sup>1,2</sup>.

Pendant l'enfance et jusqu'à la puberté, le poids de l'ovaire augmente atteignant 10 à 15 grammes à la puberté, conséquence de l'accumulation de follicules et de l'augmentation de taille de quelques-uns. Vers l'âge de 12 ans, les ovaires atteignent leur taille adulte et sont de forme ovoïde. Pendant la période d'activité génitale, les ovaires ont une taille moyenne de 4 cm, une surface de 6 cm<sup>2</sup> et un volume d'environ 10 cm<sup>3</sup>. Après la ménopause, une atrophie progressive de l'ovaire se produit suite à l'épuisement du stock de follicules<sup>1,2</sup>.

Les ovaires sont constitués de différentes régions : le cortex périphérique, la médullaire centrale et le hile ovarien. La médulla est constituée d'un tissu conjonctif lâche, très vascularisé et innervé. Le cortex est constitué d'un tissu conjonctif riche en fibroblastes, appelé « stroma ovarien », dans lequel sont contenus les follicules en croissance et le stock de follicules primordiaux. Les cellules stromales sont importantes pour la synthèse des hormones stéroïdiennes notamment par l'intermédiaire de leurs réserves lipidiques intracellulaires. L'enveloppe ovarienne est formée d'une couche fibreuse, l'albuginée, puis d'un épithélium de surface<sup>1,2</sup>.

##### b) Physiologie ovarienne

Les ovaires exercent une double activité reproductrice et hormonale de la puberté à la ménopause. Ils ont une fonction gamétogène conduisant à la croissance, à la maturation et à la libération de l'ovocyte, et une fonction endocrinienne *via* la synthèse des hormones stéroïdiennes, telles que l'œstradiol et la progestérone. Ces deux fonctions assurent l'ovulation d'un follicule et sa transformation en corps jaune durant le cycle menstruel<sup>1,2</sup>.

Les différentes étapes nécessaires à la croissance et à la maturation de l'ovocyte constituent la folliculogénèse. Ce phénomène complexe est initié dès la vie fœtale, où le stock de follicules primordiaux est déjà fixé, et s'achève à la ménopause. La folliculogénèse débute dès l'entrée en croissance du follicule et se poursuit jusqu'à son ovulation ou son atrophie, entraînant un épuisement de la réserve avec l'âge. Ce processus se déroule en quatre étapes principales : l'initiation, la croissance folliculaire basale, la sélection d'un follicule dominant et sa maturation.

La régulation de la folliculogénèse dépend initialement des sécrétions paracrines intra-ovariennes puis à l'action des gonadotrophines (FSH et LH)<sup>1,2</sup>.

## 2) Epidémiologie des cancers ovariens

### a) Incidence et mortalité

Le cancer ovarien est le 7<sup>ème</sup> cancer le plus diagnostiqué chez la femme dans le monde<sup>3</sup>. Parmi tous les cancers gynécologiques, le cancer des ovaires est celui qui est associé au plus mauvais pronostic et dont la mortalité est la plus élevée<sup>4</sup>. En France, selon les données de l'institut de veille sanitaire, le cancer ovarien se situe au 8<sup>ème</sup> rang des cancers féminins avec une incidence de 4615 patientes en 2012. Sa mortalité est importante, car il est la 4<sup>ème</sup> cause de décès par cancer chez la femme avec 3140 décès en 2012<sup>5</sup>.

L'âge médian des patientes au moment du diagnostic est de 66 ans<sup>6,7</sup>. Une projection de l'incidence et de la mortalité du cancer ovarien en France sur l'année 2015 montre que l'incidence de ce cancer est plus élevée entre 50 et 64 ans. Cependant, le regroupement des plus de 65 ans représente plus de la moitié des cas (58,5%) (Tableau 1). En termes de mortalité, l'intervalle d'âge où la mortalité est la plus élevée est 75 et 84 ans, avec un âge médian au moment du décès de 76 ans (Tableau 1). La diminution des taux de mortalité par cancer de l'ovaire observée ces dernières années, est principalement due à la diminution de l'incidence, car une fois diagnostiqué, ce cancer reste de mauvais pronostic. Tous stades confondus, sa survie globale est d'environ 40 % à 5 ans et de 32 % à 10 ans<sup>5,6</sup>.

**Tableau 1: Incidences et mortalités projetés et part dans l'incidence et la mortalité des cancers ovariens par tranches d'âge en France métropolitaine en 2015<sup>7</sup>**

| Ages (années)             | Tous âges confondus | 0-14       | 15-49       | 50-64       | 65-74       | 75-84       | > 85        | > 65        |
|---------------------------|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Incidence (Nombre de cas) | 4575                | 12         | 546         | 1340        | 1183        | 983         | 511         | 2677        |
| <b>Incidence (%)</b>      | <b>100</b>          | <b>0,3</b> | <b>11,9</b> | <b>29,3</b> | <b>25,9</b> | <b>21,5</b> | <b>11,2</b> | <b>58,5</b> |
| Mortalité (Nombre de cas) | 3132                | 0          | 119         | 586         | 750         | 918         | 759         | 2427        |
| <b>Mortalité (%)</b>      | <b>100</b>          | <b>0</b>   | <b>3,8</b>  | <b>18,7</b> | <b>23,9</b> | <b>29,3</b> | <b>24,2</b> | <b>77,5</b> |

## *b) Facteurs de risques et de protection*

### *(i) Les facteurs génétiques*

Certains facteurs de risques ont été identifiés et l'un des plus importants est l'origine génétique. Environ 10% des cancers de l'ovaire surviennent chez des patientes ayant des prédispositions génétiques souvent liées à des mutations de *BRCA1* et *BRCA2*. Ils peuvent également être associés à un syndrome de Lynch, également appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose (syndrome HNPCC), lié à la mutation de 3 des principaux gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de bases (mismatch repair), *MSH2*, *MLH1* et *MSH6*<sup>6</sup>. Dans les cas de prédispositions génétiques, les femmes ont un risque plus élevé de développer un cancer ovarien et la survenue est généralement plus précoce (environ 10 ans plus tôt) que dans la population générale. En effet, le risque de développer un cancer ovarien est de 5% chez les femmes ayant un antécédent au premier degré et augmente à 8 % en présence de deux antécédents au premier degré, comparé au risque de 1,4 à 1,7% observé dans la population générale<sup>8</sup>. Ainsi, les femmes appartenant à des familles comportant des cancers de l'ovaire devraient être considérées comme étant à risque de développer un cancer de l'ovaire, même si la mutation n'est pas identifiée<sup>9</sup>. Entre 2003 et 2015, 24631 personnes porteuses de mutation de *BRCA1/2* et 8408 personnes porteuses d'une mutation prédisposant à un syndrome de Lynch ont pu être identifiées en France<sup>7</sup>.

Le risque de développer un cancer chez les femmes présentant une mutation de *BRCA1* est situé entre 27% et 63 %, et entre 11% et 27 % pour une mutation de *BRCA2*<sup>8,10,11</sup>.

Ainsi, chez les femmes porteuses d'une mutation de *BRCA 1/2*, ou appartenant à une famille comportant plusieurs cancers du sein et/ou de l'ovaire (sans mutation identifiée), l'annexectomie bilatérale est recommandée pour prévenir la survenue de cancer de l'ovaire. Pour les patientes atteintes d'un syndrome de Lynch, une hystérectomie (pour prévenir également un cancer de l'endomètre) sera également associée à une annexectomie pour prévenir la survenue de ces cancers<sup>9</sup>.

En termes de survie globale, le pronostic des cancers des ovaires chez les femmes porteuses d'une mutation de *BRCA1* et de *BRCA2* est meilleur que celui des cancers sporadiques<sup>9</sup>.

### *(ii) Les facteurs hormonaux*

Les facteurs gynécologiques et obstétricaux, notamment ceux impliqués dans l'ovulation, semblent impliqués dans le développement des cancers ovariens. En effet, la nulliparité, les règles précoces, la ménopause tardive et l'âge avancé augmentent aussi ce risque<sup>6</sup>. Un traitement hormonal substitutif de la ménopause à bases d'œstrogènes seuls est également un facteur de risque du cancer des ovaires<sup>7</sup>.

En revanche, des facteurs protecteurs du cancer ovarien, associés à l'exposition aux hormones, ont également été mis en évidence. Nous pouvons mentionner les situations entraînant une diminution du nombre d'ovulation au cours de la vie telles qu'une contraception orale (une prise de plus de 5 ans le diminuerait de 50 %), une puberté tardive, une ménopause précoce, les périodes de grossesse (une multiparité réduirait le risque de 15 à 20 %) et d'allaitement. De plus, une ligature tubaire et l'hystérectomie le réduirait jusqu'à 80 %. La diminution des taux de mortalité par cancer de l'ovaire observée ces dernières années, est principalement due à la diminution de l'incidence qui peut s'expliquer par une augmentation de patientes ayant subi une hystérectomie ou une ligature des trompes<sup>5-7,12</sup>.

### (iii) Les facteurs comportementaux, environnementaux et professionnels

Certains facteurs de risques de développer des cancers peuvent être considérés comme évitables, tels que le tabac, l'alcool et des facteurs nutritionnels. Ainsi, le surpoids ou l'obésité semblent être des facteurs de risques du cancer ovarien. De même, la consommation de tabac, qui reste la principale cause de décès évitables par cancer dans le monde, semble favoriser la survenue de cancers ovariens du type mucineux, dont 16% de ces cancers seraient attribuables au tabac<sup>7</sup>.

Des facteurs environnementaux et professionnels semblent également influencer le développement des cancers ovariens. L'amiante, qui est une substance cancérigène avérée pour l'homme, est un facteur de risque du cancer ovarien, dont l'exposition est la plus reconnue en pathologie professionnelle. Environ 1% à 3,6%, des cancers ovariens seraient attribuables à l'amiante<sup>7</sup>.

### 3) Types histologiques

Les tumeurs ovariennes, qu'elles soient bénignes, malignes ou borderlines (à la frontière entre bénignes et malignes), sont classées en trois catégories : les tumeurs épithéliales (55 %), les tumeurs germinales (30 %) et les tumeurs des cordons sexuels et du stroma gonadique (8 %). Ces différents groupes histologiques englobent des adénomes (bénins), des tumeurs prolifératives atypiques (borderlines) et des tumeurs invasives. Seules ces dernières (tumeurs malignes) seront développées dans les parties suivantes.

### *a) Les tumeurs épithéliales*

Parmi les tumeurs malignes, les carcinomes, c'est à dire d'origine épithéliale, sont majoritaires (85 à 90 %). Ils sont subdivisés en fonction du type histologique du revêtement épithélial qui les compose, en carcinomes séreux, mucineux, séro-mucineux, endométrioïdes, à cellules claires, les tumeurs de Brenner et les tumeurs indifférenciées<sup>13,14</sup>. Ces tumeurs sont généralement positives en immunohistochimie pour PAX8 et la cytokératine (CK) 7, et négatives pour CK20<sup>15</sup>.

#### (i) Les carcinomes séreux

Les carcinomes séreux sont des tumeurs présentant une architecture glandulaire, papillaire ou solide. Ils peuvent se développer de façon bilatérale. Les cellules tumorales présentent des atypies marquées et des mitoses souvent très nombreuses avec une expression de WT1 (marquage nucléaire diffus).

#### ❖ *Les carcinomes séreux de bas grade*

Les carcinomes séreux de bas grade représentent seulement 2% des cancers ovariens et environ 15% des carcinomes séreux. Ils pourraient se développer à partir de tumeurs borderlines séreuses (carcinomes séreux de bas grades non infiltrants). En effet, ces carcinomes présentent des anomalies génétiques similaires à celles retrouvées dans les tumeurs borderlines comme des mutations de la voie des MAP-kinases telles que *BRAF* (V600E) ou *KRAS*<sup>16</sup>. Les cellules de carcinomes séreux de bas grade ont des atypies légères à modérées et un index mitotique faible. Concernant l'analyse immunohistochimique, ces tumeurs sont généralement positives pour WT1 et les récepteurs aux œstrogènes (RE) et à la progestérone (RP).

Les carcinomes séreux de bas grade progressent lentement avec une survie à 10 ans proche de 50% mais sont cependant peu sensibles aux chimiothérapies rendant le traitement chirurgical primordial<sup>16</sup>.

#### ❖ *Les carcinomes séreux de haut grade*

Les carcinomes séreux de haut grade sont les plus fréquents des cancers ovariens. Ils représentent notamment 60% de l'ensemble des carcinomes ovariens et 85% des carcinomes séreux. Ces tumeurs sont génétiquement instables et présentent un taux de mutation élevé. Contrairement aux carcinomes séreux de bas grade, une mutation du gène *TP53* est fréquemment retrouvée (96% des cas) mais pas les mutations de *BRAF* (V600E) ou *KRAS*. Une

inactivation des gènes *BRCA*, qu'elle soit génétique (due à des mutations) ou épigénétique (par des phénomènes d'hyperméthylation de leur promoteur), est fréquemment retrouvée (22%) dans les carcinomes séreux de haut-grade que ce soit pour des cancers héréditaires ou sporadiques. Les cancers héréditaires induits par une mutation constitutionnelle des gènes *BRCA* sont généralement des carcinomes séreux de haut-grade. Les cellules tumorales présentent des atypies cytonucléaires marquées. Au niveau de l'immunohistochimie, ces tumeurs sont généralement positives pour WT1, p53, p16.

Les carcinomes à cellules transitionnelles sont classés depuis 2014 dans les carcinome séreux de haut grade, de par leur ressemblance et leur mutation du gène *TP53*<sup>16</sup>.

### (ii) Les carcinomes mucineux

Les tumeurs épithéliales mucineuses sont carcinomateuses dans 5 à 10% des cas. Elles correspondent à une prolifération anarchique de cellules mucosécrétantes, évoquant l'épithélium intestinal. Les lésions sont essentiellement multiloculaires et kystiques. Ces tumeurs sont généralement volumineuses avec un contenu visqueux et restent plutôt confinées à l'ovaire. Les précurseurs de ces carcinomes semblent être des tumeurs borderlines (à la limite de la malignité) mucineuses. Les anomalies génétiques les plus fréquemment rencontrées pour ces carcinomes sont des mutations de *KRAS* (86 %) ou une amplification de *HER2* (18%), mais sont mutuellement exclusives<sup>16</sup>. L'analyse immunohistochimique montre fréquemment des tumeurs exprimant CK20 (contrairement à la majorité des carcinomes ovariens) mais qui sont négatives pour WT1, RE et RP<sup>15</sup>.

### (iii) Les carcinomes endométrioïdes

Les carcinomes endométrioïdes représentent 10 à 20 % des cancers de l'ovaire. Elles sont bilatérales dans 30 % des cas mais généralement confinées au niveau du pelvis. La tumeur est généralement solide-kystique, friable et hémorragique. Histologiquement, la tumeur est identique à un adénocarcinome de l'endomètre, évoquant la muqueuse endométriale. Les carcinomes endométrioïdes représentent le type histologique de cancer ovarien où le taux d'instabilité des microsatellites est le plus élevé. Les mutations retrouvées dans ce type de tumeur concernent la  $\beta$ -caténine (38 à 60%), PTEN (20%), PIK3CA (31.4%). Le syndrome de Lynch peut entraîner des formes familiales de carcinomes ovariens de type endométrioïde. Dans 20 % des cas, ces tumeurs sont associées à un adénocarcinome de l'endomètre. Les cellules tumorales expriment la vimentine, les kératines, l'antigène épithélial de membrane et les récepteurs hormonaux (RE et RP) mais pas WT1<sup>16</sup>.



#### (iv) Les carcinomes à cellules claires

Les carcinomes à cellules claires sont caractérisés par la présence de cellules claires ou « en galet ». Ils sont classiquement de haut grade et de mauvais pronostic. Ils se développent à partir d'endométriome et sont associés à un carcinome endométriome dans environ 25% des cas. Les carcinomes à cellules claires sont relativement stables sur le plan génétique et ne présentent pas de mutation du gène *TP53*. Cependant, plusieurs anomalies génétiques peuvent être retrouvées comme une mutation d'un gène suppresseur de tumeurs *ARID1A* (46%). L'activation de la voie PI3K/Akt associée à l'inactivation concomitante des gènes suppresseurs de tumeur comme *PTEN* et *mTOR* est observée à la fois dans l'endométriome et les carcinomes qui en découlent (carcinomes endométriomes et à cellules claires). Le carcinome à cellules claires est le type histologique de carcinome ovarien avec le taux le plus élevé de mutations activatrices de *PIK3CA* (33% des cas) ou de *KRAS* (14%). L'amplification du gène *MET* et la surexpression de la protéine MET ont été identifiées dans 22 à 24% des carcinomes de l'ovaire à cellules claires. Les cellules tumorales expriment l'« hepatocyte nuclear factor -1 bêta » (95%) et la napsin A (88%) mais pas WT1, RE et RP<sup>16</sup>.

#### (v) Les tumeurs de Brenner

Les tumeurs de Brenner sont très rares (5 % des tumeurs de l'ovaire) et parmi ces tumeurs, moins de 0,5 % sont malignes. Elles sont généralement de grande taille (16-20 cm) avec une composante solide et une composante kystique avec des lésions végétantes ou des masses polypoïdes. Elle est souvent de stade I avec un très bon pronostic et une survie à 5 ans de 88%. Les tumeurs de Brenner sont très sensibles à la chimiothérapie, notamment aux sels de platine<sup>16</sup>.

#### (vi) Les tumeurs séro-mucineuses

Malgré l'apparition de ce type histologique dans la classification WHO en 2014<sup>14</sup>, les carcinomes séro-mucineux ovariennes sont des tumeurs dont l'origine et la nature ne sont pas totalement élucidées à l'heure actuelle<sup>17</sup>. Ces tumeurs séro-mucineuses se composent d'un mélange de divers types de cellules, tels qu'un épithélium mucineux de type endocervical et un épithélium de type endométriome et squameux. Le profil immunohistochimique de ces tumeurs, proche de celui des tumeurs « mülleriennes », montre une expression fréquente de CK7, RE, RP et CA125, associée à une absence d'expression de CK20. Ces carcinomes séro-mucineux semblent fréquemment associés à la présence d'endométriome et également à une perte d'expression d'*ARID1A*. Ces tumeurs ne présentent pas de différenciation séreuse, malgré leur nom de « séro-mucineux » et semblent plus proches des carcinomes endométriomes et à cellules claires<sup>17</sup>.

## (vii) Les carcinomes indifférenciés

Les carcinomes ovariens indifférenciés correspondent à des tumeurs épithéliales ovariennes dont les caractéristiques morphologiques ne correspondent à aucun des carcinomes spécifiques cités ci-dessus.

### *b) Les tumeurs germinales*

Les tumeurs germinales représentent 5 à 10% des tumeurs de l'ovaire. Ces tumeurs ont généralement une croissance rapide pouvant atteindre un volume important. La grande majorité (95%) des tumeurs germinales est représentée par des tératomes (tumeurs germinales formées par des cellules pluripotentes) kystiques bénins. Elles se subdivisent en tumeurs bénignes (kystes dermoïdes), kystes dermoïdes cancérisés qui sont des tumeurs malignes dérivant de kystes dermoïdes et de tumeurs germinales malignes primitives. Histologiquement, ces tumeurs germinales sont classées en deux groupes : les dysgerminomes ovariens et les tumeurs non dysgerminomateuses<sup>18</sup>.

#### (i) Les dysgerminomes ovariens

Les dysgerminomes ovariens, ou séminomes ovariens, représentent environ 5% à 10% des tumeurs malignes ovariennes et 45% des tumeurs germinales. Ces tumeurs se développent à partir de cellules germinales indifférenciées et se présentent fréquemment sous la forme d'une masse ovarienne volumineuse. Contrairement aux adénocarcinomes, les dysgerminomes sont diagnostiqués majoritairement chez les adolescentes ou les femmes jeunes (22 ans en moyenne) et dans 85 % des cas avant l'âge de 30 ans. Ces tumeurs sont généralement unilatérales (85%) et de taille variant de quelques cm à 50 cm avec un diamètre moyen de 15 cm. Le pronostic est favorable avec une survie à 5 ans de 75 à 90%<sup>18</sup>. Au niveau des anomalies génétiques, des anomalies du chromosome 12p sont retrouvées dans 81 % des dysgerminomes. En immunohistochimie, la tumeur exprime la vimentine, la placenta-like alkaline phosphatase et c-kit. Le stroma compte toujours un infiltrat inflammatoire chronique d'abondance variable composé de lymphocytes, macrophages et granulomes épithélioïdes<sup>19</sup>.

#### (ii) Les tumeurs non dysgerminomateuses

Les tumeurs non dysgerminomateuses se composent de tumeurs vitellines ou tumeurs du sinus endodermique (20% des tumeurs germinales malignes), les tératomes immatures (20%), les

rare carcinomes embryonnaires purs (< 5 %), les choriocarcinomes purs et les tumeurs germinales composites ou mixtes (10 %) <sup>18,19</sup>.

#### ❖ *Les tumeurs vitellines*

Les tumeurs vitellines représentent le type histologique le plus péjoratif des tumeurs germinales malignes. Généralement, elles se développent unilatéralement et sont encapsulées, mesurant de 5 à 30 cm (15 cm en moyenne). Comme les tumeurs germinales en général, ces tumeurs vitellines sont diagnostiquées chez des femmes jeunes (en moyenne entre 18 et 25 ans). Les tumeurs vitellines ont une extension locorégionale (vessie, rectum, utérus et péritoine pelvien), ganglionnaire rétropéritonéale et hépatique dans les stades avancés. L'immunohistochimie met généralement en évidence l'expression de l' -f etoprot ine <sup>19</sup>.

#### ❖ *Les tératomes*

Les tératomes immatures se développent unilatéralement sous la forme de volumineuses masses complexes kystiques allant de 6 à 35 cm. Ils sont soit purs, soit composent une tumeur mixte. Les tératomes immatures surviennent entre 1 et 46 ans (18 ans en moyenne) <sup>19</sup>.

#### ❖ *Les carcinomes embryonnaires*

Les carcinomes embryonnaires sont exceptionnellement purs et représentent généralement une des composantes d'une tumeur germinale mixte. Macroscopiquement, ces carcinomes embryonnaires se développent sous la forme d'une tumeur solide blanc-grisâtre avec des plages nécrotiques et hémorragiques. Ils sont diagnostiqués généralement dans l'enfance ou chez les femmes jeunes (15 ans en moyenne) <sup>19</sup>.

#### ❖ *Les choriocarcinomes*

Les choriocarcinomes peuvent être gestationnels ou non gestationnels. Ils sont définis par la présence de cellules malignes, à la fois cyto- et syncytiotrophoblastiques, étroitement intriquées et sans formation villositaire associée. Les choriocarcinomes purs non gestationnels représentent des tumeurs extrêmement rares. Ils sont de mauvais pronostic et notamment plus péjoratif que celui du choriocarcinome gestationnel. Leur développement est le plus souvent unilatéral sous la forme d'une tumeur solide et hémorragique <sup>19,20</sup>.

### ❖ *Les tumeurs germinales mixtes*

Les tumeurs germinales mixtes ovariennes comportent au moins deux composantes germinales différentes. Dans la plupart des cas, ces tumeurs se composent d'un dysgerminome et d'une tumeur vitelline mais de multiples combinaisons existent associant des dysgerminomes, tératomes, tumeurs vitellines, choriocarcinomes, carcinomes embryonnaires ou polyembryomes<sup>19</sup>.

### *c) Les tumeurs des cordons sexuels et du stroma gonadique*

Les tumeurs des cordons sexuels et du stroma gonadique représentent environ 6 à 7 % des tumeurs ovariennes. Ces tumeurs comprennent un groupe hétérogène de tumeurs car elles sont formées par divers types de cellules qui proviennent des cordons sexuels primitifs ou des cellules stromales. Les cellules stromales impliquées dans ce type de tumeurs sont des cellules de la thèque de l'ovaire, des fibroblastes ou des cellules de Leydig. Les cellules des cordons sexuels sont les cellules de Sertoli et de la granulosa. La majorité de ces tumeurs peuvent synthétiser des hormones (œstrogènes, androgènes, corticoïdes)<sup>21,22</sup>. La classification de la « World Health Organization » (WHO) subdivise ces tumeurs en 3 catégories, les tumeurs stromales pures, les tumeurs des cordons sexuels pures et les tumeurs mixtes stromales/cordons sexuels. Seules les tumeurs malignes seront présentées ci-dessous.

#### (i) Les tumeurs stromales pures

### ❖ *Les fibrosarcomes ovariens*

Les fibrosarcomes ovariens présentent fréquemment une atypie nucléaire modérée à sévère. Ces tumeurs sont généralement retrouvées chez les femmes ménopausées sous la forme de grandes masses unilatérales, souvent nécrotiques et hémorragiques<sup>22</sup>.

### ❖ *Les tumeurs à cellules stéroïdes*

Les tumeurs à cellules stéroïdes sont rares et représentent environ 0,1% des cancers ovariens. La survenue de ces tumeurs est majoritairement péri et post-ménopausique. Elles sont composées exclusivement de cellules ressemblant aux cellules sécrétrices de stéroïdes sans cristoïdes de Reinke (caractéristiques des tumeurs à cellules de Leydig). Les tumeurs à cellules stéroïdes se développent sous la forme d'une masse généralement unilatérale, de grande taille, solide et hétérogène avec des plages de graisse intratumorales. Elles sont

hypervascularisées, riches en lipides et expriment l' $\alpha$ -inhibine. La sécrétion de stéroïdes conduit à une virilisation, un hirsutisme ou une manifestation d'hyperestrogénie<sup>19,21,22</sup>.

(ii) Les tumeurs des cordons sexuels pures

❖ *Les tumeurs de la granulosa*

Les tumeurs de la granulosa sont les plus fréquentes parmi les tumeurs des cordons sexuels et du stroma mais restent rares (2 à 3% des tumeurs malignes de l'ovaire). Elles se développent sous la forme d'une masse kystique de grande taille (12 cm en moyenne), rarement bilatérale. Deux types histologiques sont retrouvés, la forme adulte et la forme juvénile. La forme adulte est majoritaire (95%) et concerne des femmes en période peri ou post-ménopausique. La forme juvénile touche des femmes de moins de 30 ans et est associée à un meilleur pronostic. Les tumeurs de la granulosa sont dites endocrines, car elles dérivent de cellules participant aux sécrétions hormonales de l'ovaire. Une œstrogénosécrétion est retrouvée dans 70% des tumeurs de la granulosa, qui sont les tumeurs productrices d'œstrogènes les plus communes<sup>22</sup>. Les femmes présentent généralement une hyperestrogénicité. Au niveau génétique, la mutation (faux sens) de FOXL2 est retrouvée chez 97 % des patientes atteintes de tumeur de la granulosa de forme adulte. Ces tumeurs expriment constamment l' $\alpha$ -inhibine.

❖ *Les tumeurs à cellules de Sertoli*

Les tumeurs à cellules de Sertoli pures sont rares. Elles sont bien différenciées. Elles diffèrent des tumeurs de Sertoli-Leydig (cf. paragraphe suivant) car elles ne présentent pas la composante Leydig et ne contiennent pas le stroma néoplasique immature retrouvé dans les tumeurs de Sertoli-Leydig<sup>23</sup>. Les tumeurs à cellules de Sertoli sont généralement confinées à l'ovaire, unilatérales et présentes des motifs tubulaires<sup>24</sup>.

❖ *Les tumeurs des cordons sexuels avec des tubules annelés*

Les tumeurs des cordons sexuels avec tubules annelés se caractérisent par la présence de tubes annelés simples ou complexes. Elles présentent des caractéristiques morphologiques intermédiaires entre la tumeur de la granulosa et la tumeur à cellules de Sertoli. Elles sont le plus souvent bénignes mais de rares cas agressifs avec une extension extra-ovarienne, présentant un index mitotique élevé et des atypies ont été décrits. Dans environ 30% des cas, une association avec un syndrome de Peutz-Jeghers est retrouvée et dans ce cas, elles sont généralement bilatérales, multifocales, petites (<3 cm) et bénignes. Au contraire, les tumeurs

des cordons sexuels avec tubules annelés non associées à un syndrome de Peutz-Jeghers sont généralement unilatérales et grandes.

(iii) Les tumeurs mixtes stromales/cordons sexuels

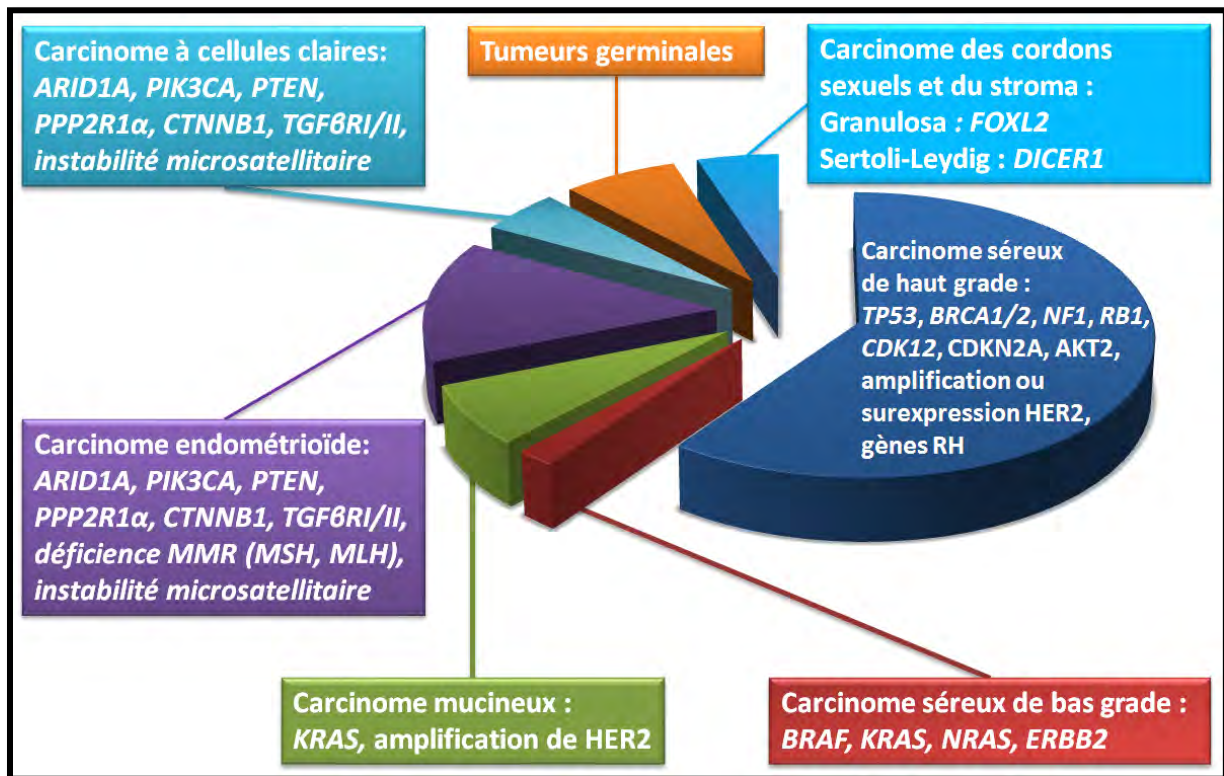
❖ *Les tumeurs à cellules de Sertoli-Leydig*

Les tumeurs à cellules de Sertoli-Leydig ou androblastomes sont des tumeurs sécrétantes rares (0,5% de tous les cancers ovariens). Elles sont généralement diagnostiquées chez la femme jeune mais peuvent survenir à tout âge. Ces tumeurs sont majoritairement bénignes, mais environ 20 % récidivent ou présentent des métastases. Elles constituent la principale tumeur ovarienne entraînant une virilisation, due à l'hyperandrogénie retrouvée dans 30 à 50% des cas. Ce sont des tumeurs mixtes (les formes pures sont classées dans les tumeurs stromales pures pour les cellules de Leydig et dans les tumeurs des cordons sexuels pour les tumeurs à cellules de Sertoli pures). Elles peuvent être bien différenciées, alors constituées de cellules de Sertoli séparées par des amas de cellules de Leydig. Les tumeurs peuvent également être à différenciation intermédiaire (constituées de tubes de Sertoli immatures, associés à un stroma composé de cellules de Leydig) ou peu différenciées. Les tumeurs de Sertoli-Leydig se développent sous la forme d'une masse ovarienne solide bien limitée.

❖ *Les tumeurs des cordons sexuels sans autre spécificité*

Les tumeurs des cordons sexuels sans autre spécificité correspondent à des tumeurs des cordons sexuels dont les caractéristiques morphologiques ne correspondent à aucune des tumeurs spécifiques cités ci-dessus.

Figure 1 : Fréquences des tumeurs malignes selon leur type histologique et leurs anomalies génétiques associées



#### 4) Oncogénèse des carcinomes ovariens

##### a) Les différentes théories de l'oncogénèse ovarienne

La pathogénèse des cancers ovariens n'est pas totalement élucidée à ce jour. En effet, le cancer ovarien est généralement diagnostiqué à un stade avancé de la maladie, rendant difficile la caractérisation du développement tumoral, et peu de modèles de progression des cancers ovariens sont disponibles à ce jour.

Les cellules de l'épithélium de surface ovarien semblent être les cellules à l'origine des carcinomes ovariens. Elles ont le potentiel de se différencier en cellules épithéliales ou mésenchymateuses en réponse à l'ovulation ou à des stimuli hormonaux. Dans un contexte de carcinome ovarien, ces cellules semblent se différencier en perdant toutefois leur plasticité et leur réactivité face aux signaux externes. Ainsi, les carcinomes ovariens semblent originaux, dans la mesure où l'épithélium devient plus différencié lorsqu'il se transforme, alors que les cellules tumorales de la plupart des autres cancers solides ou hématologiques perdent, elles, leur différenciation<sup>25</sup>.

Plusieurs théories ont été évoquées pouvant être à l'origine de la tumorigénèse ovarienne, comme la théorie de l'ovulation incessante. Cette théorie est basée sur le fait qu'à chaque ovulation une rupture au niveau de l'épithélium de surface de l'ovaire entraîne un traumatisme

suivi d'une cicatrisation accompagnée par la synthèse de facteurs de croissance ou hormonaux pouvant être à l'origine d'une prolifération puis de la transformation de cellules en cellules tumorales. Elle s'appuie sur des arguments épidémiologiques (corrélation entre l'incidence du cancer ovarien et le nombre d'ovulations au cours de la vie) et expérimentaux (études animales)<sup>8,25</sup>. D'autres théories ont également été soutenues telles que des hypothèses impliquant des facteurs hormonaux (androgènes, gonadotrophines, *etc.*), une hyperactivité stromale, l'inflammation (ovulation, infections, *etc.*)<sup>8</sup>, *etc.* Ainsi, aucune théorie n'a clairement été validée comme l'unique responsable de développement du cancer ovarien.

Bien que les carcinomes ovariens possèdent des caractéristiques morphologiques communes qui correspondent aux épithéliums de surface des ovaires, les différents sous-types arborent des aberrations moléculaires et génétiques qui leur sont propres (Figure 1). Compte tenu que des mutations somatiques de haute prévalence (>5%) sont retrouvées selon une spécificité histologique dans la plupart des cancers, des gènes dont la perturbation fonctionnelle a probablement un rôle dans la carcinogenèse ovarienne ont été recherchés. Dans les carcinomes ovariens, des mutations des gènes *TP53*, *PTEN* et *CTNNB1* (codant pour la  $\beta$ -caténine), induisant des protéines inactives, ou au contraire des mutations « activatrices » des gènes *KRAS*, *PIK3CA* et *AKT1*, ont été associées à certains types histologiques. Les carcinomes ovariens héréditaires liés à une mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* sont le plus souvent des tumeurs séreuses de haut grade avec une anomalie de p53. Ces mutations pourraient être utilisées dans l'étiologie du développement des carcinomes ovariens.

Ainsi, sur la base de ces anomalies génétiques, il a été proposé que, pour les carcinomes, l'oncogenèse ovarienne soit scindée en deux groupes correspondant à deux voies de carcinogenèse<sup>8,25,26</sup> : les tumeurs de type I et celles de type II. Les tumeurs de type I apparaissent progressivement à partir de lésions bénignes évoluant par un processus hyperplasique de l'épithélium ovarien de surface vers des tumeurs à la limite de la malignité (borderlines) qui peuvent être considérées comme précurseurs. Elles sont généralement de bas grade et comprennent des carcinomes mucineux, endométrioïdes, à cellules claires, séreux de bas grade et les tumeurs de Brenner. Les tumeurs de type II apparaissent *de novo*, à partir de l'épithélium de surface de l'ovaire sans qu'aucune lésion précurseur ne soit identifiée, et incluent les carcinomes séreux de haut grade, des tumeurs malignes mésodermiques mixtes et des carcinomes indifférenciés<sup>8,25-27</sup>. De par leur fréquence et leurs caractéristiques communes, les carcinomes séreux de bas grade (type I) et de haut grade (type II) ont été les principaux modèles utilisés pour comparer ces 2 types de tumeurs.

### *b) Les tumeurs de type I*

Les carcinomes séreux de bas grade se développent généralement de façon indolente sur plus de 20 ans, contrairement aux carcinomes séreux de haut grade qui se développent rapidement et de façon agressive. Les carcinomes mucineux, endométrioïdes, à cellules claires et les tumeurs malignes de Brenner sont fréquemment associés à des cystadénomes, à des tumeurs limites (borderlines) et à des carcinomes intra-épithéliaux. Les tumeurs classées dans le type I



ont une croissance lente et sont fréquemment confinées aux ovaires au moment du diagnostic (stade I).

Les tumeurs de type I semblent provenir d'une succession d'étapes à partir d'adénofibromes et de cystadénomes qui évolueraient pendant de nombreuses années vers des tumeurs à la limite de la malignité (borderlines), puis des carcinomes de type I. Le précurseur est ainsi généralement bien identifié. Les tumeurs mucineuses et séreuses (bas grade) pourraient ainsi dériver des kystes d'inclusion mucineux ou séreux du revêtement de surface de l'ovaire. Les carcinomes endométrioïdes et à cellules claires pourraient quant à eux se développer à partir d'endométriomes (kystes d'endométriose). En effet, les carcinomes endométrioïdes et à cellules claires sont fréquemment associés à de l'endométriose, des adénofibromes endométrioïdes, des tumeurs prolifératives atypiques (borderlines) évoquant une évolution progressive de la tumeur.

Les indices ayant conduit vers cette hypothèse sont l'identification d'altérations moléculaires et génétiques communes entre les tumeurs bénignes, à la limite de la malignité et les carcinomes invasifs. Nous pouvons citer des mutations des gènes *BRAF* et *KRAS* (>60% des cas). Une altération d'autres gènes (exemples : codants pour *PTEN* et  $\beta$ -caténine), moins courante, peut être retrouvée de manière concomitante aux tumeurs bénignes, borderlines, ou malignes.

Les mutations retrouvées sont généralement distinctes selon le type histologique des tumeurs. En effet, les mutations des gènes *BRAF* et *KRAS* correspondent généralement aux tumeurs séreuses. Les tumeurs mucineuses sont généralement accompagnées de mutations de *KRAS*. Dans le cas des carcinomes endométrioïdes, une mutation de *CTNBI* (codant pour la  $\beta$ -caténine) a été rapportée dans environ un tiers des cas et une mutation de *PTEN* dans 20%, atteignant 46% des cas en comptabilisant les tumeurs présentant une perte d'hétérozygotie 10q23. Ces altérations peuvent également être retrouvées dans des cas d'endométriose, d'endométriose atypique et de carcinome endométrioïde ovarien. Les carcinomes endométrioïdes et à cellules claires peuvent également présenter des mutations des récepteurs au TGF- $\beta$ , ainsi qu'une instabilité microsatellitaire, qui sont rarement observées dans les autres carcinomes, évoquant des précurseurs communs entre ces deux types de tumeurs.

### c) *Les tumeurs de type II*

Les tumeurs de type II correspondent à des tumeurs d'emblée de haut grade qui pourraient se développer à partir de l'épithélium de surface. Elles regroupent les carcinomes séreux de haut grade, des tumeurs malignes mésodermiques mixtes et des carcinomes indifférenciés. Ces carcinomes sont rarement associés à des lésions précurseurs morphologiquement reconnaissables (peu de cystadénomes ou tumeurs borderlines associés). Ainsi, ils pourraient se développer *de novo* à partir de l'épithélium de surface ou des kystes d'inclusion de l'ovaire avec un passage rapide du stade de carcinome microscopique à un carcinome cliniquement diagnostiqué. Cependant, les carcinomes séreux *in situ* tubaires (STIC) ont été récemment décrits comme pouvant être les potentiels précurseurs des carcinomes séreux de haut grade, venant contredire une caractéristique des cancers de type II.

Les tumeurs de type II ont une croissance rapide, un taux de prolifération cellulaire important (augmentation du marquage du Ki-67) et une agressivité clinique supérieure aux carcinomes séreux de bas grade. Contrairement aux tumeurs de type I, ces carcinomes de type II sont généralement diagnostiqués à des stades avancés. Les tumeurs de type II sont plus agressives et leur prolifération est plus importante.

Au niveau moléculaire, les mutations des gènes *BRAF* et *KRAS* sont très rares pour les tumeurs ovariennes de type II contrairement au type I. Les carcinomes de type II sont génétiquement instables avec la présence de mutations du gène *TP53* (>90%).

Les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2* prédisposent aux tumeurs ovariennes de type II. De manière intéressante, l'analyse des ovaires retirés prophylactiquement chez des femmes mutées *BRCA* a montré, dans des carcinomes séreux microscopiques très précoces, une mutation de *TP53* entraînant une surexpression de la protéine p53 mutée dans tous les carcinomes séreux invasifs de haut grade et dans les épithéliums de surface dysplasiques adjacents. Ainsi, les mutations de *BRCA* pourraient prédisposer l'épithélium ovarien de surface et les kystes d'inclusion à la transformation néoplasique par une augmentation de l'instabilité génétique. Les tumeurs ovariennes présentant une mutation de *BRCA*, qu'elle soit germinale ou somatique, ont des caractéristiques cliniques pathologiques indiscernables, suggérant une oncogenèse similaire.

D'autres altérations génétiques moléculaires ont également été retrouvées dans les carcinomes séreux de haut grade comme une amplification ou une surexpression du gène *HER2*, d'*AKT2*, alors qu'elles sont très rares dans les cancers de type I.

De même, les profils d'expression génique diffèrent généralement entre les carcinomes séreux de haut grade et ceux de bas grade. A titre d'exemple, une surexpression du système HLA-G et des apolipoprotéines E est retrouvée dans la plupart des carcinomes séreux de haut grade, mais rarement chez les carcinomes séreux de bas grade.

Ainsi cette classification permet de regrouper les tumeurs ovariennes selon deux théories distinctes sur le développement des tumeurs. Cependant, cette classification ne permet pas d'obtenir des informations sur la survie globale, qui n'est pas significativement différente entre les 2 groupes. En effet, une très grande hétérogénéité est observée en terme de survie dans le groupe des tumeurs de type I. Ainsi, cette classification en type I et type II peut uniquement être utilisée dans le but de décrire l'oncogenèse ovarienne mais ne permet pas d'obtenir de valeur pronostique ou d'orienter sur l'attitude thérapeutique à adopter.

## 5) Stadification

La stadification utilisée dans les cancers ovariens est la classification de la Fédération internationale de Gynécologie-Obstétrique (FIGO) révisée en 2014 (Tableau 2). Elle se rapproche de la classification TNM, prenant en compte la tumeur (T), les ganglions lymphatiques (N) et les métastases (M). La classification FIGO utilise 4 stades selon la localisation et l'extension de la tumeur. Le stade I correspond à une maladie confinée aux ovaires, le stade II à une maladie localisée au pelvis, le stade III comprend une atteinte péritonéale et le stade IV correspond à la présence de métastases à distance notamment des localisations viscérales<sup>28</sup>. Les stades I et II sont décrits comme des stades « précoces », alors que les stades III ou IV sont des stades dit « avancés ». Malheureusement, le diagnostic est généralement posé à un stade avancé, dû notamment aux signes cliniques qui sont peu nombreux et aspécifiques. Le stade est généralement déterminé lors d'une coelioscopie exploratrice visant à obtenir un bilan d'extension péritonéale. Le stade influence fortement la survie des patientes. En effet, le taux de survie globale à cinq ans est d'environ 80 % au stade I alors qu'il est inférieur à 20 % dans les stades avancés<sup>28</sup>.

#### *a) Stade I*

Le stade I des cancers ovariens est confiné à 1 (IA) ou 2 (IB) ovaires ou trompes de Fallope et aux liquides péritonéaux (ascite ou lavages péritonéaux). Dans le cas de rupture de la tumeur ou de l'atteinte de la surface par des cellules tumorales, le cancer ovarien est classé en stade IC. Il n'est pas possible d'avoir un cancer péritonéal au stade I<sup>29,30</sup>. Les patientes atteintes de cancer ovarien sont rarement diagnostiquées à ce stade.

#### *a) Stade II*

Le stade II des cancers ovariens est parfois difficile à définir. Il comprend des tumeurs hétérogènes dont certaines sont curables. Ainsi, certaines se sont directement étendues aux organes adjacents tout en n'ayant pas encore métastasé, alors que d'autres ont essaimé le péritoine pelvien par métastase. Dans le stade II, la tumeur concerne un ou deux ovaires ou trompes de Fallope avec des extensions pelviennes directes. Le stade IIA présente des implants à la surface de l'utérus ou des implants sur les trompes de Fallope ou une combinaison de ces caractéristiques. Le stade IIB s'étend à d'autres tissus intra-péritonéaux pelviens. Environ 10% des cancers des ovaires sont diagnostiqués à ce stade<sup>29,30</sup>.

Tableau 2 : Classification FIGO 2014 des cancers ovariens comparée à la classification TNM

| Classification TNM |                    |           | Stades FIGO      | Définition   |
|--------------------|--------------------|-----------|------------------|--|
| T                  | N                  | M         |                  |  |
| <b>T1</b>          | <b>N0</b>          | <b>M0</b> | <b>Stade I</b>   | <b>Tumeur limitée aux ovaires (un ou les 2) ou aux trompes de Fallope</b>  |
| T1a                | N0                 | M0        | IA               | tumeur limitée à un seul ovaire ou trompe de Fallope; capsule intacte, sans tumeur à la surface de l'ovaire ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal  |
| T1b                | N0                 | M0        | IB               | tumeur limitée aux deux ovaires ou trompes ; capsules intactes, sans tumeur à la surface de l'ovaire ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal   |
| T1c                | N0                 | M0        | IC               | tumeur limitée à 1 ou aux 2 ovaires ou trompes, avec soit rupture capsulaire, soit tumeur à la surface des ovaires, soit cellules malignes présentes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal<br><ul style="list-style-type: none"> <li>● IC1 : rupture peropératoire</li> <li>● IC2 : rupture préopératoire ou végétations en surface</li> <li>● IC3 : cellules malignes dans l'ascite ou le liquide de lavage péritonéal.</li> </ul>                               |
| <b>T2</b>          | <b>N0</b>          | <b>M0</b> | <b>Stade II</b>  | <b>Tumeur intéressant 1 ou les 2 ovaires avec extension pelvienne</b>  |
| T2a                | N0                 | M0        | II A             | extension et/ou greffes utérines et/ou tubaires ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou le liquide de lavage péritonéal   |
| T2b                | N0                 | M0        | II B             | extension à d'autres organes pelviens ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou le liquide de lavage péritonéal   |
| <b>T3</b>          | <b>N0 et/ou N1</b> | <b>M0</b> | <b>Stade III</b> | <b>Tumeur de l'ovaire avec extension péritonéale abdominale et/ou ganglionnaire rétropéritonéale</b>   |
| T3a                | N0                 | M0        | IIIA             | métastases rétro-péritonéales microscopiques ± péritoine :<br><ul style="list-style-type: none"> <li>● IIIA1 : adénopathie rétropéritonéale seule (prouvé par cytologie/histologie) <ul style="list-style-type: none"> <li>- (i) : foyer adénocarcinomateux dans l'adénopathie ≤ 10 mm</li> <li>- (ii) : foyer adénocarcinomateux dans l'adénopathie &gt;10 mm</li> </ul> </li> <li>● IIIA2 : extension péritonéale microscopique extra-pelvienne ± adénopathies.</li> </ul> |
| T3b                | N0                 | M0        | IIIB             | métastases péritonéales extra-pelviennes ≤ 2 cm ± adénopathies   |
| T3c                | N0 et/ou N1        | M0        | IIIC             | métastases péritonéales extra-pelviennes >2 cm ± adénopathies  |
| <b>Tous T</b>      | <b>Tous N</b>      | <b>M1</b> | <b>Stade IV</b>  | <b>Métastases à distance (à l'exclusion des métastases péritonéales)</b>   |

### b) *Stade III*

Le stade III correspond à l'atteinte d'un ou des deux ovaires avec une dissémination péritonéale cytologiquement ou histologiquement prouvée au niveau extra-pelvien ou présentant des métastases au niveau des ganglions lymphatiques rétropéritonéaux, ou une association de ces deux situations. La plupart des cancers de l'ovaire sont des adénocarcinomes sévères de haut grade qui sont habituellement diagnostiqués au stade III (stade IIIC dans plus de 80% des cas). Ces tumeurs se propagent de manière caractéristique le long des surfaces péritonéales, impliquant à la fois le péritoine pelvien et abdominal, y compris l'omentum, les surfaces du gros intestin et de l'intestin grêle, le mésentère, les gouttières paracoliques, le diaphragme et les surfaces péritonéales du foie et de la rate. Des atteintes des ganglions lymphatiques et la présence d'ascite sont retrouvées dans la majorité des cas<sup>29,30</sup>.

### c) *Stade IV*

Les cancers de stade IV sont définis comme les tumeurs ovariennes présentant des métastases à distance. Ce stade comprend les patientes atteintes d'épanchement pleural avec une cytologie positive (stade IVA). Le stade IVB correspond à la présence de métastases au niveau du parenchyme hépatique et splénique, ainsi que des métastases extra-abdominales, comme l'atteinte des ganglions lymphatiques inguinaux et supraclaviculaires, ainsi que l'atteinte transmurale des structures viscérales (stade IVB). Environ 12% à 21% des patientes atteintes de cancer ovarien sont au stade IV<sup>29,30</sup>.

Les taux de survie à 5 ans et de récurrences sont différents selon les stades. En effet, plus le stade est avancé, plus la survie à 5 ans diminue et plus le taux de récurrence augmente (Tableau 3).

Tableau 3 : Répartition des patientes au moment du diagnostic, taux de survie et de récurrence en fonction du stade

| Stade                       | Stade I  | Stade II | Stade III  | Stade IV |
|-----------------------------|--|----------|--|----------|
| Patientes au diagnostic (%) | 27   | 12       | 40   | 21       |
| Survie à 5 ans (%)          | 80   | 59       | 22   | 14       |
| Récurrence (%)              | Dépend du grade :<br>< 5 (IA, IB, bas grades)<br>20 (haut grade) | 30       | Dépend du résidu après cytoréduction :<br>50 à 60 : résidu < 1cm<br>70 à 80 : résidu > 1cm | 80 à 90  |

## 6) Traitements

Les traitements des tumeurs ovariennes dépendent principalement du type histologique, du stade et du grade de la tumeur. Cependant, d'autres paramètres peuvent influencer le choix du traitement, tels que la résectabilité, les anomalies génétiques et l'état général de la patiente.

Les traitements décrits dans ce chapitre se focaliseront uniquement sur les recommandations françaises concernant la prise en charge des carcinomes ovariens qui représentent le type de cancer ovarien le plus fréquent.

Un bilan préthérapeutique est nécessaire pour déterminer la stratégie. Ce bilan comporte le diagnostic histologique, l'évaluation de l'extension tumorale (bilan biologique, marqueurs, imagerie, coelioscopie, stadification FIGO), l'évaluation de l'état général (opérabilité). Il permet ainsi d'orienter la stratégie thérapeutique, notamment sur la faisabilité d'une chirurgie

d'exérèse première. Avant tout traitement, la stratégie doit être validée en réunion de concertation pluridisciplinaire<sup>15</sup>.

Le traitement standard comporte une exérèse chirurgicale complète des lésions par laparotomie médiane, puis une chimiothérapie adjuvante comprenant 6 cycles à base de carboplatine et paclitaxel. Si le bilan initial détermine qu'une chirurgie complète d'emblée n'est pas envisageable, une chirurgie d'intervalle peut être envisagée après réalisation de trois à quatre cures de chimiothérapie néo-adjuvante à base également de carboplatine et de paclitaxel<sup>15</sup>.

### *a) Principes des traitements*

#### *(i) La chirurgie*

Le traitement curatif des carcinomes ovariens nécessite une intervention chirurgicale. Le but de la chirurgie est une cytoréduction complète sans résidu macroscopique, que ce soit pour une chirurgie première ou d'intervalle. La cœlioscopie exploratrice réalisée lors du bilan préthérapeutique permet d'évaluer la résecabilité et d'anticiper les gestes à réaliser afin de déterminer si la chirurgie pourra être complète d'emblée ou si un traitement néo-adjuvant est nécessaire avant de réaliser une chirurgie d'intervalle. La chimiothérapie néoadjuvante ne se discute qu'à partir du stade FIGO IIIC, non opérable d'emblée. Dans les stades inférieurs, une chirurgie complète première doit être réalisée (sauf mauvais état général).

L'intervention correspond à une laparotomie médiane xiphopubienne. Les gestes à réaliser systématiquement sont une cytologie péritonéale, une hystérectomie totale non conservatrice, une omentectomie infra-gastrique et une appendicectomie. Afin de réaliser une chirurgie complète, ces gestes peuvent être associés à une résection de toutes les lésions macroscopiques, des péritonectomies ciblées, des résections digestives et des résections viscérales. Si la chirurgie complète est possible, la réalisation de curages ganglionnaires pelviens et aortico-caves remontant jusqu'à la veine rénale gauche est indiquée<sup>31</sup>. Cependant, cette pratique pourrait être rediscutée au vue des données d'une étude présentée lors du congrès de l'« American Society of Clinical Oncology 2017» montrant une augmentation de la morbidité due aux curages ganglionnaires sans gain au niveau de la survie globale ou de la survie sans progression.

Après la chirurgie, les comptes-rendus opératoires doivent mentionner l'index de carcinose péritonéale ainsi que l'existence ou non de reliquats tumoraux et, si oui, leurs localisations et leurs tailles doivent être précisées<sup>15</sup>.

#### *(ii) La chimiothérapie : molécules utilisées et mécanismes d'action*

La chimiothérapie est, dans la plupart des cas, utilisée en association avec la chirurgie dans le traitement des cancers ovariens. Les molécules de chimiothérapie présentées ci-dessous correspondent aux principaux médicaments antitumoraux utilisés dans le traitement des adénocarcinomes ovariens.

❖ *Le carboplatine : famille des sels de platine ou organoplatines*

Les sels de platine, tels que le carboplatine, le cisplatine ou l'oxaliplatine appartiennent à la famille des agents alkylants. Les agents alkylants sont des molécules fortement électrophiles capables d'interagir avec des composés possédant des radicaux nucléophiles tels que les groupements -SH, -OH, -COOH ou -NH<sub>2</sub> retrouvés notamment dans les acides nucléiques. Les agents alkylants représentent la plus ancienne classe de médicaments anticancéreux. Le développement de ces médicaments est consécutif à la constatation des effets du gaz moutarde utilisé lors de combats. Ces molécules peuvent alkyler, c'est-à-dire ajouter un groupement hydrocarboné, de façon covalente au niveau des bases de l'acide désoxyribonucléique (ADN). La liaison covalente peut être monovalente ou bivalente. Cette alkylation induit une cytotoxicité notamment sur les cellules ayant un fort taux de multiplication comme les cellules tumorales. En effet, les agents alkylants altèrent des processus indispensables à la division cellulaire, en particulier la réplication et la transcription, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire. De plus, les lésions induites par cette alkylation produisent souvent des cassures simple ou double-brins induisant l'entrée en apoptose de la cellule. Les sels de platine exercent leur activité cytotoxique par formation de ponts intra ou inter-brins en se fixant préférentiellement sur les guanines<sup>32</sup>. Les sels de platine, et notamment le carboplatine, sont les chimiothérapies de référence des cancers ovariens. La sensibilité au platine joue un rôle primordial dans le pronostic des patientes. Selon les situations, le carboplatine peut être utilisé dans le traitement du cancer ovarien en association (paclitaxel, gemcitabine, doxorubicine liposomale pégylée, bévacizumab) ou en monothérapie.

❖ *Le paclitaxel : famille des poisons du fuseau*

Lors de la mitose, un système dynamique permet la migration des chromatides, c'est le fuseau mitotique. Il permet la séparation des deux lots de chromosomes fils vers chacun des deux pôles de la cellule. Ce fuseau est constitué d'un réseau dynamique de microtubules émanant du centrosome. La polymérisation et la dépolymérisation des microtubules permettent la régulation de la longueur des fuseaux. L'équilibre, entre la tubuline sous forme d'hétérodimères et la forme polymérisée des microtubules, est extrêmement sensible. Les poisons du fuseau mitotique, utilisés en oncologie, vont empêcher la migration correcte des chromosomes en inhibant soit la polymérisation soit la dépolymérisation des microtubules.

Les taxanes inhibent la dépolymérisation des microtubules du fuseau mitotique. Les taxanes, tels que le paclitaxel, le docétaxel et le cabazitaxel, dérivent de composés issus d'un arbre, l'if. Les taxanes entraînent la formation de microtubules plus stables qui formeront à leur tour des fuseaux mitotiques plus stables qui ne pourront pas se désassembler durant l'anaphase. Ces antimitotiques conduisent à la mort cellulaire. Le paclitaxel est une molécule importante de l'arsenal thérapeutique du cancer ovarien. Il peut être utilisé en monothérapie ou en association avec un sel de platine (+/- bévacizumab).

❖ *Le bévacizumab : famille des anti-angiogéniques*

Le bévacizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui se fixe au VEGF afin d'inhiber sa fixation sur son récepteur entraînant une régression de certains vaisseaux tumoraux existants et en inhibant la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux, empêchant ainsi la croissance tumorale. Le mécanisme sera décrit plus précisément dans la partie I) 4) b) (i) sur le ciblage des cellules endothéliales vasculaires. Le bévacizumab peut être utilisé en complément de l'association carboplatine/paclitaxel ou carboplatine/gemcitabine (cf. schéma thérapeutiques ci-dessous).

❖ *La gemcitabine : famille des antimétabolites*

Les molécules de la famille des antimétabolites interfèrent avec la synthèse de l'ADN. Par inhibition enzymatique, par déplétion en acides aminés ou en se comportant comme leurre, les antimétabolites vont affecter la phase S du cycle cellulaire et empêcher la mitose.

Les bases pyrimidiques, la cytosine, l'uracile et la thymine, sont essentielles à la synthèse d'ADN. Les anti-pyrimidiques sont des analogues des bases pyrimidiques. Ainsi, ils peuvent agir comme des leurres biochimiques en prenant la place des bases pyrimidiques sur l'ADN ou l'acide ribonucléique (ARN) en cours de synthèse. Leur fixation a un effet terminateur de chaîne, inhibant ainsi la réplication et la transcription.

La gemcitabine est un analogue de la dé-oxy-cytidine qui peut être utilisée dans le traitement des récurrences des cancers ovariens, soit en monothérapie (rechute précoce) soit en association avec le carboplatine (rechute tardive).

❖ *La doxorubicine et le topotécan : famille des inhibiteurs de topoisomérase*



Au cours de la réplication, le déplacement de la fourche de réplication entraîne des tensions au niveau de la partie encore enroulée de l'ADN de plus en plus fortes et conduit à des surenroulements. Le degré de surenroulement peut induire des cassures de l'ADN d'où l'action des topoisomérase I et II dans sa régulation.

La topoisomérase I est une enzyme capable de réguler le surenroulement de l'ADN en entraînant des cassures simple-brins transitoires. Cette enzyme se lie au squelette phosphate d'un des brins d'ADN. Après hydrolyse, le brin d'ADN va pouvoir se dénouer en faisant le tour de l'autre brin puis la topoisomérase I permet la religation du brin d'ADN.

Les inhibiteurs de topoisomérase I, tels que le topotécan, stabilisant le complexe covalent topoisomérase I / ADN (ayant une cassure monobrin), induisent des lésions monocaténares et inhibent la religation de l'ADN. Ces inhibiteurs agissent donc au niveau de la phase S du cycle cellulaire.

La topoisomérase II est également impliquée dans la régulation de la torsion et du surenroulement de l'ADN. Elle induit des cassures double-brins de l'ADN afin de réguler la torsion et l'enroulement de l'ADN. Les inhibiteurs de topoisomérase II vont se placer dans le sillon de l'ADN et former un complexe avec la topoisomérase II et l'ADN, entraînant un blocage de la transcription et de la réplication de l'ADN. Les inhibiteurs de topoisomérase II peuvent être séparés en sous-classes. Les anthracyclines, telles que la doxorubicine, peuvent s'intercaler dans l'ADN entraînant une détorsion qui conduit au recrutement de la topoisomérase II. La doxorubicine liposomale pégylée (DLP), contient de la doxorubicine à l'intérieur de liposomes pégylés réduisant la vitesse de dégradation de la doxorubicine et augmentant sa demi-vie. Cette encapsulation permet également de diminuer certains effets indésirables en limitant ses effets sur les cellules et les tissus non tumoraux.

La DLP et le topotécan peuvent être utilisés en monothérapie lors de récurrences précoces de cancers ovariens. La DLP peut également être utilisée dans les traitements des cancers ovariens lors des récurrences tardives en association avec le carboplatine ou la trabectédine.

#### ❖ *La trabectédine*

La trabectédine se lie au petit sillon de l'ADN inclinant ainsi l'hélice vers le grand sillon. Cette adduit sur l'ADN se fixe sur un membre du système de réparation par excision de nucléotide (NER) induisant une cassure double-brin<sup>33</sup>. La fixation de la trabectédine sur l'ADN déclenche également une cascade d'événements qui affectent plusieurs facteurs de transcription et des protéines fixant l'ADN, perturbant ainsi le cycle cellulaire<sup>34</sup>. En plus des dommages directs sur l'ADN des cellules tumorales, il semble que la trabectédine inhiberait les signaux immunitaires du microenvironnement de la tumeur<sup>35</sup>.

La trabectédine peut être utilisée dans les récurrences tardives des cancers ovariens en association avec la DLP.

### ❖ *L'olaparib : famille des inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase*

Chaque jour, l'ADN subit une multitude de dommages conduisant à des cassures simple ou double-brins, des modifications de bases, *etc.* Plusieurs systèmes de réparation de l'ADN sont retrouvés dans les cellules humaines. Certains cancers héréditaires sont dus à une altération d'un des systèmes de réparation de l'ADN. Par exemple, une mutation de *BRCA1* ou de *BRCA2* conduit à une prédisposition génétique aux cancers du sein et de l'ovaire. Les protéines codées par *BRCA1* et *BRCA2* sont impliquées dans le mécanisme de réparation des cassures double-brins de l'ADN par recombinaison homologue. Une mutation de ces gènes entraîne la production de protéines non-fonctionnelles à l'origine d'une instabilité génétique responsable d'une augmentation du risque de développer un cancer.

Une façon de cibler les cellules tumorales présentant cette anomalie génétique est d'utiliser le principe de létalité synthétique. La létalité synthétique consiste à combiner deux événements non létaux individuellement qui vont, par synergie, entraîner la mort cellulaire. Pour cela, les cibles visées doivent être complémentaires.

Ainsi, dans les cellules mutées pour *BRCA1* ou *BRCA2*, dont le système de réparation des cassures double-brins est altéré, une des stratégies est de bloquer le système de réparation par excision de bases (BER) prenant en charge des cassures simple-brins. En inhibant la Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), le processus de réparation des cassures simple-brins est bloqué. Au cours de la réplication, ces cassures simple-brins deviendront des cassures double-brins lorsque les fourches de réplication rencontreront l'adduit PARP-ADN. Dans des cellules ayant un déficit du système de recombinaison homologue (mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* notamment), ces cassures ne seront pas réparées et conduiront à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et à l'apoptose. En effet, les systèmes alternatifs de réparation de cassures double-brins, comme la « jonction des extrémités non homologues » (NHEJ), sont plus sujets à erreur et entraînent donc une instabilité génomique conduisant à la mort cellulaire. Ainsi, les inhibiteurs de PARP tel que l'olaparib sont indiqués dans les récives tardives du cancer ovarien en présence de mutation de *BRCA* germinale ou somatique.

### *b) Les résistances à la chimiothérapie*

La résistance à la chimiothérapie est une problématique majeure dans de nombreux cancers, notamment le carcinome ovarien.

Dans les adénocarcinomes ovariens, la résistance aux sels de platine est un facteur pronostique mais également prédictif de la réponse à la prochaine ligne de chimiothérapie<sup>36</sup>. Certaines maladies deviennent résistantes au platine après une ou plusieurs rechutes sensibles à un traitement avec un sel de platine. Ainsi, les mécanismes de résistances secondaires seraient probablement différents de ceux observés lors d'une résistance primaire au traitement.

## (i) Les mécanismes généraux de la résistance aux chimiothérapies

### ❖ *La résistance pharmacocinétique*

De nombreux médicaments sont distribués dans le corps et par conséquent au niveau tumoral *via* le sang. Ainsi, une résistance impliquant la pharmacocinétique peut se produire dans les cas où la tumeur est inaccessible pour les médicaments anti-tumoraux du fait d'une faible vascularisation ou d'un débit sanguin insuffisant et d'une pression interstitielle élevée<sup>37-40</sup>. Il peut y avoir également des difficultés d'accès en terme de localisation, par exemple quand le médicament nécessite un passage de la barrière hémato-encéphalique<sup>41</sup>. Un autre facteur influençant est la variation interindividuelle. En effet, les paramètres pharmacocinétiques comme l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'excrétion influencent significativement l'efficacité ou la toxicité des médicaments. Au niveau interindividuel, ces paramètres peuvent varier selon des facteurs génétiques, l'âge, le sexe, le poids, l'état des fonctions rénale et hépatique ou en fonction de l'administration (moment, durée, *etc.*)<sup>42-44</sup>. Tous ces facteurs peuvent conduire à une résistance aux chimiothérapies chez certains patients (par exemple, inactivation de médicaments par un métabolisme plus rapide).

### ❖ *La résistance pharmacodynamique*

La résistance pharmacodynamique peut impliquer différents mécanismes, chacun comprenant différents processus. Un de ces mécanismes est d'empêcher le médicament d'atteindre sa cible thérapeutique. D'autres mécanismes pharmacodynamiques liés à la résistance peuvent être dus à une modification au niveau de la cible (par des changements dans les niveaux d'expression ou de mutations de gènes). Enfin, certains mécanismes se situent post-cible, inhibant l'effet des médicaments<sup>45-47</sup>.

### ❖ *La résistance en amont de la cible*

Il existe plusieurs façons d'empêcher un médicament d'atteindre sa cible thérapeutique. Ceux-ci incluent le passage de la membrane cellulaire par le médicament, comme une diminution de l'expression des transporteurs impliqués dans l'entrée du médicament dans la cellule. En outre, l'efflux des médicaments est également impliqué. En effet, la surexpression des protéines d'efflux, par exemple les protéines de « multi drug resistance » (MDR) ou la glycoprotéine-P (Pgp), entraînent un flux plus important de médicament du cytoplasme des cellules cancéreuses vers l'environnement extracellulaire et une concentration intracellulaire insuffisante pour permettre un effet sur sa cible. Ces mécanismes de résistance pré-cible impliquent également

une activation ou une inactivation du médicament<sup>45-47</sup>. Ainsi, une réduction de l'activation métabolique des pro-médicaments peut entraver l'acquisition de leur potentiel anti-tumoral, tels que la cytarabine, le 5-FU, le méthotrexate, la doxorubicine, *etc.* De même, une augmentation de l'inactivation d'un médicament, peut-être non spécifique (comme par le glutathion ou les métallothionéines) ou spécifique (tels que le 5-FU par la dihydropyrimidine déshydrogénase, la cytarabine par la cytidine désaminase et la bléomycine par hydrolase). Ces mécanismes peuvent ainsi conférer une résistance aux médicaments<sup>45-47</sup>.

#### ❖ *La résistance au niveau de la cible*

Nous pouvons observer une résistance médiée par des modifications de la cible. Ces dernières peuvent être induites par des changements qualitatifs. On peut citer le cas de la  $\beta$ -tubuline de classe III (une protéine des microtubules de la famille de la tubuline) qui est exprimée au détriment de sa forme classique, ce qui conduit à une résistance aux médicaments dirigée contre la tubuline comme les taxanes et les vinca-alcaloïdes<sup>48</sup>. Les changements de la topoisomérase II (cette enzyme est capable de provoquer des cassures double-brins pour moduler les surenroulements de l'ADN) confèrent une résistance aux anthracyclines et une activité enzymatique accrue de la thymidylate synthétase (enzyme impliquée dans la synthèse de thymine) résultant en une résistance au 5-FU. Les modifications quantitatives de la cible, qui peuvent être soit liées à une augmentation de son expression due soit à une surexpression, soit à une amplification génique, ou dans certains cas une diminution de son expression, peuvent également altérer l'efficacité du médicament. Dans le cas des molécules de liaison à l'ADN, une surexpression des mécanismes de réparation de l'ADN (par exemple, une augmentation de l'« excision repair cross-complementation group 1 » (ERCC1) conférant une résistance aux agents alkylants ou aux sels de platine) est impliquée dans des mécanismes de résistance situés au niveau de la cible<sup>45-47</sup>.

#### ❖ *La résistance en aval de la cible*

Même si le médicament atteint correctement sa cible, plusieurs mécanismes de résistance peuvent se produire à ce stade. L'un d'eux consiste en un défaut d'entrée de la cellule en apoptose. En effet, certaines chimiothérapies conduisent les cellules à entrer en apoptose après avoir atteint leur cible. Cependant, les cellules peuvent être résistantes à cette voie de mort cellulaire par l'expression accrue de protéines anti-apoptotiques (cellular-inhibitor of apoptosis protein (cIAP)-1/2, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), *etc.*), par une perte de fonction de p53 (facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'apoptose), mais aussi par d'autres mécanismes tels que l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire<sup>45-47</sup>. Une modification du cycle cellulaire peut également être impliquée dans la résistance post-cible. En effet, en particulier pour les agents cytotoxiques ciblant les cellules à division rapide, le

ralentissement ou l'arrêt du cycle cellulaire comme l'état de quiescence et/ou de sénescence peut conduire à une résistance au traitement malgré le fait que les médicaments atteignent leurs cibles<sup>45-47</sup>.

Ces dernières années, de nombreux travaux montrent que la résistance aux médicaments implique non seulement des modifications génétiques des cellules cancéreuses, mais aussi des modifications phénotypiques des cellules tumorales dues à leur microenvironnement. En effet, il a été suggéré que les interactions entre les cellules tumorales et, à la fois la matrice extracellulaire et les cellules stromales sont importantes dans l'acquisition de la chimiorésistance. Parmi les cellules du microenvironnement, les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) sont capables d'induire une résistance aux médicaments dans de nombreux cancers (Tableaux 8 à 13).

(ii) La classification des rechutes : sensibles / résistantes / réfractaires

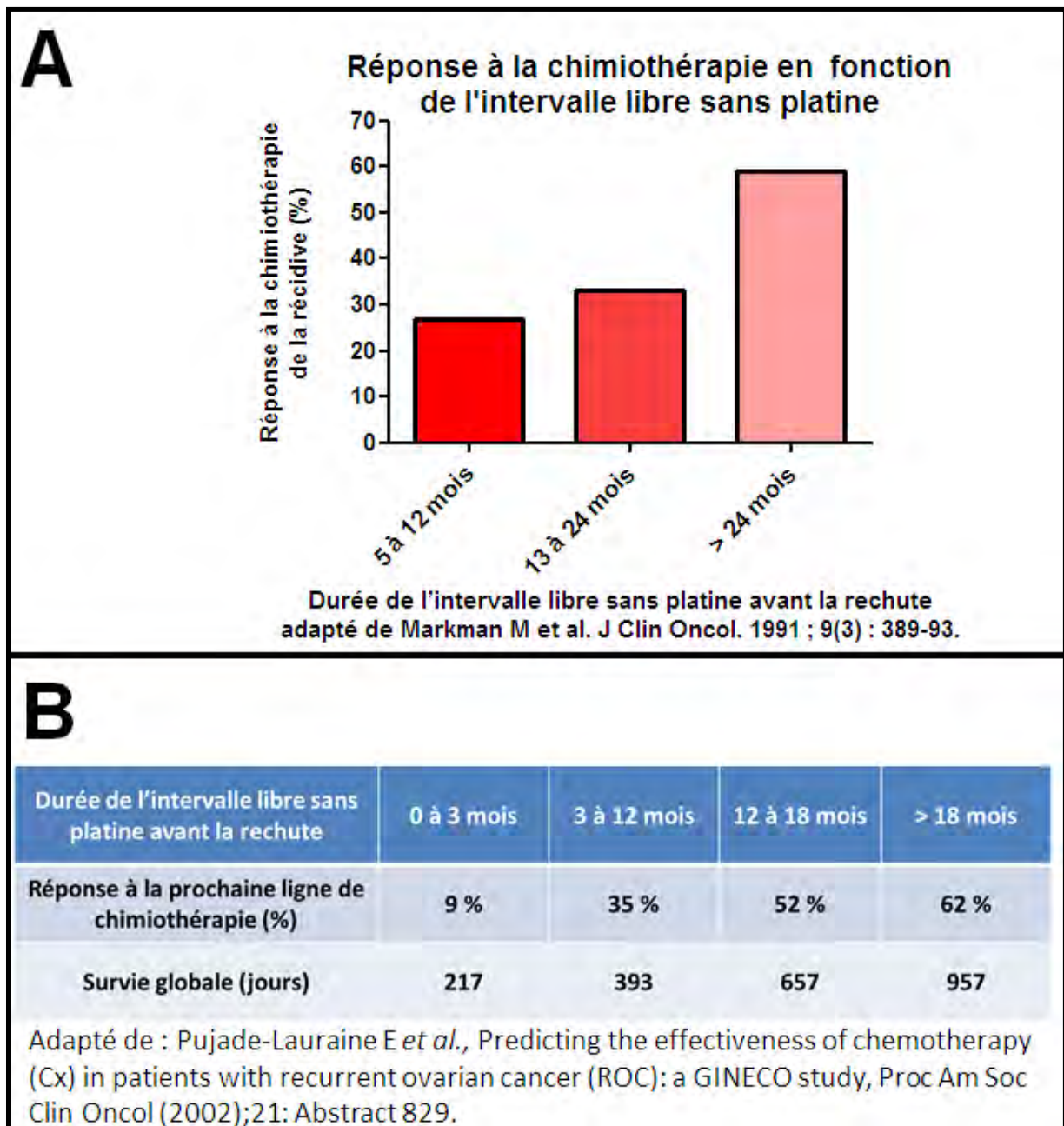
La classification de la rechute est obtenue selon la durée de l'intervalle libre sans platine, c'est-à-dire le temps entre la date de la dernière dose de platine et la date de la rechute. Les cancers dont la récurrence est supérieure à 12 mois sont considérés comme pleinement sensibles au platine. Si la récurrence se situe entre 6 et 12 mois après la dernière dose de platine, elle est classée comme partiellement sensible (ou de sensibilité intermédiaire). Dans les cas où la récurrence est inférieure à 6 mois, elle est considérée comme résistante. Enfin, les tumeurs sont classées comme réfractaires au platine si elles progressent pendant la dernière ligne de traitement avec un platine ou si une récurrence est observée dans les 4 semaines suivant la dernière dose de platine (Tableau 4).

Tableau 4 : Classification des rechutes selon la durée de l'intervalle libre sans platine avant récurrence

| Classification des rechutes                               | Réfractaires                                  | Résistantes | Partiellement sensibles | Pleinement sensibles |
|---|---|-------------|-------------------------|----------------------|
| Durée de l'intervalle libre sans platine avant la rechute | < 1 mois ou progression pendant le traitement | 1 à 6 mois  | 6 à 12 mois             | > 12 mois            |

La durée de l'intervalle libre sans sel de platine avant rechute est un facteur prédictif de la réponse au traitement chimiothérapeutique de la récurrence. En effet, plus la récurrence sera tardive, plus la survie globale sera prolongée et plus la tumeur répondra à la chimiothérapie utilisée lors de la récurrence<sup>36</sup> (Figure 2).

Figure 2 : taux de réponse à la chimiothérapie de la récurrence et survie globale en fonction de la durée de l'intervalle libre sans platine



Cependant, la classification des rechutes est rediscutée à ce jour. Le traitement à base de platine reste le traitement de référence et l'intervalle sans platine doit rester documenté. Néanmoins, compte tenu de la relation linéaire entre « l'intervalle libre sans platine » et la sensibilité au platine, les recommandations pourraient utiliser la chimiothérapie primaire en tant que variable continue, plutôt que d'adopter une définition arbitraire de la maladie « sensible au platine » ou « résistant au platine » sur la base d'un seul point de temps fixe (exemple : 6 mois)<sup>49</sup>. De plus,

du fait de l'introduction de nouvelles thérapeutiques utilisées en traitements de maintenance (anti-angiogéniques et inhibiteurs de PARP), cette classification pourrait intégrer de nouveaux critères comme « l'intervalle libre sans traitement ». Des données concernant la possibilité de réaliser une nouvelle cytoréduction complète pourrait également compléter cette classification. Enfin, le sous-type histologique, comportant notamment ses anomalies génétiques et moléculaires, pourrait également être pris en compte<sup>49</sup>.

### *c) Le primo-traitement*

Une chimiothérapie adjuvante est indiquée pour tous les types et stades d'adénocarcinomes ovariens sauf pour les stades IA ou IB de carcinomes de bas grade (séreux bas grade et endométrioïde grade 1), où le traitement est uniquement chirurgical..

Le schéma de chimiothérapie de référence reste, à ce jour, l'association carboplatine (AUC 5-6) et paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) par voie intraveineuse, administrée toutes les 3 semaines. En post-opératoire, la chimiothérapie doit être débutée dès cicatrisation<sup>15</sup>.

Si une chirurgie première est réalisée, cette association carboplatine et paclitaxel sera instaurée de façon adjuvante pour un total de six cures. Si la tumeur n'est pas résécable d'emblée (discuté uniquement à partir du stade IIIC), cette association sera débutée en situation néo-adjuvante (3 à 4 cycles) puis continuée après la chirurgie d'intervalle pour un total de 6 à 8 cures.

Le bévaccizumab dispose d'une AMM dans l'adénocarcinome ovarien pour le traitement de première ligne (mais également pour les récurrences)<sup>34</sup>. Cependant, certaines recommandations limitent son utilisation uniquement à deux situations : lorsqu'il persiste un résidu tumoral macroscopique après chirurgie de cytoréduction initiale pour les stades FIGO IIIB à IV et dans les stades IIIC-IV jugés définitivement non résécables de façon complète en réunion de concertation pluridisciplinaire<sup>15</sup>. Il est utilisé en association avec le carboplatine et le paclitaxel. Il est utilisé à la dose de 15 mg/kg toutes les 3 semaines durant 15 mois (soit 22 cycles au total).

Les alternatives au schéma de traitement de référence utilisent les mêmes molécules mais avec des schémas d'administration différents. Le schéma de dose-intensité du paclitaxel (80 mg/m<sup>2</sup> hebdomadaire J1-J8-J15) associé au carboplatine (AUC 6) toutes les 3 semaines, permet d'augmenter la dose de paclitaxel et pourrait améliorer la survie sans progression (résultats différents selon les études) mais au prix d'une augmentation des toxicités. Le schéma d'administration hebdomadaire du carboplatine (AUC 2, J1-J8-J15) et du paclitaxel (60 mg/m<sup>2</sup>, J1-J8-J15) pourrait permettre de diminuer les toxicités sans diminuer l'efficacité du traitement de référence. Une autre alternative est de proposer ces mêmes chimiothérapies mais en les administrant par voie intrapéritonéale (i.p.) séquentielle.

Pour tous ces schémas de traitement, il n'y a pas d'intérêt à prolonger la chimiothérapie au-delà de 6 à 9 cycles.

#### *d) Le traitement de la récurrence précoce*

La récurrence précoce, qu'elle soit primaire ou secondaire, et après une ou plusieurs lignes de traitement avec un sel de platine, est définie comme une récurrence apparue moins de 6 mois après la dernière dose de platine, c'est à dire réfractaire ou résistante. Ainsi, certaines maladies deviennent résistantes au platine après une ou plusieurs rechutes sensibles à un traitement à base de sel de platine.

Plus la durée de l'intervalle libre sans platine est longue, plus la réponse à une chimiothérapie de deuxième ligne est élevée. Ainsi, une relation quasiment linéaire entre la longueur de cet intervalle et la probabilité de réponse à une chimiothérapie de deuxième ligne a pu être mise en évidence<sup>50</sup>. En conséquence, les rechutes précoces sont, dans la majorité des cas, résistantes au platine, nécessitant l'utilisation de protocoles de chimiothérapies sans sel de platine. Les schémas de traitements présentés dans cette partie sont issus des recommandations de Saint-Paul-de-Vence proposées par un groupe d'experts français<sup>15,31,50</sup>.

Pour les rechutes précoces, une monochimiothérapie est recommandée, car les études évaluant l'efficacité des polychimiothérapies n'ont pas montré de supériorité mais au contraire, une augmentation des toxicités. Seule une adjonction de bévacizumab, si la patiente n'en a pas reçu antérieurement, semble bénéfique. Les molécules recommandées pour les rechutes précoces sont la DLP, le paclitaxel, le topotécan ou la gemcitabine. Le choix de la molécule se fera principalement par le schéma d'administration et le profil de toxicité de chacune d'elle. La DLP s'administre entre 40 et 50 mg/m<sup>2</sup> toutes les 4 semaines. Dans cette indication, le paclitaxel est administré de façon hebdomadaire à la dose de 80 mg/m<sup>2</sup>. Le topotécan est utilisé à la dose de 1 à 1,5 mg/m<sup>2</sup>/j pendant 5 jours toutes les 3 semaines (ou 4 mg/m<sup>2</sup> à J1, J8 et J15). La gemcitabine est administrée entre 800 et 1200 mg à J1, J8 et J15 toutes les 4 semaines.

D'autres molécules peuvent être utilisées mais leur efficacité est mal définie après traitement par sel de platine. Dans ces situations de rechute précoce, les soins de support doivent être introduits le plus tôt possible et les essais thérapeutiques doivent être proposés aux patientes<sup>15,31,50</sup>.

#### *e) Le traitement de la récurrence tardive*

Les rechutes tardives, correspondant à des rechutes considérées comme sensibles au platine, sont définies comme les récurrences observées plus de 6 mois après la dernière injection de carboplatine. Malgré un traitement généralement efficace dans un premier temps, les cancers ovariens récidivent dans plus de 70% des cas et la rechute tardive est la plus fréquente. Ces récurrences sensibles au platine sont également celles pour lesquelles les options thérapeutiques sont les plus nombreuses. Cette partie n'abordera que les recommandations relatives aux



cancers de haut grade, majoritairement de type séreux ou endométrioïde et pour des situations de première et deuxième rechutes

Le choix des traitements tient compte des caractéristiques de la tumeur, de la nature des traitements antérieurs, les réactions aux chimiothérapies reçues lors du traitement initial (exemple : hypersensibilité à certains médicaments, *etc.*) et de la patiente elle-même. Le traitement des rechutes tardives est basé, à l'heure actuelle, sur la chimiothérapie. Cependant, l'étude AGO DESKTOP III/ENGOT, comparant le traitement par une nouvelle chirurgie de cytoréduction complète au moment de la première rechute sensible en association à une chimiothérapie versus la chimiothérapie seule, semble en faveur d'une intervention chirurgicale en association avec la chimiothérapie dans cette situation<sup>51</sup>. Ces données pourraient modifier les recommandations actuelles basées uniquement sur la chimiothérapie lors de récurrences tardives.

Un des critères influençant la stratégie thérapeutique des récurrences tardives est la présence ou l'absence d'une mutation sur les gènes *BRCA1* ou *BRCA2*, qu'elle soit germinale ou somatique. En effet, le développement des inhibiteurs de la poly-(ADP-riboses) polymérase (PARP), dont seul l'olaparib dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) à l'heure actuelle, permet une nouvelle stratégie thérapeutique pour les récurrences présentant une mutation de *BRCA* via le concept de la létalité synthétique. Ceci montre la nécessité d'initier le plus précocement possible la recherche d'une mutation de *BRCA*, afin de déterminer le statut *BRCA* germinale et/ou somatique.

Les schémas de traitements présentés dans cette partie sont issus des recommandations de Saint-Paul-de-Vence proposées par un groupe d'experts français<sup>15,31,52</sup>.

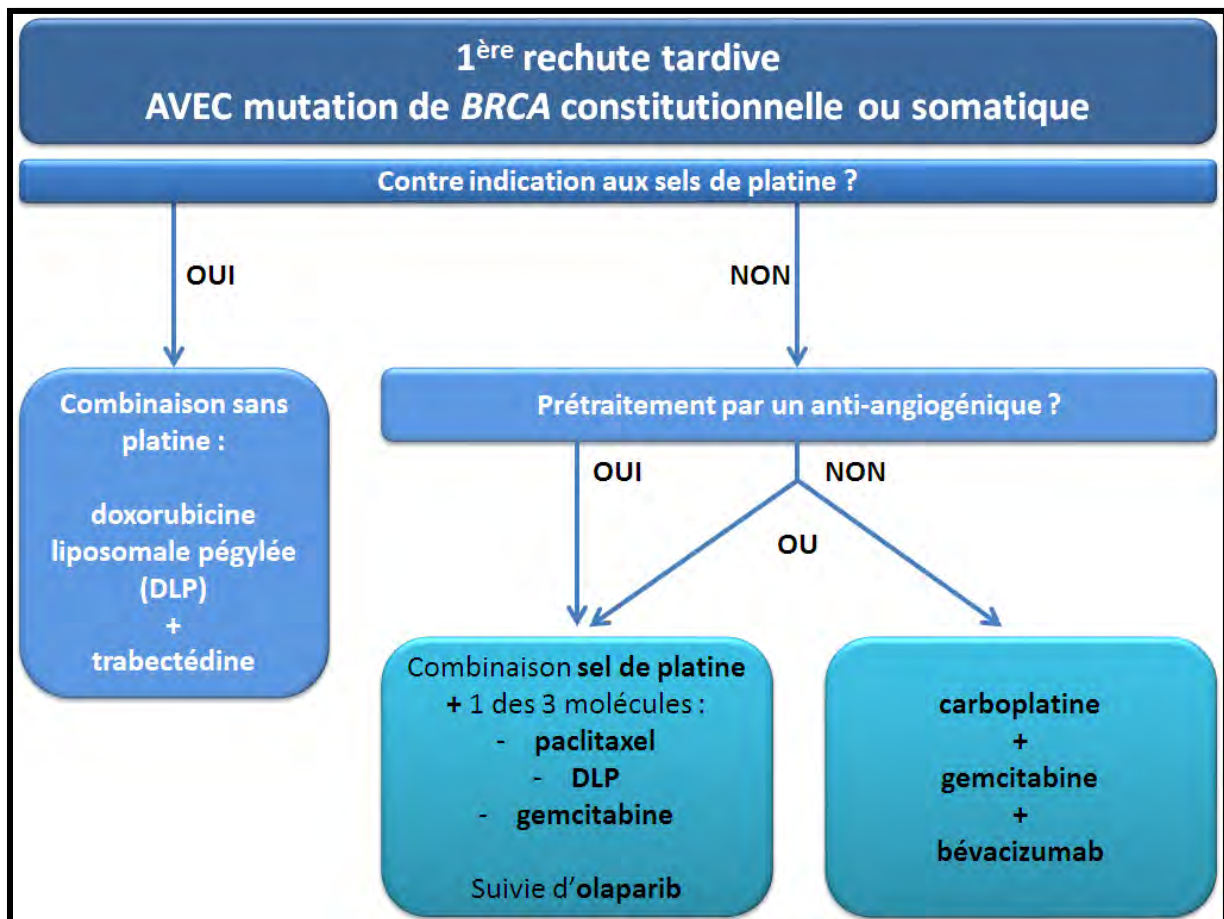
D'autres alternatives, qui ne seront pas présentées dans ce document, pourraient être utilisées, comme l'utilisation d'autres molécules à visée antitumorale dans le cadre d'essais thérapeutiques. De même la chimiohyperthermie intrapéritonéale peut se révéler une alternative après épuisement de l'arsenal thérapeutique conventionnel. Cette technique, réalisée immédiatement après le geste chirurgical, consiste en une administration i.p. de chimiothérapie, afin d'agir sur la maladie infraclinique résiduelle, combinée à une hyperthermie pouvant agir en synergie avec certains agents antitumoraux.

(i) Les traitements de la première récurrence tardive en présence de mutation de *BRCA*

Dans le cadre d'une récurrence présentant une mutation de *BRCA*, qu'elle soit constitutionnelle ou somatique, la stratégie thérapeutique va dépendre de la possibilité de traiter la patiente par sel de platine, notamment en cas de contre-indication. Cette stratégie thérapeutique dépendra également du traitement antérieur reçu par la patiente et plus particulièrement s'il comportait un anti-angiogénique tel que le bévacizumab (Figure 3).

En absence de contre-indication au traitement par carboplatine et pour les patientes prétraitées avec du bévacicumab, le traitement recommandé est une combinaison à base de sel de platine associé à du paclitaxel, de la DLP ou de la gemcitabine suivie d'un traitement de maintenance par olaparib.

Figure 3 : Stratégie thérapeutique de la première rechute tardive avec mutation de *BRCA* selon les recommandations proposées par un groupe d'experts français<sup>52</sup>



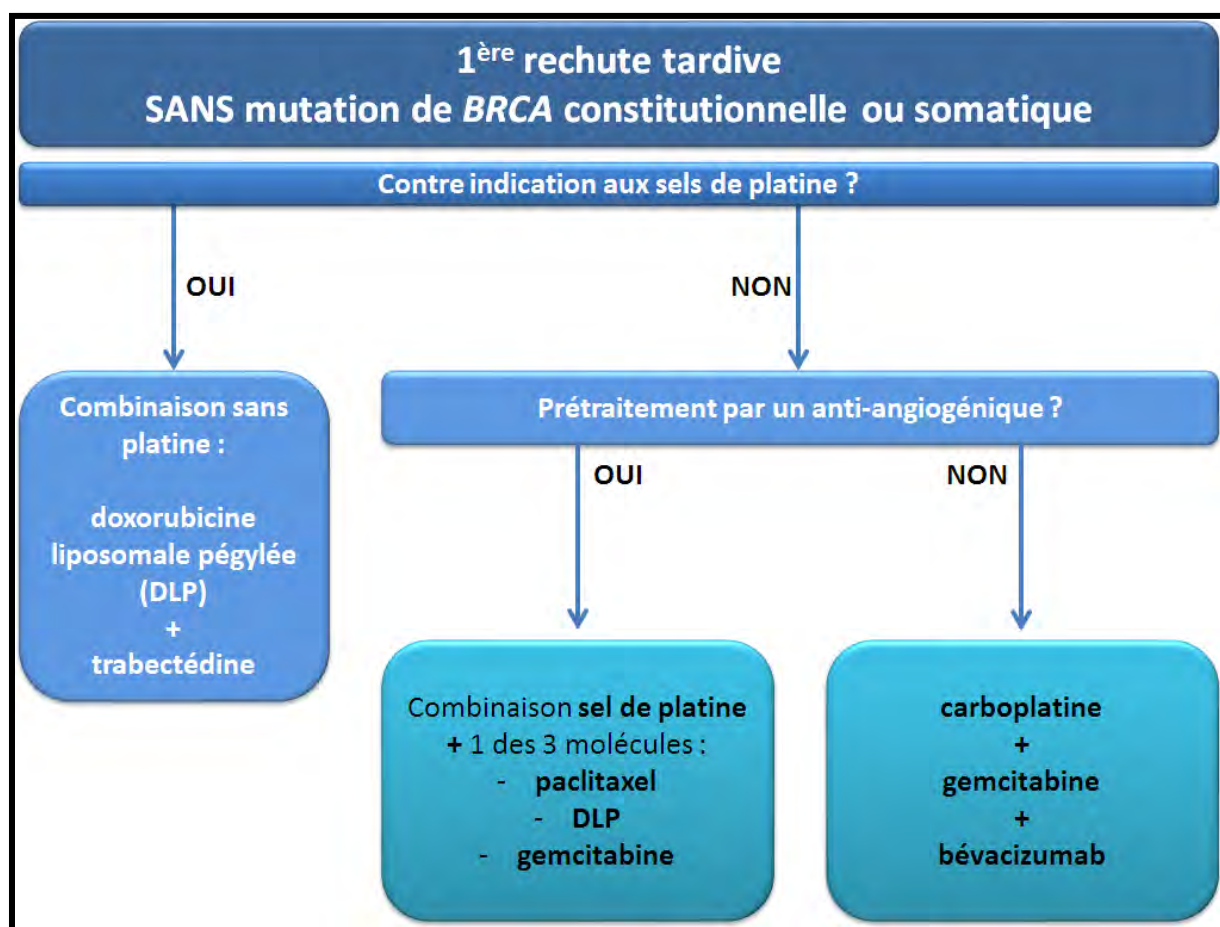
Pour les patientes dont le traitement antérieur ne comportait pas de bévacicumab, la stratégie thérapeutique pourra être l'association de carboplatine avec de la gemcitabine et du bévacicumab ou une polychimiothérapie à base de carboplatine associé à du paclitaxel, de la DLP ou de la gemcitabine et suivi d'un traitement par olaparib. A l'heure actuelle, aucune de ces deux stratégies n'a montré de preuve de sa supériorité par rapport à l'autre.

En cas de contre-indication aux sels de platine, une combinaison à base de DLP et de trabectédine est recommandée<sup>15,31,52</sup>.

- (ii) Les traitements de la première récurrence tardive en absence de mutation de *BRCA*

En l'absence de mutation *BRCA* germinale et somatique, les premières récurrences tardives dépendront également de la possibilité de traiter par sel de platine et de la présence du traitement par bévacizumab lors du traitement antérieur (Figure 4).

Figure 4 : Stratégie thérapeutique de la première rechute tardive sans mutation de *BRCA* selon les recommandations proposées par un groupe d'experts français<sup>52</sup>



En cas de contre-indication aux sels de platine, comme dans les récurrences comportant une mutation de *BRCA*, le traitement recommandé est l'association de la DLP avec la trabectédine.

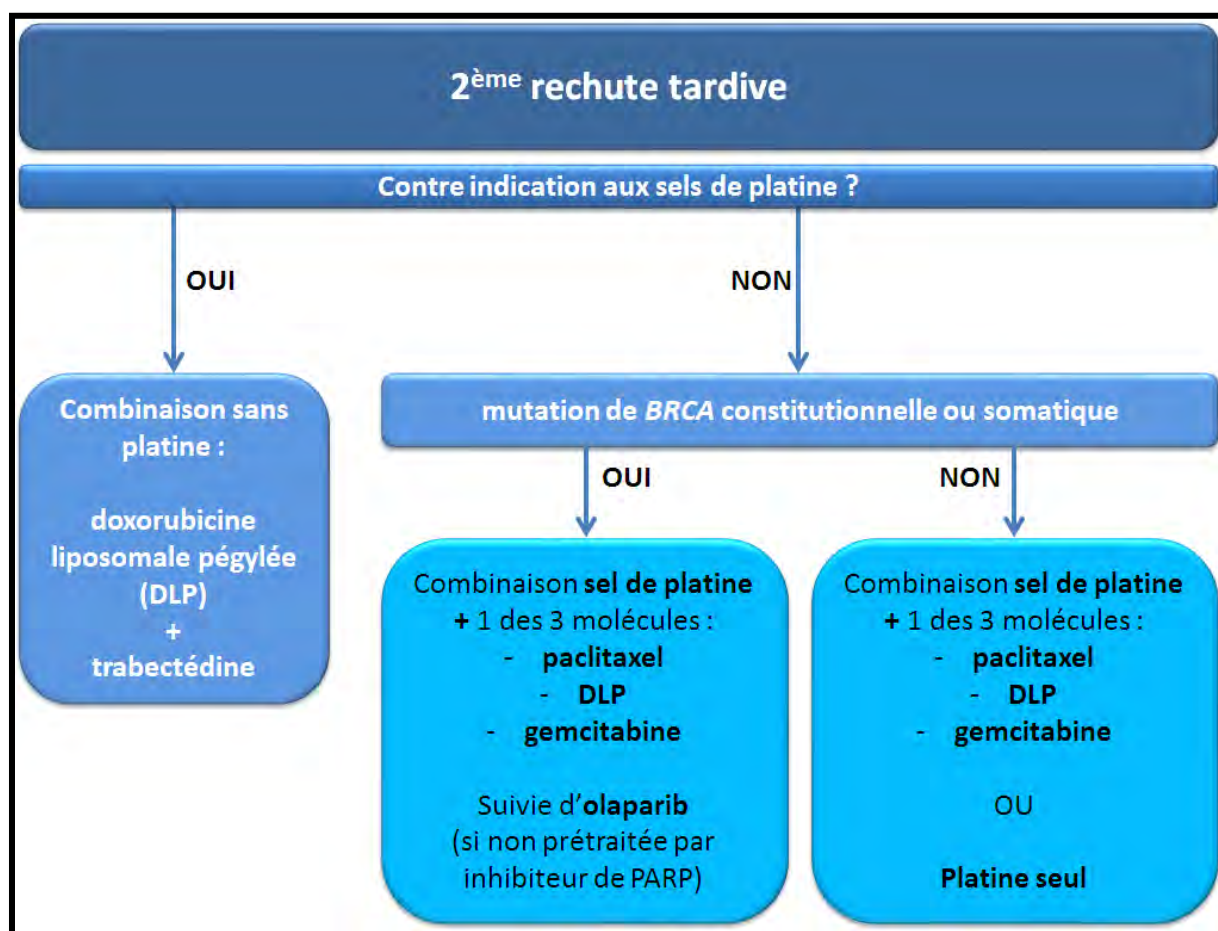
Pour les patientes ayant reçu des injections de bévacizumab lors du traitement antérieur, le standard est une combinaison à base de platine à associer avec une des trois molécules suivantes : paclitaxel, DLP ou gemcitabine, en fonction du profil de toxicité de ces molécules.

Enfin, pour les patientes non prétraitées par bévacizumab, le traitement recommandé associe le carboplatine, la gemcitabine et le bévacizumab<sup>15,31,52</sup>.

(iii) Les traitements de la deuxième récurrence tardive

Lors de la deuxième rechute tardive, la stratégie thérapeutique dépendra essentiellement du statut mutationnel de *BRCA* car les patientes ont majoritairement reçu du bévacizumab lors des traitements antérieurs (Figure 5).

Figure 5 : Stratégie thérapeutique de la deuxième rechute tardive selon les recommandations d'un groupe d'experts français<sup>52</sup>



En cas de contre-indication à l'utilisation de sels de platine, le traitement recommandé associera DLP et trabectédine comme lors des premières récurrences.

En présence de mutation de *BRCA*, le traitement sera basé sur une combinaison à base de sel de platine combiné au paclitaxel, à la DLP ou à la gemcitabine puis suivie d'un traitement de maintenance par olaparib.

En absence de mutation de *BRCA*, le traitement sera identique au traitement mise en place en présence de mutation de *BRCA* hormis la maintenance par olaparib. Une alternative est un traitement par sel de platine seul<sup>15,31,52</sup>.

## B) Le microenvironnement

Les résistances et les récurrences observées dans les cancers ovariens peuvent être dues aux caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales mais un nombre croissant de publications souligne l'importance du microenvironnement tumoral dans ces phénomènes.

Le microenvironnement est un ensemble complexe et dynamique composé de matrice extracellulaire (MEC), de cellules avoisinantes et de facteurs sécrétés. Ce microenvironnement, appelé également stroma, est présent dans les tissus et les organes en conditions physiologiques. Il joue un rôle important de soutien, de maintien, de remplissage, de jonction, de nutrition et de protection pour les organes et les tissus. En conditions physiologiques, chaque organe est constitué d'un microenvironnement qui lui est propre. Il intervient dans la communication cellulaire par des contacts directs, *via* des complexes jonctionnels par exemple, mais également par l'intermédiaire de facteurs sécrétés. Le microenvironnement est indispensable à l'architecture et à l'organisation fonctionnelle des organes.

La MEC est une structure tridimensionnelle et dynamique, composée majoritairement de macromolécules de masses moléculaires généralement comprises entre 100 et 1000 kDa. Ces macromolécules forment un gel hydraté. Ainsi, les tissus ne sont pas uniquement constitués de cellules. En effet, l'espace extracellulaire, formé d'un réseau de macromolécules formant la MEC, correspond à un volume élevé. Les nombreuses molécules qui constituent la MEC varient par leurs structures et leurs fonctions. Les macromolécules retrouvées dans la MEC sont principalement des protéines (collagène, élastine, *etc.*), des glycoprotéines (fibronectine, vitronectine, *etc.*) et des glycosaminoglycanes. Cette MEC interagit avec les cellules du microenvironnement principalement par les récepteurs d'adhérence cellulaire (intégrines, cadhérine, sélectines, *etc.*).

Les facteurs sécrétés retrouvés dans le microenvironnement sont extrêmement variés et dépendent du tissu. La composition en molécules sécrétées peut ainsi contenir des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, des lipides, *etc.* Ces facteurs peuvent être sécrétés par toutes les cellules du microenvironnement qui elles-mêmes dépendront du tissu.

Dans un contexte tumoral, de manière comparable aux conditions physiologiques, le microenvironnement est défini comme l'ensemble des cellules non tumorales, de la matrice extracellulaire et des facteurs sécrétés présents au voisinage de la tumeur. Le microenvironnement tumoral peut influencer le développement et la progression du cancer mais également sa résistance au traitement.

Les travaux de Mina Bissell ont montré que le microenvironnement dans lequel se développe le cancer domine le gène oncogénique lui-même. Pour que des cellules passent d'un état normal à cancéreux, des changements au niveau des signaux externes de la MEC sont nécessaires. Une destruction de la MEC peut entraîner une réponse tumorale. Ainsi, la croissance et le comportement malin seraient régulés au niveau de l'organisation tissulaire, elle-même dépendante de la MEC et du microenvironnement<sup>53</sup>.

Ainsi, le microenvironnement tumoral joue un rôle primordial dans la carcinogenèse et le développement tumoral<sup>54-56</sup>. Les cellules composant ce microenvironnement peuvent jouer un rôle anti-tumoral (par exemple, certaines cellules du système immunitaire, tels que les lymphocytes T cytotoxiques) ou pro-tumoral (tels que les fibroblastes ou les MSC). La tumeur, par contact direct avec ces cellules du microenvironnement, ou *via* la sécrétion de facteurs, est capable de modifier les cellules stromales, qui pourront alors acquérir des caractéristiques pro-tumorales ou entraîner une immunotolérance. De façon comparable à la thérapie ciblée, de plus en plus de molécules sont développées et ciblent des anomalies du microenvironnement tumoral. Ce chapitre se focalisera sur les cellules du microenvironnement, et les facteurs associés à ces cellules, dont des médicaments les ciblant spécifiquement sont disponibles afin d'améliorer la prise en charge des cancers.

## 1) Les cellules immunitaires et leur ciblage

Le rôle physiologique du système immunitaire est la défense de l'organisme contre le « non-soi », comme les pathogènes (bactéries, virus et parasites), les molécules exogènes, les cellules étrangères ou anormales. Ainsi, il présente un rôle anti-tumoral en éliminant les cellules anormales telles que les cellules tumorales. Cependant, au cours du développement tumoral, le système immunitaire peut être régulé, avec l'acquisition d'une immuno-tolérance voire de capacités pro-tumorales. Par conséquent, les cellules immunitaires, ou leucocytes, du microenvironnement peuvent-être ciblées dans les cancers, soit en restaurant leur activité anti-tumorale soit en bloquant leurs fonctions pro-tumorales. A l'heure actuelle, seuls les lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et les macrophages représentent des cibles thérapeutiques. D'autres médicaments, moins spécifiques ciblent plusieurs types de cellules immunitaires.

### a) Les lymphocytes T cytotoxiques

Les lymphocytes T cytotoxiques (LTc), ou lymphocytes T CD8+, sont des cellules impliquées dans l'immunité acquise capables de reconnaître spécifiquement des antigènes tumoraux. Les LTc exercent une activité anti-tumorale par sécrétion de perforine et de granzyme, entraînant respectivement la formation de pores dans la membrane plasmique et la mort cellulaire par activation des caspases. Ainsi, dans certains cancers, une infiltration de lymphocytes T au niveau tumoral est de bon pronostic<sup>57,58</sup>. Différentes molécules ont donc été développées afin de favoriser le rôle anti-tumoral de ces LTc. Ces immunothérapies semblent être actives sur des cancers accessibles aux cellules lymphocytaires et présentant des antigènes tumoraux, nécessaires à la reconnaissance des cellules tumorales par les LTc. Ainsi, ce type d'immunothérapie semble plus efficace dans les cancers ayant de nombreuses mutations, entraînant la reconnaissance par les LTc de plusieurs antigènes tumoraux.

## (i) Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires

A l'heure actuelle, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires suscitent un grand intérêt, consécutif à des résultats prometteurs obtenus dans des pathologies telles que le mélanome ou le cancer du poumon. Ce type d'immunothérapie semble en effet intéressant dans les cancers ayant un nombre important de mutations pouvant être induites par les UV (mélanome) ou le tabagisme (cancer pulmonaire). Un des mécanismes qui conduit à l'échappement tumoral à la surveillance immune est l'expression de molécules inhibitrices des LTc à la surface des cellules tumorales. Le principe de ces inhibiteurs de points de contrôle immunitaires est d'empêcher la transmission d'un signal inhibiteur aux LTc, permettant ainsi de restaurer l'activité anti-tumorale des LTc. Le ciblage des axes « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA4) / B7 ou Programmed cell Death- Ligand 1 (PD-L1) / Programmed cell Death-1 (PD-1) inhibe ces points de contrôle.

### ❖ *Les inhibiteurs de CTLA4*

La fixation de molécules B7-1 ou B7-2 (également nommées respectivement CD80 et CD86), présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes, au CD28 des LTc permet d'induire un signal activateur, entraînant la stimulation de ces derniers. Cependant, si les ligands B7-1 ou 2 se lient à CTLA4, présente également sur les LTc, un signal inhibiteur est transmis, conduisant à un effet immuno-suppressif, notamment en inhibant les fonctions de co-stimulation relayées par le CD28.

L'ipilimumab est un anticorps monoclonal entièrement humain (IgG1) dirigé contre CTLA4. Cet anticorps empêche ainsi la fixation de ligands sur CTLA4, entraînant une augmentation du nombre de cellules T effectrices réactives et également une réduction de la fonction des cellules T régulatrices. L'augmentation du ratio intra-tumoral cellules T effectrices/cellules T régulatrices ainsi obtenu contribue à une réponse immunitaire anti-tumorale.

### ❖ *Les inhibiteurs ciblant l'axe PD-L1/PD-1*

De manière comparable au CTLA4, le récepteur PD-1 conduit à un signal inhibant les LTc lors de sa liaison avec son ligand, le PD-L1 qui appartient également à la famille B7. Le PD-1 ainsi que son ligand PD-L1 sont donc des cibles potentielles pour empêcher l'inhibition des LTc et induire leur stimulation.

Deux anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1, le pembrolizumab et le nivolumab (IgG4 humaines), ont à l'heure actuelle une autorisation de mise sur le marché (AMM) en oncologie. Des anticorps ciblant le ligand de PD-1, des anti-PD-L1, sont en cours de développement. Deux anticorps, l'avelumab et l'atézolizumab, disposent à l'heure actuelle d'une autorisation

temporaire d'utilisation (ATU). Ces immuno-thérapies stimulant les LTc entraînent la mort de cellules tumorales.

## (ii) Les anticorps avec de multiples cibles spécifiques

Le catumaxomab est un anticorps trifonctionnel. Il permet d'attirer les cellules tumorales à proximité des lymphocytes T cytotoxiques, permettant à ces derniers d'exercer leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. Il cible pour cela, deux sites antigéniques différents, un situé sur les cellules tumorales et l'autre sur les lymphocytes. Il se fixe sur la molécule d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM) qui est surexprimée sur les cellules tumorales de la plupart des carcinomes et également sur l'antigène CD3, qui est exprimé sur les lymphocytes T au niveau du récepteur des cellules T (TCR). Le catumaxomab possède également un domaine fonctionnel du fragment constant (Fc) qui se lie aux récepteurs Fcγ de type I, IIa et III sur des cellules telles que les macrophages, les cellules natural killer (NK) ou les cellules dendritiques. La réaction immunologique, obtenue après regroupement des cellules tumorales, des lymphocytes T et des cellules accessoires, entraîne la mort des cellules tumorales par ADCC (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps), CDC (cytotoxicité dépendante du complément) et ADPh (phagocytose cellulaire dépendante des anticorps)<sup>59</sup>.

Une nouvelle classe de médicaments favorise l'activité des lymphocytes T et regroupe les « Bispecific T cell Engagers (BiTE) ». Ces médicaments ont une structure particulière, ils possèdent deux domaines similaires à ceux des anticorps qui se lient à des antigènes spécifiques. Ces deux domaines de liaison sont monocaténaire et sont réunis par liaison covalente *via* un peptide de liaison. Par conséquent, cet « anticorps » BiTE est complètement dépourvu des régions constantes des anticorps. Ainsi, ces BiTE sont des protéines de fusion relativement petites avec un poids moléculaire beaucoup plus faible qu'un anticorps classique<sup>60,61</sup>.

Le blinatumomab est une protéine de fusion recombinante de la classe des BiTE à chaîne simple pouvant avoir une activité contre les cellules leucémiques à précurseurs B *via* la mobilisation de lymphocytes T. Il est dirigé spécifiquement contre le CD19, exprimé à la surface des cellules de la lignée B, et le CD3, exprimé à la surface des lymphocytes T. Cette double spécificité permet de juxtaposer les cellules leucémiques à précurseurs B et les LTc. Ainsi, les LTc peuvent agir sur les cellules B leucémiques même en absence de spécificité de leur TCR vis-à-vis d'un peptide antigénique situé sur les cellules tumorales. En effet, l'activité antitumorale de l'immunothérapie par le blinatumomab est due à la formation d'une synapse cytolytique entre le LTc et la cellule tumorale libérant les enzymes protéolytiques, perforine et granzyme, pour tuer les cellules cibles qu'elles soient en prolifération ou quiescentes. Le blinatumomab est associé à une synthèse de protéines cytolytiques, la libération de cytokines inflammatoires et la prolifération des lymphocytes T, et entraîne l'élimination des cellules CD19+ avec une activation des caspases 3 et 7<sup>60,61</sup>.

### *b) Les macrophages*



Les monocytes et les macrophages sont des leucocytes qui dérivent de progéniteurs myéloïdes. En effet, dans la moelle osseuse (BM), des cellules souches hématopoïétiques multipotentes entament une série d'étapes de différenciation conduisant à l'émergence des cellules progénitrices myéloïdes, des monoblastes et des pro-monocytes. Ces cellules progénitrices peuvent alors se différencier en monocytes. Les monocytes ont la faculté de passer dans la circulation sanguine, où ils représentent environ 10% des leucocytes sanguins<sup>62</sup>. Leur demi-vie dans le compartiment sanguin est d'un à deux jours. A partir du compartiment sanguin, les monocytes vont pouvoir migrer par extravasation vers divers tissus où ils vont se différencier en macrophages résidents ou en cellules dendritiques<sup>63</sup>. Cette migration des monocytes à travers l'endothélium vasculaire est dépendante des molécules d'adhésion, telles que les intégrines, exprimées à la surface des cellules endothéliales vasculaires mais également des facteurs sécrétés tels que les cytokines, les chimiokines ou des facteurs de croissance.

Les macrophages ont une localisation qui diffère des monocytes. Ainsi les macrophages sont tissulaires alors que les monocytes sont présents dans le compartiment vasculaire. Les macrophages se différencient également des monocytes par leur morphologie (taille supérieure aux monocytes) et leur système vacuolaire très développé et varié (phagosomes, lysosomes, endosomes, *etc.*). Les macrophages sont des cellules mobiles et capables de phagocytose. Ces cellules immunitaires sécrètent de nombreux facteurs (cytokines, chimiokines, radicaux libres, eicosanoïdes, facteurs hématopoïétiques, *etc.*). Les macrophages jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la réponse immune, notamment en modulant la réponse inflammatoire. Leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles dépendent spécifiquement des tissus et des molécules sécrétées et exprimées par les cellules stromales du tissu où les macrophages sont présents.

### (i) Rôle des macrophages

Ces cellules de l'immunité innée sont capables d'éliminer des pathogènes ou des cellules anormales par phagocytose mais également d'activer le système immunitaire adaptatif en jouant le rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, les macrophages sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Ils appartiennent à la première ligne de défense de l'organisme en détectant des « signaux de dangers » provenant de micro-organismes, de tissus anormaux (cellules transformées, mort cellulaire non physiologique, *etc.*) ou de particules exogènes. Cette reconnaissance, *via* leurs récepteurs de surfaces, cytoplasmiques et endosomaux, induit la production de cytokines et de nombreux médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire.

Une des fonctions principales des macrophages est la phagocytose. Celle-ci permet de détruire les micro-organismes pathogènes, les cellules anormales et les particules exogènes. Une part de l'activité phagocytaire des macrophages est réalisée par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). En effet, ces ROS induisent l'oxydation des protéines et des acides nucléiques des pathogènes mais également une peroxydation des lipides. Les ROS sont formés suite à l'activation de la

NADPH oxydase (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase) au niveau des membranes mais également dans les phagolysosomes au cours de la phagocytose.

## (ii) Polarisation des macrophages M1/M2 et cancer

Dans un contexte tumoral, les monocytes circulants peuvent être recrutés au niveau de la tumeur grâce à des facteurs sécrétés par les cellules tumorales ou par d'autres cellules du microenvironnement tumoral<sup>64-66</sup>. Si dans les stades précoces de l'oncogenèse, il est décrit que les macrophages ont un phénotype M1 avec une activité plutôt anti-tumorale, ils acquièrent un phénotype différent appelé M2 dans les stades plus avancés de la maladie. Dans ce cas, ils participent au développement tumoral<sup>64,67</sup>. Les macrophages M1 et M2 sont classés en fonction de la production de molécules bioactives (cytokines, chimiokines, métabolites de l'acide arachidonique, *etc.*) et également en fonction des niveaux d'expression de leurs récepteurs membranaires (Tableau 5). Les polarisations M1 et M2 des macrophages doivent être considérées comme les extrémités d'un continuum d'état d'activation, et l'état exact de différenciation est fonction de la composition des signaux locaux qui vont pouvoir « éduquer » les macrophages<sup>64,67-69</sup>.

### ❖ *Les macrophages M1*

Les macrophages de type M1 sont considérés comme les macrophages classiquement activés. La polarisation vers le type M1 est induite par l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), seul ou combiné à des cytokines ou des facteurs de croissance tels que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou le granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). Les lipopolysaccharides (LPS), composants essentiels de la membrane externe des bactéries gram-négatif, peuvent également orienter les macrophages vers le phénotype M1<sup>70</sup>.

Ces macrophages sont caractérisés principalement par la production d'IL-12 mais également la surexpression d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, ainsi que l'IL-23. Certaines des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , *etc.*) sont capables d'induire directement la lyse et la mort des cellules transformées. De plus, l'amplification de la réponse inflammatoire de type 1 par l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) entraîne une inhibition de l'effet de l'IL-10. Ces macrophages M1 produisent également de nombreuses chimiokines (CCL8, CCL15, CCL19, CCL20, CXCL13, *etc.*)<sup>71</sup>.

Les macrophages de types M1 sont également caractérisés par la production de ROS *via* l'augmentation de l'expression des enzymes telles que l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la NADPH oxydase. Ils expriment également des récepteurs impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules tumorales (CD11b, CD16, CD32, *etc.*). Ces macrophages M1 peuvent également agir comme des cellules présentatrices d'antigènes et ainsi stimuler la réponse immune.

Ainsi, la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires, leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes tumoraux et leur activité phagocytaire permettent aux macrophages M1 d'exercer un rôle microbicide mais également tumoricide. Ainsi, dans un contexte tumoral, les macrophages de type M1 sont décrits comme anti-tumoraux.

### ❖ *Les macrophages M2*

Les macrophages de type M2 sont considérés comme les macrophages alternativement activés, anti-inflammatoires et impliqués dans la réparation tissulaire lors de lésions. Ces macrophages présentent une polarisation qui varie selon les signaux inducteurs environnants. Ainsi, les macrophages M2 sont classés en macrophages M2a, M2b, M2c et M2d<sup>70</sup>. Le sous-type M2a correspond à des macrophages dont la polarisation a été induite par l'IL-4 ou l'IL-13. Une exposition à des complexes immuns associés à des ligands des Toll-like récepteurs (TLR) ou des agonistes du récepteur à l'IL-1 oriente vers une polarisation M2b, considérés comme des macrophages régulateurs. La présence d'IL-10 ou de glucocorticoïdes conduisent les macrophages à adopter un phénotype M2c, correspondant à des macrophages réparateurs. Le phénotype M2d est un sous type particulier retrouvée dans un contexte de cancer ovarien. Duluc *et al.* ont identifié l'IL-6, le leukemia inhibitory factor (LIF) et le CSF-1 comme les facteurs permettant cette polarisation M2d. Ces macrophages M2d correspondent aux macrophages présents dans le microenvironnement tumoral ovarien, notamment dans l'ascite<sup>72</sup>.

Les macrophages polarisés en phénotype M2 se caractérisent principalement par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF- $\beta$ . Cependant, selon leur polarisation ils peuvent également sécréter certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). Les différents macrophages M2 expriment des marqueurs communs, tels que Dectine-1, le récepteur au mannose (CD206) et le « récepteur scavenger » CD163<sup>71</sup>.

Dans les stades tumoraux avancés, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont généralement de phénotype M2 et une forte densité de TAM est corrélée à un mauvais pronostic<sup>68</sup>. Ils exercent fréquemment une activité immunosuppressive (expression d'indoleamine 2,3-dioxygénase ; IDO) et sont considérés comme pro-tumoraux.

Tableau 5 : Caractéristiques des macrophages selon leur polarisation

|  | M1  | M2a  | M2b  | M2c  | M2d  |
|--|---|--|--|--|--|
| <b>Molécules impliquées dans la polarisation</b> | - IFN- $\gamma$<br>- LPS<br>- TNF- $\alpha$<br>- GM-CSF   | - IL-13<br>- IL-4<br>- Infection fongique ou aux helminthes  | - Complexes immuns<br>- Ligands des TLR<br>- Agonistes de IL-1R  | - IL-10<br>- Glucocorticoïdes  | - IL-6<br>- LIF<br>- M-CSF (CSF-1)   |
| <b>Récepteurs exprimés</b>                       | - TLR-2<br>- TLR-3<br>- TLR-4<br>- TLR-7<br>- TLR-8<br>- IL-1R<br>- CD16<br>- CD32<br>- CD64<br>- CD80<br>- CD86  | - Récepteur au mannose (CD206)<br>- Dectine-1<br>- CD36<br>- DC-SIGN<br>- TLR-2<br>- CD163<br>- Decoy IL-1 RII                     |  | - CD163<br>- CCR2<br>- TLR1  | - CD163<br>- CD14  |
| <b>Facteurs sécrétés</b>                         | - IL-1 $\beta$<br>- IL-6<br>- <b>IL-12 ++</b><br>- IL-15<br>- IL-18<br>- IL-23<br>- TNF $\alpha$<br>- CCL2/3/4/5/8<br>- CCL10/11/15/19/20<br>- CXCL8/9/10<br>- CXCL11/13/16 | - CCL13<br>- CCL14<br>- CCL16<br>- CCL17<br>- CCL18<br>- CCL22<br>- CCL23<br>- CCL24<br>- CCL26<br>- IL1-ra                        | - IL-1 $\beta$<br>- IL-6<br>- <b>IL-10 ++</b><br>- TNF $\alpha$<br>- CCL1  | - <b>IL-10 ++</b><br>- TGF- $\beta$<br>- CCL16<br>- CCL18  | - <b>IL-10 ++</b><br>- TGF- $\beta$<br>- CCL2/5/18<br>- CXCL10/16<br>- PDGF A/B<br>- VEGF<br>- MMP9<br>- B7-H4 |
| <b>Molécules produites / Protéines exprimées</b> | - iNOS<br>- Dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)<br>- CCR7   | - Dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)<br>- Arginase-1  | - CCR2<br>- CXCR1<br>- CXCR2   |  | - Ig-like transcript 2/3<br>- IDO<br>- B7-H4   |
| <b>Activité</b>                                  | - Anti-tumorale<br>- Recrutement de :<br>▪ Lymphocytes T cytotoxiques<br>▪ Lymphocytes Th1<br>▪ Cellules NK   | - anti-inflammatoire<br>- Immuno-régulation<br>- allergie<br>- Pro-tumorale<br>- Réparation et le remodelage des tissus endommagés | - Activation des lymphocytes Th2<br>- Immunosuppression<br>- allergie<br>- anti-inflammatoire<br>- Réparation et le remodelage des tissus endommagés<br>- Pro-tumorale | - anti-inflammatoire<br>- Immuno-régulation<br>- allergie<br>- Pro-tumorale<br>- Réparation et le remodelage des tissus endommagés | - Pro-tumorale<br>- Immunosuppression<br>- Pro-angiogéniques<br>- anti-inflammatoire                           |

(iii) Les macrophages des os : les ostéoclastes

Les ostéoclastes, comme les macrophages, sont des cellules issues de la lignée myélocytaire. Les ostéoclastes sont généralement considérés comme les macrophages des os et sont impliqués dans le renouvellement du tissu osseux. En effet, les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse *via* un processus nommé ostéolyse. Les caractéristiques communes des macrophages et des ostéoclastes font que les traitements ciblant les macrophages ou les ostéoclastes affectent ces 2 types cellulaires.

#### (iv) Le ciblage des macrophages et des ostéoclastes

Le CSF-1 (colony stimulating factor 1), ou M-CSF, est un facteur de croissance nécessaire à la différenciation et à la survie des macrophages. Duluc *et al.* ont montré que ce facteur était capable de polariser les macrophages vers un phénotype M2d, pro-tumoral<sup>72</sup>. A l'heure actuelle, des molécules dirigées contre le récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) de CSF-1 (CSF-1R), comme le pexidartinib (inhibiteur de tyrosine kinase ; ITK)<sup>73</sup> ou l'emactuzumab (anticorps monoclonal), sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques dans de nombreux cancers. De façon moins spécifique, l'imatinib et le sunitinib, qui sont des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) actifs sur de nombreuses cibles, agissent également sur le CSF-1R. L'élimination des macrophages de type M2, pro-tumoraux, pourrait permettre une meilleure efficacité des traitements anti-tumoraux associés.

Les bisphosphonates, comme l'acide zolédronique, le clodronate ou le risedronate, utilisés pour traiter l'ostéoporose, agissent sur les ostéoclastes. Ils inhibent de façon importante la résorption ostéoclastique osseuse mais le mécanisme précis n'est pas encore bien défini. Les bisphosphonates possèdent également des propriétés anti-tumorales avec un effet pro-apoptotique sur les cellules tumorales ainsi qu'un effet cytostatique synergique en association à d'autres médicaments anti-tumoraux. L'altération du microenvironnement médullaire, par l'inhibition de la résorption ostéoclastique observée *in vivo*, entraîne un environnement moins favorable à la croissance des cellules tumorales. Ainsi, ils pourraient également être utilisés pour éliminer les macrophages dont l'infiltration est de mauvais pronostic dans de nombreux cancers.

De même, le dénosumab, qui est un anticorps monoclonal IgG2 humain, agit sur les ostéoclastes. Cet anticorps se lie spécifiquement sur RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand). Le dénosumab bloque ainsi l'axe RANKL/RANK, réduisant le nombre et la fonction des ostéoclastes. L'inhibition de cet axe entraîne la diminution de la résorption et de la destruction osseuse induite par un cancer. Bien qu'il soit plutôt indiqué pour les tumeurs osseuses à cellules géantes (de type ostéoclastique) ou pour prévenir des complications osseuses, le dénosumab pourrait également agir sur les macrophages et empêcher leurs effets pro-tumoraux<sup>34</sup>.

#### c) Le système immunitaire en général

Une stratégie différente des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires est d'utiliser des médicaments capables de stimuler directement le système immunitaire. Ces immuno-stimulants visent à inhiber l'immuno-tolérance observée dans de nombreux cancers et à restaurer l'effet anti-tumoral des cellules immunitaires.

## (i) Les cytokines

L'interleukine 2 (IL-2) est une protéine naturelle de l'organisme. L'IL-2 active des récepteurs situés sur les membranes plasmiques de nombreuses cellules immunitaires telles que les NK et les lymphocytes T et B. L'IL-2 joue le rôle de facteur de croissance pour les lymphocytes T et permet leur transformation en LTc qui sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , lequel stimule les macrophages. L'aldesleukine est de l'IL-2 recombinante ayant un effet biologique comparable à cette lymphokine naturelle. Bien que les mécanismes précis de ce médicament ne soient pas encore connus, l'aldesleukine entraîne une immunostimulation en produisant de multiples effets immunologiques dose-dépendants. Cette immunothérapie permet, dans des modèles *in vivo*, de diminuer la croissance de la tumeur et sa dissémination<sup>34</sup>.

L'interféron- $\alpha$  est une protéine naturelle, produite notamment par les cellules immunitaires. Il joue un rôle dans la défense immunitaire contre les pathogènes ou les cellules anormales comme les cellules tumorales. L'interféron- $\alpha$ , après sa fixation à son récepteur, conduit à une cascade de réactions intracellulaires entraînant des activités immuno-modulatrices comme l'augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages et l'augmentation de la cytotoxicité spécifique des LTc sur des cellules tumorales. Ainsi, des interféron- $\alpha$  2a et interféron- $\alpha$  2b sont disponibles dans l'arsenal anti-tumoral grâce à leurs propriétés semblables à celles de l'interféron- $\alpha$  naturel humain. Les mécanismes précis permettant l'activité anti-tumorale des interféron- $\alpha$  2a et interféron- $\alpha$  2b ne sont pas encore bien définis, néanmoins ces molécules semblent agir directement sur les cellules tumorales, en plus de leur action sur le système immunitaire. En effet, des expériences *in vitro* ont montré une activité antiproliférative de l'interféron- $\alpha$  sur diverses lignées de cellules tumorales humaines avec une diminution significative de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines. De même, ces molécules ont un effet antiprolifératif dans des modèles expérimentaux *in vivo* de souris immunodéprimées développant des tumeurs. Toutefois, le rôle immunostimulant de ces molécules semble être majeur dans l'activité anti-tumorale de ces médicaments<sup>34</sup>.

## (ii) Les vaccins anti-tumoraux

Une autre façon de stimuler le système immunitaire est de mettre au point des vaccins qui vont induire une élimination sélective des cellules cancéreuses. Les cibles thérapeutiques peuvent être des antigènes associés aux tumeurs. La mucine 1 (MUC-1) est une cible thérapeutique envisagée pour le développement d'un vaccin permettant de lutter contre divers cancers d'origine épithéliale. La MUC-1 est une protéine transmembranaire retrouvée à la surface des cellules épithéliales. Cette protéine a pour rôles la lubrification et la protection des cellules épithéliales. Elle est surexprimée dans de nombreux cancers épithéliaux. MUC-1 régule l'expression de gènes au niveau transcriptionnel mais également au plan post-transcriptionnel. Elle favorise la croissance tumorale, la dissémination métastatique et la résistance au traitement<sup>74</sup>. La MUC-1 associée aux tumeurs diffère de celle exprimée dans les cellules normales, à la fois dans ses caractéristiques biochimiques et sa distribution cellulaire. En effet,

le profil de glycosylation est différent sur les MUC-1 retrouvées dans les cancers par rapport aux MUC-1 normales. Ainsi, sa surexpression et sa forme particulière dans les cancers font de cette protéine une cible intéressante pour développer des vaccins. Le TG4010 est un vaccin qui cible cet antigène associé aux tumeurs MUC-1. Il consiste en une suspension de vecteurs viraux recombinant dérivés du virus de la vaccine Ankara codant l'antigène MUC-1 et la cytokine IL-2 humains. Les essais cliniques utilisant ce vecteur en association avec une chimiothérapie ont montré un effet thérapeutique supérieur à l'utilisation de la chimiothérapie seule chez des patients atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules. Ces études ont montré des réponses de cellules T spécifiques de MUC-1<sup>75</sup>.

### (iii) Les médicaments immuno-modulateurs

La classe des médicaments immuno-modulateurs (IMiD) comme le thalidomide, le lénalidomide et le pomalidomide, entraîne une altération de la production de cytokines, une régulation de la co-stimulation des lymphocytes T ainsi qu'une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK<sup>76</sup>. En effet, ces médicaments entraînent une diminution de la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, et de protéines pro-angiogéniques comme le bFGF (basic-Fibroblast Growth Factor) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)<sup>77</sup>. La cible des IMiD semble être une protéine E3 ubiquitine ligase, le céréblon. En présence des IMiD, le céréblon se lie aux protéines substrats telles que les protéines ikaros (IKZF1) et aiolos (IKZF3), qui sont des facteurs de transcription spécifiques des cellules B, ce qui entraîne leur ubiquitination puis leur dégradation par le protéasome. Ce mécanisme conduit à des effets cytotoxiques et immuno-modulateurs<sup>34,78</sup>. Les protéines ikaros et aiolos sont surexprimées dans les tumeurs malignes lymphoïdes B notamment dans le myélome multiple (MM). Les IMiD modifient le ratio lymphocytaire T circulant chez le sujet sain, diminuant les cellules T « helper » et augmentant les LTc. Ces IMiD augmenteraient le nombre et l'activité cytotoxique des cellules NK, impliquées dans l'immunité anti-tumorale. En plus de leur rôle immuno-modulateur, les IMiD pourraient avoir un rôle anti-tumoral direct en bloquant la prolifération tumorale par arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou en induisant l'apoptose<sup>34,77,78</sup>.

Tableau 6 : Molécules ciblant les cellules immunitaires développées en oncologie

| <b>Ciblage du microenvironnement immunitaire</b>  |                                      |  |  |
|---|--------------------------------------|--|--|
| Cellules ciblées  | Cibles                               | Mécanisme d'action   | Molécules / médicaments                            |
| Lymphocytes T cytotoxiques  | CTLA4                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe la fixation de ligands sur CTLA4</li> <li>Bloque la transmission du signal inhibiteur de CTLA4</li> <li>Augmentation du nombre de cellules T effectrices</li> <li>Réduction de la fonction des cellules T régulatrices</li> <li>Réponse immunitaire anti-tumorale</li> </ul>   | ipilimumab   |
| Lymphocytes T cytotoxiques  | PD-1                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe la fixation de PD-L1 sur PD-1</li> <li>Bloque la transmission du signal inhibiteur de PD-1</li> <li>Augmentation du nombre de cellules T effectrices</li> <li>Réduction de la fonction des cellules T régulatrices</li> <li>Réponse immunitaire anti-tumorale</li> </ul>   | nivolumab<br>pembrolizumab                         |
| Lymphocytes T cytotoxiques  | PD-L1                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe la fixation de PD-L1 sur PD-1</li> <li>Bloque la transmission du signal inhibiteur de PD-1</li> <li>Augmentation du nombre de cellules T effectrices</li> <li>Réduction de la fonction des cellules T régulatrices</li> <li>Réponse immunitaire anti-tumorale</li> </ul>   | avelumab<br>atézolizumab (ATU)                     |
| Lymphocytes T cytotoxiques  | EpCAM<br>CD3                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Anticorps trifonctionnel possédant un fragment Fc et ciblant :                             <ul style="list-style-type: none"> <li>EpCAM: exprimé sur cellules épithéliales dont carcinomes</li> <li>CD3 : exprimé sur les LTc au niveau du TCR</li> </ul> </li> <li>Regroupement cellules tumorales, LTc et cellules accessoires</li> <li>Mort des cellules tumorales par ADCC, CDC et ADPh</li> </ul>  | catumaxomab  |
| Lymphocytes T cytotoxiques  | CD19<br>CD3                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>Protéine de fusion recombinante de la classe des BiTE ciblant :                             <ul style="list-style-type: none"> <li>CD19 : exprimé à la surface des cellules de lignée B</li> <li>CD3 : exprimé sur les LTc au niveau du TCR</li> </ul> </li> <li>Élimination des cellules B leucémiques CD19+</li> </ul>  | blinatumomab                                       |
| Macrophages   | CSF-1R                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibition du CSF-1R ayant une activité tyrosine kinase</li> <li>Inhibe la différenciation M2d et la survie des macrophages</li> <li>Inhibition de l'effet pro-tumoral des macrophages</li> </ul>   | emactuzumab<br>peixidartinib (essais cliniques)    |
| Macrophages / ostéoclastes  | RANKL                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>Liaison de l'anticorps sur RANKL</li> <li>Blocage de l'axe RANKL/RANK</li> <li>Réduction du nombre et de la fonction des ostéoclastes</li> <li>Diminution de la résorption et de la destruction osseuse due au cancer</li> <li>Possible inhibition des macrophages et de leurs effets pro-tumoraux</li> </ul>   | dénosumab  |
| Macrophages / ostéoclastes  |                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibition de la résorption ostéoclastique osseuse</li> <li>Effet pro-apoptotique sur les cellules tumorales</li> <li>Effet cytotatique synergique en association à certains antitumoraux</li> <li>Entraîne un environnement moins favorable à la croissance tumorale</li> <li>Élimination des macrophages</li> </ul>   | bisphosphonates                                    |
| Multiplés cellules immunitaires   | Récepteurs de l'IL-2                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Fixation de l'IL-2 sur ses récepteurs situés sur les cellules immunitaires tels que les NK, les lymphocytes T et B entraînant leur activation</li> <li>Rôle de facteur de croissance pour les lymphocytes T et permet leur transformation en LTc qui sécrètent de l'interféron <math>\gamma</math>, lequel stimule les macrophages</li> <li>Immuno-stimulation en produisant de multiples effets immunologiques dose-dépendants</li> <li>Diminution de la croissance et de la dissémination tumorale</li> </ul> | aldesleukine (IL-2)                                |
| Multiplés cellules immunitaires   | Récepteurs de l'interféron- $\alpha$ | <ul style="list-style-type: none"> <li>Fixation de l'interféron-<math>\alpha</math> sur son récepteur</li> <li>Augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages</li> <li>Augmentation de cytotoxicité spécifique des LTc sur cellules tumorales</li> <li>Activité antiproliférative directe de l'interféron-<math>\alpha</math> sur diverses lignées de cellules tumorales humaines</li> </ul>  | interféron- $\alpha$ 2a<br>interféron- $\alpha$ 2b |
| Multiplés cellules immunitaires   | MUC-1                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>Vaccin contenant des séquences codant :                             <ul style="list-style-type: none"> <li>l'antigène MUC1 : retrouvé à la surface des cellules épithéliales. et surexprimé dans de nombreux cancers épithéliaux</li> <li>la cytokine IL-2 immunostimulante</li> </ul> </li> <li>Réponse anti-tumorale de cellules T spécifiques à MUC-1</li> </ul>   | vaccins : TG4010 (essais cliniques)                |
| Multiplés cellules immunitaires : cellules NK, Lymphocytes T cytotoxiques et « helper », etc. | Céréblon                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Liaison du céréblon à ikaros et aiolos</li> <li>Dégradation d'ikaros et aiolos par le protéasome</li> <li>Effets cytotoxiques et immuno-modulateurs <i>via</i> :                             <ul style="list-style-type: none"> <li>altération de la production de cytokines</li> <li>régulation de la co-stimulation des LTc</li> <li>augmentation de la cytotoxicité des cellules NK</li> </ul> </li> </ul>   | thalidomide<br>lénalidomide<br>pomalidomide        |



## 2) Les cellules non-immunitaires et leur ciblage

### a) Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont les cellules qui tapissent la face interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ces cellules sont donc importantes pour l'intégrité des vaisseaux sanguins et lymphatiques mais également pour la formation de nouveaux vaisseaux. Ainsi, elles sont déterminantes pour l'angiogenèse et la lymphangiogenèse qui sont les processus conduisant à la création de nouveaux vaisseaux, respectivement sanguins et lymphatiques, à partir de vaisseaux préexistants. Ces deux phénomènes sont impliqués dans le développement tumoral. La voie la plus connue dans ces phénomènes est celle du « vascular endothelial growth factor » (VEGF) et de son récepteur, le VEGFR. Le VEGF peut être sécrété par les cellules tumorales. Plusieurs isoformes de VEGF sont retrouvées chez l'homme, le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C et le VEGF-D. Le VEGF-A est le plus décrit dans l'angiogenèse alors que le VEGF-C et le VEGF-D semblent également impliqués dans la lymphangiogenèse. Ces facteurs de croissance se fixent sur leurs récepteurs, le VEGFR-1, le VEGFR-2 et le VEGFR-3. Le VEGFR-1 est un récepteur leurre et la fixation du VEGF sur ce récepteur n'induit pas d'effet pro-angiogénique. Au contraire, la fixation du VEGF sur le VEGFR-2 stimule l'angiogenèse, augmente la perméabilité vasculaire et transmet des signaux de prolifération, migration et de survie. Enfin, le VEGFR-3 semble plus particulièrement impliqué dans la lymphangiogenèse.

#### (i) Les cellules endothéliales vasculaires

L'angiogenèse a de multiples rôles physiologiques notamment dans le développement embryonnaire, le cycle menstruel, la croissance osseuse, *etc.* Cependant, ce processus joue aussi un rôle dans certaines conditions pathologiques, par exemple en favorisant la cicatrisation. L'angiogenèse est également importante dans le développement tumoral. En effet, la tumeur a besoin d'oxygène et de nutriments pour proliférer. L'oxygénation des tissus ne peut pas se faire au-delà de 200  $\mu\text{m}$  (environ 5 rangées de cellules), rendant nécessaire la création de nouveaux vaisseaux pour alimenter la tumeur. Dans le cas des cancers, la nécessité d'un « switch angiogénique » semble indispensable au développement tumoral. Ce switch angiogénique correspond à un déséquilibre en faveur des molécules pro-angiogéniques (telles que le VEGF, le FGF, le PDGF, *etc.*) au dépend de molécules anti-angiogéniques (telles que l'endostatine, la tumstatine, *etc.*). Ainsi, afin de limiter cette néo-angiogenèse, des médicaments ont été développés pour éviter la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de cellules endothéliales. L'axe le plus ciblé est celui du VEGF / VEGFR et plus particulièrement VEGF-A / VEGFR-2.

Deux médicaments ayant une AMM ciblent le VEGF. Il s'agit du bévacizumab, qui est un anticorps monoclonal humanisé, ou de l'aflibercept qui est un récepteur leurre soluble constitué de fragments issus des VEGFR-1/2 (où peuvent se fixer le VEGF-A), fusionnés au fragment Fc

de l'IgG1 humaine. Le bévacicumab et l'aflibercept vont ainsi se fixer au VEGF et empêcher sa fixation sur le VEGFR. La neutralisation de l'activité biologique du VEGF entraîne une importante activité anti-tumorale en induisant la régression de certains vaisseaux tumoraux existants et en inhibant la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux, inhibant ainsi la croissance tumorale. Les vaisseaux tumoraux étant anormaux et anarchiques, les anti-VEGF permettent également une normalisation transitoire des vaisseaux tumoraux, conduisant à une meilleure diffusion dans la tumeur des médicaments cytotoxiques qui peuvent leur être associés durant cette période.

D'autres médicaments anti-angiogéniques ciblent le VEGFR-2. Le ramucirumab est un anticorps monoclonal humain qui cible spécifiquement le VEGFR-2. Il empêche ainsi la fixation du VEGF sur le VEGFR-2 et inhibe l'activation de cette voie. Les autres médicaments ciblant le VEGFR-2 sont des ITK mais ne sont pas spécifiques car ils ciblent de nombreuses autres kinases. Le sorafénib, le sunitinib, le pazopanib, l'axitinib, le vandétanib, le nintédanib, le régorafénib, le lenvatinib et le cabozantinib sont des inhibiteurs multicibles notamment de l'activité tyrosine kinase du récepteur VEGFR-2<sup>34</sup>.

A titre d'exemple, le Sorafénib est une petite molécule inhibitrice des RAF-kinases, qui sont des sérine/thréonine-kinases, mais également de c-KIT, FLT-3, PDGFR- $\beta$ , VEGFR-2 et VEGFR-3, qui sont des RTK<sup>34</sup>.

## (ii) Les cellules endothéliales lymphatiques

La lymphangiogenèse correspond à la croissance de nouveaux vaisseaux lymphatiques à partir de vaisseaux préexistants. Elle permet la nutrition des tissus par apport des graisses absorbées au niveau de l'intestin grêle. La lymphe peut être assimilée à du sang dépourvu de globules rouges, plus pauvre en nutriments et plus riche en déchets que le sang. Dans un contexte tumoral, les cellules cancéreuses sont généralement séquestrées et détruites dans les ganglions lymphatiques qu'elles traversent. Cependant, dans certaines circonstances, les cellules peuvent se développer dans les ganglions et former des foyers tumoraux secondaires<sup>79</sup>. Les vaisseaux lymphatiques sont tapissés de cellules endothéliales lymphatiques. La voie impliquant le VEGF-C/D et le VEGFR-3 est la plus décrite dans la lymphangiogenèse.

Les anti-VEGFR3 disposant d'une AMM à l'heure actuelle sont des ITK mais ils ciblent également d'autres kinases. Le sorafénib, le sunitinib, le pazopanib, le lenvatinib, l'axitinib, le nintédanib, le régorafénib et le cabozantinib sont des anti-lymphangiogénique ciblant le VEGFR3 mais qui inhibent également de nombreuses autres cibles.

## *b) Les fibroblastes*

Les fibroblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse appartenant au tissu conjonctif. Ils ont une morphologie fusiforme et un rôle de soutien pour les différents tissus. Ils sont impliqués en particulier dans l'homéostasie de la matrice extracellulaire en régulant sa synthèse (production de collagène, élastine, fibronectine et laminine) ou sa dégradation (synthèse de métalloprotéases matricielles ; MMP). Les fibroblastes jouent également un rôle dans la réparation de lésions tissulaires. Le cancer étant souvent comparé à une blessure qui ne guérit pas, les fibroblastes semblent donc être des cellules du microenvironnement tumoral intéressantes à étudier.

Dans le contexte du cancer, les fibroblastes adoptent un phénotype particulier nommé « fibroblastes associés au cancer » (CAF). Ces CAF possèdent des caractéristiques phénotypiques différentes des fibroblastes normaux. En effet, les CAF expriment une forme particulière d'actine, l'actine des muscles lisses  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA), comme les myofibroblastes. Les CAF expriment aussi des protéines telles que « fibroblast activation protein » (FAP), « platelet-derived growth factor receptor » (PDGFR) ou encore le récepteur au facteur de croissance des fibroblastes (FGFR). Ces modifications phénotypiques semblent induites par les cellules tumorales. Les CAF sont décrits comme pro-tumoraux. En effet, ils peuvent jouer un rôle pro-angiogénique et favoriser à la fois la croissance tumorale et la dissémination métastatique (par dégradation de la MEC *via* la sécrétion de MMP). Dans de nombreux cancers, une forte proportion de CAF est de mauvais pronostic et peut entraîner la formation de fibrose.

Le ciblage des CAF semble intéressant pour améliorer le traitement de certains cancers. A l'heure actuelle, aucun médicament disposant d'une AMM n'est spécifique des fibroblastes. Cependant, des inhibiteurs agissant sur l'activité du FGFR sont utilisables en oncologie. Le nintédanib, le régorafénib, le ponatinib, le lenvatinib, le lucitanib et le dovitinib inhibent le FGFR, mais toutes ces molécules inhibent également d'autres cibles<sup>34</sup>.

Des traitements plus spécifiques des fibroblastes sont en cours de développement et pourraient permettre d'améliorer la prise en charge de certains cancers. A titre d'exemple, une molécule, le RO6874281, formée d'une protéine de fusion recombinante composée d'un anticorps monoclonal humain dirigé contre FAP lié à une forme modifiée d'interleukine-2, est en essai clinique de phase I ciblant les CAF. Une autre molécule, le RO6874813, est également en essai clinique de phase I. Le RO6874813 est un anticorps bispécifique qui cible simultanément la FAP des CAF et le récepteur de mort DR5 sur les cellules tumorales. Enfin, un anticorps monoclonal F19 ciblant spécifiquement FAP est également en essai clinique de phase I<sup>80</sup>.

Tableau 7 : Molécules ciblant les cellules stromales non-immunitaires développées en oncologie

## Ciblage du microenvironnement non-immunitaire

| Cellules ciblées                    | Cibles | Mécanisme d'action   | Molécules / médicaments  |
|-------------------------------------|--------|--|--|
| Cellules endothéliales vasculaires  | VEGF-A | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fixation de l'anticorps au VEGF-A et inhibition de sa fixation au VEGFR</li> <li>• Régression des vaisseaux tumoraux et inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux</li> <li>• Inhibition de la croissance tumorale</li> <li>• Normalisation des vaisseaux tumoraux, conduisant à une meilleure diffusion intra-tumorale des médicaments cytotoxiques associés</li> </ul>   | bévacizumab  |
| Cellules endothéliales vasculaires  | VEGF-A | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Récepteur leurre soluble constitué de fragments issus des VEGFR-1/2, fusionnés au fragment Fc de l'IgG1</li> <li>• Fixation au VEGF -A et inhibition de sa fixation au VEGFR</li> <li>• Régression des vaisseaux tumoraux et inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux,</li> <li>• Inhibition de la croissance tumorale</li> <li>• Normalisation des vaisseaux tumoraux, conduisant à une meilleure diffusion intra-tumorale des médicaments cytotoxiques associés</li> </ul> | aflibercept  |
| Cellules endothéliales vasculaires  | VEGFR2 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fixation au VEGF R2 et inhibition de la fixation du VEGF sur le VEGFR2</li> <li>• Inhibition de l'activation de la voie VEGF/VEGFR2</li> <li>• Inhibition de l'angiogenèse</li> </ul>   | ramucirumab  |
| Cellules endothéliales vasculaires  | VEGFR2 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de multiples kinases dont l'activité tyrosine kinase du VEGFR3</li> <li>• Inhibition de l'angiogenèse</li> </ul>   | sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, vandétanib, nintédanib, régorafénib, lenvatinib et cabozantinib |
| Cellules endothéliales lymphatiques | VEGFR3 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de multiples kinases dont l'activité tyrosine kinase du VEGFR3</li> <li>• Inhibition de la lymphangiogenèse</li> </ul>   | sorafenib, sunitinib, pazopanib, lenvatinib, axitinib, nintédanib, régorafénib et cabozantinib             |
| Fibroblastes                        | FGFR   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de multiples kinases dont l'activité tyrosine kinase du FGFR</li> <li>• Inhibition de la voie FGF/FGFR en inhibant l'activité du facteur de croissance transmise par cette voie</li> </ul>   | nintédanib, régorafénib, ponatinib, lenvatinib, lucitanib et dovitinib                                     |
| Fibroblastes                        | FAP    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fixation des anticorps sur la FAP des CAF</li> <li>• Diminution des CAF potentiellement pro-tumoraux</li> </ul>   | RO6874281, RO6874813, anticorps F19 (essais cliniques)   |

### *c) Les autres cellules non immunitaires*

A l'instar de ce que nous venons de voir, le microenvironnement tumoral est constitué d'énormément de cellules pouvant influencer le développement de la tumeur, sa progression ou sa résistance aux traitements. Chaque localisation tumorale dispose d'un environnement particulier, pouvant impliquer de nombreuses cellules. Dans le contexte du cancer ovarien, de multiples cellules sont à proximité des cellules tumorales, d'autant plus lorsque cette tumeur s'est disséminée dans le péritoine. Certaines cellules du microenvironnement impliquées dans la cancérogenèse, la progression tumorale et la chimiorésistance disposent de médicaments antitumoraux les ciblant (cf. ci-dessus : cellules endothéliales, fibroblastes, *etc.*). Cependant, d'autres cellules restent, à l'heure actuelle, privées de molécules les ciblant spécifiquement. Ainsi, les adipocytes<sup>81</sup>, les cellules mésothéliales et les cellules souches/stromales mésenchymateuses (MSC), impliquées dans le développement du cancer ovarien<sup>56</sup>, pourraient être des cibles intéressantes pour améliorer le traitement de ce cancer. Néanmoins, comme ce chapitre se focalise uniquement sur les cellules du microenvironnement disposant de médicaments (ayant une AMM) pour les cibler spécifiquement en oncologie, ces autres types cellulaires ne seront pas développés, mises à part les cellules stromales mésenchymateuses qui constituent les cellules plus spécifiquement étudiées dans ce manuscrit.

## C) Les cellules stromales mésenchymateuses

### 1) Caractéristiques

Les MSC appartiennent à une population cellulaire hétérogène de cellules multipotentes capables de se différencier, *in vitro*, en cellules de lignées mésodermiques, telles que des adipocytes, des ostéoblastes, des chondrocytes, des fibroblastes et des structures vasculaires et péri-vasculaires. Les MSC possèdent des propriétés caractéristiques des cellules souches en ce qui concerne leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation<sup>82</sup>. Les MSC présentent une adhérence au plastique et expriment plusieurs marqueurs de surface tels que CD73, CD90 et CD105. En revanche, elles n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques tels que CD11b, CD14, CD19, CD45 ou HLA-DR<sup>83</sup>. Bien qu'elles aient d'abord été identifiées comme une sous-population de cellules de moelle osseuse à potentiel ostéogénique, les MSC peuvent provenir de différents tissus. En effet, les MSC peuvent être obtenues non seulement à partir de la moelle osseuse (BM-MS), mais aussi à partir du tissu adipeux (ADSC) et d'une variété d'autres tissus, y compris le placenta, la peau, le cordon ombilical, le sang, *etc*<sup>84-87</sup>. Les MSC jouent un rôle majeur dans l'homéostasie et la régénération tissulaire. Elles participent à la réparation des tissus par leur tropisme spécifique vers les sites de blessures, où elles peuvent se différencier en cellules mésodermiques<sup>88-90</sup> et peuvent contribuer à la guérison des tissus principalement par la sécrétion de facteurs paracrines<sup>91-97</sup>. Les MSC servent également de cellules de niche pour d'autres types cellulaires en régulant des processus régénératifs tels que l'expansion des cellules hématopoïétiques et la régulation des cellules souches hématopoïétiques. De plus, les MSC jouent un rôle dans la tolérance immunitaire, par leurs effets immunosuppresseurs sur les lymphocytes T et les cellules dendritiques<sup>98-100</sup>, empêchant ainsi une réaction immune dans des conditions physiologiques et pathologiques. Enfin, leur capacité à sécréter divers facteurs neurotrophiques et anti-inflammatoires, ainsi que leur capacité à se différencier en phénotype neuronal, pourraient conférer des effets neuroprotecteurs dans des modèles de sclérose latérale amyotrophique, de sclérose en plaques, de maladie de Parkinson et de glaucome<sup>101-107</sup>. Pour toutes ces raisons, les MSC représentent une population cellulaire hétérogène qui pourrait être très adaptée aux thérapies cellulaires en médecine régénérative<sup>108-110</sup>.

### 2) Cellules stromales mésenchymateuses et cancer

Une caractéristique majeure des MSC est leur potentiel à migrer vers les sites de blessures. Les MSC peuvent ainsi être étroitement associées à des tumeurs malignes solides et hématologiques, et peuvent être recrutées sur les sites tumoraux ou, au contraire, attirer des cellules tumorales dans la moelle osseuse<sup>111</sup>.

### *a) Attraction des cellules tumorales vers la moelle osseuse ou constitution de niche métastatique*

Uchiyama *et al.* ont décrit que les MSC dérivées de la moelle osseuse (BM-MS) peuvent affecter le développement de cellules hématopoïétiques *via* des interactions cellule-cellule directes et/ou par la libération de facteurs de croissance et de différenciation. Ils ont montré que l'adhésion des lignées de cellules de myélome à des MSC permettait un contact cellule-cellule facilitant la stimulation de la sécrétion d'IL-6 par les MSC, par un mécanisme de croissance paracrine<sup>112</sup>. Les données de la littérature soutiennent le concept que d'autres cellules souches hématopoïétiques participent également activement à constituer une niche permissive pour les cellules métastatiques<sup>113,114</sup>. En résumé, les données montrent que les cellules tumorales pourraient subir une « chimio-attraction » par les MSC.

### *b) Recrutement des MSC au niveau du site tumoral*

Des BM-MS sont présentes dans le microenvironnement tumoral<sup>115,116</sup>. Kidd *et al.* ont montré que des MSC injectées par voie intraveineuse dans un animal porteur de tumeur sont attirées par la tumeur<sup>117</sup>. Des travaux ont montré que la chimio-attraction de MSC dépendait, au moins en partie, de plusieurs chimiokines et cytokines dont, entre autres, l'IL-1<sup>118</sup> et le SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor 1)<sup>119</sup>. Les MSC sont activement recrutées dans le stroma tumoral où elles interagissent avec les cellules malignes *via* un contact direct et par une signalisation paracrine. Grâce à de tels échanges, elles affectent sensiblement la biologie et le phénotype des cellules cancéreuses, augmentant leur capacité migratoire et métastatique et conférant des fonctions pro-tumorales par une augmentation de l'adhérence cellulaire, de l'invasion, de la prolifération et de la chimiorésistance<sup>55,56,114,120-124</sup>.

### *c) Phénotype des MSC associées au cancer (CA-MS)*

Comme mentionné auparavant, la biologie des cellules tumorales est affectée par les MSC. Il est raisonnable de supposer que les cellules tumorales peuvent à leur tour affecter la biologie des MSC. Des différences entre les phénotypes de CA-MS et de BM-MS ont été suggérées. Rafii *et al.* ont isolé un nouveau type de cellules stromales, provenant de l'ascite de patientes atteintes de cancer de l'ovaire, qui ont été trouvées étroitement associées aux cellules tumorales<sup>125</sup>. Ils ont défini ces cellules comme des cellules souches mésothéliales (dénommées Hospicells), car elles présentaient un phénotype typique de fibroblaste de par leur morphologie et l'expression de marqueurs tels que CD9, CD10, CD29, CD73, CD146 et CD166, sans expression de CD45 et CD34. Pour savoir si ces cellules dérivait de MSC, leurs propriétés ont été analysées en utilisant des BM-MS comme contrôle. Les résultats indiquaient des

similitudes entre ces Hospicells et les MSC, les amenant à redéfinir les cellules souches mésothéliales comme des CA-MS<sup>125-127</sup>.

Il n'y a pas de critères majeurs décrits en termes de phénotype ou de propriétés entre ces CA-MS<sup>125-127</sup> (Hospicells) et les BM-MS<sup>125-127</sup>, bien que Bochet *et al.* aient signalé que les BM-MS<sup>125-127</sup> ou les ADSC, pourraient acquérir un phénotype fibroblastique lors du contact avec la tumeur<sup>128</sup>. Ainsi, le contact de MS<sup>125-127</sup> physiologiques avec la tumeur pourrait entraîner une modification de leur phénotype. Dans le myélome multiple, par exemple, les MS<sup>125-127</sup> cultivées avec des cellules de MM ont un profil transcriptomique différent de MS<sup>125-127</sup> cultivées seules (augmentation de la transcription de l'IL-8, CXCL1, MMP12, *etc.*)<sup>129</sup>. Dans ce même cancer, les BM-MS<sup>125-127</sup> issues de patients atteints de MM ont une transcription de facteurs tels que GDF-15, IL-6 et DKK1 supérieure à celle des BM-MS<sup>125-127</sup> de donneurs sains<sup>130</sup>. Cette différence entre CA-MS<sup>125-127</sup> et MS<sup>125-127</sup> pourrait également être retrouvée dans d'autres cancers, comme le cancer du poumon. En effet, une étude comparant des MS<sup>125-127</sup> isolées de tissus non tumoraux à des MS<sup>125-127</sup> issus de sites tumoraux de cancer bronchiques non à petites cellules a montré des différences au niveau de la transcription d'une soixantaine de gènes dans ces 2 populations (butyrylcholinestérase, clusterin, *etc.*)<sup>131</sup>. Ces données montrent l'influence d'un environnement tumoral sur le phénotype des MS<sup>125-127</sup>, bien qu'une telle étude n'ait, jusqu'à ce jour, pas été réalisée dans le cancer ovarien.

#### d) *Le rôle pro-tumoral des MS<sup>125-127</sup>*

Le rôle des MS<sup>125-127</sup> dans le cancer est controversé<sup>132</sup>. Certaines publications mentionnent un rôle anti-tumoral potentiel des MS<sup>125-127</sup>. Takahara *et al.* ont décrit que l'injection d'ADSC en même temps que les cellules cancéreuses chez la souris induit un ralentissement de la prolifération tumorale<sup>133</sup>. Cependant, la plupart des données publiées soutiennent un effet pro-tumoral des MS<sup>125-127</sup>, principalement par la libération de facteurs d'activation tels que des cytokines et des facteurs de croissance. Les MS<sup>125-127</sup> sont capables de stimuler la croissance tumorale *in vivo*, d'augmenter l'angiogénèse et de favoriser le développement des métastases. A titre d'exemple, des expériences ont montré que les MS<sup>125-127</sup> contribuaient à la tumorigénicité du cancer de l'ovaire par la production altérée des « bone morphogenetic proteins » (BMP), BMP2, BMP4 et BMP6, conduisant à une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes *in vitro* et *in vivo*.

L'effet pro-tumoral des CA-MS<sup>125-127</sup> pourrait être attribué à leur effet sur l'angiogénèse par la libération, par elles-mêmes ainsi que par des cellules environnantes comprenant les cellules tumorales<sup>66</sup>, de facteurs pro-angiogéniques tels que l'IL-6, le VEGF, l'IL-8 et l'« hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  » (HIF-1 $\alpha$ ). Les MS<sup>125-127</sup> sont également capables d'inhiber la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T, l'abrogation de la réponse immunitaire contribuant à l'expansion tumorale<sup>98,99</sup>. Karnoub *et al.* ont démontré que l'injection de BM-MS<sup>125-127</sup> et de cellules de cancer du sein entraîne une augmentation du potentiel métastatique des cellules tumorales par la libération de « chemokine (C-C motif) ligand 5 » (CCL5)<sup>122</sup>. De plus, les MS<sup>125-127</sup> peuvent indirectement contribuer à la progression tumorale par leur action sur d'autres cellules



stromales à l'intérieur de la tumeur, telles que les macrophages. De tels macrophages activés présentent un phénotype particulier, sécrètent des quantités élevées de VEGF et favorisent ainsi l'angiogenèse<sup>66</sup>.

De plus, les CA-MSC semblent, non seulement favoriser la prolifération des cellules cancéreuses et l'angiogenèse *in vivo*<sup>126</sup>, mais elles peuvent également être impliquées dans l'acquisition d'une chimiorésistance par des cellules cancéreuses traitées par différents agents chimiothérapeutiques. Cette chimiorésistance acquise peut se produire par:

- la libération de facteurs solubles par les MSC (IL-6, IL-8, VEGF, *etc.*)<sup>66,126,127</sup>
- un échange de matériel cellulaire (comme des protéines membranaires, telles que des protéines MDR, entre MSC et cellules tumorales, *etc.*)<sup>125</sup>
- l'interaction directe par contact avec les cellules tumorales (pouvant conduire à l'activation de voie de signalisation comme Notch<sup>134</sup> ou Wnt<sup>135</sup>, *etc.*)

### 3) Rôle des cellules stromales mésenchymateuses dans la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies

Pour exercer leur rôle chimioprotecteur sur les cellules tumorales, les cellules stromales et les MSC semblent également résister à différents médicaments leur permettant d'agir tout au long du traitement<sup>136</sup>. Cette hypothèse a été étayée par différents rapports montrant une résistance *in vitro* des MSC humaines (hMSC) à des substances chimiothérapeutiques. Compte tenu des effets pro-apoptotiques de la plupart des médicaments cytotoxiques, ces auteurs ont suggéré que la résistance des hMSC contre les dommages génotoxiques provoqués par les médicaments pourrait être associée à leur résistance à l'induction de l'apoptose. Mueller *et al.* ont démontré que les hMSC, isolées à partir des échantillons de moelle osseuse de patients après chimiothérapie à dose élevée ou standard, étaient résistantes à des substances chimiothérapeutiques présentant pourtant différents mécanismes d'action (asparaginase, cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, carboplatine, méthotrexate, cladribine, cytarabine, thioguanine, mercaptopurine, vincristine, étoposide, teniposide, doxorubicine, idarubicine et épirubicine). Les hMSC conservent leurs caractéristiques (phénotype, capacité de prolifération et potentiel multipotent de différenciation) en dépit des traitements de chimiothérapie<sup>136</sup>. Ils ont comparé la réponse *in vitro* des BM-MSC exposées à différents types de chimiothérapies versus non exposées avec la réponse d'une lignée cellulaire de haute sensibilité connue. Les BM-MSC étaient plus résistantes au cisplatine, à la vincristine et à l'étoposide comparés à une lignée de cellules tumorales et conservaient leurs caractéristiques de cellules souches après un traitement génotoxique *in vitro*. De même, Beane *et al.* ont pu montrer que les ADSC conservaient leur potentiel régénératif après traitement par carboplatine<sup>137</sup>. Le fait que ces cellules soient encore présentes même après plusieurs cycles de chimiothérapies implique qu'elles peuvent effectivement jouer un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements antitumoraux.

De fait, outre leur effet stimulant sur la progression tumorale et l'invasion, plusieurs rapports ont suggéré que les MSC pourraient contribuer à modifier la résistance des cellules tumorales à différents médicaments. Les données *in vitro* et *in vivo* rapportées au cours de la dernière décennie ont mis en évidence l'importance du microenvironnement médullaire et en particulier des MSC dans la protection des cellules tumorales comme par exemple des cellules de LLC ou d'autres cellules leucémiques, de l'apoptose induite par des chimiothérapies<sup>124,138-140</sup>. Cet effet protecteur semble concerner à la fois les MSC murines et humaines et être indépendantes de l'origine des cellules tumorales – tumeurs solides ou hématologiques. A titre d'exemple, Kurtova *et al.* ont trouvé que les MSC murines et humaines étaient très efficaces pour protéger les cellules de LLC de plusieurs médicaments cytotoxiques. Le mécanisme impliqué s'est avéré être la résistance aux médicaments médiée par l'adhésion cellulaire, qui est de plus en plus reconnue comme étant la cause de la maladie résiduelle et des rechutes après le traitement classique des hémopathies et d'autres malignités. L'effet protecteur pourrait être obtenu avec un rapport d'une seule MSC pour 100 cellules tumorales<sup>140</sup>. La chimiorésistance conférée par les MSC aux cellules tumorales agit contre un grand nombre de molécules appartenant à différentes sous-classes (taxanes, sels de platine, fludarabine, dexaméthasone, cyclophosphamide, *etc.*), en les protégeant de l'apoptose induite par les cytotoxiques<sup>140</sup>. Bien que les effets des MSC sur la chimiorésistance des cellules tumorales soient principalement décrits dans les cancers hématologiques, les MSC sont également impliquées dans la résistance aux médicaments de cancers solides, comme l'adénocarcinome ovarien et le cancer du poumon, entre autres. Cependant, les mécanismes et les voies cellulaires qui sont activés par les MSC sont différents d'un modèle à l'autre.

#### *a) Mécanismes de résistance nécessitant un contact direct avec les cellules tumorales*

Dans certains modèles tumoraux, le contact direct des MSC avec les cellules tumorales semble important dans l'acquisition d'une chimiorésistance. Uchiyama *et al.* ont montré que l'adhésion des cellules tumorales aux MSC induisait la sécrétion d'IL-6 par les cellules tumorales. Les auteurs ont caractérisé l'adhésion des cellules tumorales (lignées cellulaires dérivées de myélome) aux MSC en utilisant des essais de fixation au chrome 51 et ont ensuite analysé l'effet de cette adhésion sur la synthèse de l'ADN et la sécrétion d'IL-6 par les cellules tumorales. Ils ont conclu que le contact cellule-cellule facilitait la sécrétion d'IL-6 par les cellules tumorales<sup>112</sup> et que cette cytokine était impliquée dans l'acquisition de la chimiorésistance<sup>124,139,141-144</sup>. De la même manière, Kurtova *et al.* ont montré que l'effet protecteur conféré par les MSC sur des cellules leucémiques était largement dépendant de leur contact cellule-cellule direct, car une séparation des cellules par des filtres micropores abrogeait la fonction protectrice des MSC<sup>140</sup>.

Enfin, Jin *et al.* ont rapporté un rôle protecteur des MSC sur des cellules leucémiques vis-à-vis de l'imatinib qui impliquait le contact cellule-cellule entre les MSC et les cellules tumorales par l'intermédiaire de l'« intégrin-linked kinase ». En fait, ces auteurs ont montré que l'inhibition de cette « intégrin-linked kinase » conduisait à une abrogation de la croissance et à une apoptose

accrue des cellules leucémiques induites par l'imatinib lorsqu'elles sont co-cultivées avec des MSC<sup>145</sup>.

(i) Modification de l'expression de canaux à la surface cellulaire des cellules tumorales

Le flux de médicaments est une considération importante dans l'efficacité des médicaments anti-tumoraux. Il concerne à la fois le niveau d'absorption intracellulaire de la molécule, nécessaire pour induire un effet cytotoxique, et son efflux dans le milieu extracellulaire qui diminue efficacement la quantité de médicament atteignant la cible et donc son efficacité. De nombreuses pompes ou canaux cellulaires sont impliqués dans des mécanismes de résistance aux médicaments des cellules tumorales. Un mécanisme bien décrit est la surexpression des protéines impliquées dans la résistance à plusieurs médicaments (protéines de « multidrug resistance » ; MDR). Les protéines MDR sont des pompes dépendantes de l'ATP qui peuvent conférer une résistance à de nombreux médicaments, y compris les taxanes, les vinca-alcaloïdes et les anthracyclines<sup>74</sup>. Une augmentation de l'expression de ces pompes, et donc de la résistance des cellules tumorales au traitement, pourrait être induite par le stroma (Tableau 8).

Rafii *et al.* ont montré que les Hospicells (assimilés à des CA-MSC, isolées de patientes atteintes d'un cancer ovarien) pouvaient interagir directement avec les cellules épithéliales cancéreuses ovariennes. Ils ont démontré que les Hospicells sont spécifiquement associées aux cellules tumorales *via* leurs pseudopodes, par contact membranaire sur une grande surface, et à travers des jonctions serrées comme les desmosomes. Les auteurs ont étudié le rôle potentiel de ces Hospicells dans la chimiorésistance et ont découvert que la co-culture entre Hospicells et cellules épithéliales cancéreuses ovariennes induisait un profil chimio-résistant des cellules tumorales, par l'intermédiaire d'un contact direct cellule-cellule<sup>125</sup>. Ils proposent plusieurs mécanismes responsables de l'acquisition de la chimiorésistance par les cellules cancéreuses, y compris le transfert de molécules par des jonctions gap ou le couplage par des interactions ligand-récepteur. L'analyse morphologique par microscopie électronique des interactions entre CA-MSC et cellules cancéreuses a finalement amené les auteurs à suggérer l'apparition de « synapses oncologiques » comparables aux « synapses immunologiques ». Ces interactions ont induit la capture de morceaux de membranes des Hospicells au niveau de la surface des cellules cancéreuses dans un processus actif appelé trogocytose oncologique. Ce transfert de protéines membranaires a conduit les cellules tumorales à acquérir de nouvelles protéines à leur surface, en particulier des protéines MDR, et ainsi de présenter de nouvelles propriétés. Les auteurs ont observé que ces échanges ont permis l'acquisition par les cellules tumorales ovariennes de protéines MDR et de la P-gp, exprimées initialement par les CA-MSC (Hospicells). La co-culture avec ces CA-MSC (Hospicells) a conduit à une augmentation de la résistance des cellules tumorales ovariennes (CTO) au paclitaxel et au carboplatine. Le blocage des pompes d'efflux a restauré la sensibilité au paclitaxel et au carboplatine<sup>125</sup>. Cette augmentation de protéines MDR semble nécessiter un échange membranaire, soit par contact

direct cellule-cellule, soit par l'intermédiaire d'exosomes (cf. partie exosomes I) C) 3) b) (vii))<sup>146</sup>.

Lis *et al.* ont démontré des changements du profil transcriptomique de cellules cancéreuses induits par leur culture avec des MSC<sup>123,147</sup>. Les auteurs ont réalisé un tri cellulaire et une analyse transcriptomique après co-cultures de deux lignées cellulaires différentes de cancer de l'ovaire avec des MSC. Après 24 heures, les mono ou co-cultures ont été traitées pendant 24 heures supplémentaires avec du cisplatine à 90 µM et du paclitaxel à 6 nM. Ils ont constaté que les cellules cancéreuses ovariennes OVCAR-3 co-cultivées présentaient des niveaux accrus de « growth arrest and DNA damage » (GADD)<sup>123</sup>, dont la carence est connue pour augmenter la sensibilité cellulaire à l'irradiation par des UV ou au cisplatine<sup>148,149</sup> par rapport aux cellules cultivées seules. L'interaction MSC/cellules tumorales induit également une augmentation de la transcription de « DNA-damage-inducible transcript 3 » (*DDIT3*), qui peut moduler la régulation de la P-gp<sup>150</sup>. Dans une autre lignée cellulaire (SKOV-3), les MSC induisaient une variation de l'expression de la fibronectine impliquée dans la résistance au paclitaxel<sup>123</sup>.

Les protéines MDR ne sont pas les seules à être potentiellement impliquées dans la résistance aux traitements anticancéreux. Pillozzi *et al.* ont observé une augmentation de l'expression du gène lié au canal potassique-1 apparenté à éther-à-go-go (*hERG1*) à la surface des cellules de LAL lorsqu'elles étaient associées à des MSC. Ces canaux *hERG1* semblent jouer un rôle important dans l'acquisition de résistance à la doxorubicine, à la prednisone et au méthotrexate par les cellules tumorales. En effet, l'utilisation de molécules bloquant ces canaux a diminué l'effet chimioprotecteur des MSC<sup>151</sup> (Tableau 8).

Tableau 8 : Différents mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales nécessitant un contact direct avec les MSC

| Mécanismes de résistance impliquant un contact direct cellule/cellule |   |  |   |  |  |  |                                       |
|---|---|--|---|--|--|--|---------------------------------------|
| Mécanismes de résistance  | Facteurs sécrétés et/ou contact cellule/cellule | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales  | Cellules stromales utilisées                             | Origine des cellules tumorales utilisées               | Médicaments                            | Références                            |
| Expression de protéines MDR   | co-culture                                      | Expression de protéines MDR                          | Acquisition de protéines MDR par trogocytose oncologique  | Hospicells   | Cellules cancéreuses ovariennes                        | carboplatine, paclitaxel               | Rafii <i>et al.</i> <sup>125</sup>    |
| Augmentation de l'expression de hERG1                                 | co-culture                                      |  | Augmentation de l'expression de CXCR4<br>Augmentation de l'expression de hERG1,<br>Activation des voies de signalisation impliquant PI3K/Akt et ERK1/2  | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT                  | Cellules de LAL  | doxorubicine, prednisone, méthotrexate | Pillozzi <i>et al.</i> <sup>151</sup> |
| Résistance aux anticorps médiée par l'adhésion cellulaire             | co-culture                                      |  | Expression de VLA4  | HS-5   | Lymphome à cellules B                                  | rituximab, doxorubicine                | Mraz <i>et al.</i> <sup>152</sup>     |
| Voie de signalisation NF-κB   | co-culture                                      |  | Augmentation de RelB nucléaire  | BM-cellules stromales humaines*                          | Cellules de LLC  | fludarabine                            | Xu <i>et al.</i> <sup>153</sup>       |
| Voie de signalisation Wnt   | co-culture                                      | Expression de ligands de la voie Wnt                 | Diminution du clivage de Bcl-2,<br>Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie Wnt   | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT                  | Cellules de LAL  | cytarabine                             | Yang <i>et al.</i> <sup>135</sup>     |
| Modification du profil transcriptomique                               | co-culture                                      |  | Modification du profil transcriptomique dans des gènes impliqués dans la chimiorésistance :<br>Augmentation de la transcription des gènes <i>DDIT3</i> , <i>ATF2</i> , <i>RASGRP1</i> et<br>Diminution de la transcription du gène de <i>BTG2</i> | BM-MSC de donneurs sains                                 | Cellules cancéreuses ovariennes                        |  | Lis <i>et al.</i> <sup>123</sup>      |
| Inconnu   | co-culture                                      |  |   | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT                  | Cellules LMC   | imatinib, nilotinib, dasatinib         | Zhang <i>et al.</i> <sup>154</sup>    |
| Inconnu   | co-culture                                      |  |   | BM-MSC de patients volontaires de chirurgie orthopédique | Cellules de carcinome épidermoïde de la tête et du cou | paclitaxel                             | Scherzed <i>et al.</i> <sup>155</sup> |
| Inconnu   | co-culture                                      |  |   | BM-MSC   | Cellules cancéreuses ovariennes                        | carboplatine                           | Lis <i>et al.</i> <sup>147</sup>      |

BM-cellules stromales\*, probablement des BM-MSC: cellules ayant la morphologie de MSC et positives pour le marqueur de surface CD54.

## (ii) Résistance aux médicaments induite par l'adhérence cellulaire

L'adhérence intercellulaire par des protéines comme VCAM1 et l'intégrine  $\beta 1$  joue un rôle dans la résistance aux traitements<sup>156</sup>. L'adhérence des cellules tumorales de myélome à la fibronectine se fait spécifiquement par le VLA4 (Very late antigen 4), appelé également intégrine  $\alpha 4 \beta 1$ <sup>112</sup>. VLA4 permet l'adhérence des cellules tumorales à la fibronectine et à VCAM1 qui sont responsables de la résistance aux médicaments induite par l'adhérence cellulaire (cell adhesion-mediated drug resistance; CAM-DR)<sup>157</sup>. Cette CAM-DR est responsable par exemple de la résistance au tipifarnib, qui est un inhibiteur de farnésyl transférase<sup>158</sup>. Ce mécanisme a été montré lors de la co-culture de cellules de myélome multiple (MM) avec des cellules stromales de moelle osseuse<sup>158</sup>. Dans les cellules de MM, Sanz-Rodriguez *et al.* ont mis en évidence une up-régulation de VLA4 induite par SDF-1. Ainsi, comme le SDF-1 peut être sécrété par les MSC (cf. partie SDF-1 I) C) 3) b) (i)), ces cellules pourraient être responsables d'une augmentation de l'expression de VLA4 dans les cellules tumorales conduisant à une augmentation de leur résistance à certains traitements. De manière comparable à la CAM-DR, Mraz *et al.* ont pu mettre en évidence un mécanisme de CAM-AR (cell adhesion-mediated antibody resistance) induit par des cellules stromales. Dans leurs expériences, ils ont montré que les cellules stromales isolées de moelle osseuse protégeaient les cellules de lymphome B de l'apoptose induite par le rituximab, nommée CAM-AR mais aussi de l'apoptose induite par la doxorubicine, CAM-DR<sup>152</sup>. L'utilisation d'un anti-VLA4, le natalizumab, diminue de façon importante l'adhérence des lymphocytes B à la fibronectine et reverse partiellement l'effet chimioprotecteur vis-à-vis de la doxorubicine et le rituximab des cellules stromales de moelle osseuse sur les cellules de lymphome B (Tableau 8).

## (iii) Acquisition de la résistance *via* l'activation de la voie NF- $\kappa$ B

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est impliqué dans l'inflammation et dans divers processus physiologiques telles que la régulation de la prolifération cellulaire, l'apoptose et la transduction du signal. Dans de nombreux cancers, la voie de signalisation NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans la tumorigenèse et peut également protéger les cellules cancéreuses de la chimiothérapie et de la radiothérapie<sup>159</sup> aussi bien pour les cancers solides comme le cancer du sein<sup>160,161</sup> que pour les cancers hématologiques<sup>162</sup>. L'activité constitutive de NF- $\kappa$ B/Rel a été démontrée dans plusieurs hémopathies malignes. En relation avec cela, une autre voie activée par NF- $\kappa$ B implique la protéine RelB, dont l'activité est corrélée avec le stade de LLC selon la classification de Binet<sup>153</sup>. Les cellules B de LLC RelA+/RelB+ sont plus résistantes à l'apoptose que les cellules RelA+/RelB-. Au cours de la culture avec des cellules stromales issues de moelle osseuse (probablement pas seulement des BM-MSK mais aussi des fibroblastes et des macrophages), une augmentation de la quantité de RelB est observée dans le noyau des cellules cancéreuses. De plus, la co-culture avec des cellules stromales augmente la résistance des cellules B de LLC à la fludarabine. RelB pourrait donc être impliquée dans la résistance des cellules tumorales à la fludarabine induite par les cellules stromales<sup>153</sup> (Tableau 8).

(iv) Acquisition de la résistance *via* l'activation de la voie (Wnt)/ $\beta$ -caténine

La voie « wingless-type MMTV integration site family » (Wnt)/ $\beta$ -caténine joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires, y compris le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. En l'absence d'activation de la voie Wnt, la  $\beta$ -caténine s'associe à un complexe protéique (le complexe cadhérine-caténine), conduisant à son ubiquitination et sa dégradation<sup>163</sup>. L'activation de la voie Wnt inhibe ce complexe et stabilise la  $\beta$ -caténine, permettant sa translocation au niveau du noyau pour remplir son rôle de co-activateur transcriptionnel. Cette voie régule l'expression de nombreux gènes impliqués, entre autres, dans la prolifération, la différenciation, la survie et la polarité cellulaire<sup>164,165</sup>. Par conséquent, et sans surprise, le dysfonctionnement de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine peut conduire à des maladies telles que la fibrose, des maladies neurodégénératives et le cancer<sup>165</sup>. Dans les cellules cancéreuses, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est capable de moduler la migration cellulaire, les processus d'invasion et la prolifération<sup>164</sup>. Elle régule également les gènes impliqués dans l'apoptose et participe à la résistance de certains cancers à la chimiothérapie.

Les MSC peuvent activer cette voie conduisant à la protection des cellules tumorales contre les traitements anti-tumoraux (Tableau 8). Yang *et al.* ont montré que les BM-MSc (lignées cellulaires de MSC humaines, HS-5, et murines, M2-10B4) protégeaient les cellules de LAL contre l'apoptose induite par la cytarabine<sup>135</sup>. Une analyse par qRT-PCR montrait la transcription de 16 ARNm codants pour les ligands de la voie de signalisation Wnt dans les MSC. En utilisant des microarrays pour étudier les profils d'expression génique, ils ont observé une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la voie Wnt (lymphoid enhancer-binding factor 1 ; *LEF1*, *MYC* (codant pour un facteur de transcription), cyclin D-type binding-protein 1 ; *CCNDBP1*) dans les cellules de LAL co-cultivées avec des MSC par rapport à des cellules leucémiques cultivées seules. De plus, Xia *et al.* ont montré que la co-culture avec les MSC entraînait une résistance des cellules de LAM à l'apoptose induite par le traitement par la mitoxantrone<sup>166</sup>. L'adhésion aux MSC conduit, dans les cellules de LAM, à une augmentation de l'expression de la protéine c-Myc. La résistance à la mitoxantrone des cellules de LAM n'a pas été observée dans le système en transwell, ce qui démontre la nécessité d'un contact direct cellule-cellule pour que les cellules de LAM acquièrent une résistance<sup>167</sup>. Le ciblage de la voie Wnt semble une alternative intéressante pour prévenir l'effet chimioprotecteur des MSC sur les cellules tumorales. L'utilisation d'un inhibiteur de la  $\beta$ -caténine, impliquée dans la voie Wnt, réduit la résistance, induite par les MSC, de cellules de LAL à la cytarabine, observée *in vitro*, et permet également de potentialiser son action *in vivo*<sup>135</sup>. L'inhibition de c-Myc en utilisant un siRNA ou un inhibiteur, augmente l'apoptose induite par la mitoxantrone et empêche l'effet chimioprotecteur induit par les MSC dans les cellules de LAM<sup>166</sup>.

(v) Effet des MSC sur la transcription, au sein des cellules tumorales, de gènes impliqués dans la résistance au traitement

Les MSC peuvent modifier le profil de transcription des gènes qui prédisent la réponse à certains traitements. Les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement font partie d'un processus important conduisant à la modification du microenvironnement vers un contexte pro-tumoral (Figure 6). Les cellules du microenvironnement, y compris les MSC, peuvent alors modifier le phénotype des cellules tumorales, qui seraient alors capables de présenter des changements dans leurs capacités proliférative, migratoire et métastatique, et d'acquérir une résistance accrue aux médicaments antitumoraux<sup>55,120-123,168-170</sup>. En effet, la co-culture de BM-MSC avec des cellules tumorales ovariennes (CTO) conduit à une modification du profil transcriptomique des cellules tumorales. Les CTO surexpriment alors les gènes impliqués dans la résistance à de nombreux médicaments antitumoraux (Tableau 8). Ainsi, en présence de BM-MSC, Lis *et al.* ont observé une transcription accrue du gène « activating transcription factor 2 » (*ATF2*) dans les CTO<sup>123</sup>. L'*ATF2* est un facteur de transcription impliqué dans les lésions de l'ADN<sup>171</sup>. Il peut induire une résistance aux traitements entraînant des dommages à l'ADN, comme le cisplatine ou l'étoposide, dans des cellules de cancer du sein ou de cancer du poumon non à petites cellules<sup>172</sup>. Il induit également une résistance à la radiothérapie dans les cellules de mélanome<sup>173</sup>. Lis *et al.* ont également observé une augmentation de la transcription du gène « RAS guanyl releasing protein 1 » (*RASGRP1*), qui, lorsqu'il est surexprimé, peut provoquer une résistance à l'inhibition de MEK<sup>174</sup>, et une diminution de la transcription du gène « B-cell translocation gene 2 » (*BTG2*), dont la perte est prédictive de la résistance au tamoxifène<sup>175</sup>. En somme, ces résultats démontrent que l'interaction des cellules tumorales avec les MSC conduit à la transcription de gènes impliqués dans la résistance aux traitements chimiothérapeutiques dans les cellules tumorales (Tableau 8).

#### (vi) Arrêt du cycle cellulaire, état de quiescence

Une des causes de la chimiorésistance de certaines cellules tumorales et de la récurrence tumorale, est la présence de cellules tumorales dans un état de quiescence. En effet, la plupart des molécules cytotoxiques, en particulier les plus anciennes, ciblent des cellules à multiplication rapide telles que les cellules tumorales. Cependant, l'hétérogénéité cellulaire, caractéristique des tumeurs, permet à certaines cellules cancéreuses, en particulier celles en état de quiescence, ou avec un taux de multiplication lent, d'échapper aux traitements cytotoxiques. Ces cellules présentent un potentiel de récurrence quand elles rentrent ultérieurement dans le cycle cellulaire. L'état de quiescence peut être induit par des signaux externes, en particulier ceux émis par le microenvironnement tumoral. Les MSC peuvent modifier la croissance des cellules tumorales ou provoquer un blocage de ces cellules dans la phase G0 / G1 du cycle cellulaire. Cela entraîne une sensibilité réduite à la chimiothérapie (Tableau 9). Nefedova *et al.* ont observé l'arrêt du cycle cellulaire dans des cellules de myélome lors de leur contact direct avec des cellules stromales (telles que des BM-MSC: cellules ayant la morphologie de MSC et étant positives pour le marqueur de surface CD54)<sup>176</sup>. Ils ont également observé une augmentation parallèle de la résistance à la mitoxantrone (inhibiteur de la topoisomérase II), avec une diminution d'environ 50% de cellules en apoptose lorsque les cellules de myélome adhéraient sur des



cellules stromales par rapport à celles cultivées seules en suspension. Cette résistance n'était pas due à une diminution de l'entrée de médicaments dans les cellules mais plutôt à l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt du cycle pourrait être induit par la surexpression de l'inhibiteur de « cyclin-dépendent kinase » (CDK) p21<sup>WAF1</sup>, qui se lie et inhibe l'activité des complexes cycline/CDK conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. L'inhibiteur de CDK p27<sup>Kip1</sup>, connu pour se lier au complexe cycline E/CDK2 conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire, pourrait également être impliqué. Les MSC peuvent moduler l'expression de p21<sup>WAF1</sup> et de p27<sup>Kip1</sup>. La surexpression de ces protéines empêche le passage de la phase G1 à la phase S et provoque donc un blocage du cycle cellulaire<sup>176</sup>. En effet, Lwin *et al.* ont observé que l'adhérence des cellules de lymphome du manteau et de lymphome non hodgkinien sur les BM-MSC (HS-5) induisait un arrêt du cycle cellulaire en phase G1<sup>177</sup> par surexpression des protéines p21<sup>WAF1</sup> et p27<sup>Kip1</sup>. Ces protéines sont régulées au niveau post-transcriptionnel par « S-phase kinase-associated protein 2 » (SKP2), une sous-unité de l'ubiquitine ligase Skp, Cullin, F-box containing complex (SCF<sup>Skp2</sup>). Une diminution de cette ubiquitine ligase conduit à une augmentation de l'expression de p21<sup>WAF1</sup> et p27<sup>Kip1</sup>, entraînant finalement l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. De même, Wei *et al.* ont montré que la culture de cellules de LMC en présence de BM-MSC (que ce soit avec contact direct cellule-cellule ; co-culture, soit sans contact direct ; système de transwell) ou en présence de milieu conditionné (MC) par des MSC, induisait une réduction de la prolifération des lignées cellulaires de LMC avec une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0 / G1 par rapport aux lignées cellulaires de LMC cultivées seules<sup>178</sup>. Cette inhibition de la prolifération induite par les MSC pourrait jouer un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose. En effet, la co-culture avec des MSC provoque une diminution du pourcentage de cellules tumorales en apoptose (induite par une privation en sérum) par rapport aux cellules cultivées seules. Le mécanisme à l'origine de cette résistance apoptotique induite par les MSC dans les cellules leucémiques pourrait impliquer l'induction par des MSC d'un état cellulaire proche de la quiescence<sup>178</sup>. Cet effet des MSC sur la régulation du cycle cellulaire des cellules tumorales pourrait être présent dans de nombreux autres cancers. En effet, Ramasamy *et al.* ont observé un arrêt du cycle cellulaire induit par des MSC à la fois dans les cellules tumorales d'origine hématopoïétique et non hématopoïétique<sup>179</sup>. Dans cette expérience, la co-culture des cellules cancéreuses avec les BM-MSC a entraîné une réduction de l'apoptose des cellules tumorales en bloquant les cellules tumorales dans la phase G1. Bien que le plus grand effet ait été obtenu par co-culture, l'effet antiprolifératif est dû, au moins en partie, à la sécrétion de facteurs solubles<sup>179</sup>. Des preuves d'un arrêt induit par les MSC en phase G1 impliquant la voie de signalisation Notch ont été présentées par Nefedova *et al.* Cette équipe a utilisé des cellules stromales de moelle osseuse (BM-MSC, fibroblastes et macrophages) de cinq patients exprimant les ligands de la voie Notch, Jagged-1 et delta-1<sup>134</sup>. La co-culture de ces cellules stromales avec des cellules de myélome a induit l'activation de la voie Notch et la résistance au melphalan et à la mitoxantrone. Toutes les lignées de cellules de myélome évaluées exprimaient Notch-1, sauf une. Les cellules qui n'exprimaient pas Notch-1 mais qui exprimaient Notch-2 et Notch-3 n'ont pas acquis cette résistance. L'addition de peptide Jagged-1 aux cellules de myélome exprimant Notch-1 a également induit cette résistance aux médicaments<sup>180</sup>. Cette activation de Notch-1 associée à la résistance aux médicaments s'accompagne d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et d'une augmentation de l'expression de p21<sup>WAF1</sup>. Ainsi, l'arrêt en phase G1 semble donc induire la

présence de cellules quiescentes, difficiles à éliminer par des médicaments cytotoxiques, en particulier ceux agissant sur des cellules se divisant rapidement. En utilisant un autre modèle (LLC), Nwabo Kamdje *et al.* ont montré que les BM-MSC pouvaient réguler et soutenir la survie des cellules de LLC traitées par différentes molécules chimiothérapeutiques telles que le cyclophosphamide, la fludarabine et la bendamustine, ainsi que des corticostéroïdes comme la prednisone et l'hydrocortisone<sup>180,181</sup>. Pour étudier le rôle de la signalisation Notch dans cette chimiorésistance induite par les BM-MSC, ils ont réalisé une co-culture de cellules de LLC et de BM-MSC et ont appliqué des chimiothérapies en présence ou en l'absence d'une combinaison d'anticorps anti-Notch-1, Notch 2 et Notch-4 ou des anticorps inhibiteurs de  $\gamma$ -secrétase XII (XII GSI), permettant d'inhiber la chimiorésistance observée en 3 jours. Ils ont montré que la signalisation *via* Notch avait un rôle direct dans la survie cellulaire des LLC. La présence de BM-MSC, qu'elles soient d'origine allogénique ou autologue, amplifiait le phénomène et induisait un effet anti-apoptotique. L'activation de la voie de signalisation de Notch était observée lors du contact entre les BM-MSC et les cellules de LLC. Les deux types de cellules exprimant les récepteurs (Notch-1, -2 et -4) et les ligands de la voie Notch, étaient impliqués dans la chimiorésistance à l'apoptose induite lors de contacts directs entre les cellules de LLC et des BM-MSC. Cet effet pourrait impliquer au moins en partie Bcl-2, NF- $\kappa$ B et des mécanismes dépendants de p53<sup>181</sup>. Bien que le contact étroit entre les cellules de LLC et les BM-MSC soit véritablement associé à l'acquisition de la chimiorésistance, des facteurs solubles libérés par des MSC, tels que l'IL-7 et le VEGF, pourraient également être impliqués dans ce phénomène<sup>134,176,180,181</sup>.

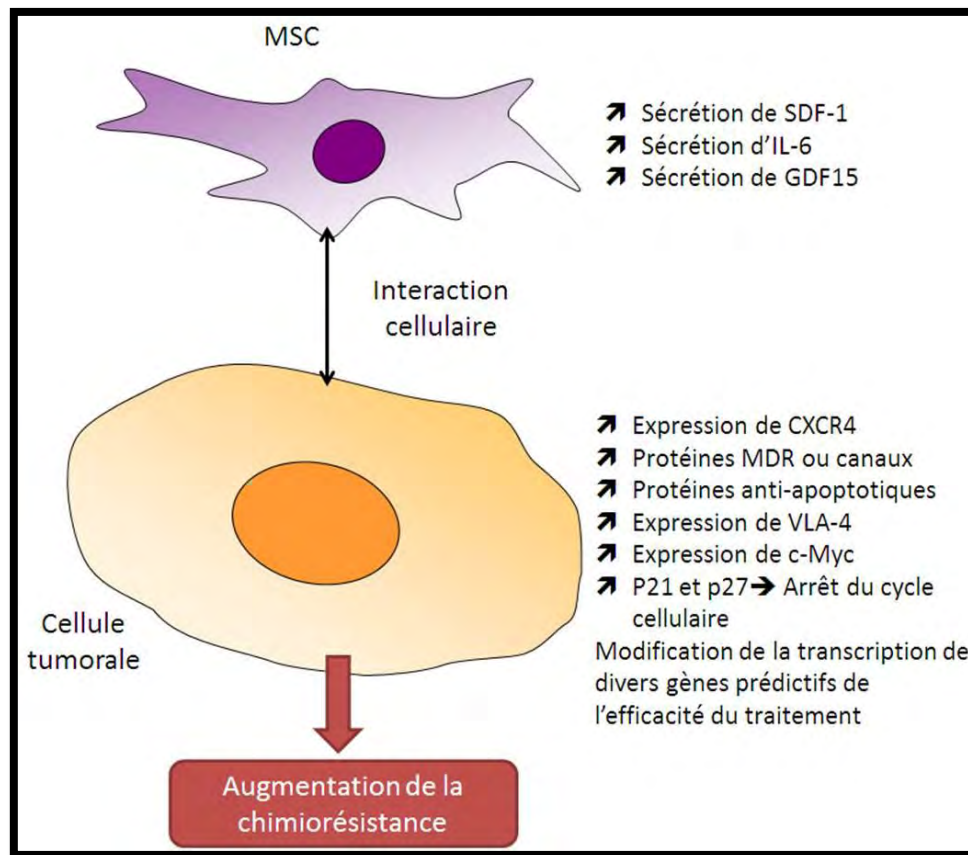
Tableau 9 : Résistance des cellules tumorales induite par les MSC par arrêt du cycle cellulaire

| Arrêt du cycle cellulaire          |  |  |   |  |  |   |
|------------------------------------|--|--|---|--|--|---|
| Facteurs sécrétés et/ou co-culture | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales                             | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales   | Cellules stromales utilisées                            | Origine des cellules tumorales utilisées   | Médicaments                                  | Références                                |
| Co-culture                         |  | Arrêt du cycle cellulaire  | Cellules stromales dérivées de BM de donneurs sains     | Cellules de myélome  | mitoxantrone                                 | Nefedova <i>et al.</i> <sup>176</sup>     |
| Co-culture                         | Expression des ligands de la voie Notch: Jagged-1 and Delta-1                    | Expression de Notch-1, augmentation de l'expression de p21, arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 | Cellules stromales dérivées de BM de donneurs sains     | Cellules de myélome  | melphalan, mitoxantrone                      | Nefedova <i>et al.</i> <sup>134</sup>     |
| Co-culture                         |  | Surexpression de p21 et p27, arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1                                | HS-5  | Cellules de lymphome   |  | Lwin <i>et al.</i> <sup>177</sup>         |
| Facteurs sécrétés                  |  | arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, augmentation de la phosphorylation de BAD et Akt           | BM-MSC de patients de LLC, LMC et LAM                   | Cellules de LMC  |  | Wei <i>et al.</i> <sup>178</sup>          |
| Co-culture et facteurs sécrétés    |  | Arrêt du cycle cellulaire en phase G1  | BM-MSC de donneurs sains                                | Lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T humains, cellules d'adénocarcinome colique, cellules tumorales pulmonaires, cellules B, cellules de LAM et LMC |  | Ramasamy <i>et al.</i> <sup>179</sup>     |
| Co-culture                         | Expression des ligands de la voie Notch: Jagged-1/-2, Delta like ligands-1/-3/-4 | Expression de Notch-1/-2/-4  | BM-MSC de patients atteints de LLC et de donneurs sains | Cellules de LLC  | fludarabine, cyclo-phosphamide, bendamustine | Nwabo Kamdje <i>et al.</i> <sup>181</sup> |

### b) Mécanismes de résistance liés à la sécrétion de facteurs solubles

De nombreux facteurs ont été identifiés dans le microenvironnement des tumeurs. En effet, les cellules tumorales et les cellules stromales, y compris les MSC, sécrètent de nombreux facteurs, et nombre d'entre eux sont décrits comme ayant des propriétés pro-tumorales. Ainsi, certaines de ces molécules pourraient être associées à l'acquisition de chimiorésistance, comme des facteurs solubles tels que l'IL-6, l'IL-8 et le SDF-1 (Figure 6).

Figure 6 : Les interactions entre les cellules tumorales et les MSC modifient le phénotype de ces deux types cellulaires conduisant à une augmentation de la chimiorésistance tumorale



(i) Acquisition de résistance impliquant l'axe SDF-1 / CXCR4

Un des facteurs pertinents dans la chimiorésistance des cellules tumorales induite par les MSC est le stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), également appelé « chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) ». Le SDF-1 se lie à son récepteur, « chemokine (C-X-C motif) receptor 4 » (CXCR4), qui est exprimé par les cellules tumorales. La voie de signalisation de SDF-1 / CXCR4 est impliquée dans le « homing » des cellules de LMC dans la moelle osseuse<sup>138</sup>. Le niveau d'expression de CXCR4 sur des cellules tumorales est corrélé au degré de chimiotactisme induit par SDF-1 ou par des cellules stromales<sup>182</sup>. Corcoran *et al.* ont montré que les lignées de cellules tumorales de sein (MCF-7, T47D et MDA-MB-231), ont une expression de CXCR4 supérieure à celle des lignées de cellules mammaires non tumorales (MCF12A)<sup>183</sup>. L'extinction par siRNA de l'expression (knockdown) de CXCR4 sur les cellules tumorales mammaires réduit leur migration vers les MSC et leur adhérence sur les MSC. Des résultats similaires sont obtenus lors d'un knockdown par siRNA de SDF-1 dans les MSC. L'intérêt de cette voie en oncologie a donc conduit la mise en place d'un nombre croissant d'études consacrées au rôle de l'axe SDF-1 / CXCR4 sur la chimiorésistance (Tableau 10).

Les MSC, par elles-mêmes, sont capables d'induire une surexpression de CXCR4 à la surface de cellules tumorales. En effet, des BM-MSc provenant de donneurs sains, injectées dans des souris, sont capables d'interagir avec des cellules tumorales conduisant à la surexpression de CXCR4<sup>145,151,184,185</sup>.

Dans un modèle *in vitro* de LMC, la co-culture de BM-MSc avec des cellules tumorales a induit une résistance à l'imatinib<sup>145,184</sup>. Puisque des niveaux similaires de chimiorésistance des cellules leucémiques ont été également obtenus avec le milieu conditionné (MC) par les MSC, cet effet a été attribué à la sécrétion de facteurs solubles. Cette chimiorésistance était concomitante à l'augmentation de l'expression de CXCR4 dans des cellules tumorales. Cette augmentation de CXCR4 a également été observée dans des cellules tumorales ovariennes (CTO) et des cellules de LAL co-cultivées avec des BM-MSc provenant de donneurs sains ou avec des CA-MSc isolées soit d'ascite de patientes présentant un adénocarcinome ovarien<sup>185</sup> soit du sang de patients atteints de LAL<sup>151</sup>.

Kim *et al.* ont montré que les BM-MSc de patients atteints de LAM sécrètent plus de SDF-1 que celles provenant de donneurs sains<sup>186</sup>. Cette augmentation de la sécrétion de SDF-1 est corrélée à l'augmentation de la résistance à la cytarabine présentée par les cellules leucémiques co-cultivées avec des MSC issues de patients atteints de LAM. Cet effet n'a pas été observé lorsque des MSC provenaient de donneurs sains. Lis *et al.* ont démontré la résistance des CTO à l'hyperthermie à 42°C (une thérapie utilisée en association avec la chimiothérapie dans le traitement du cancer des ovaires) induite par les BM-MSc et les CA-MSc (Hospicells)<sup>185</sup>. La co-culture de MSC avec des CTO ou à l'aide de systèmes de transwell a montré que la résistance des cellules tumorales à l'hyperthermie ne nécessite pas d'interaction directe cellule-cellule<sup>185</sup>. Cela indique que les facteurs sécrétés par les BM-MSc sont impliqués dans la résistance des CTO à l'hyperthermie. Le SDF-1 pourrait être un bon candidat permettant la médiation de cet effet car l'incubation des CTO avec le SDF-1 augmente leur résistance au traitement par hyperthermie.

Le SDF-1 sécrété par les cellules stromales peut réguler la chimiorésistance par différents mécanismes. Il pourrait activer la voie de signalisation PI3K/Akt (Figure 7), ou agir par une up-régulation de VLA4 dans les cellules de MM. Cette intégrine sert d'intermédiaire à l'adhésion à la fibronectine et à la VCAM-1<sup>157</sup>, toutes deux impliquées dans la résistance aux médicaments médiée par adhésion cellulaire (voir partie I) C) 3) a) (ii)).

La protéine de fusion p210<sup>BCR-ABL</sup> (une protéine de fusion de 210 kDa obtenue après juxtaposition du gène *ABL* à une partie du gène *BCR*) résultant de la translocation (9; 22) est retrouvée chez presque tous les patients atteints de LMC. Cette protéine kinase anormalement produite diminue la migration de cellules tumorales vers les MSC médiée par la voie SDF-1 / CXCR4<sup>187</sup>. Elle est régulée par un ITK, l'imatinib, qui restaure la migration des cellules de LMC vers le SDF-1. Jin *et al.* ont montré que les cellules de LMC (KBM-5) avaient acquis une résistance à l'apoptose médiée par l'imatinib lorsqu'elles étaient cultivées en présence de MSC. L'addition d'un inhibiteur de CXCR4 a augmenté de manière significative l'inhibition, induite par l'imatinib, de la croissance tumorale et de l'apoptose des cellules KBM-5 en présence de MSC<sup>145</sup>.

De façon similaire, une mutation de Fms-like tyrosine kinase-3 (*FLT3*), décrite dans la LAM, était associée à un mauvais pronostic. Kojima *et al.* ont montré que les MSC pourraient être impliquées dans la résistance au traitement par un anti-FLT3 ou par la doxorubicine *via* la sécrétion de SDF-1<sup>188</sup>.

Le blocage de la voie de signalisation de SDF-1/CXCR4, soit en ciblant le ligand SDF-1, soit en ciblant le récepteur CXCR4, semble intéressant pour contrecarrer cette résistance induite par le microenvironnement. Concernant SDF-1, Hoellenriegel *et al.* ont utilisé des oligonucléotides d'ARN dans une configuration L dirigés contre SDF-1 dans un modèle *in vitro* utilisant des cellules de LLC. Ils ont montré que le ciblage de SDF-1 rendait des cellules tumorales, co-cultivées avec des lignées cellulaires stromales murines MS-5 (probablement des BM-MSc avec une morphologie mésenchymateuse et capables de se différencier en adipocytes<sup>189</sup>), sensibles à un traitement combinant fludarabine et bendamustine<sup>190</sup>, inhibant ainsi l'effet chimioprotecteur des BM-MSc vis-à-vis de la fludarabine et de la bendamustine<sup>181</sup>.

Concernant le récepteur CXCR4, un de ses antagonistes, l'AMD3100 (Plerixafor), favorise l'apoptose, induite par la caspase 3, de cellules de leucémie traitées avec de l'imatinib, même lors de co-culture avec des BM-MSc<sup>191</sup>. Cet antagoniste a permis à la fois *in vitro* et *in vivo*, l'inversion de la résistance au carboplatine induite par les MSC dans les cellules cancéreuses du sein, à travers l'augmentation de la caspase 3 et la diminution de la viabilité cellulaire<sup>191</sup>. D'autres inhibiteurs de CXCR4, tels que le polypeptide RCP168 ou une petite molécule non peptidique AMD3465, ont partiellement inversé la résistance induite par des cellules stromales à la cytarabine dans des cellules leucémiques<sup>182</sup>. Le blocage du récepteur CXCR4 avec un anticorps monoclonal a également inversé la résistance à la chaleur induite par les BM ou les CA-MSc. Dans ce cas, l'inhibition de CXCR4 a induit une diminution de la phosphorylation d'Akt dépendante de SDF-1.

Toutefois, une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL a été observée dans des co-cultures de cellules tumorales et de MSC. L'antagoniste de CXCR4, AMD3100 (Plerixafor), sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose après un traitement anti-tumoral, sans pour autant modifier l'expression de Bcl-xL induite par les MSC dans les cellules tumorales<sup>184</sup>. La voie de signalisation SDF-1 / CXCR4 ne semble donc pas être impliquée dans l'expression accrue de Bcl-xL dans les cellules tumorales. Ainsi, les MSC semblent conférer une chimioprotection non seulement par leur action sur la voie SDF-1 / CXCR4, mais également par d'autres mécanismes responsables de l'augmentation de l'expression et de l'activité des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL dans les cellules tumorales.

Tableau 10 : Résistance des cellules tumorales induite par les MSC *via* la voie de signalisation SDF-1/CXCR4

| La voie de signalisation SDF-1/CXCR4 |  |  |   |   |  |  |
|--------------------------------------|--|--|---|---|--|--|
| Facteurs sécrétés et/ou co-culture   | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales   | Cellules stromales utilisées                            | Origine des cellules tumorales utilisées                | Médicaments                                | Références                                 |
| Co-culture                           |  | Augmentation de l'expression de CXCR4, Augmentation de l'expression de Bcl-xL  | BM-MSC de donneurs sains                                | Cellules de LMC   | imatinib                                   | Vianello <i>et al.</i> <sup>184</sup>      |
| Facteurs sécrétés                    |  | Augmentation de l'expression de CXCR4  | BM-MSC de donneurs sains                                | Cellules de LMC   | imatinib                                   | Jin <i>et al.</i> <sup>145</sup>           |
| Facteurs sécrétés                    |  | Augmentation de l'expression de CXCR4  | BM-MSC humaines, Hospicells                             | Cellules tumorales ovariennes                           | hyperthermie                               | Lis <i>et al.</i> <sup>185</sup>           |
| Co-culture                           |  | Augmentation de l'expression de CXCR4, Augmentation de l'expression de hERG1, Activation des voies de signalisation impliquant PI3K/Akt and ERK1/2 | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT                 | Cellules de LAL   | doxorubicine<br>prednisone<br>méthotrexate | Pillozzi <i>et al.</i> <sup>151</sup>      |
| Co-culture                           | Augmentation de la sécrétion de SDF-1                |  | BM-MSC de patients atteints de LAM                      | Cellules de LAM   | cytarabine                                 | Kim <i>et al.</i> <sup>186</sup>           |
| Facteurs sécrétés                    | Sécrétion de SDF-1                                   | Augmentation de l'expression de Survivine, Bcl-xL et Mcl-1   | BM-MSC de donneurs sains et de patients atteints de LAM | Cellules de LAM   | anti-FLT3,<br>doxorubicine                 | Kojima <i>et al.</i> <sup>188</sup>        |
| Facteurs sécrétés                    | Sécrétion de SDF-1                                   |  | MS-5  | Cellules de LLC   | bendamustine<br>fludarabine                | Hoellenriegel <i>et al.</i> <sup>190</sup> |
| Co-culture                           |  | Expression de CXCR4  | BM-MSC  | Cellules tumorales de sein                              | carboplatine                               | Greco <i>et al.</i> <sup>191</sup>         |
| Co-culture                           |  | Corrélation entre l'expression de CXCR4 et le chimiotactisme, phosphorylation d'Akt par addition de SDF-1  | MS-5  | Lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T humains | cytarabine                                 | Zeng <i>et al.</i> <sup>182</sup>          |

(ii) Acquisition de la résistance impliquant la sécrétion d'IL-6 par les MSC

La cytokine pro-inflammatoire IL-6 est sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les cellules immunitaires (cellules B, cellules T et macrophages), les cellules stromales (par exemple, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les ostéoblastes et les MSC) et les cellules tumorales. Grâce à ses effets pléiotropes, tels que l'induction de la synthèse d'autres molécules inflammatoires (par exemple, la protéine C-réactive, le VEGF et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF)-2), l'IL-6 est impliquée dans divers processus physiologiques comprenant l'hématopoïèse, la reproduction et l'inflammation. Elle est également impliquée dans de nombreuses maladies, y compris celles impliquant le système immunitaire et les cancers<sup>192</sup>.

L'IL-6 se lie à son récepteur, qui peut être soluble ou localisé au niveau de la membrane cellulaire. Cette liaison conduit à la dimérisation de la gp130 puis la phosphorylation et l'activation des kinases associées aux récepteurs : Janus kinase (JAK) 1, JAK2 et tyrosine kinase (Tyk) 2. Cette activation conduit à son tour à la phosphorylation et à l'activation de « signal transducer and activator of transcription » (STAT) 3, qui favorise la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose. Pour cette raison, l'IL-6 est considérée comme un facteur de croissance pour les cellules cancéreuses dont les cellules de MM<sup>193</sup>.

En plus de son rôle pro-tumoral, l'IL-6 joue un rôle important dans la résistance aux médicaments. Frassanito *et al.* ont montré que les cellules de myélome résistantes à la dexaméthasone provenant de patients atteints de MM pouvaient produire de l'IL-6 *via* une boucle autocrine<sup>194</sup>. Cette sécrétion d'IL-6 est associée à une résistance aux médicaments car les cellules de myélome ne produisant pas l'IL-6 sont sensibles à la dexaméthasone. Cette résistance est associée à une diminution de l'apoptose, spontanée et induite par les médicaments, médiée par la voie de signalisation STAT3 qui entraîne une protection contre l'apoptose impliquant FAS<sup>124,139</sup>. Ainsi, l'IL-6 peut protéger les cellules tumorales de l'apoptose et augmenter leur résistance aux agents anti-tumoraux *via* l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-xL, survivine et « X-linked inhibitor of apoptosis » (XIAP) et « induced myeloid leukemia cell differentiation protein » (Mcl-1) passant par l'activation de la voie JAK/STAT-3<sup>141-144</sup> (Figure 7). En effet, l'analyse immuno-histochimique a révélé une augmentation de l'expression de STAT3 et de phospho-STAT3 dans les tumeurs récidivantes, qui sont généralement plus résistantes aux médicaments antitumoraux, que dans les tumeurs primaires<sup>195</sup>.

L'IL-6 a également la capacité d'augmenter l'expression des protéines d'efflux, telles que les protéines de la famille MDR et MRP, impliquées dans la résistance à de nombreux médicaments<sup>196</sup>, appuyant son rôle dans la chimiorésistance. Shain *et al.* ont montré que l'adhésion des cellules tumorales à la fibronectine entraînait un arrêt du cycle cellulaire de cellules de myélome conférant une résistance à la mitoxantrone et à la doxorubicine. En présence d'IL-6, l'activation de la voie JAK/STAT-3 permet de maintenir la résistance au traitement et permet en plus de ne pas bloquer les cellules dans le cycle cellulaire. Ceci permet donc d'entraîner une chimiorésistance tout en favorisant la progression tumorale<sup>197</sup>.

Le ciblage de cette cytokine pourrait donc être une stratégie intéressante dans certains cancers où l'IL-6 est impliquée dans la résistance au traitement. Duan *et al.* ont utilisé des lignées de CTO résistantes au paclitaxel exprimant de manière plus importante phospho-STAT3. L'utilisation de siRNA dirigés contre STAT3 reverse la résistance au paclitaxel des CTO rendues résistantes<sup>141,195</sup>. De même, comparée au paclitaxel seul, l'utilisation d'un inhibiteur de JAK et de STAT3 (AG490) associé au paclitaxel augmente le nombre de cellules en apoptose dans les CTO rendues résistantes au paclitaxel<sup>195</sup>.

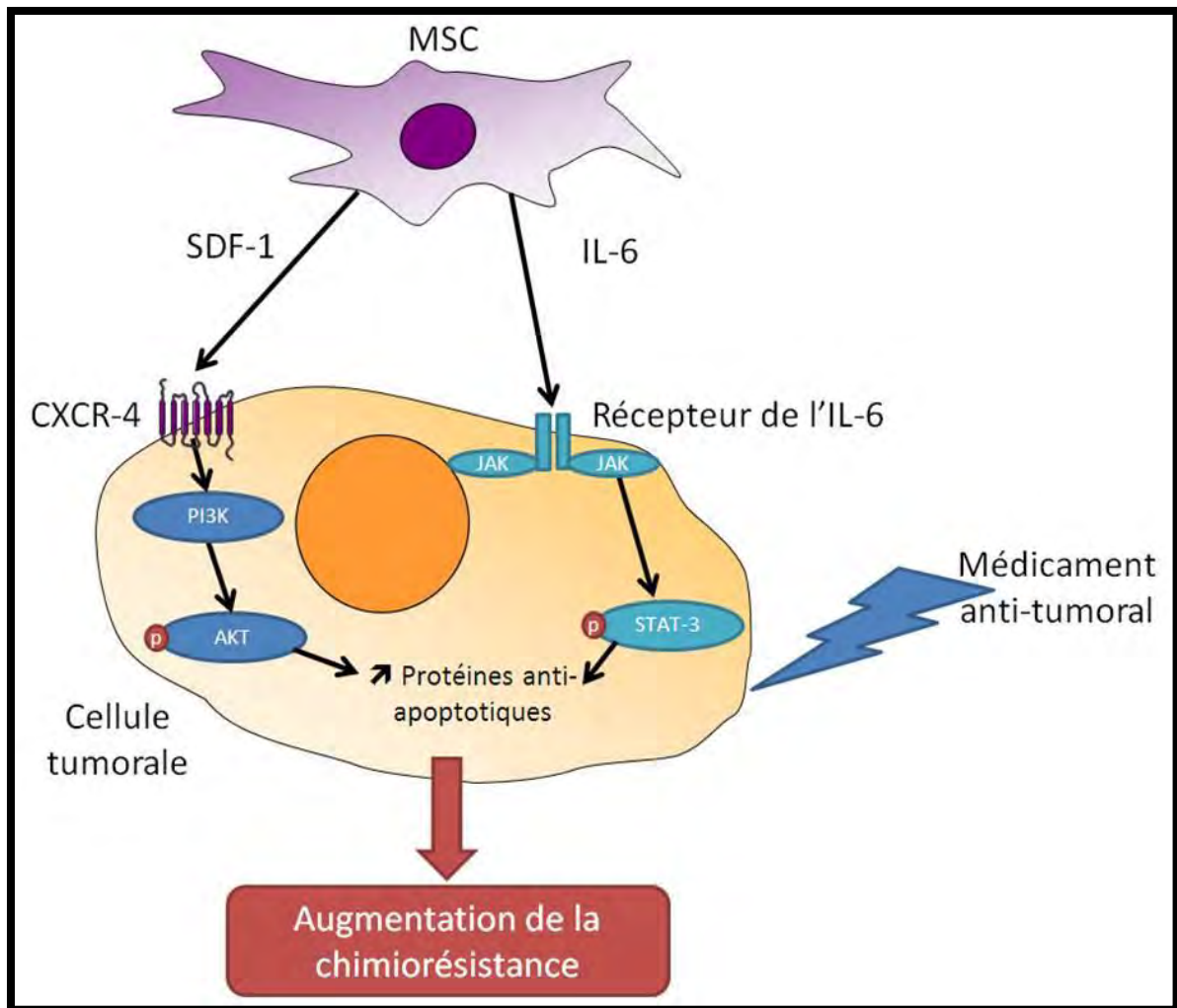
En résumé, l'IL-6 participe à la résistance de nombreux types de cancers (dont MM, cancer de la prostate, cancer ovarien, *etc.*) aux agents anticancéreux (le melphalan, les sels de platine, le tamoxifène et le paclitaxel)<sup>198-200</sup>. Considérant que l'IL-6 peut être synthétisée par des cellules



stromales, le microenvironnement est probablement impliqué dans la chimiorésistance induite par cette cytokine (Tableau 11).

**Figure 7 : Les sécrétions des MSC et les mécanismes de chimiorésistance induits dans les cellules tumorales**

Les MSC sont capables de sécréter du SDF-1 et de l'IL-6. Ces facteurs activent les voies de signalisation impliquant respectivement CXCR-4 et STAT-3 dans les cellules tumorales conduisant à une augmentation des protéines anti-apoptotiques et finalement induisent une résistance à de nombreux médicaments anti-tumoraux.



❖ *MSC et IL-6*

Plusieurs auteurs ont signalé une augmentation de la sécrétion d'IL-6 en présence de MSC<sup>130</sup>. Les MSC, ainsi que d'autres cellules stromales telles que les macrophages qui interagissent avec les MSC ou les cellules tumorales<sup>194</sup> sont une source de sécrétion d'IL-6. Ces synthèses d'IL-6 sont induites par la libération de facteurs solubles par les cellules environnantes ou par des contacts cellule-cellule.

Corre *et al.* ont observé que les BM-MSc isolées de patients atteints de MM sécrètent plus d'IL-6 que celles de donneurs sains<sup>130</sup>. L'augmentation de la sécrétion d'IL-6 par les cellules stromales de moelle osseuse peut nécessiter au préalable l'adhérence des cellules tumorales de myélome sur ces cellules stromales. En effet, cette augmentation de sécrétion de l'IL-6 nécessite un contact direct cellule-cellule car lorsqu'ils effectuaient une expérience en transwell, celle-ci n'était plus observée<sup>112</sup>. Cependant, un autre mécanisme passant par des facteurs sécrétés peut conduire à une augmentation de la sécrétion d'IL-6 par le stroma de la moelle osseuse. Ainsi, la production de VEGF et de FGF par les cellules tumorales peut stimuler la synthèse d'IL-6 par le stroma. Cette augmentation d'IL-6 stimule à son tour les cellules de myélome conduisant à une augmentation de la synthèse de VEGF et de FGF aboutissant à une boucle d'amplification<sup>124,139</sup>.

#### ❖ *Activation des voies STAT3 via l'IL-6 sécrétée par les MSC*

Dans un modèle de LMC, Bewry *et al.* ont montré que le milieu conditionné (MC) des cellules HS-5 (ayant des caractéristiques de BM-MSc) entraînait l'activation de la voie STAT3 mise en évidence par une augmentation de sa phosphorylation<sup>141</sup>. Le milieu conditionné (MC) des cellules HS-5 protégeait les cellules de l'apoptose induite par les inhibiteurs de la protéine de fusion p210<sup>BCR-ABL</sup>, l'imatinib, le nilotinib et le dasatinib. Comme nous l'avons déjà mentionné pour les CTO, l'utilisation de siRNA dirigés contre STAT3 empêche l'effet chimioprotecteur des cellules HS-5 sur les cellules de LMC traitées par l'imatinib.

Concernant le ciblage de l'IL-6 produit par le microenvironnement, Golay *et al.* ont démontré que l'utilisation de l'histone désacétylase ITF2357 inhibe 80 à 95% de la production d'IL-6 par les MSC<sup>201</sup>. L'ITF2357 est fortement cytotoxique, en entraînant une apoptose par voie intrinsèque, pour une lignée cellulaire de MM dépendante de l'IL-6 (CMA-03), ou pour les cellules de LAM stimulés en co-culture avec des MSC<sup>201</sup>. L'IL-6 pourrait représenter une bonne cible pour inhiber la chimiorésistance et diminuer la progression tumorale. Plusieurs médicaments ciblant l'IL-6 ou ses voies de signalisation (par exemple le tocilizumab) ont déjà été évalués en oncologie mais également dans d'autres pathologies. De façon surprenante, les thérapies dirigées contre l'IL-6 n'ont pas donné de résultats cliniques à ce jour dans la réversion de la chimiorésistance en cancérologie.

Tableau 11 : Rôle de la voie de signalisation IL-6 / STAT3 dans la chimiorésistance des cellules tumorales induite par les MSC

| Voie de signalisation IL-6/STAT3   |  |   |  |  |                                |                                       |
|------------------------------------|--|---|--|--|--------------------------------|---------------------------------------|
| Facteurs sécrétés et/ou co-culture | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales                                   | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales  | Cellules stromales utilisées                                       | Origine des cellules tumorales utilisées | Médicaments                    | Références                            |
| Facteurs sécrétés                  | Les BM-MSC de patients ayant MM secrètent plus d'IL-6 que des BM-MSC de donneurs sains |   | BM-MSC de patients ayant MM et de donneurs sains                   |  |                                | Corre <i>et al.</i> <sup>130</sup>    |
| Co-culture                         | Adhérence aux cellules de myélome induit une augmentation de la sécrétion d'IL-6       |   | Cellules stromales de BM de patients ayant MM et de donneurs sains | Cellules de MM                           |                                | Uchiyama <i>et al.</i> <sup>112</sup> |
| Facteurs sécrétés                  |  | Augmentation de la phosphorylation de STAT3, Augmentation de l'expression de survivine, Bcl-xL et Mcl-1 | HS-5   | Cellules de LMC                          | imatinib, nilotinib, dasatinib | Bewry <i>et al.</i> <sup>141</sup>    |
| Co-culture                         | Sécrétion d'IL-6   |   | BM-MSC de donneurs sains   | Cellules de MM et de LAM                 |                                | Golay <i>et al.</i> <sup>201</sup>    |

(iii) Acquisition d'une résistance par activation de la voie PI3K / Akt dans les cellules tumorales

Les phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) sont une famille de kinases lipidiques qui intègrent des signaux provenant de facteurs de croissance, de cytokines ainsi que d'autres signaux environnementaux et les traduisent en signaux intracellulaires qui régulent de multiples voies de signalisation<sup>202,203</sup>. La voie de signalisation impliquant les PI3K joue un rôle à la fois dans l'initiation et la progression tumorale. En effet, plusieurs types de cellules tumorales présentent des altérations de différentes isoformes de PI3K conduisant à un phénotype d'activation constitutive associé à une progression tumorale. L'activation de la voie de signalisation des PI3K induite par les MSC est également impliquée dans l'acquisition de la chimiorésistance des cellules tumorales. Ceci a été indirectement démontré par Castells *et al.*, qui ont montré que le milieu conditionné (MC) par des CA-MSC (Hospicells) induisait la phosphorylation d'Akt, ce qui entraîne à son tour la phosphorylation et la stabilisation de la protéine anti-apoptotique XIAP. L'utilisation de siRNA dirigé contre XIAP a aboli la résistance au carboplatine acquise par des cellules d'adénocarcinome ovarien cultivées avec des CA-MSC, confirmant ainsi l'implication de cette voie de signalisation dans la chimiorésistance<sup>127</sup>. Wei *et al.* ont rapporté des résultats similaires sur des cellules de LMC en ce qui concerne l'implication de la

phosphorylation d'Akt dans la chimiorésistance, en présence de MSC. Ils ont démontré que la phosphorylation et l'activation d'Akt sont induites par l'action du facteur soluble SDF-1, qui se lie à son récepteur CXCR4, activant ainsi la voie PI3K/Akt<sup>178</sup>. L'implication de SDF-1 dans la régulation de la voie de signalisation d'Akt a été décrite également dans des cellules leucémiques<sup>182</sup>, où SDF-1 $\alpha$  augmentait la phosphorylation d'Akt. Il est intéressant de noter qu'une telle activation de la voie de signalisation d'Akt a maintenant été impliquée dans la résistance aux traitements cytotoxiques (Tableau 10).

Enfin, Pillozzi *et al.* ont démontré que les cellules de LAL co-cultivées avec des MSC présentaient une activation des voies de signalisation impliquant à la fois les axes PI3K / Akt et « extracellular signal-regulated kinases » (ERK)1/2 qui étaient responsables de la chimiorésistance à la doxorubicine, à la prednisone et au méthotrexate observée dans ces cellules tumorales<sup>151</sup> (Tableau 8).

#### (iv) Acquisition de résistance *via* la sécrétion d'acides gras par les MSC

Les liens entre l'obésité et le cancer ont été mis en évidence dans plusieurs publications récentes. Les adipocytes, par leur sécrétion d'acides gras libres ou d'adipokines, peuvent favoriser le développement tumoral et la résistance des cellules tumorales aux traitements anti-tumoraux<sup>204</sup>. Les adipocytes peuvent également se transdifférencier en cellules proches des CAF et synthétiser divers facteurs pro-tumoraux. Les acides gras peuvent être utilisés par les cellules cancéreuses comme source d'énergie<sup>204</sup> contribuant à leur métabolisme et pouvant également conduire à une résistance à la cytotoxicité induite par les glucocorticoïdes<sup>205</sup>. Ces effets pourraient être exercés par modulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques. D'autres lipides, y compris les dérivés de l'acide arachidonique tels que la prostaglandine E2 (PGE2), peuvent être impliqués dans la résistance des cellules tumorales aux agents cytotoxiques après leur libération dans le milieu extracellulaire<sup>206</sup>. Enfin, les sphingolipides, par exemple la sphingosine-1-phosphate (S1P), peuvent également être impliqués dans la chimiorésistance<sup>207</sup>.

Le stroma semble jouer un rôle dans cette résistance induite par les acides gras. Dandekar *et al.* ont démontré que le stroma pouvait induire une augmentation de l'expression de PGE2 par les cellules tumorales et stimuler ainsi leur chimiorésistance<sup>208</sup>. Les cellules stromales telles que les MSC sont capables de sécréter directement des acides gras, qui contribuent probablement à leurs effets chimioprotecteurs (Tableau 12). Roodhart *et al.* ont montré que l'injection de BM-MSc murines ou humaines par voie intraveineuse ou sous-cutanée chez des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées (cellules de carcinome pulmonaire ou colique), permettant de mimer le recrutement de BM-MSc au niveau de la tumeur, entraînait une résistance dose-dépendante au cisplatine<sup>121</sup>. Ils ont également observé une résistance similaire à de nombreux médicaments cytotoxiques (oxaliplatine, carboplatine, cisplatine, 5-FU et irinotécan) par injection de milieu conditionné obtenu à partir de BM-MSc cultivées en présence de sels de platine (oxaliplatine, carboplatine et cisplatine). Cette résistance aux médicaments a été associée à l'activation de la voie impliquant la cyclooxygénase 1 (COX-1) et la thromboxane A synthase (TXAS) dans les

MSC, conduisant à la sécrétion de deux acides gras polyinsaturés, l'acide 12-oxo-5,8,10-heptadécatriénoïque (KHT) et l'acide hexadéca-4,7,10,13-tétraénoïque<sup>121</sup>.

(v) Acquisition de résistance *via* la sécrétion de GDF-15 par les MSC

Le « Growth and differentiation factor 15 » (GDF-15) est un pro-peptide appartenant à la superfamille TGF- $\beta$ , qui est capable d'inhiber l'apoptose dans différents types cellulaires, y compris les cardiomyocytes. Sa concentration est élevée dans le sérum de patients atteints de cancers colorectaux, pancréatiques, prostatiques ou neuronaux (gliomes). Corre *et al.* ont démontré que les BM-MSC isolées de patients atteints de MM sécrètent plus de GDF-15 que celles isolées chez des donneurs sains. Le GDF-15 augmente la résistance des cellules de MM (MOLP-6 et MM1.S) aux agents chimiothérapeutiques tels que le melphalan, le bortezomib et le lenalidomide (Tableau 12). Cliniquement, ils ont pu montrer que la concentration plasmatique de GDF-15 était corrélée à la survie du patient<sup>130,209</sup>.

(vi) Acquisition de la résistance *via* la supplémentation en acides aminés par les MSC

Le métabolisme des cellules tumorales diffère de celui des cellules saines, notamment avec une augmentation de la glycolyse. Le microenvironnement des cellules tumorales peut favoriser le métabolisme cellulaire en fournissant de l'énergie sous forme de lactate, d'acétate et de macromolécules, mais aussi sous la forme d'acides aminés<sup>210</sup>. Les acides aminés, utilisés par les cellules tumorales comme source d'énergie et aussi comme constituants basiques des protéines, peuvent favoriser le développement tumoral. En plus de leur rôle pro-tumoral, les acides aminés qui sont sécrétés par le microenvironnement de la tumeur, comme la glutamine ou l'asparagine, peuvent provoquer une résistance à certains agents chimiothérapeutiques<sup>211</sup> (Tableau 12).

Alors que les cellules normales sont capables de synthétiser leur propre asparagine, les cellules leucémiques ont une capacité limitée de synthèse de cet acide aminé. L'asparagine étant indispensable à la synthèse protéique, les cellules leucémiques doivent donc la puiser à partir du milieu extracellulaire. Une stratégie pour traiter la leucémie est donc l'utilisation de l'asparaginase, enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'asparagine en acide aspartique et en ammoniacque, ce qui provoque, dans les cellules leucémiques, une privation en asparagine. Les MSC peuvent fournir de l'asparagine à ces cellules et ainsi provoquer une résistance au traitement par cette enzyme. En effet, comme l'ont montré Iwamoto *et al.*, les cellules de LAL exprimaient de faibles quantités d'asparagine synthétase (23 fois moins que celles exprimées par les MSC primaires) et étaient sensibles à l'asparaginase<sup>212</sup>. La co-culture avec les BM-MSC provoque une résistance des cellules de LAL au traitement par asparaginase. Cette résistance semble impliquer l'asparagine synthétase des MSC, qui stimule la libération d'asparagine par

des MSC, qui à son tour peut être utilisée par les cellules de LAL. L'inhibition de l'asparagine synthétase par siRNA conduit à l'incapacité des MSC à induire une résistance des cellules de LAL au traitement par asparaginase.

#### (vii) Acquisition de résistance *via* des exosomes dérivés de MSC

Les exosomes sont un type de microvésicules (terme qui désigne collectivement divers types d'éléments membranaires de l'ordre de 20 nm à 1 µm de diamètre) qui sont libérés et captés par la plupart des types cellulaires. Les exosomes apparaissent nécessaires pour éliminer les protéines inutiles des cellules. De plus, ils permettent un transport intercellulaire d'ARNm et de miRNA susceptibles de modifier le devenir des cellules receveuses. Plusieurs études ont rapporté que les exosomes dérivés de MSC présentent des propriétés fonctionnelles similaires à celles des MSC, comme la capacité à réparer les lésions tissulaires, à supprimer les réponses inflammatoires et à moduler le système immunitaire. Les MSC et les exosomes dérivés de MSC augmentent la croissance de la lignée cellulaire de cancer gastrique humain SGC-7901 et des lignées cellulaires d'adénocarcinome de colon humain SW480, ce qui suggère que les exosomes dérivés de MSC favorisent la progression tumorale d'une manière similaire aux MSC *in vivo*<sup>213</sup>. Lee *et al.* ont montré que les exosomes dérivés de MSC réduisaient significativement la régulation de l'expression du VEGF dans les cellules tumorales, ce qui a conduit à l'inhibition de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*<sup>214</sup>. En ce qui concerne l'acquisition de la résistance à la chimiothérapie, Ji *et al.* ont montré que des exosomes dérivés de MSC permettent de protéger les cellules de cancer gastrique de l'apoptose induite par le traitement au 5-FU *in vivo* et *ex vivo*. Cette résistance semble impliquer l'activation de la voie des MAP-kinases, entraînant en aval une surexpression de pompes d'efflux de médicaments. Ainsi, en présence d'exosomes issus de MSC, les cellules de cancer gastrique expriment de façon plus importante les protéines MDR, MRP et LRP qui sont associées à des phénomènes de résistance à de nombreux médicaments. L'inhibition de la voie des MAP-kinases par l'utilisation d'un inhibiteur de MEK ou de B-Raf, a diminué la résistance et l'expression des protéines MDR, MRP et LRP des cellules tumorales induite par les exosomes de MSC<sup>146</sup>.

Ono *et al.* ont suggéré que l'induction de la quiescence des cellules tumorales les protège des traitements de chimiothérapie<sup>215</sup>. Puisque les exosomes portent des miRNA qui pourraient être impliqués dans cette quiescence, les auteurs ont évalué le rôle des miRNA dans la chimiorésistance. Ils ont démontré que parmi divers miRNA, le miR-23b était augmenté dans les exosomes dérivés de BM-MSC par rapport aux exosomes de fibroblastes. Lorsque le miR-23b a été surexprimé dans les cellules cancéreuses du sein, il a induit des phénotypes de cellules cancéreuses quiescentes par la suppression de l'expression d'un gène cible, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (*MARCKS*), qui code pour une protéine favorisant le cycle cellulaire et la motilité. Ils ont suggéré que le transfert exosomal de miRNA issus de BM-MSC pouvait favoriser la quiescence des cellules cancéreuses du sein dans une niche métastatique et donc induire la chimiorésistance de ces cellules.

Tableau 12 : Différents mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales impliquant des facteurs sécrétés par les MSC

| Mécanismes de résistance impliquant divers facteurs sécrétés |  |  |   |   |  |   |   |
|--|--|--|---|---|--|---|---|
| Mécanismes de résistance                                     | Facteurs sécrétés et/ou contact cellule /cellule | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales                 | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales                            | Cellules stromales utilisées                    | Origine des cellules tumorales utilisées   | Médicaments   | Références                              |
| Sécrétion d'acides gras polyinsaturés                        | Facteurs sécrétés                                | Sécrétion d'acides gras polyinsaturés impliquant la voie COX-1/ TXAS |   | BM-MSC murines et humaines                      | Cellules cancéreuses de poumon et du colon | oxaliplatine, carboplatine, cisplatine, 5-FU, irinotécane | Roodhart <i>et al.</i> <sup>121</sup>   |
| Sécrétion de GDF-15  | Facteurs sécrétés                                | GDF-15 sécrétion   |   | BM-MSC de patients avec MM ou de donneurs sains | Cellules de MM                             | melphalan, lénalidomide, bortezomib                       | Corre <i>et al.</i> <sup>209</sup>      |
| Apport d'acides aminés                                       | Co-culture                                       | Expression d'asparagine synthétase, sécrétion d'asparagine           |   | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT         | Cellules de LAL                            | asparaginase  | Iwamoto <i>et al.</i> <sup>212</sup>    |
| Production d'exosomes  | Exosomes   | Production d'exosomes  | Activation de la voie Raf/ MEK/ERK, surexpression des protéines MDR, MRP et LRP | MSC humaines dérivées du cordon ombilical       | Cellules de cancer gastrique               | 5-FU  | Ji <i>et al.</i> <sup>146</sup>         |
| Inconnu  | Facteurs sécrétés                                |  |   | HS-5  | Cellules de MM et LAM                      | tipifarnib, bortezomib                                    | Yanamandra <i>et al.</i> <sup>158</sup> |

(viii) Augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques dans les cellules tumorales

Comme mentionné ci-dessus, les MSC infiltrant les tumeurs peuvent modifier les cellules tumorales par la libération de plusieurs facteurs, tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les peptides, les acides gras et les miRNA. Tous ces composés sont capables d'activer des voies de signalisation impliquées dans la résistance aux médicaments. Les voies impliquées dans l'apoptose ont été largement décrites et plusieurs auteurs ont rapporté que les sécrétions des MSC induisaient la surexpression de plusieurs protéines anti-apoptotiques (Tableau 13). Les MSC sont impliquées dans l'augmentation de l'expression de Bcl-xL<sup>141,184,188,216,217</sup> et de survivine<sup>141,188</sup>, et contribuent à la stabilisation ou la synthèse accrue de Mcl-1<sup>140,141,188,218,219</sup> et XIAP<sup>127</sup>. Les MSC sont également associées à la régulation de Bcl-2 soit en entraînant une augmentation de son expression<sup>187,193</sup> soit en diminuant son clivage<sup>186</sup> (le clivage de la protéine Bcl-2 génère un fragment pro-apoptotique). Ces divers effets semblent être indépendants de l'origine des cellules tumorales et ont été rapportés à la fois dans des cancers hématologiques (cellules leucémiques de LAM<sup>166,188,217</sup>, LMC<sup>141,184</sup>, LAL<sup>135</sup>, LLC<sup>140,218</sup>

et MM<sup>219</sup>) et des cancers solides (CTO)<sup>127</sup>. L'augmentation des protéines anti-apoptotiques mentionnées ci-dessus pourrait être due à la sécrétion d'IL-6 par les MSC<sup>124,192</sup>.

En outre, les BM-MSc de patients atteints de leucémie ont été impliquées dans la résistance des cellules de LMC à l'apoptose, associée à une phosphorylation accrue et la séquestration de « Bcl-2-associated death promoter » (BAD)<sup>178</sup>.

Pour empêcher l'effet chimioprotecteur induit par les MSC, des inhibiteurs pharmacologiques des différentes protéines citées, comme des BH3-mimétiques et des smac-mimétiques, ou le ciblage de ces protéines par l'utilisation d'ARN interférents pourraient restaurer la sensibilité des cellules tumorales à diverses chimiothérapies (par exemple siRNA dirigé contre XIAP<sup>127</sup>, Bcl-xL<sup>220</sup>, Mcl-1<sup>220</sup> ou l'utilisation d'HDAC entraînant une diminution de l'expression de Bcl-2 et de Mcl-1<sup>201</sup>).

Ainsi, le travail présenté ci-dessous a eu pour objectif de déterminer si les MSC pourraient également jouer un rôle dans la chimiorésistance des cancers ovariens. L'identification de ces cellules dans le microenvironnement tumoral ovarien et la détermination de leur rôle à la fois dans l'oncogenèse et dans la chimiorésistance pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'améliorer la prise en charge du cancer ovarien.



**Tableau 13 : Rôle des protéines anti-apoptotiques dans la chimiorésistance des cellules tumorales induite par les MSC**

| Augmentation de protéines anti-apoptotiques      |  |  |   |  |  |   |
|--|--|--|---|--|--|---|
| Facteurs sécrétés et/ou contact cellule /cellule | Mécanismes de résistance dans les cellules stromales | Mécanismes de résistance dans les cellules tumorales   | Cellules stromales utilisées  | Origine des cellules tumorales utilisées | Médicaments                                  | Références                                |
| Facteurs sécrétés                                |  | Augmentation de l'activation de la voie PI3K/Akt, stabilisation de XIAP par phosphorylation      | BM-MSC de donneurs sains et Hospicells  | Cellules tumorales ovariennes            | Carboplatine                                 | Castells <i>et al.</i> <sup>127</sup>     |
| Co-culture                                       |  | Augmentation de Bcl-xL, arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1                                 | BM-MSC humaines   | Cellules leucémiques                     | Daunorubicine                                | Lin <i>et al.</i> <sup>216</sup>          |
| Co-culture                                       |  | Diminution du clivage de PARP et de Mcl-1  | Cellules murines M2-10B4, KUM4, KUSA-H1, ST2 et cellules humaines StromaNKtert, UE6E7T-2 et UCB408E6E7TERT-33 | Cellules de LLC                          | Fludarabine, cyclophosphamide, dexaméthasone | Kurtova <i>et al.</i> <sup>140</sup>      |
| Co-culture                                       |  | Augmentation de l'expression de Bcl-2, Bcl-xL et c-Myc   | BM-MSC de donneurs sains  | Cellules de LAM                          | Mitoxantrone                                 | Xia <i>et al.</i> <sup>166</sup>          |
| Facteurs sécrétés                                | Sécrétion potentielle d'IL-6 ou d'IGF-1 ?            | Augmentation de Mcl-1  | HS-5  | Cellules de MM                           | Melphalan, bortezomib, dexaméthasone         | Pei <i>et al.</i> <sup>219</sup>          |
| Co-culture                                       | Expression de ligands de la voie Wnt                 | Diminution du clivage de Bcl-2, Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie Wnt | BM-MSC humaines immortalisées par hTERT   | Cellules de LAL                          | Cytarabine                                   | Yang <i>et al.</i> <sup>135</sup>         |
| Facteurs sécrétés                                |  | Augmentation de Bcl-2 et Bcl-xL, Diminution de la prolifération de cellules leucémiques          | MS-5  | Cellules de LAM                          | Cytarabine                                   | Konopleva <i>et al.</i> <sup>217</sup>    |
| Co-culture                                       |  | Stabilisation et augmentation de Mcl-1   | BM-MSC humaines et murines immortalisées par hTERT  |  | Forodesine                                   | Balakrishnan <i>et al.</i> <sup>218</sup> |
| Facteurs sécrétés                                |  | Augmentation de la phosphorylation de STAT-3, augmentation de survivine, Bcl-xL et Mcl-1         | HS-5  | Cellules de LMC                          | Imatinib, nilotinib, dasatinib               | Bewry <i>et al.</i> <sup>141</sup>        |
| Facteurs sécrétés                                | Sécrétion de SDF-1                                   | Augmentation de survivine, Bcl-xL et Mcl-1   | BM-MSC de donneurs sains et de patients atteints de LAM   | Cellules de LAM                          | anti-FLT3, doxorubicine                      | Kojima <i>et al.</i> <sup>188</sup>       |
| Co-culture                                       |  | Augmentation de l'expression de CXCR4 et Bcl-xL  | BM-MSC de donneurs sains  | Cellules de LMC                          | Imatinib                                     | Vianello <i>et al.</i> <sup>184</sup>     |
| Facteurs sécrétés                                |  | Arrêt du cycle cellulaire en G0/G1, augmentation de la phosphorylation d'Akt et de BAD           | BM-MSC de patients atteints de LLC, LMC et LAM  | Cellules de LMC                          |  | Wei <i>et al.</i> <sup>178</sup>          |

## II) RESULTATS

### A) Rôle des ascites dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes

Dans la majorité des cas, le diagnostic de cancer ovarien est réalisé en situation de tumeur localement avancée avec une atteinte du péritoine. On parle alors de carcinose péritonéale. L'ovaire est situé directement dans la cavité péritonéale. Toutefois, il n'est pas recouvert de péritoine. Les cellules tumorales ovariennes (CTO) vont donc disséminer dans toute la cavité péritonéale au gré du courant de liquide péritonéal. Elles vont se fixer ensuite dans des zones péritonéales de faible flux. L'inflammation péritonéale et le développement tumoral induisent chez les patientes un épanchement liquidien appelé ascite. Cette ascite contient des CTO qui ont desquamé de la tumeur ainsi que de très nombreuses cellules du microenvironnement qui participent à l'inflammation et à la progression tumorale<sup>221,222</sup>.

Cette ascite maligne est donc souvent retrouvée dans les cancers ovariens que ce soit au diagnostic ou lors de la récurrence. Un volume d'ascite important semble de mauvais pronostic. En effet, dans une étude sur 333 patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien, le volume moyen d'ascite est de 1,8 litres et les patientes ayant un volume d'ascite supérieur à cette moyenne ont une survie médiane plus faible (28,6 mois) comparée aux patientes ayant un volume d'ascite inférieur à 1,8 litres (58 mois)<sup>221</sup>. L'ascite est composée de nombreux facteurs dont certains sont décrits comme pro-tumoraux et notamment chimioprotecteurs comme, par exemple, l'IL-6<sup>222</sup>. Des thérapies ciblées ont été récemment mises au point en tant que nouvelles options thérapeutiques contre l'ascite maligne<sup>223</sup>

Dans un premier temps, nous avons souhaité confirmer le rôle global du microenvironnement tumoral, et plus particulièrement des facteurs sécrétés, dans la chimiorésistance du cancer ovarien. Notre modèle d'étude d'acquisition de chimiorésistance a été des cellules d'adénocarcinome ovarien établies en lignées et standardisées. Plusieurs lignées ont été utilisées. Elles diffèrent entre autres par leur statut génétique et leur origine. La lignée la plus utilisée a été les cellules IGROV-1 obtenues de l'Institut Gustave Roussy<sup>224</sup>. Pour le microenvironnement, nous avons utilisé dans un premier temps, 8 ascites de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien. La majorité des tumeurs étaient des carcinomes ovariens séreux (7), dont 6 de haut grade et 1 de bas grade, et 1 tumeur était un carcinome à cellules claires. Les caractéristiques des patientes et des tumeurs sont résumées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Caractéristiques des tumeurs et des ascites utilisées pour évaluer la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au traitement par carboplatine en présence d'ascite

| Numéro de patiente | Age | Cancer                 | Type             | Grade      | Stade | PCI | Nombre de régions touchées | Volume d'ascite (L) | Chimiothérapies avant prélèvement | Chimiothérapies après prélèvement     | Sensibilité | Récidive                         | Décès |
|--------------------|-----|------------------------|------------------|------------|-------|-----|----------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------|----------------------------------|-------|
| 1                  | 76  | Adénocarcinome ovarien | Séveux           | Bas-grade  | IIIc  | 9   | 5                          | 1,2                 | Non                               | Carboplatine + paclitaxel             | Sensible    | Pas de récidive même après 5 ans | Non   |
| 2                  | 77  | Adénocarcinome ovarien | Séveux           | Haut-grade | III   | 34  | 13                         | 5,4                 | Non                               | Carboplatine monothérapie             | Réfractaire | Durant le traitement             | Oui   |
| 3                  | 80  | Adénocarcinome ovarien | Séveux           | Haut-grade | IV    | ND  |                            | ND                  | Non                               | Carboplatine + paclitaxel             | Réfractaire | Durant le traitement             | Oui   |
| 4                  | 66  | Adénocarcinome ovarien | Séveux           | Haut-grade | III   | 20  | 10                         | 4                   | Non                               | Carboplatine + paclitaxel             | Sensible    | 48 mois                          | Non   |
| 5                  | 75  | Adénocarcinome ovarien | Séveux           | Haut-grade | III   | 20  | 13                         | 5                   | Non                               | Carboplatine + paclitaxel             | Sensible    | 20 mois                          | Non   |
| 6                  | 59  | Adénocarcinome ovarien | Séveux           | Haut-grade | III   | 26  | 11                         | 0,2                 | Carboplatine + paclitaxel         | Carboplatine + paclitaxel             | Réfractaire | Durant le traitement             | Oui   |
| 7                  | 74  | Adénocarcinome ovarien | Cellules claires | ND         | IIIc  | ND  | ND                         | ND                  | Carboplatine + paclitaxel         | Paclitaxel + bévacizumab + everolimus | Réfractaire | Durant le traitement             | Oui   |
| 8                  | 66  | Adénocarcinome ovarien | Séveux           | Haut-grade | III   | 27  | 11                         | 5,4                 | Non                               | Carboplatine + paclitaxel             | Sensible    | 7 mois                           | Oui   |

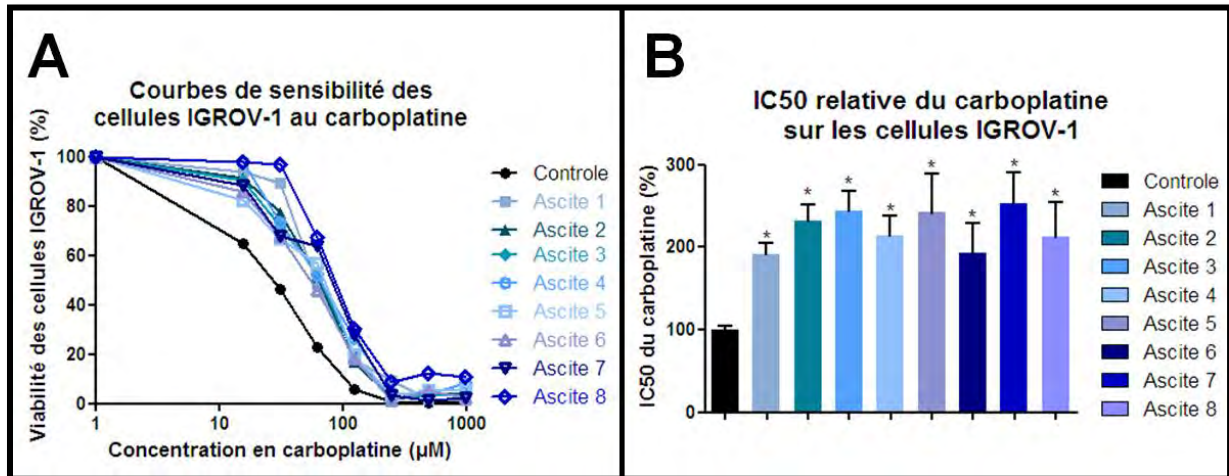
Les ascites de ces patientes ont été centrifugées (300 g pendant 5 minutes) et filtrées (0,2µm) afin de ne récupérer que les facteurs solubles. Pour évaluer le rôle chimioprotecteur des facteurs contenus dans l'ascite, nous avons cultivé des CTO IGROV-1 en présence de ces ascites et nous les avons traitées par une gamme de carboplatine. La concentration en carboplatine inhibant 50% de la viabilité cellulaire (IC50), obtenue 48 heures après le début du traitement, est le reflet de la sensibilité des cellules IGROV-1 au carboplatine.

En présence d'ascite, les courbes de viabilité des cellules IGROV-1 en fonction de la concentration en carboplatine sont décalées vers la droite montrant une augmentation de la résistance (Figure 8A) de ces CTO au traitement par carboplatine. L'IC50 du carboplatine des cellules IGROV-1 est multipliée en moyenne par 2,2 en présence d'ascite par rapport au milieu contrôle. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les différentes ascites (Figure 8B).

Nous pouvons conclure que les facteurs contenus dans les 8 différentes ascites de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien, utilisées dans cette expérience, peuvent induire une augmentation de la résistance des CTO au traitement par carboplatine.

**Figure 8 : Sensibilité au carboplatine des cellules tumorales ovariennes IGROV-1 en présence d'ascites**

Les CTO IGROV-1 sont mises en culture à 5000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. 50µl de RPMI ou d'ascites centrifugées (300 g, 5 min) sont ajoutés dans 50µL de RPMI contenant les 5000 CTO. Après 24 heures, les cellules sont traitées par une gamme de carboplatine. La viabilité cellulaire est évaluée 48 heures après le traitement par un test au WST-8. Le WST-8 est un sel de tétrazolium qui peut être clivé par les enzymes mitochondriales des cellules vivantes entraînant la formation de formazan qui absorbe à 450nm. La concentration inhibant de 50% la viabilité cellulaire (IC50) est le reflet de la sensibilité des CTO au carboplatine. La courbe de viabilité (A) ainsi que le calcul des IC50 du carboplatine (B) sont obtenus par le logiciel Graph Pad Prism®.



## **B) Isolement et identification de cellules du microenvironnement tumoral ovarien : Mise en évidence de la présence de CA-MSC**

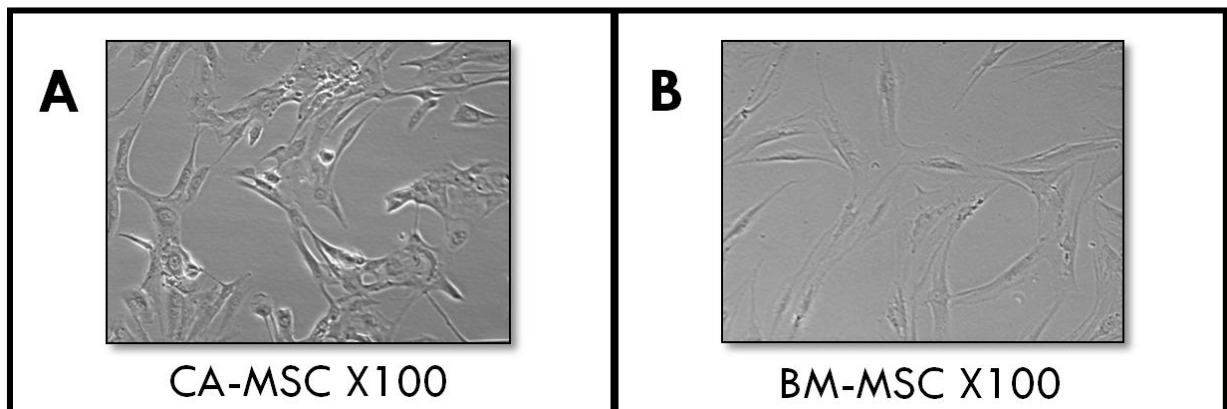
Ainsi, le microenvironnement dans sa globalité (l'ascite contenant des facteurs provenant de nombreuses cellules stromales) semble pouvoir jouer un rôle chimioprotecteur vis-à-vis des cellules tumorales. L'identification de cellules impliquées dans cette sécrétion de facteurs chimioprotecteurs pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de sensibiliser les CTO aux chimiothérapies.

### **1) Isolement de cellules du microenvironnement tumoral ovarien**

Afin d'identifier des cellules ayant des propriétés permettant de protéger les CTO de la chimiothérapie, nous avons isolé des cellules co-localisées avec les tumeurs ovariennes, à partir de tumeurs fraîches obtenues après biopsie ou exérèse tumorale chez des patientes atteintes de cancer ovarien. La tumeur a été soit dissociée à l'aide de collagénase soit ensemencée directement dans des boîtes de culture. Les fragments tumoraux ou les cellules dissociées ont été cultivés dans un milieu de culture contrôle (DMEM). Nous avons séparé les cellules selon leur potentialité à adhérer au plastique et le temps qu'il leur faut pour adhérer. En effet, de nombreuses cellules sont présentes dans les fragments tumoraux obtenus. Cependant, peu de cellules sont adhérentes rapidement ce qui nous permet d'effectuer un tri selon leur capacité à adhérer au plastique. Des cellules telles que les MSC, ou les macrophages adhèrent les premières. Ensuite, entre autres, des cellules tumorales peuvent adhérer au plastique. Par adhésion et lavage au bout de deux heures, nous pouvons isoler les MSC et les macrophages. Le décollage de ces cellules, à l'aide de la trypsine, permet de s'affranchir de la présence de macrophages au cours des repiquages successifs car les macrophages sont résistants à la trypsine. Ainsi, chez une vingtaine de patientes, nous avons isolé des cellules (Figure 9A) ayant une morphologie fibroblastique évoquant des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) (Figure 9B).

### Figure 9 : Cellules isolées de biopsies tumorales de patientes atteintes de carcinome ovarien

Les cellules isolées de prélèvements tumoraux de patientes atteintes de cancer ovarien (A) ont une morphologie fibroblastique évoquant des MSC, par exemple ici des BM-MSC isolées de donneurs ne présentant pas de cancer (B).



### 2) Etude de marqueurs exprimés par les cellules isolées

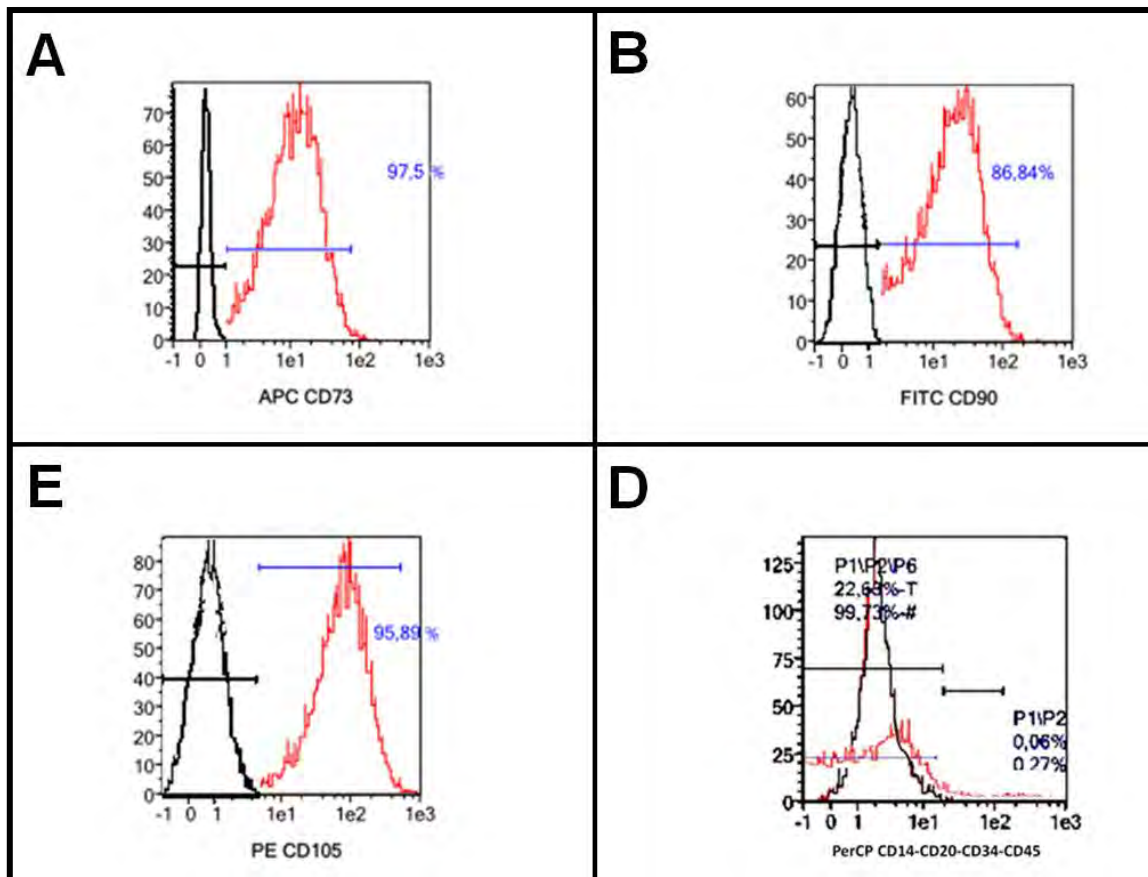
Afin de confirmer la nature de ces cellules isolées du microenvironnement tumoral, nous avons étudié l'expression membranaire de 3 marqueurs caractéristiques des MSC : le CD73, le CD90 et le CD105. Par cytométrie en flux, nous avons montré qu'autour de 90 % de ces cellules étaient positives à la fois pour les marqueurs CD73, CD90 et CD105 et négatives pour les marqueurs normalement non exprimés par les MSC : CD14, CD20, CD34 et CD45 (Figure 10).

Ainsi, nous avons pu montrer que des MSC sont retrouvées dans les tumeurs ovariennes. Ces MSC, à proximité des cellules tumorales, peuvent donc être considérées comme des MSC associées au cancer (CA-MSC). La population cellulaire remise en culture est homogène.

Cependant, l'expression des marqueurs membranaires caractéristiques des MSC par ces CA-MSC isolées de tumeurs de patientes n'indiquait pas si les fonctionnalités des CA-MSC étaient identiques à celles des MSC physiologiques, notamment sur leur potentiel de différenciation.

### Figure 10 : Expression membranaire de marqueurs caractéristiques de MSC d'une culture de cellules isolées de tumeurs ovariennes.

Par cytométrie en flux, l'analyse des cellules isolées de prélèvements tumoraux de patientes atteintes de cancer ovarien montrent qu'elles expriment CD73 (A), CD90 (B) et CD105 (C) mais pas CD14, CD20, CD34, ni CD45 (D). L'expérience a été confirmée sur 6 cultures de MSC isolées de patientes.



### 3) Capacité des CA-MSC à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes

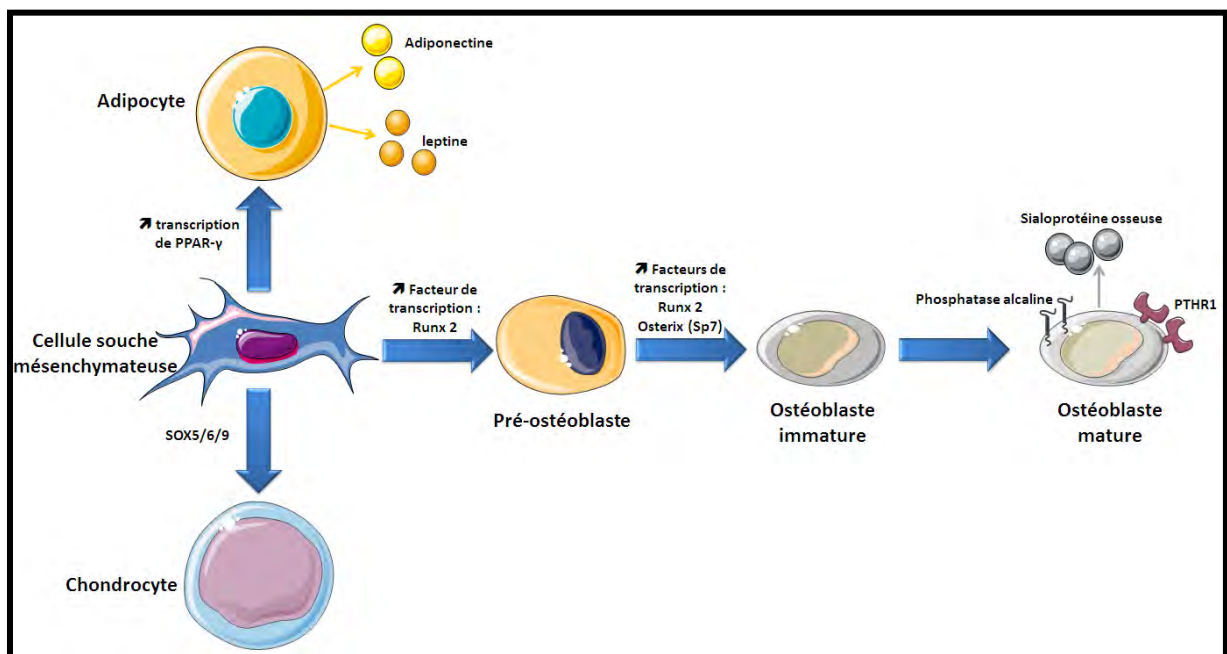
Les CA-MSC isolées présentent des caractéristiques phénotypiques communes avec des MSC physiologiques (expression de CD73, CD90 et CD105). Nous avons voulu déterminer si les cellules que nous avons isolées correspondaient bien à des cellules souches mésenchymateuses (MSC) dont la caractéristique est leur multipotence. Nous avons donc étudié la capacité des CA-MSC de patientes à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes, versus des MSC physiologiques de moelle osseuse (BM-MSC). Pour cela, les CA-MSC ou les BM-MSC sont cultivées pendant 21 jours dans du milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff Media) ou ostéoblastique (OsteoDiff Media). L'aptitude de ces cellules à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes est ensuite évaluée d'une part en étudiant la transcription (par RT-qPCR) de gènes caractéristiques de ces différenciations et d'autre part en évaluant leur faculté à minéraliser et à produire des protéines marquant une différenciation.

Une différenciation adipocytaire entraîne une augmentation de la transcription des gènes codant pour l'adiponectine, la leptine et PPAR- $\gamma$ . En effet, l'adiponectine et la leptine sont des adipokines produites majoritairement par les adipocytes et elles jouent un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique. PPAR- $\gamma$ , qui est un récepteur nucléaire agissant comme un facteur

de transcription, est impliqué dans la régulation de la transcription durant la maturation terminale de l'adipocyte (Figure 11).

De même, les gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique ont été évalués, tels que les gènes codant pour Runx2, ostérix, PTHR1 et la sialoprotéine osseuse (Figure 11). Runx2 est un facteur de transcription impliqué dans les étapes précoces de la différenciation ostéoblastique. En effet, sa transcription est augmentée dans les MSC se différenciant en pré-ostéoblastes. La différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes immatures implique une augmentation de la transcription des facteurs de transcription Runx2 et osterix (SP7)<sup>225</sup>. Les pré-ostéoblastes peuvent se différencier en ostéoblastes mais également en chondrocytes. L'augmentation de la transcription d'osterix est nécessaire pour une différenciation ostéoblastique pure, en ostéoblastes immatures. La différenciation au stade d'ostéoblastes matures conduit à l'expression de la phosphatase alcaline, qui est une enzyme localisée au niveau de la membrane cellulaire. Les ostéoblastes matures expriment le récepteur de la parathormone et produisent également la sialoprotéine osseuse, qui est une glycoprotéine non collagénique retrouvée abondamment dans l'os.

Figure 11 : Schéma de la différenciation des MSC en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes



#### a) Analyse transcriptionnelle de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSC

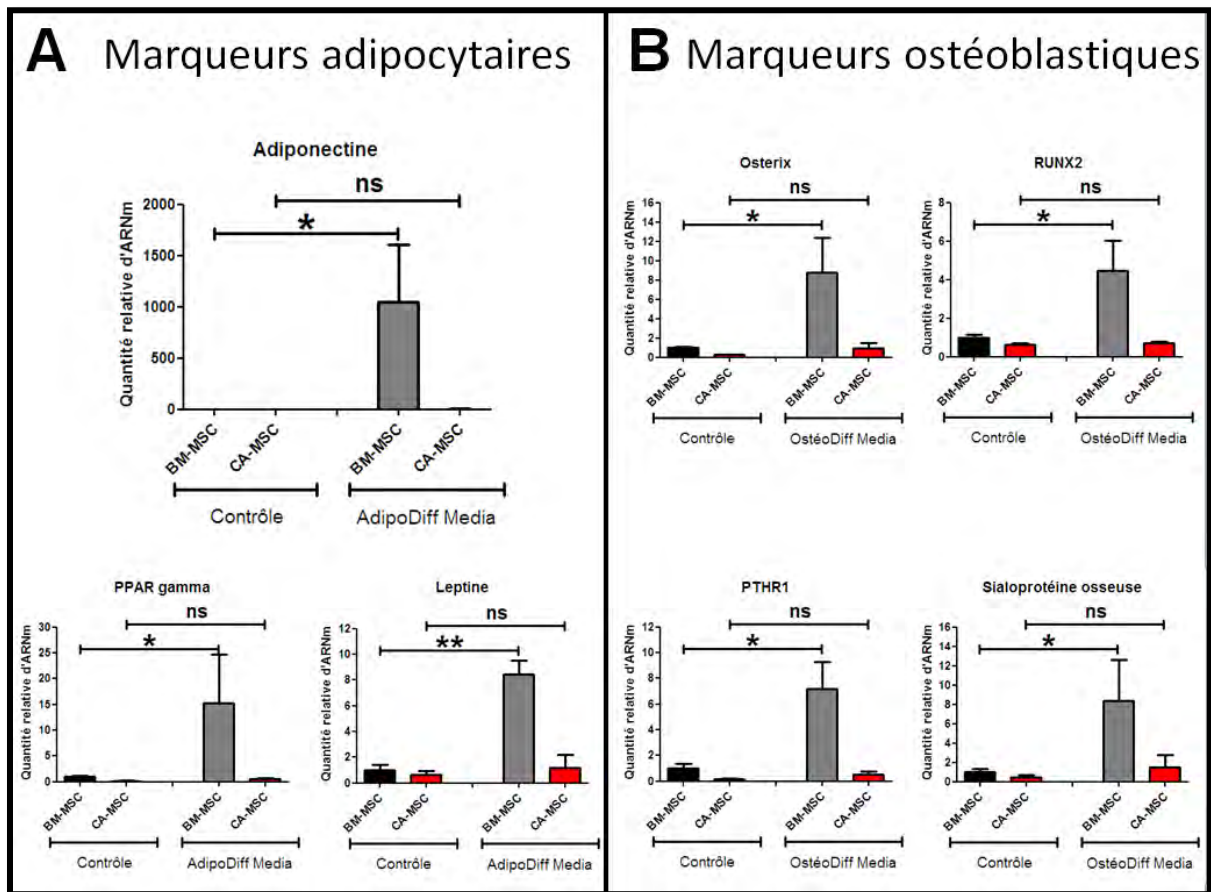
Nous avons observé que seules les BM-MSC ont une augmentation significative de la transcription des gènes codant pour l'adiponectine, la leptine et PPAR-γ lorsqu'elles sont en



présence du milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff Media). Les CA-MSC n'ayant pas de modification de la transcription des gènes codant pour l'adiponectine, la leptine et PPAR- $\gamma$  (Figure 12A), ne semblent pas avoir la capacité à se différencier en adipocytes.

**Figure 12 : Evaluation de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des BM-MSC et des CA-MSC**

1.10<sup>4</sup> BM-MSC ou CA-MSC sont ensemencées par plaques 24 puits. Après 3 jours d'adhérence, le milieu est remplacé par du milieu contrôle, du milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff Media) ou du milieu de différenciation ostéoblastique (OsteoDiff Media). Après 14 jours de culture, les ARNm totaux sont extraits puis leur ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé par reverse transcription. La quantité relative d'ADNc, issu des ARNm totaux des BM-MSC et CA-MSC, est évaluée en réalisant une PCR quantitative (qPCR). La transcription relative de chacun des gènes évalués est calculée par rapport à la transcription de la GAPDH. Les gènes codant pour l'adiponectine, la leptine et PPAR- $\gamma$  sont analysés pour évaluer la différenciation adipocytaire des BM-MSC et des CA-MSC (A). Les gènes codant pour osterix, Runx2, PTHR1 et la sialoprotéine osseuse sont analysés pour la évaluer la différenciation ostéoblastique des BM-MSC et des CA-MSC (B).



Les gènes codants pour Runx2, osterix, PTHR1 et la sialoprotéine osseuse ne semblent pas être plus transcrits dans les CA-MSC cultivées dans du milieu de différenciation ostéoblastique (OsteoDiff Media), contrairement aux BM-MSC (Figure 12B) qui présentent une transcription de ces gènes significativement augmentée en présence du milieu de différenciation ostéoblastique par rapport au milieu contrôle. Ainsi, les CA-MSC issues de tumeurs ovariennes ne semblent pas avoir la faculté de se différencier en adipocytes et en ostéoblastes.

### *b) Analyse colorimétrique de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSC*

Afin de confirmer les résultats obtenus par analyse de la transcription des gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et ostéoblastique, nous avons également étudié la capacité des BM-MSC et des CA-MSC à se différencier à l'aide d'expériences colorimétriques.

La différenciation adipocytaire est évaluée en observant la formation de vacuoles lipidiques à l'aide du colorant « Nile red ». Comme nous l'avons observée au niveau transcriptionnel, la différenciation adipocytaire des CA-MSC semble altérée comparée à celle des BM-MSC. En effet, nous n'observons pas de formation de vacuoles lipidiques dans les CA-MSC cultivées pendant 21 jours dans du milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff Media) contrairement aux BM-MSC (Figure 13A).

La différenciation ostéoblastique, quant à elle, est évaluée par la capacité de minéralisation des cellules, mise en évidence par l'alizarine rouge permettant de révéler les dépôts calciques, mais également par l'activité des phosphatases alcalines, qui sont des enzymes fortement concentrées dans les os, qui sera évaluée à l'aide du colorant « Fast violet ». La culture de CA-MSC dans du milieu de différenciation ostéoblastique (OsteoDiff Media), ne semble pas augmenter la capacité de minéralisation de ces cellules, ni augmenter l'activité des phosphatases alcalines comparée à la culture de ces mêmes CA-MSC dans du milieu contrôle. Les BM-MSC contrôles, cultivées dans du milieu de différenciation ostéoblastique (OsteoDiff Media) se différencient en ostéoblastes, étant donné l'augmentation de la minéralisation et de l'activité des phosphatases alcalines observée avec ces cellules comparée à leur culture dans du milieu contrôle (Figure 13B).

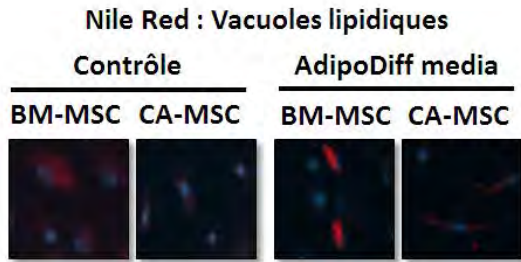
Ces résultats montrent donc que les CA-MSC issues de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien ont des caractéristiques communes avec les MSC (expression des marqueurs membranaires, adhésion rapide au plastique, association avec des cellules tumorales). Toutefois, elles ne sont pas multipotentes et nous pouvons envisager soit qu'elles appartiennent à une population cellulaire originale, soit que ce soient des MSC qui seraient entrées en différenciation perdant ainsi le caractère souche.

Nous avons évalué une autre caractéristique fonctionnelle des MSC évoquée dans la littérature : leur rôle dans la résistance aux chimiothérapies.

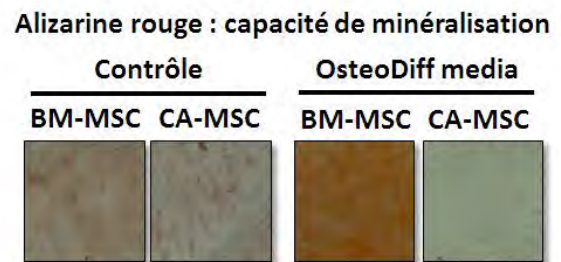
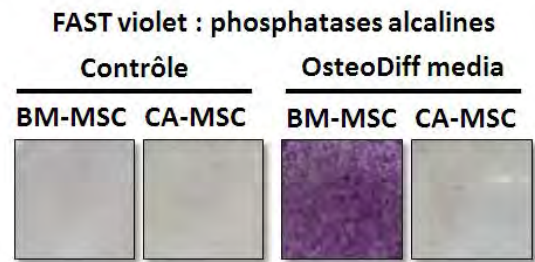
#### **Figure 13 : Analyse colorimétrique de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des BM-MSC et des CA-MSC**

1.10<sup>4</sup> BM-MSC ou CA-MSC sont ensemencées par plaques 24 puits. Après 3 jours d'adhérence, le milieu est remplacé par du milieu contrôle, du milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff Media), du milieu de différenciation ostéoblastique (OsteoDiff Media). Après 21 jours de culture, la coloration par le « Nile Red » (25µg/mL) permet de visualiser si des vacuoles lipidiques se sont formées (A) dans les BM-MSC ou les CA-MSC, traduisant une différenciation adipocytaire (A). Les colorations par l'« alizarine rouge » (40mM), évaluant la capacité de minéralisation, ou par « Fast violet » (0,3mg/mL), mesurant l'activité des phosphatases alcalines, des BM-MSC et des CA-MSC permettent d'étudier leur éventuelle différenciation ostéoblastique (B).

## A Marqueurs adipocytaires



## B Marqueurs ostéoblastiques

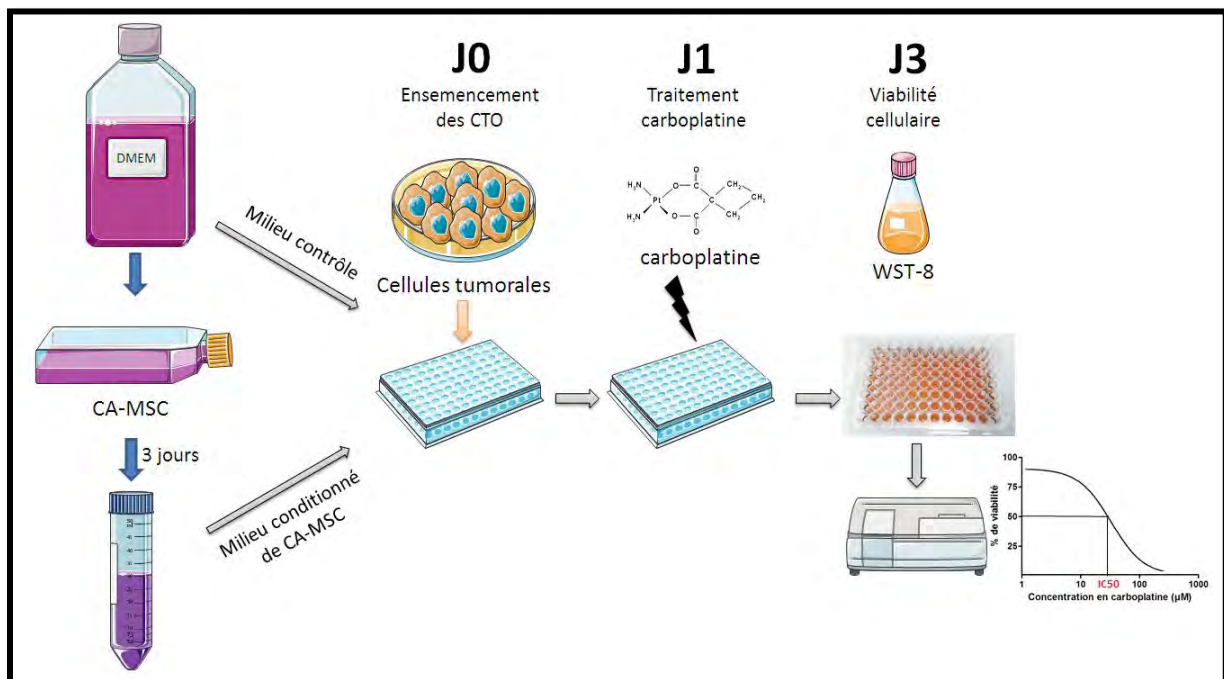


### C) Effet *in vitro* des CA-MSC sur la sensibilité de cellules tumorales ovariennes au carboplatine

Afin d'étudier le rôle des CA-MSC isolées de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien dans la résistance au traitement des CTO, nous avons utilisé 2 lignées cellulaires de cancer ovarien, les cellules IGROV-1 déjà décrites et les cellules SKOV-3. Ces lignées diffèrent par leur résistance intrinsèque au carboplatine, leur profil mutationnel et leur morphologie. En effet, les cellules SKOV-3 sont considérées comme chimio-résistantes alors que les cellules IGROV-1 sont plus sensibles au carboplatine. Les cellules IGROV-1 sont hyper-mutées, avec des mutations des gènes *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA*, *PTEN* et *ARID1A* alors que les cellules SKOV-3 ont un profil mutationnel différent avec des mutations de *PIK3CA* et de *ARID1A* et une amplification de *ERBB2*<sup>226</sup>. Leur morphologie est également différente avec un aspect de cellules épithéliales pour les cellules IGROV-1 alors que les cellules SKOV-3 sont plus allongées. Cette différence morphologique pourrait évoquer une transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules SKOV-3. Ainsi, ces 2 lignées de CTO, qui diffèrent sur de nombreux aspects, permettent une étude plus large sur des lignées cellulaires hétérogènes.

Figure 14 : Protocole de l'expérience évaluant la chimiorésistance des CTO

Après récupération du milieu conditionné (MC) pendant 3 jours par des CA-MSC, les CTO sont mises en culture à 5000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. 50µl de DMEM ou de milieu conditionné (MC) de CA-MSC sont ajoutés dans 50µL de RPMI contenant les 5000 CTO. Après 24 heures, les cellules sont traitées par une gamme de carboplatine. La viabilité cellulaire est évaluée 48 heures après le traitement par un test au WST-8. La concentration inhibant de 50% la viabilité cellulaire (IC50) est le reflet de la sensibilité des CTO au carboplatine.

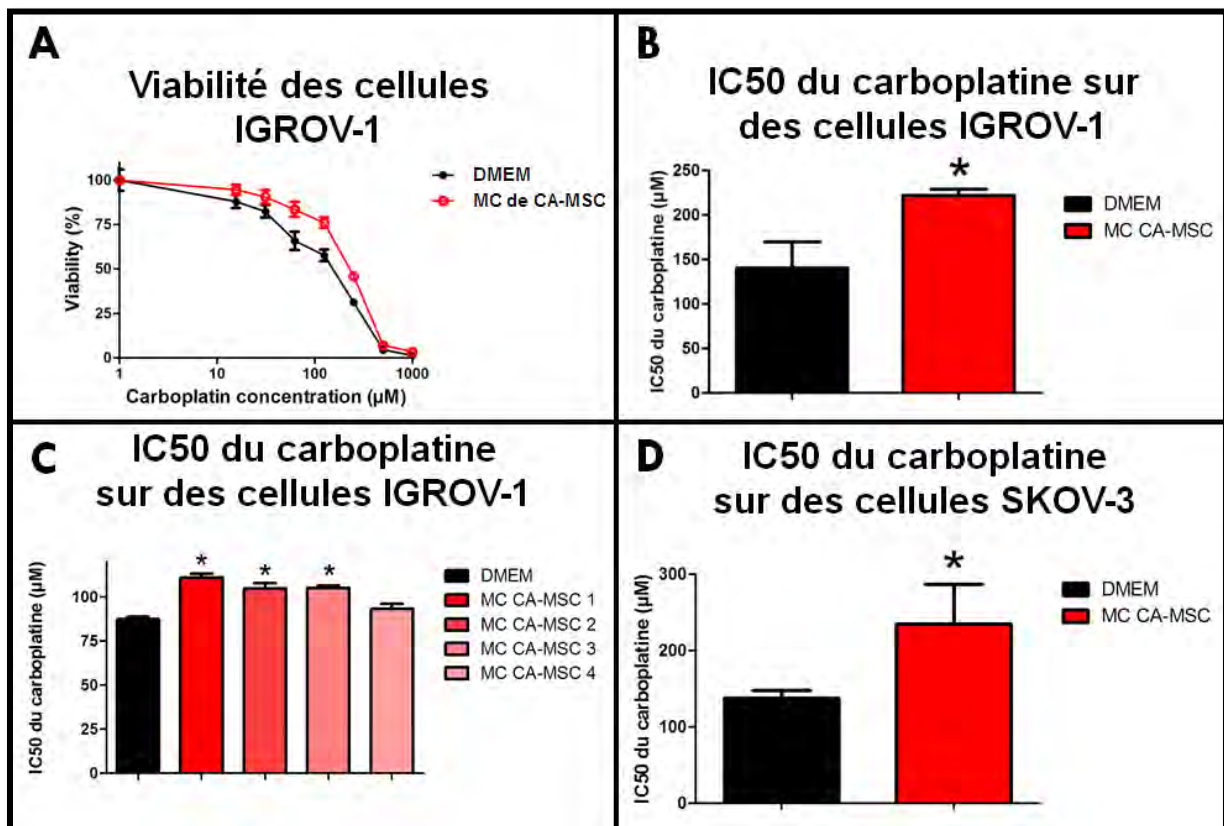


Ainsi, nous avons cultivé des CTO IGROV-1 et SKOV-3 avec du milieu conditionné (MC) de CA-MSC et nous les avons traitées par une gamme de carboplatine (Figure 14). La concentration en carboplatine inhibant 50% de la viabilité cellulaire (IC50), obtenue 48 heures après le début du traitement, est le reflet de la sensibilité des cellules IGROV-1 et SKOV-3 au carboplatine.

En présence de milieu conditionné (MC) d'une première culture de CA-MSC, la courbe de sensibilité au carboplatine des cellules IGROV-1 est décalée vers la droite montrant une augmentation de la résistance (Figure 15A) de ces CTO au carboplatine. Nous constatons une majoration de l'IC50 du carboplatine des cellules IGROV-1 en présence de MC de CA-MSC (Figure 15B). Nous avons confirmé cet effet des CA MSC avec 4 autres cultures de CA-MSC isolées et triées (CD 73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD20-, CD34- et CD45-) (Figure 15C).

**Figure 15 : Sensibilité au carboplatine des CTO IGROV-1 et SKOV-3 en présence de milieu conditionné de CA-MSC**

Après récupération du milieu conditionné (MC) pendant 3 jours par des CA-MSC, les CTO IGROV-1 et SKOV-3 sont mises en culture à 5000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. 50µl de DMEM ou de MC de CA-MSC sont ajoutés dans 50µL de RPMI contenant les 5000 CTO. Après 24 heures, les cellules sont traitées par une gamme de carboplatine. La viabilité cellulaire est évaluée 48 heures après le traitement par un test au WST-8. La concentration inhibant de 50% la viabilité cellulaire (IC50) est le reflet de la sensibilité des CTO au carboplatine. La courbe de viabilité (A) ainsi que le calcul des IC50 du carboplatine (B, C et D) sont obtenus par le logiciel Graph Pad Prism®.



De la même façon, nous avons montré que le MC des CA-MSC (ici valeurs cumulées des IC50 obtenues avec 3 CA-MSC issues de patientes différentes) entraîne une augmentation de la chimiorésistance des CTO de la lignée cellulaire SKOV-3 au traitement par carboplatine (Figure 15D).

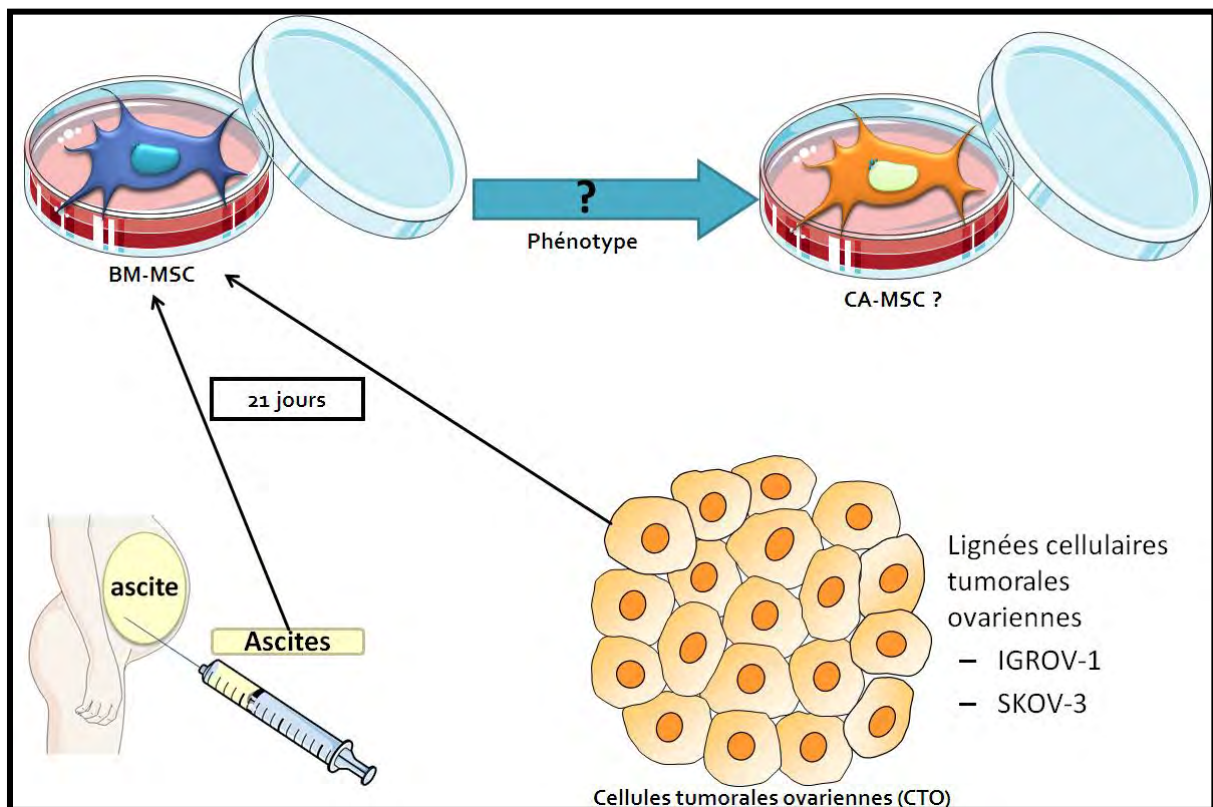
Nous avons donc pu montrer que les CA-MSC retrouvées au niveau des tumeurs ovariennes sont capables de sécréter des facteurs induisant une résistance au carboplatine de deux lignées de CTO. L'effet chimioprotecteur des CA-MSC pourrait se généraliser à de nombreux types de CTO.

## D) Mise en place d'un modèle de CA-MSC « induites »

L'origine des CA-MSC isolées n'étant pas connue, nous avons voulu déterminer si elles pourraient effectivement être des MSC s'étant différenciées. Dans ce cas, elles pourraient provenir de cellules proches des BM-MSC ou des ADSC. En effet, les BM-MSC comme les ADSC ayant une forte attraction pour les cellules tumorales, elles pourraient être recrutées lors de la progression tumorale. Afin d'évaluer la capacité des BM-MSC à acquérir le potentiel des CA-MSC au niveau de l'induction de la chimiorésistance (facteurs sécrétés), nous avons mis en place un modèle expérimental permettant d'obtenir des CA-MSC « induites ». Ce modèle utilise comme cellules d'origine des BM-MSC physiologiques issues de donneuses ne présentant pas de cancer. Elles sont cultivées pendant 21 jours en présence soit de milieu contrôle (DMEM), soit d'ascites de patientes (mimant les facteurs sécrétés à la fois par les cellules tumorales et le stroma) ou soit de milieu conditionné par des cellules tumorales établies en lignées (cellules IGROV-1 ou SKOV-3). Nous obtenons donc, à l'issue des 21 jours, des BM-MSC dites témoins et des CA-MSC induites de deux façon différentes (Figure 16). La comparaison de ces MSC issues d'un même sujet, en fonction de leur condition de culture (normale ou mimant un environnement tumoral), permet de s'affranchir de la variabilité interindividuelle.

Figure 16 : Schéma de la méthode permettant l'obtention de CA-MSC « induites »

Les BM-MSC sont cultivées pendant 21 jours dans un environnement tumoral (50% de DMEM avec 50 % de pool d'ascites ou de milieu conditionné (MC) de CTO IGROV-1 ou SKOV-3) ou dans un milieu contrôle (DMEM).



## 1) Méthode permettant l'obtention de CA-MSC « induites »

Ce modèle vise à obtenir des MSC issues d'un même sujet sain mais qui pourront être différentes en fonction du contexte et notamment dans un contexte de tumeur ovarienne. Pour cela, les BM-MSC de donneuses ne présentant pas de cancer sont utilisées. Ces BM-MSC proviennent de prélèvements de têtes fémorales chez des femmes ayant subi une chirurgie de la hanche. Ces femmes sont âgées d'une soixantaine d'année, ce qui correspond à l'âge des patientes atteintes de cancers ovariens (âge moyen au diagnostic : 66 ans).

Les BM-MSC sont cultivées pendant 21 jours dans un environnement tumoral ovarien. Cet environnement tumoral ovarien est mimé par le milieu conditionné (MC) de CTO (IGROV-1 et SKOV-3) ou par du liquide d'ascite de patientes atteintes de cancer ovarien (Figure 16) suivies à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT). Cette ascite est centrifugée à 300g pendant 5 minutes afin de ne récupérer que les facteurs contenus dans l'ascite. Cette ascite est ensuite filtrée à 0,2µm afin d'éliminer toutes les cellules résiduelles. Cette étape permet de ne pas ensemer de cellules, de bactéries ou de virus qui pourraient être présents dans l'ascite. Afin d'obtenir des quantités suffisantes, nous avons réalisé un pool d'ascites regroupant dix ascites de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien.

Ainsi, en résumé, les BM-MSC sont cultivées dans un milieu composé à 50% de DMEM. Les 50 % restant du milieu de culture sont composés, en fonction des conditions, de MC de CTO (MSC/igrov-1 ou MSC/skov-3), d'ascite (MSC/ascite) ou de DMEM (MSC physiologiques contrôle).

## 2) Analyse de l'expression membranaire des marqueurs de MSC sur les cellules issues de notre modèle de CA-MSC « induites »

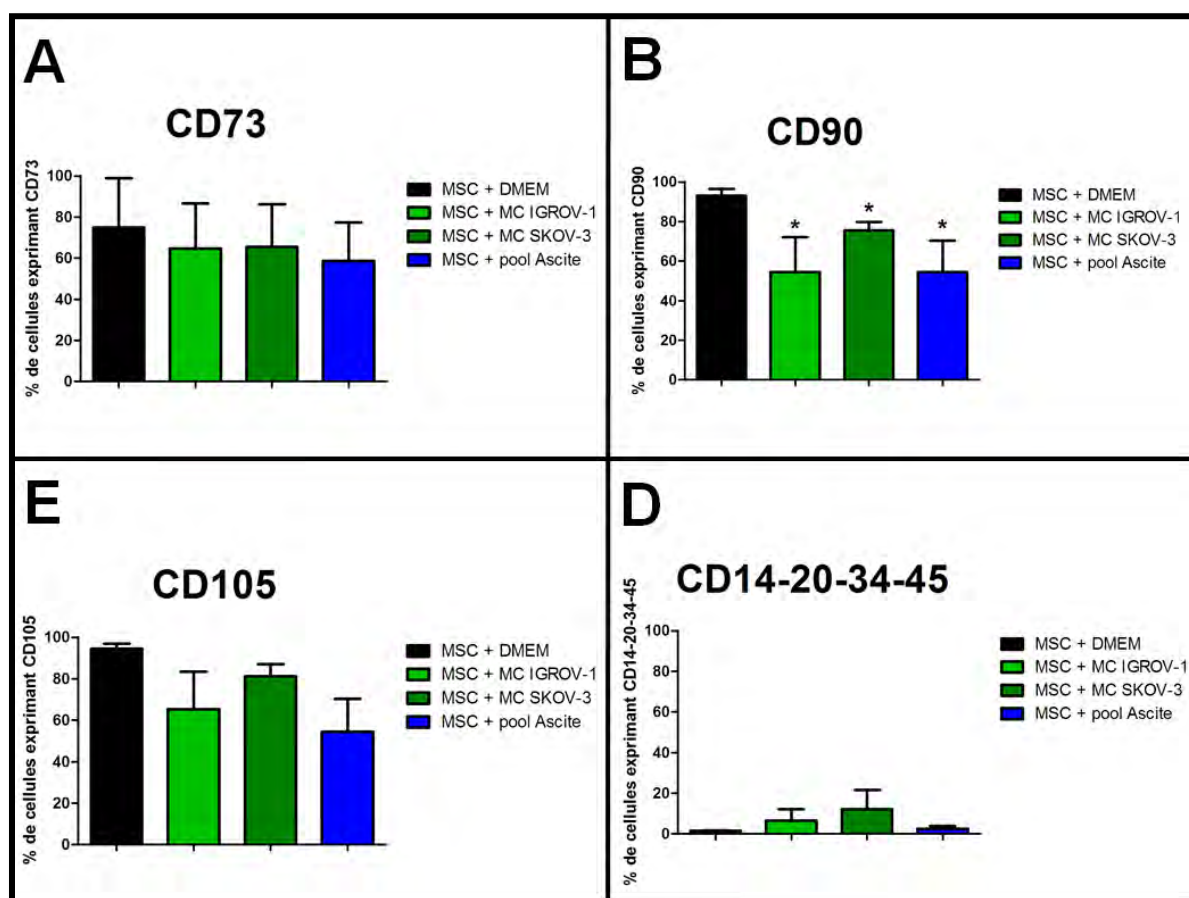
Après 21 jours de culture, l'expression membranaire des marqueurs CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34 et CD45, a été étudiée. Seule une légère diminution de l'expression du CD90 était significative comparée à la condition contrôle (DMEM) (Figure 17B). L'expression des marqueurs CD73, CD105, CD14, CD20, CD34 et CD45 (Figure 17A, C et D) n'était pas significativement différente du milieu de culture contrôle (DMEM). L'intensité du marquage des cellules positives reste identique selon ces différentes conditions.

Ainsi, les MSC cultivées en présence d'un environnement tumoral ovarien semblent peu différentes des BM-MSC d'origine au niveau de l'expression membranaires des marqueurs CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34 et CD45. Elles correspondent également au phénotype observé sur les CA-MSC isolées de patientes.



**Figure 17 : Expression membranaire des marqueurs caractéristiques des MSC**

Après 21 jours de culture des BM-MSC dans un environnement tumoral (50% de DMEM avec 50 % de pool d'ascites ou de milieu conditionné de CTO IGROV-1 ou SKOV-3) ou dans un milieu contrôle (DMEM), l'expression membranaire de CD73 (A), CD90 (B), CD105 (C), CD14-20-34-45 (D) est étudié par cytométrie en flux à l'aide du cytomètre BD FACSCalibur™.



### 3) Etude *in vitro* de l'effet des facteurs sécrétés par des CA-MSC « induites » sur la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au carboplatine

Afin de valider ce modèle, la capacité de ces différentes MSC « activées » par le MC des cellules IGROV-1 (MSC/igrov-1), des cellules SKOV-3 (MSC/skov-3) ou de l'ascite (MSC/ascite) à induire une chimiorésistance comparable à celle des CA-MSC, a été étudiée. Après 21 jours de culture des cellules issues des BM-MSC dans les différentes conditions, les milieux sont remplacés par du milieu contrôle (DMEM) afin de récupérer, 72 heures plus tard, du MC par ces MSC ne contenant que les sécrétions de ces dernières (sans ascite, ni sécrétion des CTO) (Figure 18A).

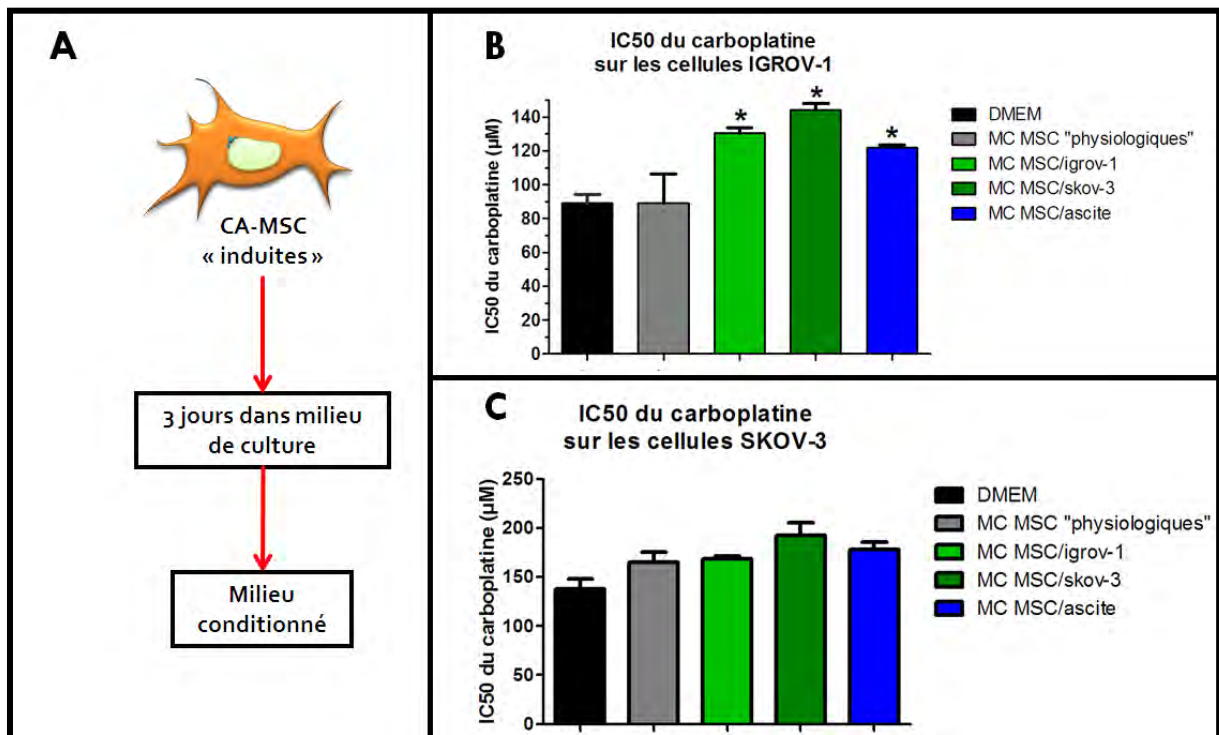
Alors que le MC des BM-MSC physiologiques ne modifie pas la résistance des cellules IGROV-1 au carboplatine, le MC des MSC « activées » quel que soit le processus d'activation entraîne une augmentation de la résistance mise en évidence par l'augmentation de l'IC50 du carboplatine sur les cellules IGROV-1 (Figure 18B). Bien que des augmentations d'IC50 du

carboplatine sur les cellules SKOV-3 aient été également observées en présence de MC des MSC « activées » comparées aux conditions contrôles (DMEM et MC de MSC « physiologiques »), celles-ci n'étaient pas significativement différentes (Figure 18C).

Au contact d'un environnement tumoral, les BM-MSC peuvent donc avoir une modification de leur phénotype conduisant à la sécrétion de facteurs chimioprotecteurs pour les CTO IGROV-1 comme nous l'avons montré pour les CA-MSC. Ces MSC activées peuvent donc être nommées CA-MSC « induites ».

**Figure 18 : Effet des CA-MSC « induites » sur la résistance des cellules IGROV-1 et SKOV-3 au carboplatine**

Après 21 jours de culture des BM-MSC dans un environnement tumoral, ces cellules sont cultivées dans du DMEM. Le MC des MSC est recueilli 72h après (A). Les CTO IGROV-1 et SKOV-3 sont mises en culture à 5000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. 50µl de DMEM ou de MC de CA-MSC « induites » sont ajoutés dans 50µL de RPMI contenant les 5000 CTO. Après 24h, les cellules sont traitées par une gamme de carboplatine. La viabilité cellulaire est évaluée 48h après le traitement par un test au WST-8. Les IC50 du carboplatine (B et C) sont tracées et calculées par le logiciel Graph Pad Prism®.



#### 4) Capacité des CA-MSC « induites » à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes

Nous avons montré que les CA-MSC et les CA-MSC « induites » présentaient des propriétés différentes des MSC physiologiques, plus particulièrement sur la sécrétion de facteurs chimioprotecteurs. Nous avons souhaité savoir si les CA-MSC « induites » différaient des MSC physiologiques également au niveau de leur multipotence, de façon comparable aux CA-MSC de patiente, en évaluant la capacité des CA-MSC « induites » à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes.

##### *a) Analyse transcriptionnelle de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSC « induites »*

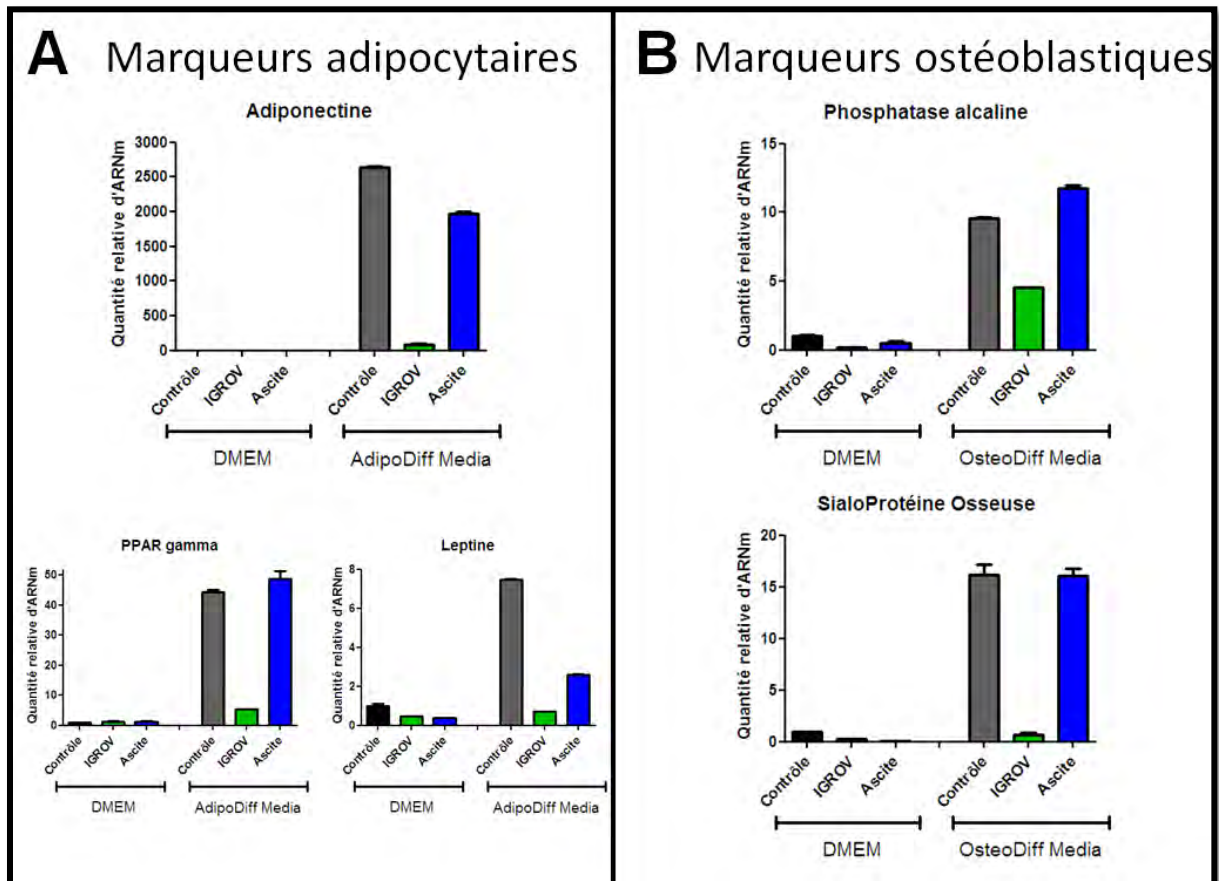
Dans un premier temps, la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSC « induites » a été évaluée par analyse transcriptionnelle (RT-qPCR).

Après 14 jours de culture dans du milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff media), nous observons une augmentation de la transcription des gènes codant pour l'adiponectine, la leptine et PPAR- $\gamma$  dans les MSC/contrôle et les MSC/ascite par rapport à leur culture dans le milieu contrôle (Figure 19A). En revanche, la culture des MSC en présence de MC de cellules IGROV-1 semble réduire de façon importante la faculté de ces cellules à se différencier en adipocytes. En effet, nous avons observé une transcription beaucoup plus faible des gènes codants pour l'adiponectine, la leptine et PPAR- $\gamma$  dans les MSC/igrov-1 comparée à celle observée dans les MSC/contrôle et MSC/ascite, cultivées dans le milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff media).

L'observation est la même avec les marqueurs ostéoblastiques. En effet, la culture dans du milieu de différenciation ostéoblastique (OsteoDiff Media) entraîne une augmentation de la transcription de gènes traduisant une différenciation ostéoblastique, tels que ceux codant pour la phosphatase alcaline et la sialoprotéine osseuse, dans les MSC/contrôle et les MSC/ascite. Pour les MSC/igrov-1, la transcription des gènes codants pour la phosphatase alcaline et la sialoprotéine est moins importante que pour les MSC/contrôle et MSC/ascite, malgré la culture dans du milieu de différenciation ostéoblastique (Figure 19B).

**Figure 19 : Evaluation de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des BM-MSc et des CA-MSc "induites"**

1.10<sup>4</sup> BM-MSc ou CA-MSc « induites » soit par les CTO IGROV-1 soit par des ascites sont ensemencées par plaques 24 puits. Après 3 jours d'adhérence, le milieu est remplacé par du milieu contrôle, du milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff Media) ou du milieu de différenciation ostéoblastique (OsteoDiff Media). Après 14 jours de culture, les ARNm totaux sont extraits puis leur ADNc est synthétisé par reverse transcription. La quantité relative d'ADNc, issus des ARNm totaux des BM-MSc et CA-MSc « induites » est évaluée en réalisant une qPCR. La transcription relative de chacun des gènes évalués est calculée par rapport à la transcription de la GAPDH. Les gènes codant pour l'adiponectine, la leptine et PPAR- $\gamma$  sont analysés pour évaluer la différenciation adipocytaire (A) des BM-MSc et des CA-MSc « induites ». Les gènes codant pour la phosphatase alcaline et la sialoprotéine osseuse sont analysés pour la évaluer la différenciation ostéoblastique des BM-MSc et des CA-MSc « induites » (B).



*b) Analyse colorimétrique de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des CA-MSc « induites »*

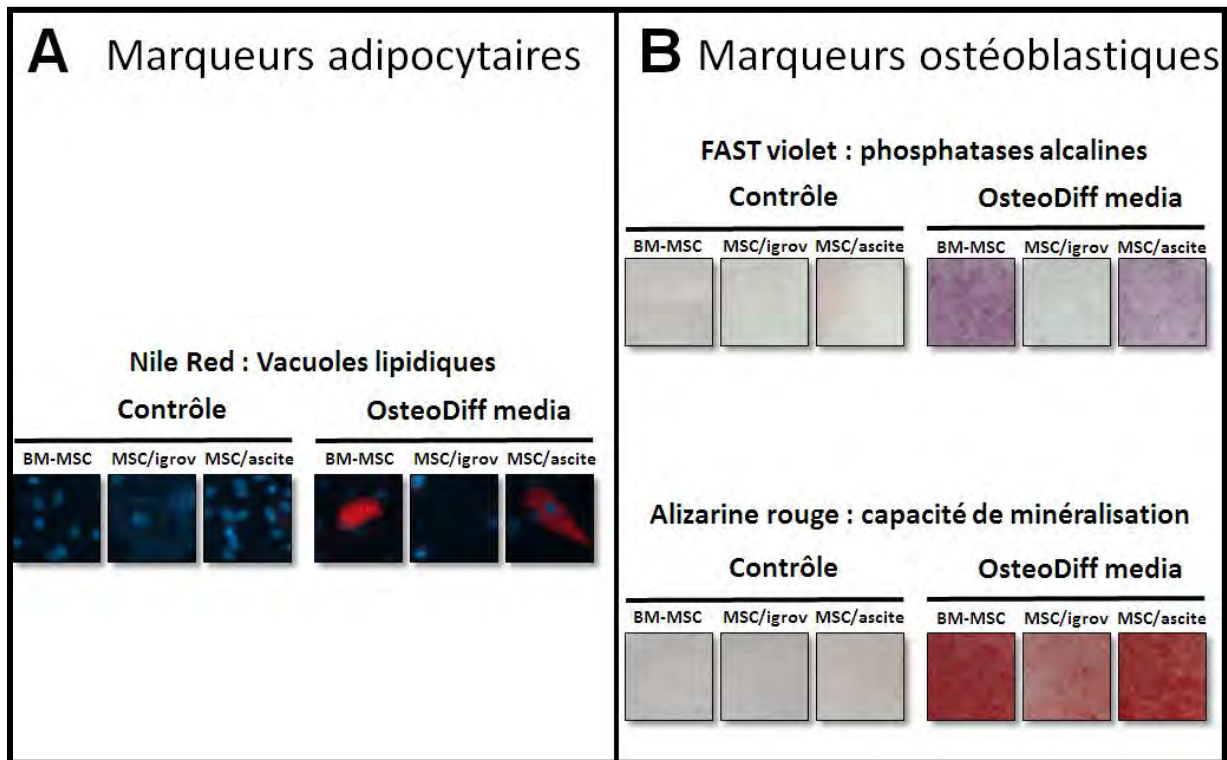
L'analyse, par des expériences colorimétriques, de la formation de vacuoles lipidiques, correspondant à une différenciation adipocytaire, mais également de l'activité des phosphatases alcalines et de la capacité de minéralisation, traduisant une différenciation ostéoblastique, est également réalisée.

En présence de milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff media), nous observons la formation de vacuoles lipidiques dans les MSC/contrôle (BM-MSc) et les MSC/ascite mais pas

dans les MSC/igrov-1 (Figure 20A). Comparée au milieu contrôle, la culture dans du milieu de différenciation ostéoblastique entraîne une forte activité des phosphatases alcalines et une augmentation de la minéralisation pour les BM-MSC et les MSC/ascite, contrairement aux MSC/igrov-1 (Figure 20B).

**Figure 20 : Analyse colorimétrique de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des BM-MSC et des CA-MSC "induites"**

1.10<sup>4</sup> BM-MSC ou CA-MSC « induites » soit par les CTO IGROV-1 soit par des ascites sont ensemencées par plaques 24 puits. Après 3 jours d'adhérence, le milieu est remplacé par du milieu contrôle, du milieu de différenciation adipocytaire (AdipoDiff Media) ou du milieu de différenciation ostéoblastique (OsteoDiff Media). Après 21 jours de culture, la coloration par le « Nile Red » (25µg/mL) permet de visualiser si des vacuoles lipidiques se sont formées (A) dans les BM-MSC ou les CA-MSC, traduisant une différenciation adipocytaire (A). Les colorations par l'« alizarine rouge » (40mM), évaluant la capacité de minéralisation, ou par « Fast violet » (0,3mg/mL), mesurant l'activité des phosphatases alcalines, des BM-MSC et des CA-MSC permettent d'étudier leur éventuelle différenciation ostéoblastique (B).



Les résultats des expériences précédentes, obtenus avec les CA-MSC, montrent qu'elles ont perdu leur capacité de différenciation adipocytaire et ostéoblastique par rapport aux MSC physiologiques. Le modèle de CA-MSC « induites » donnent des résultats différents selon si les CA-MSC ont été induites par de l'ascite, auquel cas la différenciation adipocytaire et ostéoblastique perdure, ou par les CTO (IGROV-1), qui induit une perte de cette capacité de différenciation. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les CA-MSC proviendraient bien de la différenciation de MSC. Cette différenciation est moins avancée lorsque les cellules sont cultivées en présence d'ascites que lorsqu'elles sont cultivées en présence de MC de lignées de CTO. Nous avons généré un modèle original de CA-MSC « induites » qui se rapproche des CA-MSC de patientes retrouvées dans les adénocarcinomes ovariens.

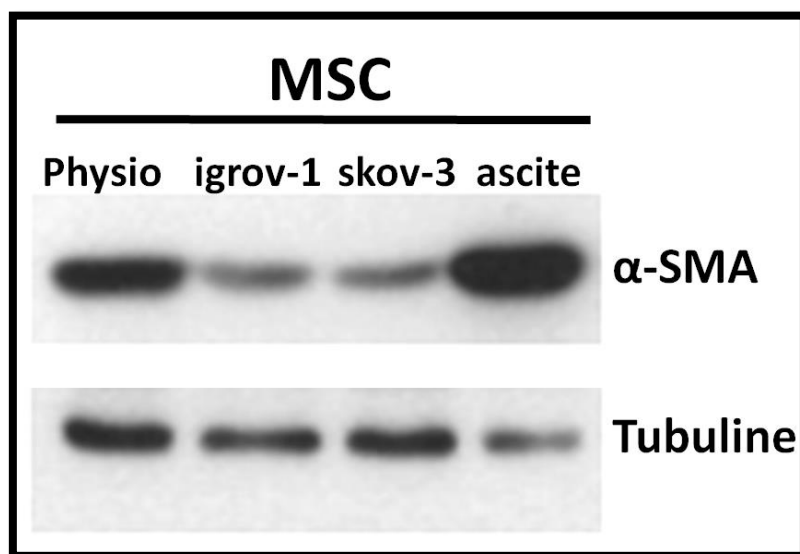
## 5) Etude de l'expression par les CA-MSc « induites » de protéines surexprimées dans les fibroblastes associés au cancer

La perte du caractère multipotent des CA-MSc et CA-MSc « induites » par le MC de CTO pourrait être dû au fait que les MSc, au contact d'un environnement tumoral ovarien, se différencieraient en fibroblastes associés au cancer (CAF). Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié un des principaux marqueurs des CAF,  $\alpha$ -SMA.

Nous avons observé une expression différente d' $\alpha$ -SMA dans les CA-MSc « induites » par rapport aux BM-MSc physiologiques (contrôle). Cependant, selon la méthode d'activation des MSc, l'expression est différente. En effet, la culture des MSc en présence des sécrétions des CTO entraîne une diminution de l'expression d' $\alpha$ -SMA comparée à leur culture dans du milieu contrôle. Au contraire, cette protéine est augmentée dans les MSc cultivées en présence d'ascites en comparaison aux MSc contrôles (Figure 21).

**Figure 21 : Expression d' $\alpha$ -SMA dans les CA-MSc "induites"**

Après 21 jours de culture des BM-MSc dans un environnement tumoral (50% de DMEM avec 50 % de pool d'ascites ou de MC de CTO IGROV-1 ou SKOV-3) ou dans un milieu contrôle (DMEM), l'expression d' $\alpha$ -SMA est étudiée par Western Blot. La détection de la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. Cette figure est représentative de 3 expériences.



Ainsi, ces résultats suggèrent que, si une différenciation des MSc en CAF se produisait, celle-ci serait plutôt induite par de l'ascite plutôt que par du MC de CTO. Cependant, en présence d'ascites, les MSc conservent leur potentiel de différenciation adipocytaire et ostéoblastique, contrairement à celles cultivées en présence de MC de CTO. Ainsi, une différenciation en CAF des BM-MSc ne semble pas être induite par le MC de CTO. En conclusion, la perte de la capacité des CA-MSc, et des CA-MSc « induites » par les CTO, à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes ne s'expliquerait pas par une différenciation en CAF.

## **E) Rôle *in vivo* des MSC dans la résistance des cellules tumorales ovariennes au traitement par carboplatine**

Afin de vérifier si, *in vivo*, les MSC peuvent induire une chimiorésistance, nous avons utilisé deux modèles expérimentaux murins dans lesquels des MSC ont été co-injectées avec des CTO. Les souris ont été traitées au carboplatine afin de déterminer l'effet des MSC sur la chimiorésistance. L'expérience durant plus de 21 jours, les BM-MSc qui ont été au contact d'un environnement tumoral ont pu acquérir le phénotype de CA-MSc « induites ».

### **1) Modèle expérimental d'adénocarcinome ovarien totalement murin**

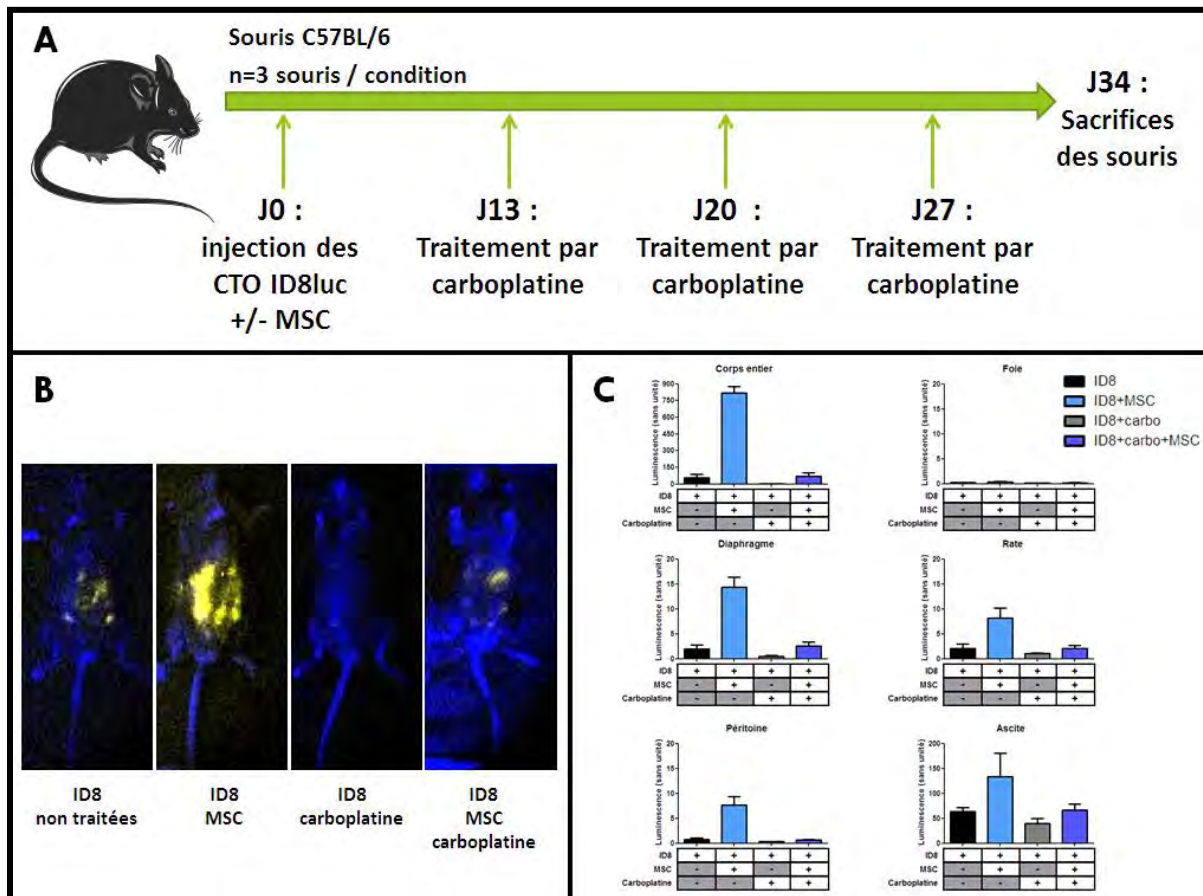
Nous avons utilisé un modèle expérimental totalement murin en induisant une carcinose péritonéale chez des souris C57BL/6 en injectant des CTO possédant le même fond génétique que ces souris, les cellules ID8<sup>227</sup>. Afin de suivre le développement tumoral par luminescence, les cellules ID8 ont été au préalable transduites par le gène de la luciférase d'une luciole (Firefly), la *Photinus pyralis*. Les cellules obtenues sont nommées ID8luc et peuvent émettre de la bioluminescence, en présence de luciférine. Les MSC (RCB2295) utilisées dans cette expérience sont des MSC immortalisées murines ayant un fond génétique C57BL/6. Les souris sont injectées par des CTO ID8luc seules, ou avec des MSC murines, par voie i.p. (Figure 22A). L'injection par voie i.p. permet de mimer une dissémination péritonéale, qui est observée chez les patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien. Le volume tumoral est évalué par luminescence des CTO ID8luc 7 jours après la fin du traitement par carboplatine (Figure 22A). La luminescence est réalisée sur le corps entier de souris vivantes, puis sur différents organes (rate, diaphragme, péritoine et foie) après sacrifice et dissection des souris, et également sur le liquide de lavage péritonéal (ascite).

La luminescence des cellules ID8luc, reflet du volume tumoral, est plus importante dans les souris ayant reçu une co-injection d'ID8luc et de MSC que dans les souris ayant eu une injection de CTO ID8luc seules (Figure 22C et D). De même, la luminescence observée sur le corps entier des souris traitées au carboplatine est plus importante dans les souris ayant reçu une co-injection d'ID8luc et de MSC que dans les souris ayant eu une injection de CTO ID8luc seules.

Pour évaluer la dissémination tumorale au niveau des organes de la cavité abdominale, nous avons sacrifié les souris et prélevé le foie, le diaphragme, la rate et le péritoine et le liquide de lavage péritonéal (ascite). Les organes ont été récupérés et disséqués, et l'émission de bioluminescence, relative à la présence de cellules ID8luc, a été mesurée dans chacun de ces fragments d'organes et dans l'ascite.

**Figure 22 : Effet des MSC sur la résistance des CTO ID8luc au carboplatine dans un modèle expérimental totalement murin**

A J0,  $5.10^6$  cellules ID8luc +/-  $5.10^5$  MSC (RCB2295) sont injectées par voie i.p. dans des souris C57BL/6. Les souris sont traitées à partir de J13. Le traitement par carboplatine consiste à réaliser une injection de 200 $\mu$ L d'une solution de carboplatine à 4,5 mg/mL tous les 7 jours pendant 3 semaines. Après 34 jours, soit 7 jours après la dernière injection de carboplatine, le volume tumoral est évalué par luminescence (A). Dans un premier temps, une injection de 200 $\mu$ L de luciférine firefly à 15mg/mL par voie i.p. est réalisée sur souris vivantes (anesthésiées au préalable avec de l'isoflurane). L'appareil de mesure de bioluminescence (IVIS®) est constitué d'une enceinte totalement hermétique à la lumière dans laquelle est placée une caméra CCD (Charge Coupled Device) permettant l'acquisition du signal. Les souris sont placées dans l'enceinte et les images sont obtenues 10 minutes après l'injection de luciférine (B). La quantification de la luminescence obtenue sur les images est réalisée grâce au logiciel ImageJ® (C). Les souris sont ensuite sacrifiées et un lavage péritonéal est réalisé en injectant 5mL de NaCl 0,9%. Ce liquide, contenant de l'ascite et du NaCl, est ré-aspiré. Le foie, le diaphragme, la rate et le péritoine sont prélevés et disséqués puis mis dans les puits d'une plaque 96 puits à fond blanc contenant 150 $\mu$ L de milieu de culture. 50 $\mu$ L de luciférine sont ajoutés et la luminescence produite est détectée au luminomètre (EnVision™ Multilabel Plate Readers - PerkinElmer®). L'intensité de luminescence de chaque organe est obtenue en additionnant la valeur de luminescence de chaque fragment d'organe (C). Pour l'ascite (ou liquide de lavage péritonéal), 150  $\mu$ L de cette suspension cellulaire sont déposés dans des plaque 96 puits à fond blanc et 50  $\mu$ L de luciférine sont ajoutés pour obtenir l'intensité de luminescence des ascites (C).



Les résultats font état d'une augmentation de la luminescence dans la rate, le péritoine et le diaphragme des souris non traitées ayant reçu une co-injection de MSC et de cellules ID8luc comparée à la luminescence de ces mêmes organes issus de souris ayant eu une injection de cellules ID8luc seules. De même, concernant les souris traitées au carboplatine, l'étude de la luminescence de ces organes montre également une augmentation de la luminescence pour les souris ayant reçu une co-injection de MSC et de cellules ID8luc comparée aux souris ayant eu



une injection de cellules ID8luc seules (Figure 22C). En revanche, dans ce modèle expérimental murin, la dissémination au niveau du foie semble très faible car la luminescence détectée dans cet organe est proche du bruit de fond (Figure 22C).

Dans les conditions non traitées, ce modèle expérimental totalement murin montre ainsi une progression tumorale des cellules ID8luc plus importante en présence de MSC, au niveau de la cavité abdominale entière et plus précisément dans le diaphragme, la rate et le péritoine. Ces MSC murines ont donc un effet pro-tumoral.

Chez les souris traitées au carboplatine, cet effet pro-tumoral est également observé par l'étude de la luminescence du corps entier, du diaphragme, de la rate, du péritoine et de l'ascite, qui est plus importante chez les souris ayant eu une injection de MSC versus celles sans MSC.

De plus, la luminescence abdominale mais également des organes des souris traitées par carboplatine ayant reçu une injection de MSC est comparable à la luminescence observée chez des souris non traitées ayant reçu une injection de cellules ID8luc seules, suggérant un effet chimioprotecteur des MSC. Cependant, nous ne pouvons pas l'affirmer à ce stade des travaux. En effet, l'augmentation du volume tumoral en présence de MSC dans les souris traitées au carboplatine pourrait être causé par une plus forte prolifération des CTO et pas forcément par une augmentation de la résistance des CTO.

Ce modèle permet donc de démontrer un rôle pro-tumoral des MSC sans toutefois permettre de conclure sur leur rôle chimioprotecteur.

## **2) Modèle expérimental d'adénocarcinome ovarien réalisé chez la souris avec des CTO et des MSC humaines**

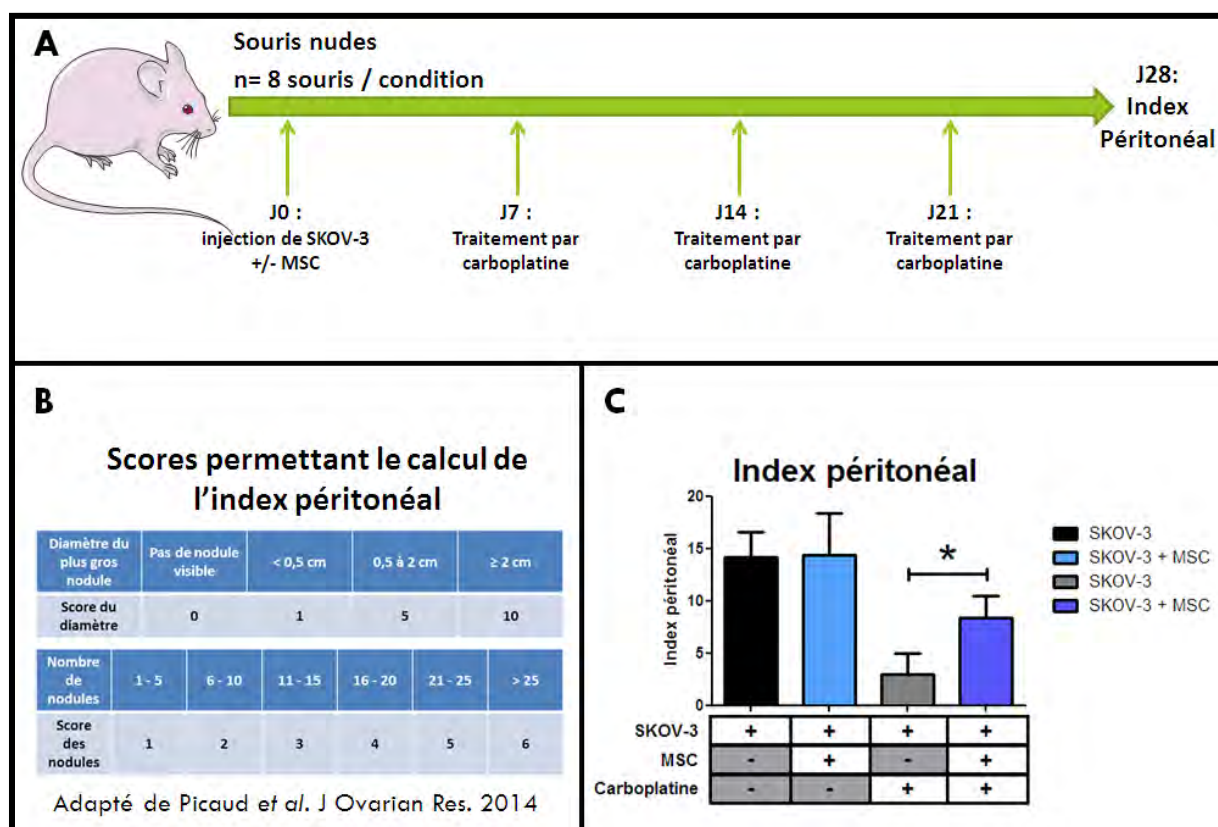
Pour évaluer, *in vivo*, le rôle de MSC humaines sur des CTO humaines, nous avons également utilisé un modèle expérimental murin. Afin que les CTO et les MSC humaines ne soient pas rejetées par le système immunitaire des souris, ce modèle nécessitait l'utilisation de souris immunodéprimées comme les souris nues. Les souris nues sont des souris présentant une aplasie du thymus provoquant une absence de lymphocytes T.

Les CTO que nous avons le plus étudiées *in vitro* sont les cellules IGROV-1, notamment en raison de leur sensibilité initiale au carboplatine, permettant plus facilement d'étudier une augmentation de la résistance. Ces cellules auraient ainsi également représenté des cellules intéressantes à étudier *in vivo*. Cependant, le taux d'implantation de ces cellules a été inconstant (environ 60% de prise tumorale) dans les souris nues. Ainsi, l'utilisation de ces cellules aurait conduit à l'injection de nombreuses souris par groupes, pour pallier au fait que certaines souris ne présenteraient pas de tumeur, et à la probable variabilité dans les prises tumorales. Notre choix s'est alors porté sur les cellules SKOV-3, dont l'injection dans les souris nues permettait une implantation tumorale dans pratiquement 100% des cas. L'emploi des cellules SKOV-3 a donc permis de réaliser des injections dont la prise tumorale est plus reproductible et de diminuer le nombre de souris par groupe, ce qui est plus acceptable éthiquement.

L'injection des CTO humaines a donc été réalisée dans des souris nues, pouvant être associée ou non à une injection de BM-MSc humaines (issues de sujets ne présentant pas de cancer connu au moment du don). Etant donné que les cellules SKOV-3 n'expriment pas la luciférase, la progression tumorale est évaluée par le calcul d'un index péritonéal (Figure 23A), adapté de Picaud *et al.*<sup>228</sup>, prenant en compte le nombre de nodules et le diamètre du plus gros nodule tumoral (Figure 23B). Cet index péritonéal est obtenu en multipliant le score du diamètre du plus gros nodule par le score dépendant du nombre total de nodules.

**Figure 23 : Effet des MSC sur la résistance des CTO SKOV-3 au carboplatine dans un modèle expérimental murin/humain**

A J0,  $10.10^6$  cellules SKOV-3 +/-  $1.10^6$  BM-MSc (issues de têtes fémorales de donneuses ayant subi une chirurgie de la hanche et ne présentant pas de cancer au moment de cette chirurgie) sont injectées dans des souris nues. Les souris sont traitées à partir de J7. Le traitement par carboplatine consiste à réaliser une injection de  $200\mu\text{L}$  d'une solution de carboplatine à  $4,5\text{ mg/mL}$  tous les 7 jours pendant 3 semaines. Après 28 jours, soit 7 jours après la dernière injection de carboplatine, le volume tumoral est évalué par le calcul d'un index péritonéal (A). Le calcul de l'index nécessite l'obtention de 2 scores, le premier score est établi en fonction du diamètre du plus gros nodule péritonéal et le second dépend du nombre total de nodules observés au niveau de la cavité abdominale (B). L'index péritonéal est calculé en multipliant ces 2 scores dans les souris étudiées (C).



Contrairement aux résultats du modèle expérimental totalement murin présentés précédemment, la co-injection des BM-MSc avec des CTO SKOV-3 ne modifie pas la progression tumorale dans ce modèle (Figure 23C), en absence de traitement.

Cependant, lors du traitement par carboplatine, l'index péritonéal est plus élevé chez les souris ayant eu une co-injection de MSC avec des cellules SKOV-3 que chez les souris ayant eu une injection de CTO seules. La présence de MSC au contact de la tumeur entraîne une augmentation de la résistance des CTO au carboplatine (Figure 23C).

Ainsi, ce modèle expérimental murin humanisé (cellules humaines SKOV-3 et BM-MSc), a permis de montrer un rôle pro-tumoral des MSC vis-à-vis des CTO. Dans ce modèle, contrairement au modèle expérimental totalement murin (CTO ID8luc et MSC murines), le rôle pro-tumoral des MSC ne peut pas être attribué uniquement à une augmentation de la prolifération tumorale mais bien à une résistance des CTO au carboplatine. Il permet de valider les résultats obtenus *in vitro* montrant l'induction de la chimiorésistance des CTO par des CA-MSc.

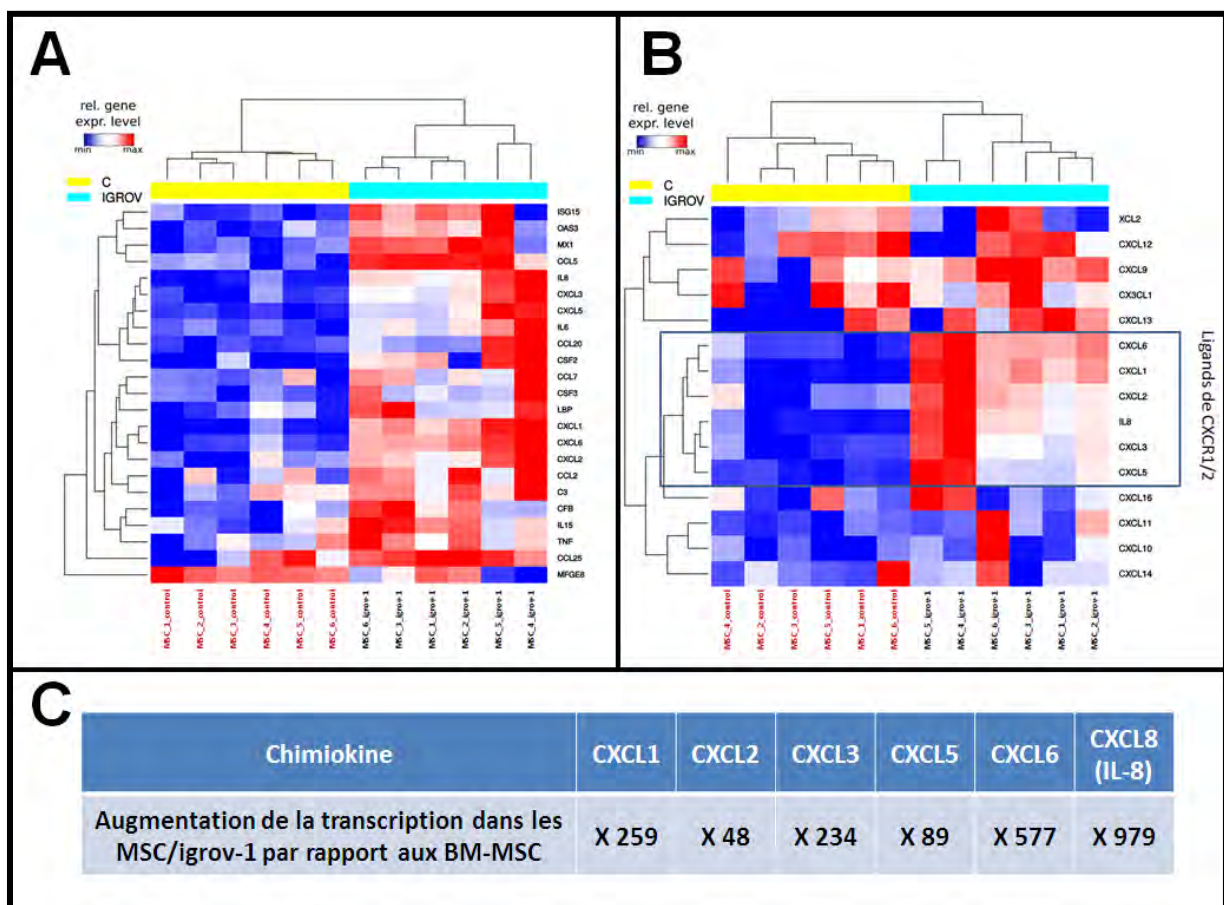
## F) Identification des facteurs sécrétés par les CA-MSC impliqués dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes

### 1) Identifications de facteurs potentiels par analyse transcriptomique

Afin d'identifier les facteurs sécrétés par les CA-MSC impliqués dans la chimiorésistance des CTO, une analyse transcriptomique a été réalisée. Pour éviter d'interpréter des différences d'ordre interindividuel, nous avons utilisé notre modèle de CA-MSC « induites », qui permet de comparer des MSC physiologiques avec des CA-MSC issues de la même personne.

Figure 24 : Analyse transcriptomique comparant des BM-MSC et des CA-MSC "induites" par des cellules IGROV-1

Après 21 jours de culture des BM-MSC dans du milieu contrôle ou en présence de MC de cellules IGROV-1 (CA-MSC « induites » par les cellules IGROV-1, nommées MSC/igrov-1), les ARN totaux sont extraits. Les ARN totaux extraits des MSC et des CA-MSC « induites » sont détectés directement, sans nécessité d'amplification, et comptés dans les échantillons par la technologie Nanostring. L'analyse a été effectuée sur le panel « nCounter® PanCancer Immune Profiling Panel » (Nanostring), permettant d'étudier la transcription de 770 gènes. Une sélection de 29 gènes de ménage a été utilisée pour calculer la quantité relative d'ARN cible. Pour étudier les gènes différentiellement transcrits, un premier filtre ( $sd > 0.25$ ) a été appliqué afin d'éliminer les gènes peu variant. L'analyse statistique des 699 gènes restants a été effectuée à l'aide d'un test ANOVA pour la comparaison des 6 échantillons contrôles versus les 6 MSC/igrov-1. Les valeurs p ont été corrigées pour les tests multiples en utilisant la méthode Benjamini & Hochberg (BH).



Les CA-MSC « induites » par les CTO IGROV-1 ont été choisies pour cette analyse transcriptomique car ce sont celles qui semblaient se rapprocher le plus des CA-MSC de patientes. Nous avons utilisé 6 couples de MSC/contrôle et MSC/igrov-1, dont nous avons étudié la transcription de 770 gènes par la technologie Nanostring.

Les résultats de l'analyse transcriptomique montrent une différence entre les 2 populations MSC/contrôle et MSC/igrov-1. Parmi les facteurs différentiellement exprimés entre les MSC/contrôle et MSC/igrov-1 une vingtaine de facteurs sécrétés ont pu être identifiés (Figure 24A). L'analyse de ces résultats montre qu'une grande partie de ces facteurs identifiés sont des chimiokines. Ainsi, en regardant plus précisément la transcription des chimiokines, notamment les chimiokine au motif CXCL (Figure 24B), celles qui semblent les plus discriminantes entre les MSC/contrôle et MSC/igrov-1, sont les chimiokines se liant aux récepteurs CXCR1 et/ou CXCR2.

Ainsi, les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 et l'IL-8 (CXCL-8) sont plus transcrites dans les CA-MSC « induites » par les CTO IGROV-1 que dans les BM-MSC (Figure 24 B et C). Ces chimiokines pourraient faire partie des facteurs sécrétés par les CA-MSC et CA-MSC « induites » conduisant à la résistance des CTO au traitement par carboplatine. En effet, la faculté de l'IL-8 à induire une chimiorésistance sur des CTO a déjà été démontrée<sup>229</sup>. Les autres chimiokines pouvant également se fixer et activer CXCR1 et/ou CXCR2 pourraient également entraîner une chimiorésistance des CTO.

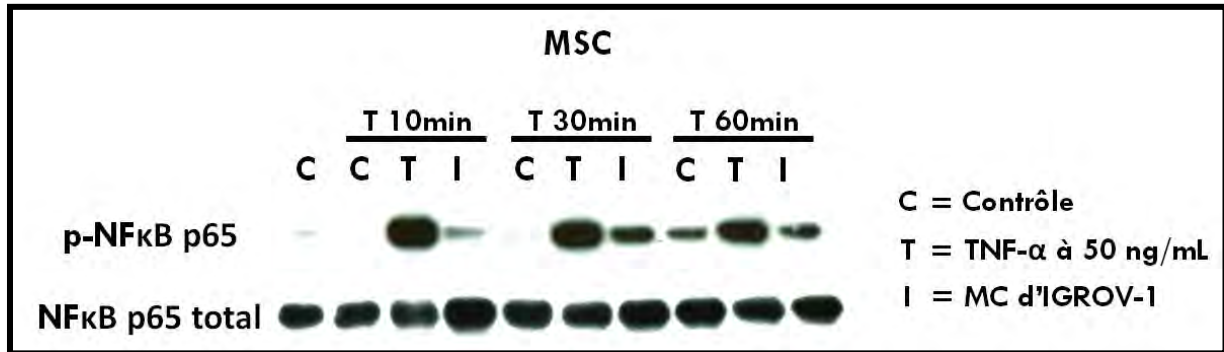
## 2) Analyse de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B

La voie NF- $\kappa$ B est impliquée dans la régulation de l'expression des chimiokines<sup>230,231</sup>. Ainsi, si l'environnement tumoral ovarien induisait une augmentation de la transcription des chimiokines dans les MSC, la voie NF- $\kappa$ B devrait être activée. Comme les résultats de l'analyse transcriptomique montrent une augmentation de la transcription des chimiokines dans les MSC cultivées en présence de MC de CTO IGROV-1 par rapport aux BM-MSC issues des mêmes personnes, nous avons étudié l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans ces conditions. Le TNF- $\alpha$ , connu pour activer la voie NF- $\kappa$ B, est utilisé comme contrôle positif. Des BM-MSC sont ainsi cultivées dans du milieu contrôle, dans du MC de CTO IGROV-1 ou en présence de TNF- $\alpha$ . L'activation de la voie NF- $\kappa$ B est évaluée en étudiant la phosphorylation de p65 (RelA), une sous unité constituant la forme classique de NF- $\kappa$ B (hétérodimères p50/p65).

En présence de MC de cellules IGROV-1, les MSC présentent une augmentation de la quantité relative de la forme phosphorylée de p65 comparée à la condition contrôle. Cette augmentation de phospho-p65, également observée avec le TNF- $\alpha$  (contrôle positif), s'observe à partir de temps très courts (dès 10 minutes) (Figure 25).

**Figure 25 : Etude de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans des MSC mises en présence de sécrétions de cellules tumorales ovariennes**

1,5.10<sup>5</sup> MSC sont ensemencées dans des boîtes de Pétri 100mm. Les MSC sont cultivées dans du milieu contrôle (RPMI), en présence de TNF $\alpha$  (50 ng/mL dans RPMI), ou de MC de cellules IGROV-1 (dilué v/v dans du RPMI). Les protéines sont extraites à 0, 10 min, 30 min, 60 min. L'analyse protéique est réalisée par Western Blot.



La présence des facteurs sécrétés par les CTO IGROV-1 induit une augmentation de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, qui se traduit par l'augmentation de la phosphorylation de p65. Cette augmentation de la voie p65 pourrait entraîner par la suite une augmentation de la transcription de chimiokines.

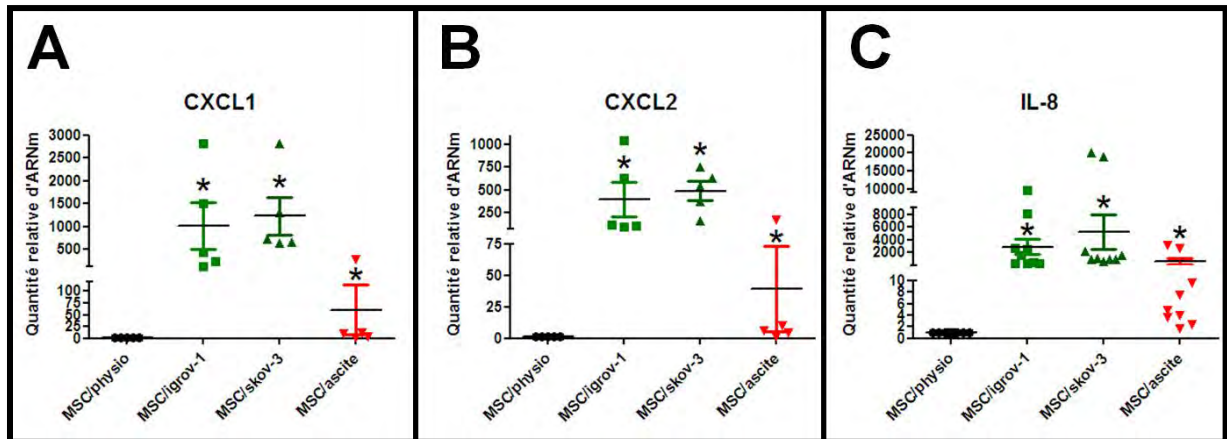
### 3) Validation de la surexpression des chimiokines identifiées au niveau transcriptionnel et protéique dans les CA-MSC

#### a) Validation de l'augmentation de la transcription des chimiokines dans les CA-MSC « induites »

Nous avons voulu valider la surexpression des gènes codant pour CXCL1, CXCL2 et IL-8 dans les CA-MSC « induites » en présence de MC de CTO IGROV-1, par une deuxième méthode. Nous avons donc réalisé une RT-qPCR. Dans les CA-MSC « induites », que ce soit par les CTO (IGROV-1 et SKOV-3) ou par l'ascite, une augmentation significative de la transcription est observée pour les gènes codant CXCL1, CXCL2 et IL-8 (Figure 26 A, B et C). Ces résultats valident donc l'augmentation de la transcription des chimiokines, observée par l'analyse au Nanostring (Figure 24 A et B). Cependant, en présence d'ascite, l'augmentation de la transcription des gènes codant pour CXCL1, CXCL2 et IL-8 est moins importante que celle observée en présence des MC des CTO (Figure 26).

**Figure 26 : Analyse de la transcription des chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8 dans les BM-MSc et les CA-MSc "induites"**

Après 21 jours de culture des BM-MSc dans du milieu contrôlé (MSc/physio) ou en présence de MC de cellules IGROV-1 (MSc/igrov-1), de MC de cellules SKOV-3 (MSc/skov-3) ou d'ascites (MSc/ascite), les ARN totaux de ces cellules sont extraits puis leur ADNc est synthétisé par reverse transcription. La quantité relative d'ADNc, issus des ARN totaux des BM-MSc et CA-MSc « induites » est évaluée en réalisant une PCR quantitative (qPCR). La transcription relative de chacun des gènes évalués est calculée par rapport à la transcription de la GAPDH. Les gènes codant pour CXCL1 (A), CXCL2 (B) et IL-8 (C) sont analysés.



*b) Analyse de la sécrétion de chimiokines par les CA-MSc et CA-MSc « induites »*

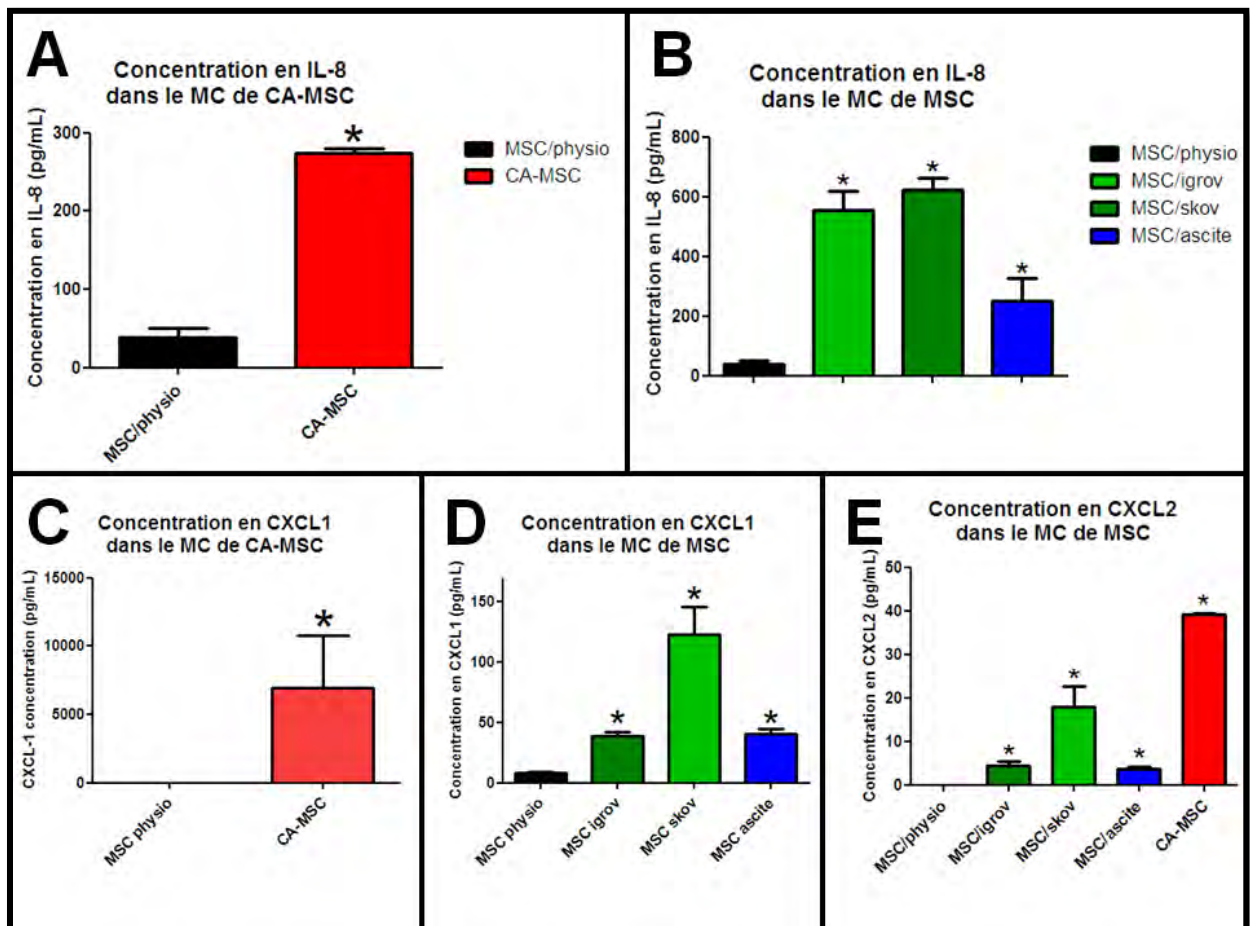
Dans le but de vérifier si l'augmentation de la transcription s'accompagnait d'une augmentation de la sécrétion des chimiokines par les CA-MSc et CA-MSc « induites », nous avons mesuré la concentration en chimiokines (test ELISA) dans le MC de ces cellules.

Nous avons observé une augmentation de la sécrétion d'IL-8 par les CA-MSc (Figure 27A) et les CA-MSc « induites » (Figure 27B) comparée à la sécrétion de BM-MSc (MSc/physiologiques). De même, on retrouve une augmentation de la sécrétion des protéines CXCL1 et CXCL2 pour les CA-MSc et CA-MSc « induites » par rapport aux BM-MSc (Figure 27 C, D et E).

Ainsi, nous avons montré que l'augmentation de la transcription des chimiokines dans les MSc qui sont au contact d'un environnement tumoral ovarien s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de ces protéines. De manière comparable à l'analyse de la transcription des chimiokines, les sécrétions en CXCL1, CXCL2 et IL-8 sont plus faibles lorsque les CA-MSc « induites » sont issues d'une culture avec des ascites que de celles provenant de la culture avec du MC de CTO.

**Figure 27 : Analyse de la sécrétion des chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8 par les BM-MSC, les CA-MSC et les CA-MSC "induites"**

5.10<sup>5</sup> BM-MSC ou CA-MSC sont ensemencés dans une flask de 75cm<sup>2</sup>. Après 3 jours de culture, les différents surnageants sont récupérés puis filtrés à 0,2µm. Les milieux conditionnés (MC) des BM-MSC et des CA-MSC sont ainsi obtenus. 1.10<sup>5</sup> BM-MSC sont ensemencés dans une flask de 75cm<sup>2</sup>. Après 21 jours de culture des BM-MSC dans du milieu contrôle (MSC/physio) ou en présence de MC de cellules IGROV-1 (MSC/igrov-1), de MC de cellules SKOV-3 (MSC/skov-3) ou d'ascites (MSC/ascite), leur milieu est remplacé par du DMEM et 3 jours plus tard, les différents surnageants sont récupérés puis filtrés à 0,2µm. Les MC des CA-MSC « induites » sont ainsi obtenus. La concentration en CXCL-1, CXCL2 et IL-8 est déterminée à l'aide de kits ELISA sur les MC des BM-MSC, CA-MSC et CA-MSC « induites ».





## **G) Implication des chimiokines identifiées dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes induite par les CA-MSC**

Nous avons mis en évidence que des MSC, lorsqu'elles sont dans un contexte de cancer ovarien, sécrètent plus de chimiokines. Ces protéines pourraient être impliquées dans la chimiorésistance induite par ce type de MSC. En effet, l'IL-8, qui se fixe sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2, a déjà été identifiée comme un facteur protecteur des CTO vis-à-vis du carboplatine et du paclitaxel<sup>229</sup> (molécules de référence dans le traitement du cancer ovarien). Les chimiokines se lient à ces récepteurs et conduisant à leur activation pourraient avoir le même impact sur la chimiorésistance que l'IL-8. Les chimiokines CXCL1/2/3/5/6/7/8 se lient à CXCR2 et seules les chimiokines CXCL6/7/8 se lient également à CXCR1. Ainsi ces 2 récepteurs, CXCR1 et CXCR2, pourraient être impliqués dans la résistance des CTO au carboplatine due aux sécrétions des CA-MSC et CA-MSC « induites ».

### **1) Etude rétrospective de la concentration sérique en chimiokines au moment du diagnostic chez les patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien**

Nous avons débuté une étude rétrospective sur le sérum de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien et ayant été soignées à l'institut Claudius Regaud ou ensuite à l'IUCT-Oncopole. La concentration en chimiokines a été mesurée sur du sérum prélevé au moment du diagnostic, avant toute chimiothérapie. Nous avons tenté de corrélérer les concentrations en chimiokines avec la réponse au traitement par sel de platine afin d'évaluer leur rôle prédictif dans la réponse à la chimiothérapie. Les patientes ont été réparties en 2 groupes selon leur sensibilité au traitement par carboplatine. Un groupe dont la tumeur a récidivé dans les 6 mois après la dernière injection de sel de platine (réfractaires et résistantes) et le second groupe réunissant les patientes ayant récidivé plus de 6 mois après la dernière cure de platine ou n'ayant pas récidivé (sensibles). Les caractéristiques des patientes et de leur tumeur sont résumées dans le tableau 15.

Nous avons observé que la concentration sérique moyenne en IL-8 est significativement supérieure dans le groupe des patientes qui seront à postériori résistantes (ou réfractaires), au traitement de chimiothérapie comparée à la moyenne des concentrations retrouvée chez les patientes sensibles au traitement, (90 pg/mL versus 25 pg/ml) (Figure 28A).

De même, la moyenne des concentrations sériques en CXCL1 est significativement plus élevée dans le groupe des résistantes, avec par rapport aux sensibles, (212 pg/mL versus 122 pg/mL) (Figure 28B). Pour les concentrations en CXCL2, on constate la même tendance, avec une concentration moyenne de 92 pg/mL pour le groupe des résistantes et de 83 pg/mL dans le groupe des sensibles, bien que celle-ci ne soit pas significative (Figure 28C).

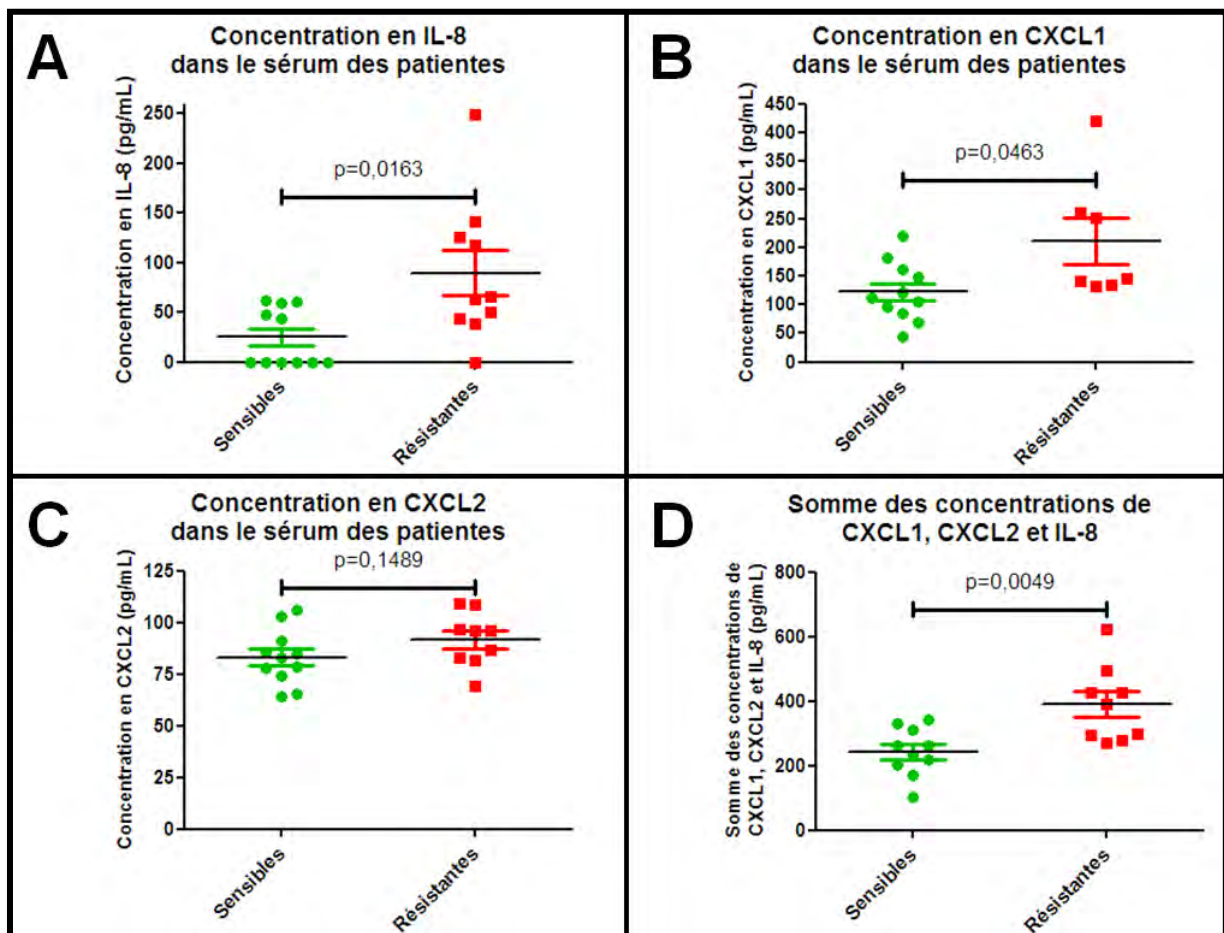
Tableau 15 : Caractéristiques de la cohorte de patientes, et de leur tumeur, utilisée dans l'étude rétrospective de la concentration sérique en chimiokines

| Numéro | type de cancer                                 | Stade | traitement                | Mois avant récurrence          | Sensibilité |
|--------|--|-------|---------------------------|--------------------------------|-------------|
| 1      | carcinome séreux de haut grade                 | IIIc  | Carboplatine + paclitaxel | > 36 mois                      | Sensible    |
| 2      | carcinome ovarien peu différencié              | IV    | Carboplatine + paclitaxel | progression pendant traitement | Réfractaire |
| 3      | carcinome séreux de haut grade                 | III   | Carboplatine + paclitaxel | 30 mois                        | Sensible    |
| 4      | carcinome papillaire séreux                    | IIIc  | Carboplatine + paclitaxel | 5 mois                         | Résistante  |
| 5      | carcinome papillaire séreux                    | IV    | Carboplatine + paclitaxel | > 48 mois                      | Sensible    |
| 6      | carcinome à cellule claire                     | IIIc  | Carboplatine + paclitaxel | 7 mois                         | Sensible    |
| 7      | carcinome séreux de haut grade                 | II    | Carboplatine + paclitaxel | 14 mois                        | Sensible    |
| 8      | carcinome papillaire séreux                    | IIIb  | Carboplatine + paclitaxel | 30 mois                        | Sensible    |
| 9      | carcinome séreux de haut grade                 | IIIc  | Carboplatine + paclitaxel | 22 mois                        | Sensible    |
| 10     | Carcinome séreux de bas grade II               | III   | Carboplatine + paclitaxel | > 60 mois                      | Sensible    |
| 11     | carcinome mucineux atypique                    | III   | Carboplatine + paclitaxel | 3 mois                         | Résistante  |
| 12     | carcinome séreux de haut grade                 | IV    | Carboplatine + paclitaxel | 8 mois                         | Sensible    |
| 13     | carcinome séreux de haut grade                 | III   | Carboplatine + paclitaxel | progression pendant traitement | Réfractaire |
| 14     | carcinome séreux                               | IIIc  | Carboplatine + paclitaxel | > 42 mois                      | Sensible    |
| 15     | carcinome séreux de bas grade                  | III   | Carboplatine + paclitaxel | 18 mois                        | Sensible    |
| 16     | carcinome séreux                               | III   | Carboplatine + paclitaxel | 4 mois                         | Résistante  |
| 17     | carcinome séreux haut grade                    | IV    | Carboplatine + paclitaxel | 3 mois                         | Résistante  |
| 18     | carcinome séreux moyennement à peu différencié | ND    | Carboplatine + paclitaxel | progression pendant traitement | Réfractaire |
| 19     | carcinome séreux                               | IV    | Carboplatine + paclitaxel | 3 mois                         | Résistante  |
| 20     | carcinome séreux de haut grade                 | III   | Carboplatine + paclitaxel | 5 mois                         | Résistante  |
| 21     | adénocarcinome moyennement différencié         | IV    | Carboplatine + paclitaxel | progression pendant traitement | Réfractaire |

De manière intéressante, on s'aperçoit que la valeur la plus fortement associée à la réponse à la chimiothérapie à base de sel de platine est obtenue en tenant compte de la concentration globale de ces 3 chimiokines. En effet, en additionnant les concentrations de ces 3 chimiokines, CXCL1/2/8, nous obtenons une concentration globale en chimiokines. Ainsi, la moyenne de la somme de ces concentrations est significativement supérieure dans le groupe des résistantes par rapport au groupe des sensibles.

**Figure 28 : Concentrations sériques en chimiokines au moment du diagnostic en fonction du statut sensible ou résistant des patientes**

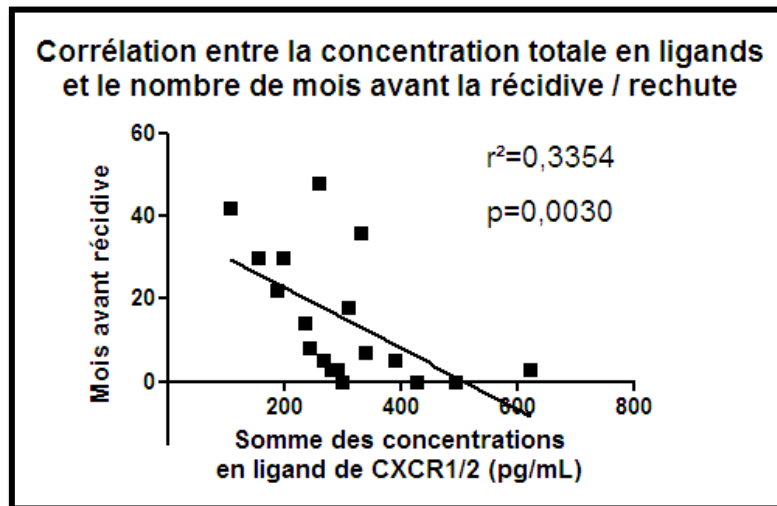
La concentration en CXCL-1 (A), CXCL2 (B) et IL-8 (C) est déterminée à l'aide de kits ELISA sur des échantillons de sérums de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien prélevés au moment du diagnostic. Le statut des tumeurs « sensibles » ou « résistantes » a été établi a posteriori en fonction de la durée de l'intervalle libre sans platine avant rechute. Les patientes ayant récidivé dans un délai de 6 mois après la dernière injection de platine ont été classées comme « résistantes » (les patientes réfractaires sont classées dans le même groupe) et les autres patientes sont classées dans le groupe des « sensibles ». La somme des concentrations en CXCL1, CXCL2 et IL-8 (D) est obtenue en additionnant la concentration sérique de ces trois chimiokines.



Nous avons observé que la concentration sérique en chimiokines, et plus particulièrement la somme des chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8, était statistiquement associée, chez les patientes, à la résistance future de leur tumeur à la chimiothérapie.

**Figure 29 : Corrélation entre la concentration en ligands des récepteurs CXCR1 et CXCR2 en fonction des mois avant récurrence**

La concentration en CXCL-1, CXCL2 et IL-8 est déterminée à l'aide de kits ELISA sur des échantillons de sérums de patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens prélevés au moment du diagnostic. La recherche de corrélation entre la somme de ces concentrations en chimiokines et le délai avant la récurrence est effectuée. L'existence d'une liaison entre 2 variables est évaluée à l'aide d'un test non paramétrique, le test de corrélation de Spearman.



Nous avons également réalisé un test de corrélation entre la concentration sérique totale en chimiokines (somme des concentrations en CXCL1, CXCL2 et IL-8) et la durée avant une éventuelle récurrence. Ce test montre une relation inverse significative entre ces deux paramètres, signifiant que plus la concentration sérique totale en chimiokines est élevée plus la récurrence est précoce (Figure 29). Cependant, ce test doit être interprété avec précaution car les durées qui correspondent aux rechutes sont parfois approximatives (date de la récurrence rapportée au moment de l'examen de contrôle dont la date a été prévue antérieurement) ou, dans le cas où les patientes n'ont pas présenté de récurrence, la date correspond au dernier examen.

## **2) Etude de la concentration en chimiokines dans l'ascite avant traitement dans un modèle expérimental murin**

Les résultats précédents montrent que la concentration en chimiokines dans le sang est un marqueur statistiquement associé à la réponse au traitement à base de carboplatine. La concentration en chimiokines dans les ascites pourrait potentiellement être informative sur la réponse au traitement. Nous avons étudié cette éventualité dans un modèle expérimental murin.

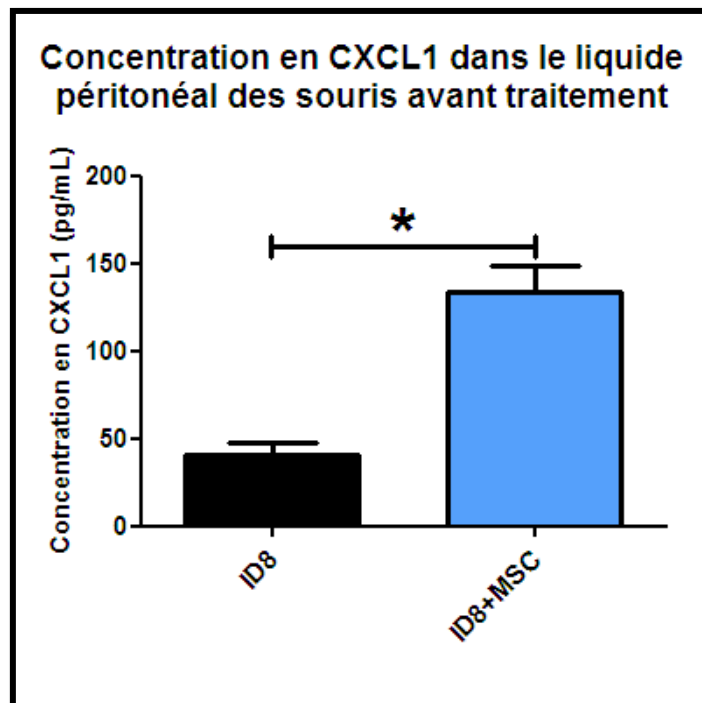
Dans le modèle expérimental murin présenté précédemment (cf. II) E) I)), les souris ont reçu une injection i.p. de CTO murines ID8luc seules ou avec des MSC murines. Afin d'évaluer dans ce modèle le rôle prédictif des chimiokines, nous avons mesuré la concentration en chimiokines dans le lavage péritonéal des souris (pouvant être assimilé à de l'ascite). L'IL-8 n'étant pas présent chez les souris, et les concentrations en CXCL2 murine étant inférieures au

seuil de détection du kit ELISA, ces deux chimiokines n'ont pas pu être étudiées dans ce modèle. En conséquence, seule la concentration en CXCL1 a été déterminée dans le liquide de lavage péritonéal.

Avant de débiter le traitement par carboplatine, nous avons observé que la concentration en CXCL1 dans le liquide de lavage péritonéal était plus importante dans les souris ayant eu une co-injection de MSC avec les cellules ID8 par rapport aux souris ayant reçu uniquement l'injection de CTO (Figure 30).

**Figure 30 : Concentration en CXCL1 dans le liquide de lavage péritonéal des souris avant traitement**

A J0,  $5.10^6$  cellules ID8luc +/-  $5.10^5$  MSC (RCB2295) sont injectées par voie i.p. dans des souris C57BL/6. A J13, avant tout traitement, les souris sont euthanasiées et un lavage péritonéal est réalisé avec 5mL de NaCl (0,9%). La concentration en chimiokine CXCL-1 murine dans ce liquide de lavage péritonéal est déterminée à l'aide d'un kit ELISA.



Ainsi, comme nous avons montré qu'après traitement par carboplatine les souris ayant eu une co-injection de MSC possédaient une charge tumorale supérieure aux souris ayant reçu uniquement les cellules ID8luc, il semblerait que la concentration en chimiokine CXCL1 dans le liquide de lavage péritonéal soit un marqueur statistiquement associé à la réponse au traitement.

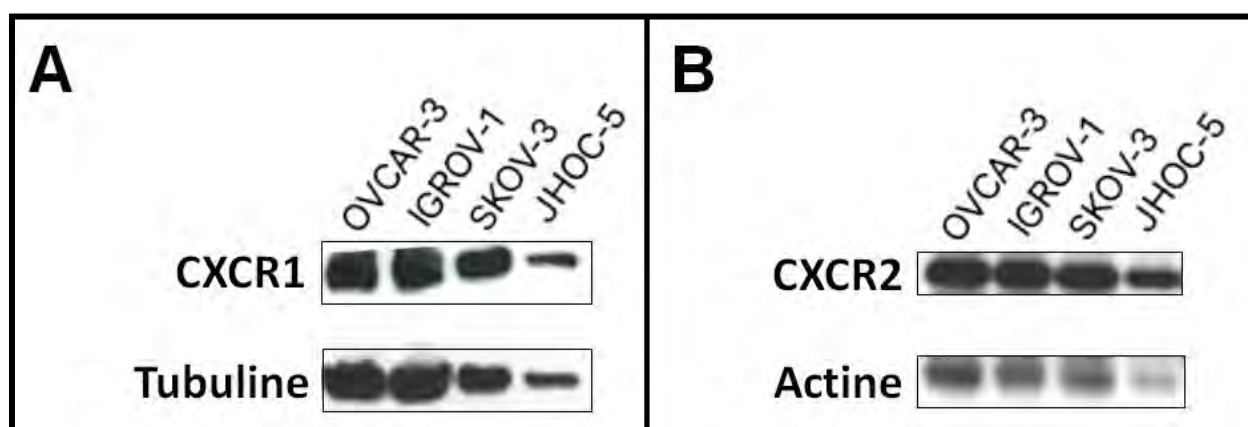
### 3) Etude de l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 par les cellules tumorales ovariennes

La surexpression des chimiokines par les CA-MSC, capables d'entraîner une chimiorésistance *via* la sécrétion de facteurs, ainsi que le fait que ces chimiokines sont des marqueurs statistiquement associés à la réponse à la chimiothérapie, orientent vers un rôle chimioprotecteur de ces protéines. Cependant, avant d'établir le rôle de ces molécules sur les CTO, il est important de vérifier que ces cellules expriment bien les récepteurs de ces chimiokines. Ainsi, nous avons étudié l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 par les CTO, en utilisant 4 lignées cellulaires d'adénocarcinomes ovariens, les cellules IGROV-1, SKOV-3, OVCAR-3 et JHOC-5. En effet, les lignées OVCAR-3, isolées de l'ascite d'une patiente présentant un adénocarcinome de l'ovaire, ainsi que les cellules JHOC-5, issues d'adénocarcinome ovarien à cellules claires, ont également été étudiées en plus des cellules IGROV-1 et SKOV-3 afin de déterminer si l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 était généralisable à de nombreuses CTO.

L'analyse protéique (Western-Blot) de ces CTO IGROV-1, SKOV-3, OVCAR-3 et JHOC-5 montre qu'elles expriment ces récepteurs CXCR1 et CXCR2 (Figure 31). Ainsi, on peut envisager que l'expression des récepteurs aux chimiokines telles que CXCL1/2/3/5/6/7/8, puisse être assez généralisée et que la plupart des CTO devraient pouvoir être affectées par les chimiokines liant ces récepteurs.

**Figure 31 : Analyse protéique de l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 par les lignées cellulaires tumorales ovariennes**

5.10<sup>5</sup> CTO IGROV-1, SKOV-3, OVCAR-3 et JHOC5 sont ensemencées dans des boîtes de Pétri 100mm et 24h après, leurs protéines sont extraites. La détection de l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 a été réalisée par Western-Blot. Les détections de la tubuline et l'actine ont été utilisées comme contrôle de charge.



#### 4) Effet *in vitro* de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sur la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au carboplatine

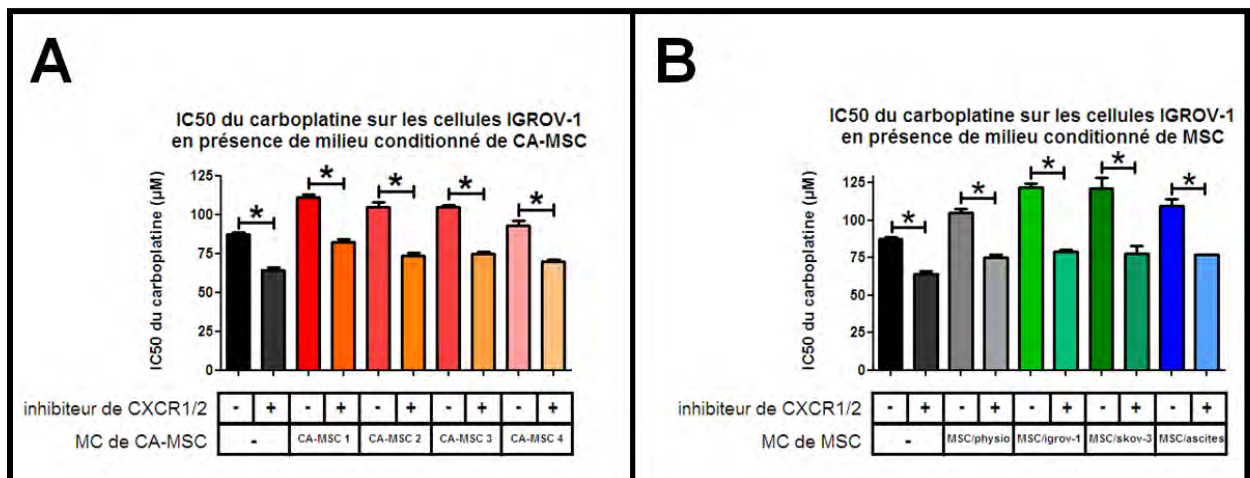
Les résultats de l'étude rétrospective sur la concentration sérique en chimiokines montre que les protéines CXCL1, CXCL2 et IL-8 sont des marqueurs statistiquement associés à la résistance future des tumeurs aux traitements à base de carboplatine. Dans le but de déterminer si ces protéines sont seulement des marqueurs associés à la réponse au platine ou si elles jouent un rôle direct dans la chimiorésistance des CTO, nous avons réalisé une expérience où nous avons évalué l'acquisition de la chimiorésistance des CTO sous l'influence du milieu conditionné par les CA MSC mais en présence d'un inhibiteur des récepteurs aux chimiokines. L'inhibiteur utilisé dans les expériences *in vitro* est un hexapeptide capable d'inhiber les récepteurs CXCR1 et CXCR2<sup>232</sup>.

Nous avons cultivé les CTO IGROV-1 avec du milieu conditionné (MC) par des CA-MSC (issues de 4 patientes différentes : Figure 32A) ou par des CA-MSC « induites » (Figure 32B). Nous les avons ensuite traitées par une gamme de carboplatine en présence ou en absence d'une concentration fixe en inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 (100µM).

Nous avons montré que l'utilisation de l'inhibiteur de CXCR1 et de CXCR2 permet de reverser l'effet chimioprotecteur induit par le MC des CA-MSC (Figure 32A) ou des CA-MSC « induites » (Figure 32B).

**Figure 32 : Sensibilité au carboplatine des CTO IGROV-1 en présence de milieu conditionné de CA-MSC et co-traitées par un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2**

Après récupération du milieu conditionné (MC) pendant 3 jours par des BM-MSC, CA-MSC ou CA-MSC « induites », 5.10<sup>3</sup> CTO IGROV-1 sont ensemencées par puits dans des plaques 96 puits. 50µl de DMEM (contrôle) ou de MC de BM-MSC, CA-MSC ou CA-MSC « induites » sont ajoutés dans 50µL de RPMI contenant les CTO. Après 24 heures, les cellules sont traitées par une gamme de carboplatine +/- un inhibiteur de CXCR1 et de CXCR2 (100µM). La viabilité cellulaire est évaluée 48 heures après le traitement par un test au WST-8. Les IC<sub>50</sub> du carboplatine sont obtenues par le logiciel Graph Pad Prism®, en présence de MC de CA-MSC (A) ou de CA-MSC « induites » (B).



Ainsi, le traitement par un inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 permet de sensibiliser *in vitro* les CTO au traitement par carboplatine malgré la présence de facteurs sécrétés par les CA-MSc, qui, sans ce traitement, augmentaient la résistance des CTO au carboplatine.

## 5) Effet de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 dans un modèle expérimental murin sur la sensibilité des cellules tumorales ovariennes au carboplatine

### a) Etude *in vivo* du développement tumoral avant sacrifice des souris

Dans le but de valider les résultats obtenus *in vitro*, démontrant l'intérêt d'utiliser un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 pour sensibiliser les CTO au traitement par carboplatine, nous avons débuté une expérience sur un modèle expérimental murin.

Le modèle expérimental murin mis en place a nécessité d'utiliser des souris immunodéprimées (nudes) afin d'injecter des CTO humaines ( $10 \cdot 10^6$  SKOV-3luc) et des MSC humaines ( $1 \cdot 10^6$  BM-MSc). Les cellules SKOV-3 ont été au préalable transduites par le gène de la luciférase (nommées SKOV-3luc) afin de suivre tout au long de l'expérimentation le développement tumoral par analyse de la bioluminescence, sans nécessité de sacrifier les souris. Six groupes de souris (n=8 souris par groupe) sont alors constitués. Au début de l'expérimentation, 3 groupes reçoivent une injection de cellules SKOV-3luc et les 3 autres groupes reçoivent une co-injection de cellules SKOV-3luc et de BM-MSc. Après 7 jours, permettant la prise tumorale (qui a été vérifiée par bioluminescence), le traitement est débuté à base de carboplatine seul ou associé à un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2, la reparixin. Le traitement est réalisé pendant 3 semaines, comportant une injection i.p. de carboplatine hebdomadaire et 3 injections i.p. de reparixin par semaine.

En absence de traitement, nous confirmons l'expérience présentée figure 23, en constatant que la co-injection de MSc n'a pas modifié le développement tumoral des cellules SKOV-3luc (Figure 33 A, B et C).

Le traitement par carboplatine permet de diminuer de façon importante la progression tumorale, que ce soit dans les souris ayant reçu une injection i.p. de cellules SKOV-3luc seules ou avec des MSc. Cependant, la co-injection de MSc avec les cellules SKOV-3luc conduit à un développement tumoral plus important que l'injection de ces mêmes CTO seules, en présence de carboplatine (Figure 33 A, B et C). Ceci traduit un effet chimioprotecteur des MSc vis-à-vis des CTO SKOV-3luc. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus lors de l'expérience sur un modèle expérimental murin, présenté précédemment, utilisant des cellules SKOV-3wt (Figure 23C).

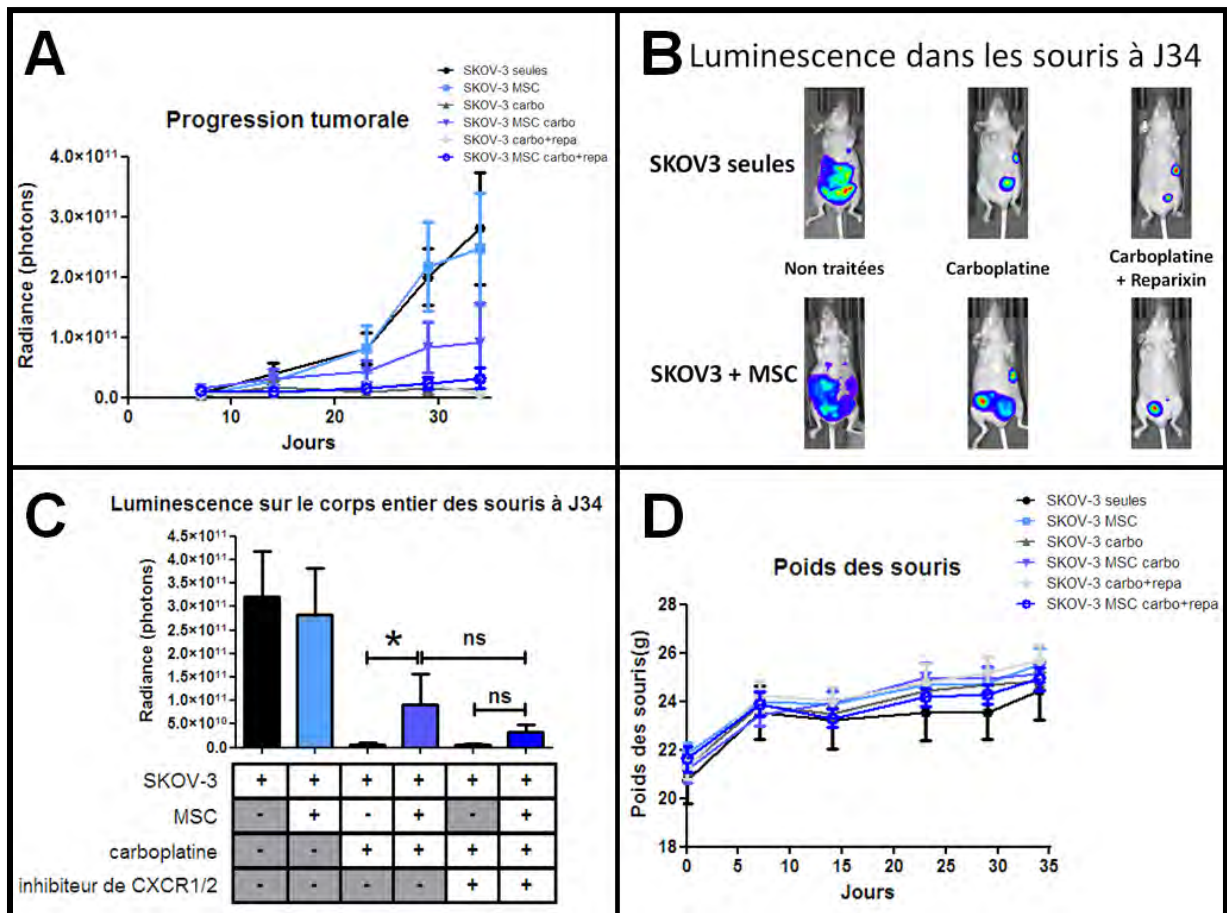
Le co-traitement avec un inhibiteur de CXCR1 et CXCR2, la reparixin, a également été étudié. Une toxicité importante ou l'efficacité d'un médicament entraîne parfois des variations du poids des souris. Ainsi, le poids des souris a été mesuré et suivi tout au long de l'expérience. Le poids



des souris aux différents temps de l'expérience ne sont pas significativement différents dans les différents groupes (Figure 33D), n'orientant pas vers une éventuelle toxicité ou efficacité de la reparixin. Cependant, l'utilisation de la reparixin dans les souris ayant reçu une co-injection de cellules SKOV-3luc et de MSC semble diminuer la charge tumorale observée dans ces souris, bien qu'elle ne soit pas significative.

**Figure 33 : Evaluation de la progression tumorale par bioluminescence dans un modèle expérimental murin/humain**

A J0,  $10.10^6$  SKOV-3luc +/-  $1.10^6$  MSC (issues de têtes fémorales de donneuses ayant subi une chirurgie de la hanche et ne présentant pas de cancer au moment de cette chirurgie) sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) dans des souris nues. Après 7 jours, les traitements sont débutés, comprenant 1 injection de carboplatine ( $200\mu\text{L}/\text{souris}$  d'une solution à  $4,5\text{ mg/mL}$ ) tous les 7 jours pendant 3 semaines (soit 3 injections) et 1 injection de reparixin ( $30\text{ mg/kg}$ ) 3 fois par semaine pendant 3 semaines (soit 9 injections). L'analyse de la bioluminescence à travers le corps entier des souris est réalisée une fois par semaine par une injection i.p. de luciférine, 10 minutes avant analyse à l'IVIS® Imaging Systems (PerkinElmer's) (A). A J34, la bioluminescence sur le corps entier des souris est réalisée permettant l'obtention de photos associant la quantification des luminescences, illustrées avec une souris par groupe (B). Les moyennes (et écart-types) des valeurs de luminescence de chaque groupes de souris sont représentés (C). Le poids des souris a été mesuré une fois par semaine durant l'expérimentation (D).



Cette expérience montre que la présence de MSC entraîne une résistance plus importante des CTO SKOV-3luc au traitement par carboplatine. L'utilisation de reparixin, en présence des

MSC, semble entraîner une sensibilisation de ces CTO au traitement par carboplatine. Cet effet protecteur de la reparixin devra être confirmé par des expériences ultérieures. En effet, cette diminution de la charge tumorale après traitement par reparixin, observée lors de la mesure de la bioluminescence à travers le corps des souris, n'était pas significative.

#### *b) Etude in vivo de la dissémination tumorale dans la cavité abdominale*

Afin d'évaluer la dissémination tumorale intrapéritonéale de la tumeur, un lavage péritonéal, permettant de récupérer l'ascite et les cellules en suspension dans le péritoine, a été effectuée après euthanasie des souris. En outre, des organes dans lesquels une dissémination est généralement retrouvée chez les patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens, tels que le péritoine, la rate, le foie et le diaphragme, ont été prélevés. Ces organes ont été disséqués et, après ajout de luciférine, la bioluminescence, évaluant la quantité de CTO SKOV-3luc ayant disséminé dans ces organes, a été mesurée. La quantité de cellules tumorales en suspension présentes dans la cavité péritonéale, a de même été évaluée par analyse du liquide de lavage péritonéal.

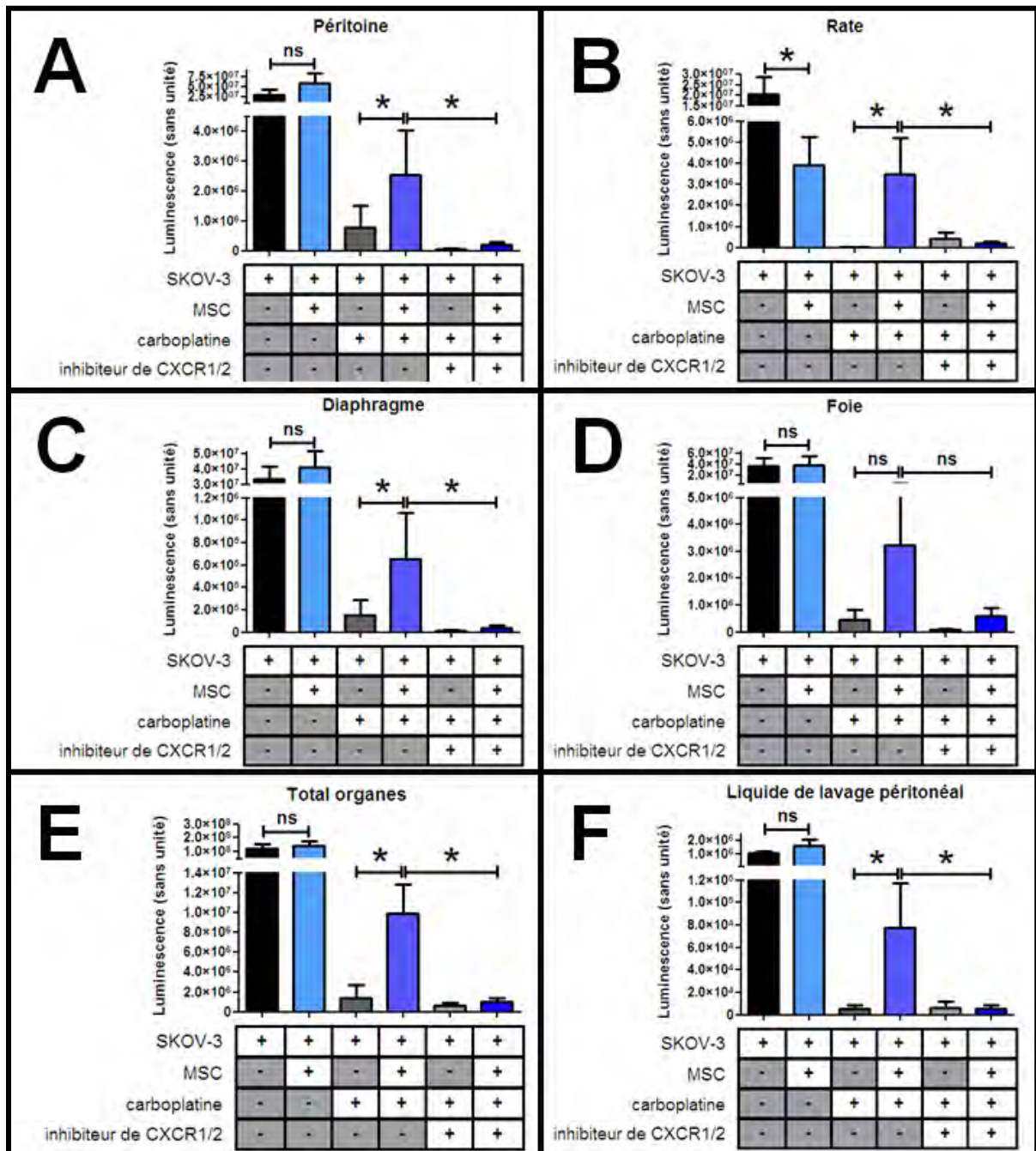
Dans les souris non traitées, comme nous l'avons observé avec les valeurs de luminescence obtenue sur le corps entier des souris, la co-injection de MSC ne modifie pas la quantité de CTO présentes dans les différents organes et dans le liquide de lavage péritonéal (Figure 34).

Lorsque les souris sont traitées par du carboplatine, en revanche, nous mettons en évidence une valeur de bioluminescence supérieure pour les organes des souris ayant été injectées par la combinaison CTO SKOV-3luc et MSC par rapport aux souris ayant reçu les CTO seules. Ceci est observé à la fois pour le péritoine, la rate et le diaphragme (Figure 34 A, B et C). L'effet des MSC dans le foie est moins franc. En effet, après traitement par carboplatine, même s'il semble y avoir une tendance à un nombre supérieur de CTO implantées en présence de MSC, celle-ci n'est pas significative (Figure 34D). Pour évaluer la dissémination globale au niveau des organes de la cavité péritonéale, nous avons additionné les valeurs de luminescence de ces 4 organes pour chacune des souris. Ainsi, nous avons montré que l'injection de MSC réduit l'efficacité du carboplatine sur la diminution du nombre de CTO SKOV-3 dans les organes de la cavité péritonéale (Figure 34E). De même, le nombre de cellules tumorales, évalué par bioluminescence, est moins important dans le liquide de lavage péritonéal des souris traitées au carboplatine ayant reçu des MSC avec des cellules SKOV-3 luc par rapport à celles n'ayant reçu que des cellules SKOV-3luc (Figure 34F).

**Figure 34 : Etude de la dissémination péritonéale par mesure de la bioluminescence dans des organes de la cavité abdominale**

A J0,  $10.10^6$  SKOV-3luc +/-  $1.10^6$  MSC (issues de têtes fémorales de donneuses ayant subi une chirurgie de la hanche et ne présentant pas de cancer au moment de cette chirurgie) sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) dans des souris nudes.

Après 7 jours, les traitements sont débutés, comprenant 1 injection de carboplatine (200 $\mu$ L/souris d'une solution à 4,5 mg/mL) tous les 7 jours pendant 3 semaines (soit 3 injections) et 1 injection de reparixin (30 mg/kg) 3 fois par semaine pendant 3 semaines (soit 9 injections). A J36, les souris sont euthanasiées et un lavage péritonéal est réalisé avec 5mL de NaCl (0,9%). Le péritoine, la rate, le foie et le diaphragme sont prélevés. Ces organes sont ensuite disséqués et disposés dans des plaques blanches 96 puits. Le liquide de lavage péritonéal (150 $\mu$ L) est également disposé dans des plaques blanches. Après ajout de luciférine (150  $\mu$ g/mL), la luminescence du péritoine (A), de la rate (B), du diaphragme (C), du foie (D) et du liquide de lavage péritonéal (F) est mesurée par EnVision™ Multilabel Plate Readers (PerkinElmer's). La somme des organes est également effectuée (E) pour évaluer la dissémination péritonéale de façon plus globale.



Le traitement par la reparixin (inhibiteur de CXCR1 et CXCR2), en absence des MSC, ne semble pas modifier la sensibilité des CTO SKOV-3 au carboplatine. En revanche, la résistance des CTO au traitement par carboplatine induite par la co-injection de MSC a pu être diminuée par le traitement avec la reparixin. En effet, dans les souris ayant eu une co-injection de MSC,

la bioluminescence observée au niveau des organes péritonéaux (Figure 34E), tels que le péritoine (Figure 34A), la rate (Figure 34B), le diaphragme (Figure 34C) mais également dans le liquide de lavage péritonéal (Figure 34F) était moins élevée dans les souris co-traitées par reparixin comparée à celle des souris exposées uniquement au carboplatine.

En conclusion, l'injection par voie i.p. des CTO SKOV-3luc conduit bien à une dissémination péritonéale. Cette dissémination péritonéale s'apparente à la carcinose péritonéale observée chez les patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien à un stade avancé, avec l'atteinte d'organes de la cavité péritonéale tels que le péritoine, la rate, le diaphragme et le foie, et d'un liquide péritonéal contenant des cellules tumorales. Nous avons pu montrer le rôle protecteur des MSC sur les CTO SKOV-3luc au traitement par carboplatine. En effet, la co-injection de MSC entraînait une persistance plus élevée de CTO au niveau du péritoine, de la rate et du diaphragme mais également libres dans la cavité péritonéale (liquide de lavage péritonéal) lors du traitement par carboplatine. L'ajout d'un traitement par inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 a permis de resensibiliser les CTO au traitement par carboplatine malgré l'injection de MSC.

## H) Interaction entre les CA-MSC et les macrophages

De nombreuses publications et le travail présenté ci-dessus montrent l'effet du microenvironnement sur les cellules tumorales<sup>55,56,233</sup>. Cependant, une interaction entre les cellules du microenvironnement elles-mêmes peut également influencer le devenir de la tumeur. Par exemple, les MSC semblent pouvoir agir sur les cellules immunitaires, le rôle immunosuppresseur des MSC ayant déjà été largement décrit<sup>98-100</sup>.

### 1) Effet des CA-MSC sur la polarisation des macrophages

Les CA-MSC isolées de tumeurs ovariennes et les CA-MSC « induites » par notre modèle sécrètent plus de chimiokines que les MSC physiologiques. Ainsi, cette production accrue de chimiokines pourrait entraîner un recrutement plus important de cellules immunitaires au niveau tumoral qui pourraient à leur tour influencer le développement de ces carcinomes. En effet, les cellules du système immunitaire peuvent agir fortement sur le développement tumoral en ayant un rôle soit anti-tumoral (lymphocytes T cytotoxiques, macrophages M1, *etc.*), soit pro-tumoral (lymphocytes T régulateurs, macrophages M2, *etc.*).

#### *a) Identification de facteurs surexprimés par les CA-MSC « induites » pouvant interagir avec les macrophages*

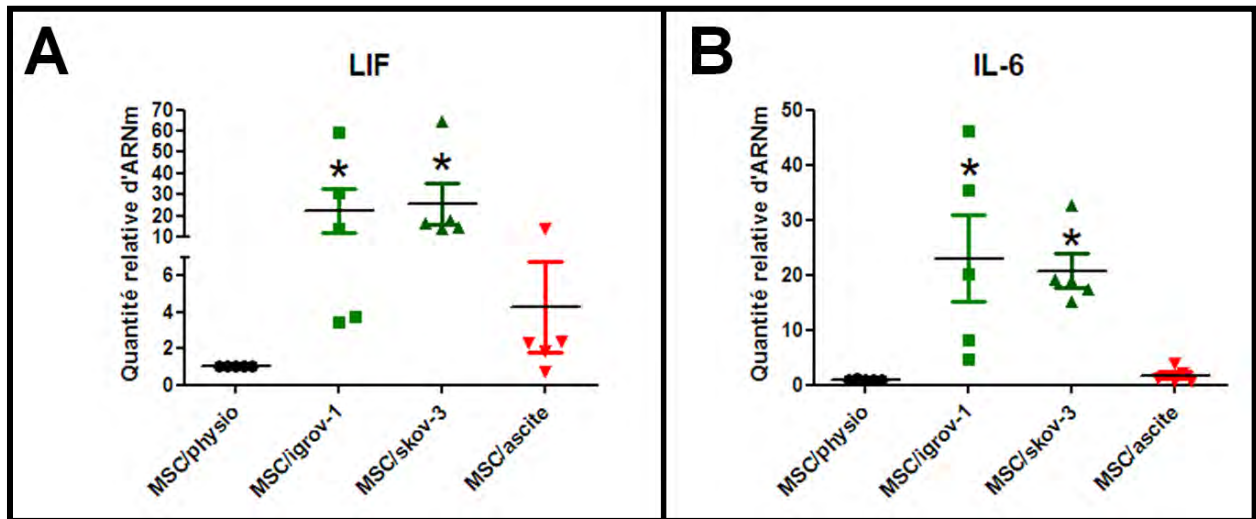
Du fait que les CA-MSC sécrétaient, entre autres, plus de chimiokines que les MSC physiologiques, une interaction entre les CA-MSC et des cellules immunitaire a été étudiée. Une attention particulière a été portée sur leur éventuelle interaction avec les macrophages car des travaux antérieurs de mon laboratoire de thèse avaient montré le rôle des Hospicells (cellules apparentées à des CA-MSC) dans le recrutement et la polarisation des macrophages<sup>66</sup>.

Une analyse des résultats de transcriptomique présentée précédemment (Figure 24A) a montré que les CA-MSC « induites » (par des CTO IGROV-1) avaient une augmentation de la transcription de l'IL-6 et de LIF (leukemia inhibitory factor). Ces deux facteurs ont été décrits comme étant capables de polariser les macrophages vers un phénotype M2d<sup>72</sup>. Ce phénotype M2d est le phénotype des macrophages associés aux tumeurs (TAM) qui sont retrouvés dans le cancer ovarien et qui sont de mauvais pronostic.

Nous avons donc voulu valider si les CA-MSC « induites » par notre modèle sécrétaient plus d'IL-6 et de LIF. Une analyse par RT-qPCR a montré que la transcription en ARNm de ces deux gènes était plus élevée dans les CA-MSC « induites » par les CTO (IGROV-1 et SKOV-3) mais pas par celles induites par l'ascite (Figure 35).

**Figure 35 : analyse de la transcription de l'IL-6 et de LIF dans les CA-MSC "induites"**

Après 21 jours de culture des BM-MSC dans du milieu contrôle (MSC/physio) ou en présence de MC de cellules IGROV-1 (MSC/igrov-1), de MC de cellules SKOV-3 (MSC/skov-3) ou d'ascites (MSC/ascite), les ARN totaux de ces cellules sont extraits puis leur ADNc est synthétisé par reverse transcription. La quantité relative d'ADNc, issus des ARN totaux des BM-MSC et CA-MSC « induites » est évaluée en réalisant une PCR quantitative (qPCR). La transcription relative de chacun des gènes évalués est calculée par rapport à la transcription de la GAPDH. Les gènes codant pour LIF (A) et IL-6 (B) sont analysés.



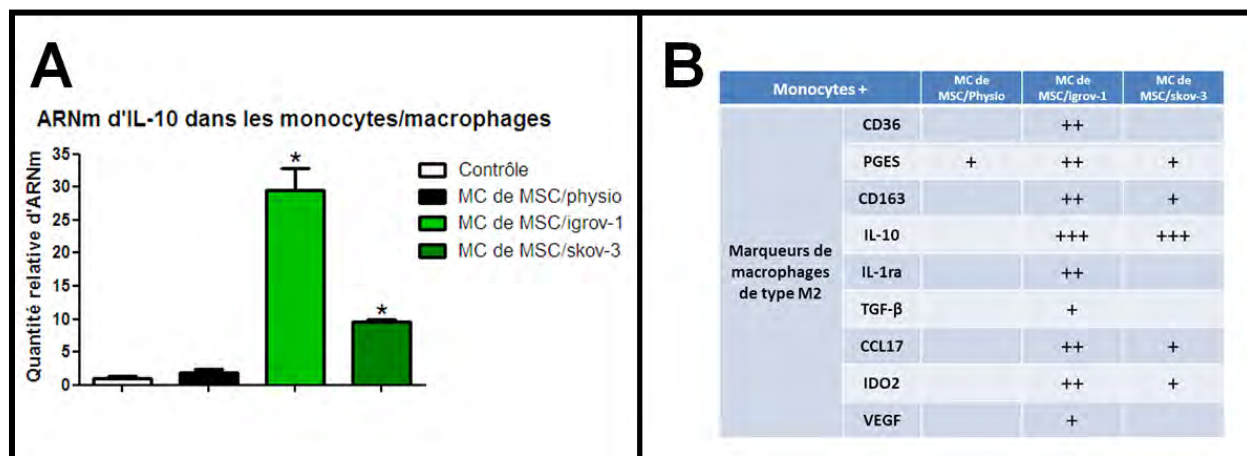
Ainsi, le modèle de CA-MSC « induites » par les CTO entraîne la transcription de facteurs, l'IL-6 et LIF, impliqués entre autres dans la polarisation M2d, correspondant au phénotype des macrophages retrouvés dans le cancer ovarien et associée à une activité pro-tumorale.

### *b) Effet des sécrétions des CA-MSC sur le phénotype des macrophages*

Nous avons donc identifié des facteurs sécrétés par les CA-MSC « induites » par les CTO qui pourraient potentiellement moduler le phénotype des macrophages. Afin de montrer que ces facteurs sécrétés modifient effectivement le phénotype des monocytes/macrophages, nous avons cultivé des monocytes humains primaires en présence de MC de BM-MSC ou de CA-MSC « induites ». Un des marqueurs principaux des macrophages de type M2 est le fait qu'ils produisent de l'IL-10. Nous avons observé qu'en présence de MC de CA-MSC « induites » (par les cellules IGROV-1 ou SKOV-3), la transcription de l'IL-10 par les monocytes est fortement augmentée (Figure 36A) comparée à des monocytes non stimulés (contrôle) et contrairement au MC de BM-MSC. Nous avons montré que de nombreux autres gènes codants pour des marqueurs de macrophages de type M2 (Tableau 5) étaient également plus transcrits dans les monocytes qui avaient été cultivés dans du MC de CA-MSC « induites » comparés à ceux cultivés avec du MC de BM-MSC (Figure 36B).

**Figure 36 : Effet des sécrétions des CA-MSC "induites" sur la transcription des gènes marqueurs d'une polarisation M2 dans des monocytes humains primaires**

1.10<sup>5</sup> PBMC sont ensemencés dans des puits de plaque 48 puits. Les monocytes sont sélectionnés par adhésion (2h) puis ils sont mis en présence de MC de BM-MSC ou de CA-MSC « induites ». 24 heures après, les monocytes sont placés dans du tampon de lyse. Les ARN totaux de ces monocytes sont extraits puis leur ADNc est synthétisé par reverse transcription. La quantité relative d'ADNc, issus des ARN totaux des BM-MSC et CA-MSC « induites » est évaluée en réalisant une PCR quantitative (qPCR). La transcription relative de chacun des gènes évalués est calculée par rapport à la transcription de la GAPDH. Les gènes codant pour l'IL-10 (A), le CD36, CD163, CCL17, IDO2, IL-1ra, PGES, TGF-β et VEGF (B) sont analysés. Les signes +, ++ et +++ correspondent respectivement à une augmentation de la transcription, par rapport à celle des monocytes non stimulés, d'un facteur supérieur à 2, 5 et 10.



Ainsi, les facteurs sécrétés par les CA-MSC « induites » sont capables de modifier le phénotype de monocytes humains primaires vers un phénotype de TAM de type M2.

*c) Effet des sécrétions des CA-MSC sur l'activité cytotoxique des macrophages vis-à-vis des cellules tumorales ovariennes*

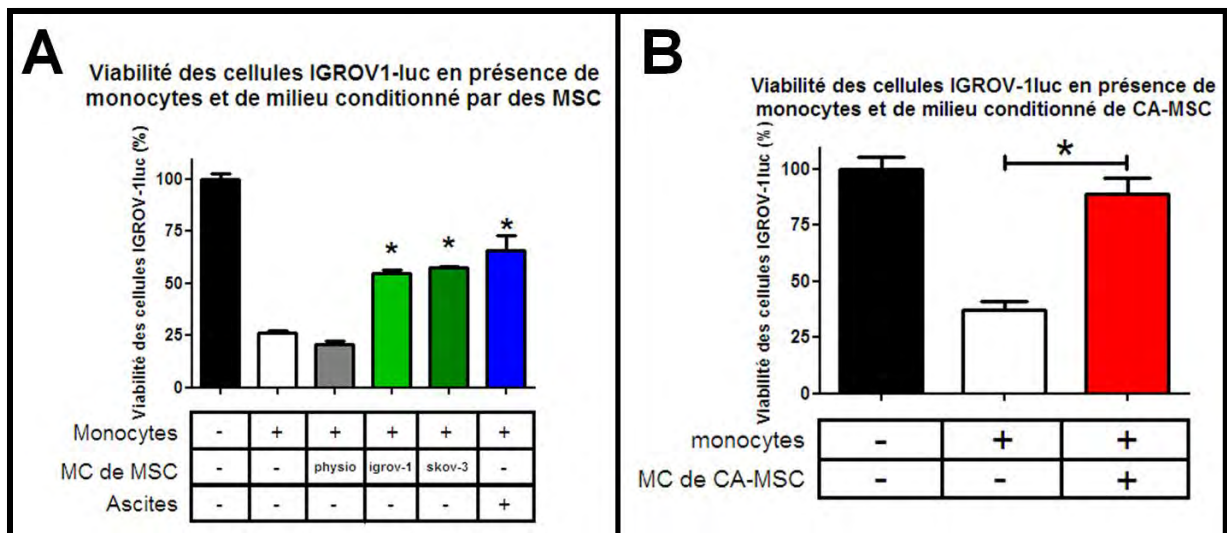
Après avoir étudié le rôle des facteurs sécrétés par les CA-MSC sur le phénotype des macrophages, nous avons étudié si ces facteurs pouvaient modifier les caractéristiques fonctionnelles des monocytes/macrophages. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de co-culture entre des CTO et des monocytes ayant été préalablement activés par du MC de CA-MSC, de CA-MSC « induites » ou de liquide d'ascite (contrôle positif de polarisation car Duluc *et al.* ont montré que l'ascite modifiait le phénotype des macrophages vers un phénotype M2d<sup>72</sup>, correspondant aux TAM ovariens). Les CTO utilisées sont des cellules IGROV-1 transduites pour exprimer la luciférase permettant d'évaluer à la fin de l'expérience uniquement la viabilité des CTO par luminescence.

Nous avons observé que la co-culture de CTO avec des monocytes induit une mort importante des CTO (Figure 37 A et B) mettant en évidence le rôle tumoricide des macrophages. Le MC de BM-MSC ne modifie pas l'activité tumoricide des monocytes. En effet, nous constatons une mort des cellules IGROV-1luc induite par ces monocytes, de façon comparable au milieu

contrôle. En revanche, la polarisation des monocytes par l'ajout de MC de CA-MSc « induites » ou de CA MSC isolées de tumeurs ovariennes entraîne une réduction de l'activité cytotoxique des monocytes vis-à-vis des CTO, de manière comparable à l'ajout de l'ascite (contrôle positif) (Figure 37A et B).

**Figure 37 : Effets des monocytes sur la viabilité des cellules tumorales ovariennes**

5.10<sup>5</sup> PBMC (correspondant à environ 5.10<sup>4</sup> monocytes) sont ensemencées dans des plaques 96 puits blanches. Après 2h d'adhésion, le milieu est remplacé par le MC (dilué au demi dans du milieu Macrophage-SFM) de MSC, CA-MSc, CA-MSc « induites » ou d'ascites. Le lendemain, 2,5.10<sup>4</sup> CTO IGROV-1luc sont ajoutées dans les puits. Après 3 jours de co-culture, la viabilité cellulaire des CTO IGROV-1luc est évaluée par la bioluminescence émise après ajout de luciférine.



Ainsi, les facteurs sécrétés par les CA-MSc et CA-MSc « induites » semblent entraîner un phénotype permissif chez les monocytes/macrophages en diminuant leur activité cytotoxique vis-à-vis des CTO. Cette modification fonctionnelle semble équivalente à celle observée avec de l'ascite de patientes atteintes de tumeurs ovariennes qui ont été décrites comme inductrices de phénotype M2d pour les macrophages.



## 2) Etude du rôle des MSC sur la polarisation des macrophages dans des modèles expérimentaux murins

Dans le but de confirmer les résultats obtenus *in vitro*, nous avons utilisé des modèles expérimentaux murins développant des carcinomes péritonéaux avec des CTO pour évaluer les capacités des MSC à modifier le phénotype des macrophages péritonéaux, considérés dans ce contexte comme des TAM. Dans les cancers, les TAM ne représentent pas une population homogène de macrophages (soit tous M1 soit tous M2), même si dans les cancers avancés les TAM sont majoritairement de type M2. Ainsi, le ratio M1/M2 des TAM influence la progression tumorale et la survie des patientes<sup>234,235</sup> conduisant à un meilleur pronostic des patientes atteintes de cancers ovariens lorsque ce ratio est élevé.

### a) Rôle des MSC dans la polarisation des macrophages : étude dans un modèle expérimental totalement murin

Dans un modèle expérimental totalement murin présenté précédemment (cf. II) E) 1)), nous avons évalué la polarisation des macrophages dans un contexte de tumeurs ovariennes. Les CTO murines ID8luc étaient injectées seules ou avec des MSC murines (RCB 2295) dans des souris immunocompétentes (C57BL/6) ayant le même fond génétique que ces 2 lignées cellulaires. A la fin de l'expérience, les macrophages récupérés dans le lavage péritonéal, correspondant à des TAM, sont mis en culture afin d'étudier leur phénotype au niveau transcriptionnel et fonctionnel.

#### (i) Analyse transcriptionnelle du phénotype des macrophages péritonéaux

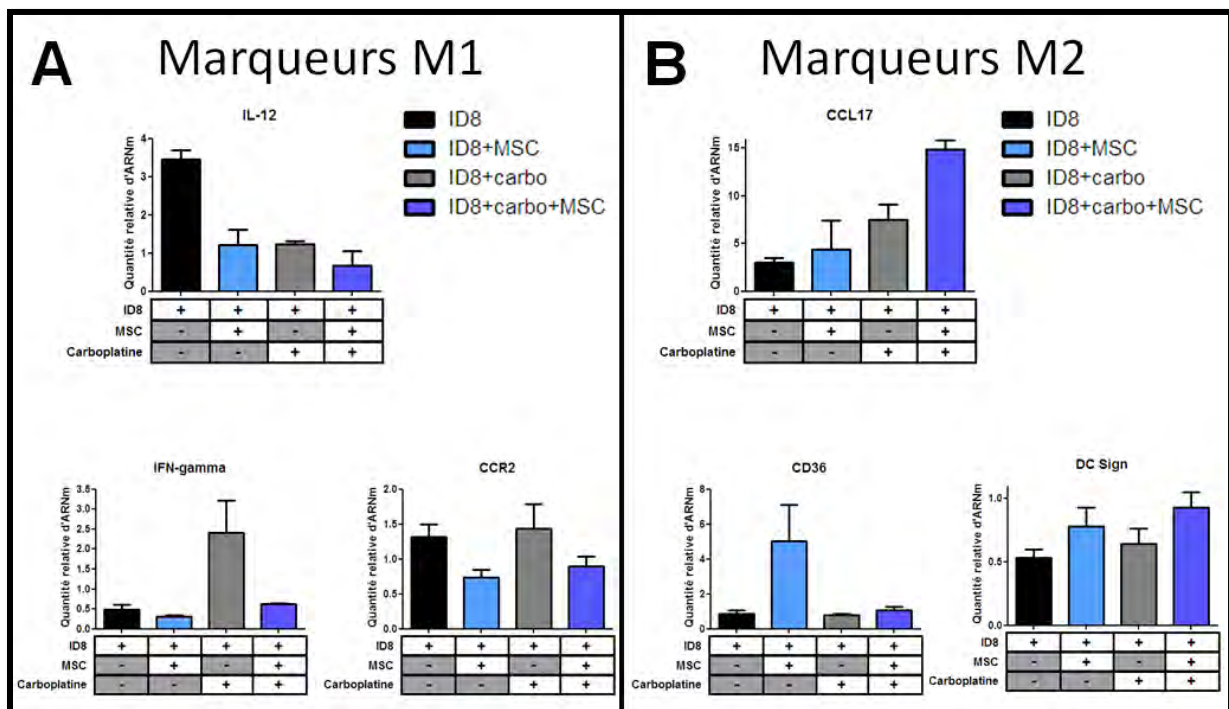
Le phénotype des macrophages péritonéaux est déterminé par RT-qPCR. Nous avons ainsi étudié la transcription de gènes codant pour des protéines qui sont des marqueurs d'une polarisation en macrophages M1 (IL-12, IFN- $\gamma$  et CCR2) ou M2 (CCL17, CD36 et DC Sign).

Dans les souris non traitées par carboplatine, la co-injection de MSC avec les CTO semble entraîner une diminution de la transcription de l'IL-12 et de CCR2 (Figure 38A) et une augmentation de la transcription de CD36 et DC Sign (Figure 38B) dans les macrophages péritonéaux par rapport à l'injection de cellules ID8luc seules.

Concernant les souris traitées par carboplatine, les macrophages péritonéaux présentent une diminution de la transcription de l'IFN- $\gamma$  et de CCR2 (Figure 38A) et une augmentation de la transcription de CCL17 et DC Sign (Figure 38B), lorsque les souris ont au préalable reçu une co-injection de MSC comparées à la transcription de ces gènes lors de l'injection de CTO seules.

**Figure 38 : Phénotypes des macrophages péritonéaux dans un modèle expérimental murin de cancer ovarien**

A J0,  $5.10^6$  cellules ID8luc +/-  $5.10^5$  MSC (RCB2295) sont injectées par voie i.p. dans des souris C57BL/6. Les souris sont traitées à partir de J13. Le traitement par carboplatine consiste à réaliser une injection de 200 $\mu$ L d'une solution de carboplatine à 4,5 mg/mL tous les 7 jours pendant 3 semaines. Après 34 jours, soit 7 jours après la dernière injection de carboplatine, les souris de souris sont euthanasiées et un lavage péritonéal est réalisé avec 5mL de NaCl permettant de récupérer les cellules en suspension dans le péritoine. Après lyse des globules rouges (tampon Ack), les cellules sont séparées par utilisation de percoll.  $1.10^5$  cellules de la fraction contenant les macrophages sont ensemencées dans des puits de plaque 48 puits. Les macrophages sont sélectionnés par adhésion (2h) puis ils sont placés dans du tampon de lyse du kit d'extraction d'ARN. Les ARN totaux de ces monocytes sont extraits puis leur ADNc est synthétisé par reverse transcription. La quantité relative d'ADNc, issus des ARN totaux des BM-MSc et CA-MSc « induites » est évaluée en réalisant une PCR quantitative (qPCR). La transcription relative de chacun des gènes évalués est calculée par rapport à la transcription de la GAPDH. Les gènes codant pour des marqueurs de macrophages de type M1 : l'IL-12, l'interféron- $\gamma$  (IFN-gamma) et CCR2 (A), ainsi que des marqueurs de polarisation M2 : le CCL17, CD36 et DC Sign (B) sont analysés.



Ces résultats semblent montrer que les macrophages péritonéaux, présenteraient une diminution de la transcription de marqueurs de la polarisation M1 et une augmentation des marqueurs M2 lors de la co-injection de MSC par rapport à l'injection de CTO seules. Ainsi, les MSC semblent entrainer une augmentation de la proportion de TAM polarisés en type M2. Le ratio M1/M2 des TAM serait alors diminué, lequel, lorsqu'il est diminué chez les patientes, est associé à un pronostic péjoratif.

A noter également que le traitement par carboplatine, dans les souris ayant reçu une injection de cellules tumorales ID8luc seule, semble également orienter vers un phénotype M2 avec une diminution de la transcription de l'IL-12 et une augmentation de CCL17. Ces données pourraient corroborer des données montrant la capacité des sels de platine à polariser les macrophages vers un phénotype M2<sup>236</sup>. Les MSC et le carboplatine pourraient ainsi avoir un

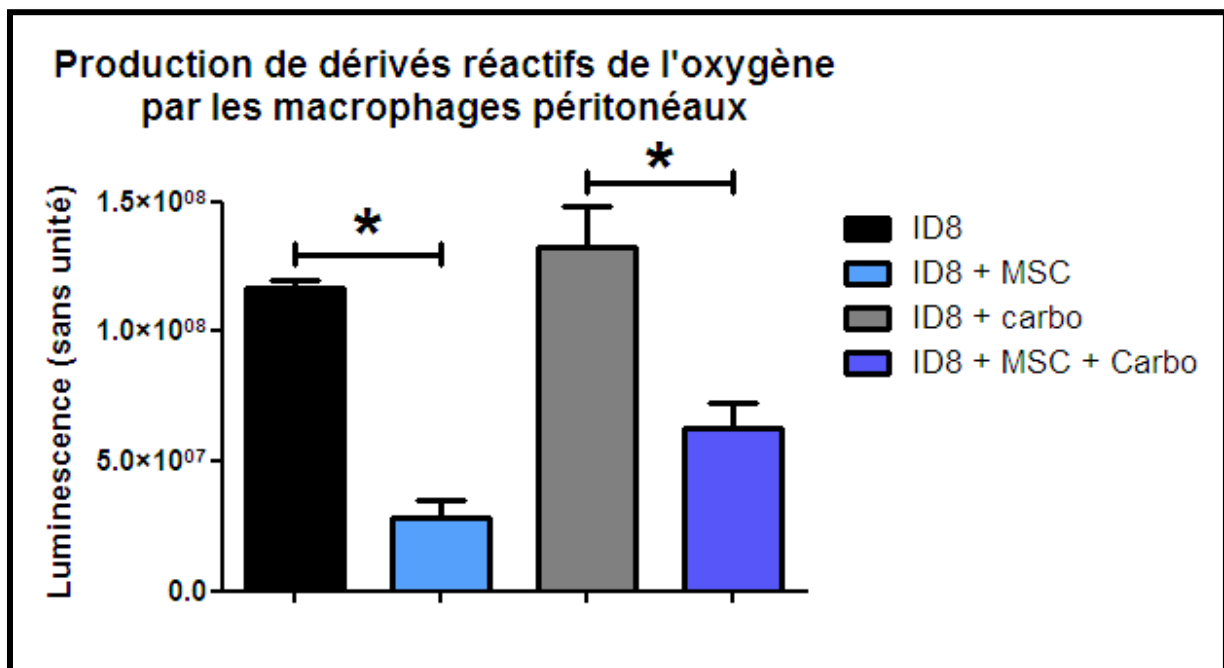
effet additif sur la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, conduisant à une diminution du ratio M1/M2 dans les TAM.

(ii) Analyse fonctionnelle des macrophages péritonéaux

Après avoir étudié le phénotype des macrophages induit par la présence conjointe des MSC et du carboplatine, nous avons voulu confirmer nos observations en évaluant un autre paramètre caractéristique de la polarisation des macrophages, la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Cette dernière est principalement retrouvée chez les macrophages de type M1 où elle entraîne une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. Ainsi, cette production de ROS est le reflet d'une polarisation M1 (forte production de ROS) ou M2 (faible production de ROS). La production de ROS par les macrophages péritonéaux a été mesurée par chimioluminescence en présence d'une sonde chimioluminogène, le luminol.

**Figure 39 : Production des dérivés réactifs de l'oxygène par les macrophages péritonéaux issus d'un modèle expérimental totalement murin de cancer ovarien**

A J0,  $5.10^6$  cellules ID8luc +/-  $5.10^5$  MSC (RCB2295) sont injectées par voie i.p. dans des souris C57BL/6. Les souris sont traitées à partir de J13. Le traitement par carboplatine consiste à réaliser une injection de  $200\mu\text{L}$  d'une solution de carboplatine à  $4,5\text{ mg/mL}$  tous les 7 jours pendant 3 semaines. Après 34 jours, soit 7 jours après la dernière injection de carboplatine, les souris de souris sont euthanasiées et un lavage péritonéal est réalisé avec  $5\text{mL}$  de NaCl permettant de récupérer les cellules en suspension dans le péritoine. Après lyse des globules rouges (tampon Ack), les cellules sont séparées par utilisation de percoll.  $1.10^5$  cellules de la fraction contenant les macrophages sont ensemencées dans des puits de plaque 48 puits. Les macrophages sont sélectionnés par adhésion (2h) puis la production de ROS a été mesurée par l'analyse de la production de chimioluminescence en présence de luminol ( $60\mu\text{M}$ ) grâce à un luminomètre (PerkinElmer's, EnVision™ Multilabel Plate Readers). Les valeurs de chimioluminescence ont été enregistrées continuellement pendant 90 minutes.



La co-injection de MSC, que ce soit dans les souris traitées ou non au carboplatine entraîne une réduction importante de la production de ROS par les macrophages péritonéaux par rapport aux macrophages issus des souris ayant reçu une injection de CTO ID8luc seule (Figure 39).

En conclusion, la présence de MSC au niveau du site tumoral entraîne chez les macrophages la perte de production de ROS, qui ont une activité antitumorale. Nous confirmons ainsi que la présence de MSC réduit donc l'activité antitumorale des macrophages et semble les polariser préférentiellement vers un phénotype M2.

### *b) Rôle des MSC dans la polarisation des macrophages : étude dans un modèle expérimental murin/humain*

Après analyse des macrophages péritonéaux dans un modèle de cancer ovarien totalement murin, nous avons poursuivi l'étude de leur polarisation dans le modèle expérimental murin/humain présenté précédemment (cf. II) E) 2)). Ce modèle, plus humanisé, utilise des CTO humaines (SKOV-3luc) et des MSC humaines (BM-MSc) injectées dans des souris nudes.

Bien qu'immunodéprimées, les souris nudes possèdent toujours des macrophages. En effet, ces souris présentent une aplasie du thymus induisant une absence de lymphocytes T mais elles conservent tout de même d'autres cellules immunitaires telles que des macrophages, des cellules NK ainsi que des cellules T-like. Selon leur âge, elles possèdent également des lymphocytes B qui sont en quantité normale chez la jeune souris mais qui régressent après l'âge de 7 semaines. Malgré que ce modèle reste imparfait pour étudier les cellules immunitaires, il permet de mettre en place un modèle murin/humain possédant des macrophages.

#### *(i) Analyse transcriptionnelle du phénotype des macrophages péritonéaux*

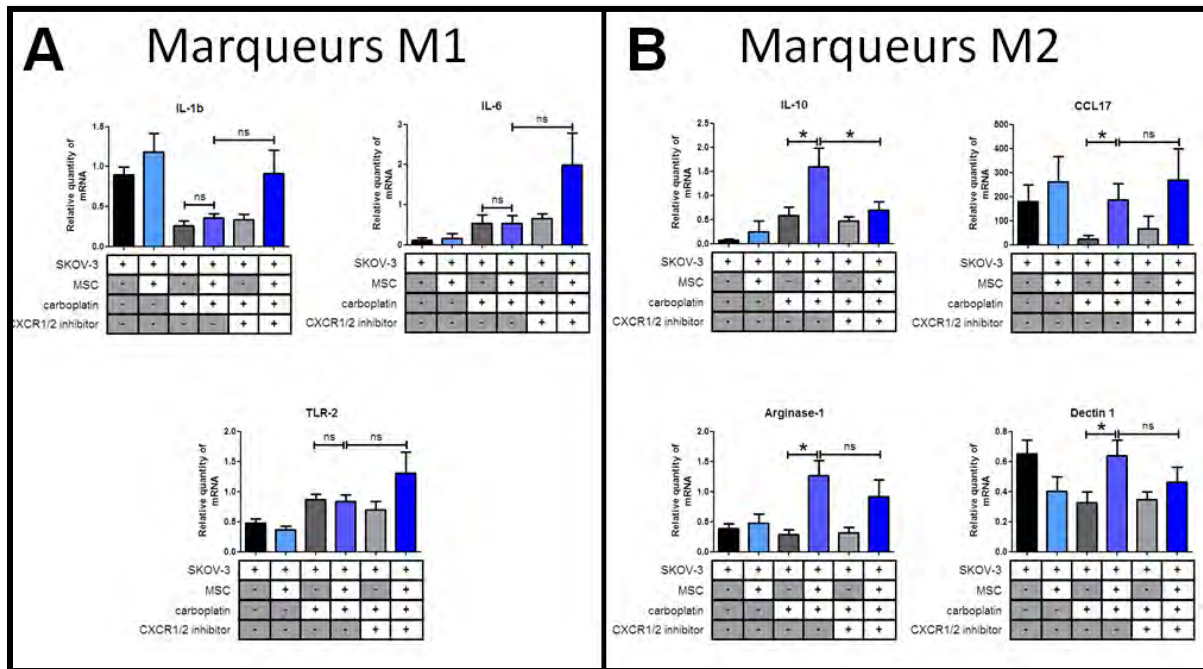
Comme pour le modèle totalement murin, les macrophages étudiés sont des macrophages péritonéaux issus des souris ayant reçu des CTO (SKOV-3luc) avec ou sans MSC humaines.

Les macrophages péritonéaux correspondent donc à des TAM, de par leur localisation au niveau du site de dissémination de la tumeur. Ainsi, nous avons étudié dans les TAM des marqueurs de type M1 (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TLR-2) et de type M2 (IL-10, CCL17, Arginase-1 et Dectine-1) car le ratio M1/M2 joue un rôle dans le pronostic des patientes.

#### **Figure 40 : Phénotypes des macrophages péritonéaux dans un modèle expérimental murin/humain de cancer ovarien**

A J0, 10.10<sup>6</sup> SKOV-3luc +/- 1.10<sup>6</sup> MSC (issues de têtes fémorales de donneuses ayant subi une chirurgie de la hanche et ne présentant pas de cancer au moment de cette chirurgie) sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) dans des souris nudes.

Après 7 jours, les traitements sont débutés, comprenant 1 injection de carboplatine (200µL/souris d'une solution à 4,5 mg/mL) tous les 7 jours pendant 3 semaines (soit 3 injections) et 1 injection de reparixin (30 mg/kg) 3 fois par semaine pendant 3 semaines (soit 9 injections). A J36, les souris sont euthanasiées et un lavage péritonéal est réalisé avec 5mL de NaCl (0,9%). Après lyse des globules rouges (tampon Ack), les cellules du liquide de lavage péritonéal sont séparées par utilisation de percoll. 1.10<sup>5</sup> cellules de la fraction contenant les macrophages sont ensemencées dans des puits de plaque 48 puits. Les macrophages sont sélectionnés par adhésion (2h) puis ils sont placés dans du tampon de lyse du kit d'extraction d'ARN. Les ARN totaux de ces monocytes sont extraits puis leur ADNc est synthétisé par reverse transcription. La quantité relative d'ADNc, issus des ARN totaux des BM-MSc et CA-MSc « induites » est évaluée en réalisant une PCR quantitative (qPCR). La transcription relative de chacun des gènes évalués est calculée par rapport à la transcription de la GAPDH. Les gènes codant pour des marqueurs de macrophages de type M1 : l'IL-1β, l'IL-6 et le TLR-2 (A), ainsi que des marqueurs de polarisation M2 : l'IL-10, le CCL17, l'arginase-1 et la dectine 1 (B) sont analysés.



Dans les souris non traitées, nous n'avons pas observé de modification de la transcription des gènes des marqueurs de type M1 ou M2 dans les macrophages péritonéaux issus de souris ayant reçu des CTO SKOV-3luc seules ou avec des MSC (Figure 40 A et B).

Dans les souris traitées au carboplatine, les marqueurs de type M1 des macrophages n'étaient pas modifiés au niveau de leur transcription. En revanche, la transcription des gènes codants pour l'IL-10, le CCL17, l'arginase-1 et la dectine-1, marqueurs de type M2, était augmentée dans les macrophages péritonéaux issus de souris traitées au carboplatine et ayant reçu une co-injection de MSC avec les cellules SKOV-3luc par rapport aux macrophages des souris ayant reçu uniquement des CTO (Figure 40 A et B).

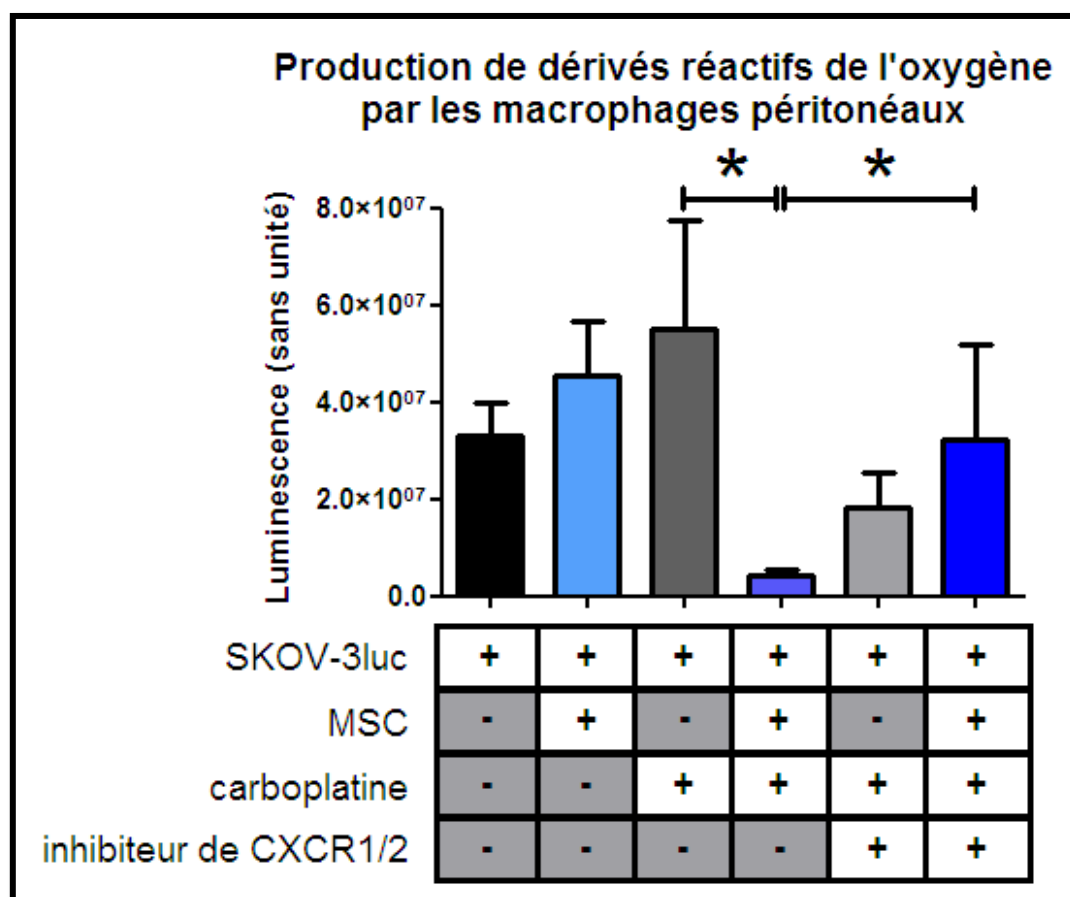
Dans ce modèle murin/humain, la présence de MSC humaines semble pouvoir modifier le phénotype des macrophages péritonéaux murin vers un phénotype M2 dans un contexte de cancer ovarien traité au carboplatine. En effet, nous ne pouvons observer l'induction de la polarisation M2 par les MSC qu'en présence de carboplatine.

(ii) Analyse fonctionnelle des macrophages péritonéaux

Comme pour les TAM étudiés dans le modèle expérimental totalement murin, les macrophages péritonéaux issus des souris du modèle murin/humain ont été analysés pour leur production de ROS afin de confirmer leur orientation M2 en présence de MSC.

**Figure 41 : Production des dérivés réactifs de l'oxygène par les macrophages péritonéaux issus d'un modèle expérimental murin/humain de cancer ovarien**

A J0,  $10.10^6$  SKOV-3luc +/-  $1.10^6$  MSC (issues de têtes fémorales de donneuses ayant subi une chirurgie de la hanche et ne présentant pas de cancer au moment de cette chirurgie) sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) dans des souris nudes. Après 7 jours, les traitements sont débutés, comprenant 1 injection de carboplatine ( $200\mu\text{L}/\text{souris}$  d'une solution à  $4,5\text{ mg/mL}$ ) tous les 7 jours pendant 3 semaines (soit 3 injections) et 1 injection de reparixin ( $30\text{ mg/kg}$ ) 3 fois par semaine pendant 3 semaines (soit 9 injections). A J36, les souris sont euthanasiées et un lavage péritonéal est réalisé avec  $5\text{ mL}$  de NaCl ( $0,9\%$ ). Après lyse des globules rouges (tampon Ack), les cellules du liquide de lavage péritonéal sont séparées par utilisation de percoll.  $1.10^5$  cellules de la fraction contenant les macrophages sont ensemencées dans des puits de plaque 48 puits. Les macrophages sont sélectionnés par adhésion (2h) puis la production de ROS a été mesurée par analyse de la production de chimioluminescence en présence de luminol ( $60\mu\text{M}$ ) grâce à un luminomètre (PerkinElmer's, EnVision™ Multilabel Plate Readers). Les valeurs de chimioluminescence ont été enregistrées continuellement pendant 90 minutes.



Dans ce modèle, et confirmant les résultats précédents, la co-injection de MSC avec les cellules SKOV-3luc entraîne, dans les souris également traitées au carboplatine, une réduction

importante de la production de ROS par les macrophages péritonéaux par rapport aux macrophages issus des souris ayant reçu une injection de CTO seules (Figure 41).

Ainsi, de manière semblable aux résultats obtenus par analyse transcriptionnelle, nous avons montré que, dans ce modèle, les MSC peuvent modifier les TAM vers un phénotype produisant moins de ROS, donc potentiellement moins anti-tumoral. En revanche, à la différence du modèle complètement murin, ceci n'a été observé qu'en présence de carboplatine.

### **3) Rôle des chimiokines se liant à CXCR1 et CXCR2 dans la polarisation des macrophages**

A l'heure actuelle, les molécules ciblant les macrophages, comme celles ciblant l'axe CSF1/CSF1R, entraînent une diminution du nombre de TAM<sup>237</sup> indépendamment du fait qu'ils aient un phénotype M1 ou M2. Ces TAM sont observés dans de nombreuses tumeurs dont le cancer ovarien. Une immunothérapie vraiment innovante visant les macrophages serait une molécule qui ciblerait l'infiltrat macrophagique mais, plutôt que d'éliminer les TAM, entraînerait une repolarisation des macrophages vers un phénotype anti-tumoral. Nous avons souhaité essayer de restaurer l'activité cytotoxique des monocytes vis-à-vis des cellules tumorales même et surtout en présence de facteurs sécrétés par les CA-MSc.

Nous savions grâce aux expériences décrites dans ce manuscrit que les CA-MSc étaient capables d'exprimer non seulement l'IL-6 et LIF, déjà connues dans la littérature pour influencer la polarisation des macrophages, mais également l'IL-8, CXCL1 et CXCL2. Les inhibitions décrites dans la littérature et au laboratoire (voir annexe 1) de l'IL-6 ne semblent pas avoir d'effet sur la chimiorésistance des CTO *in vivo*. Compte tenu que nous avons à disposition un modèle expérimental murin humanisé dans lequel un traitement par inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 avait été réalisé (afin d'évaluer son effet chimiosensibilisant), nous avons évalué l'effet de cette inhibition des récepteurs aux chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8 dans la polarisation des macrophages.

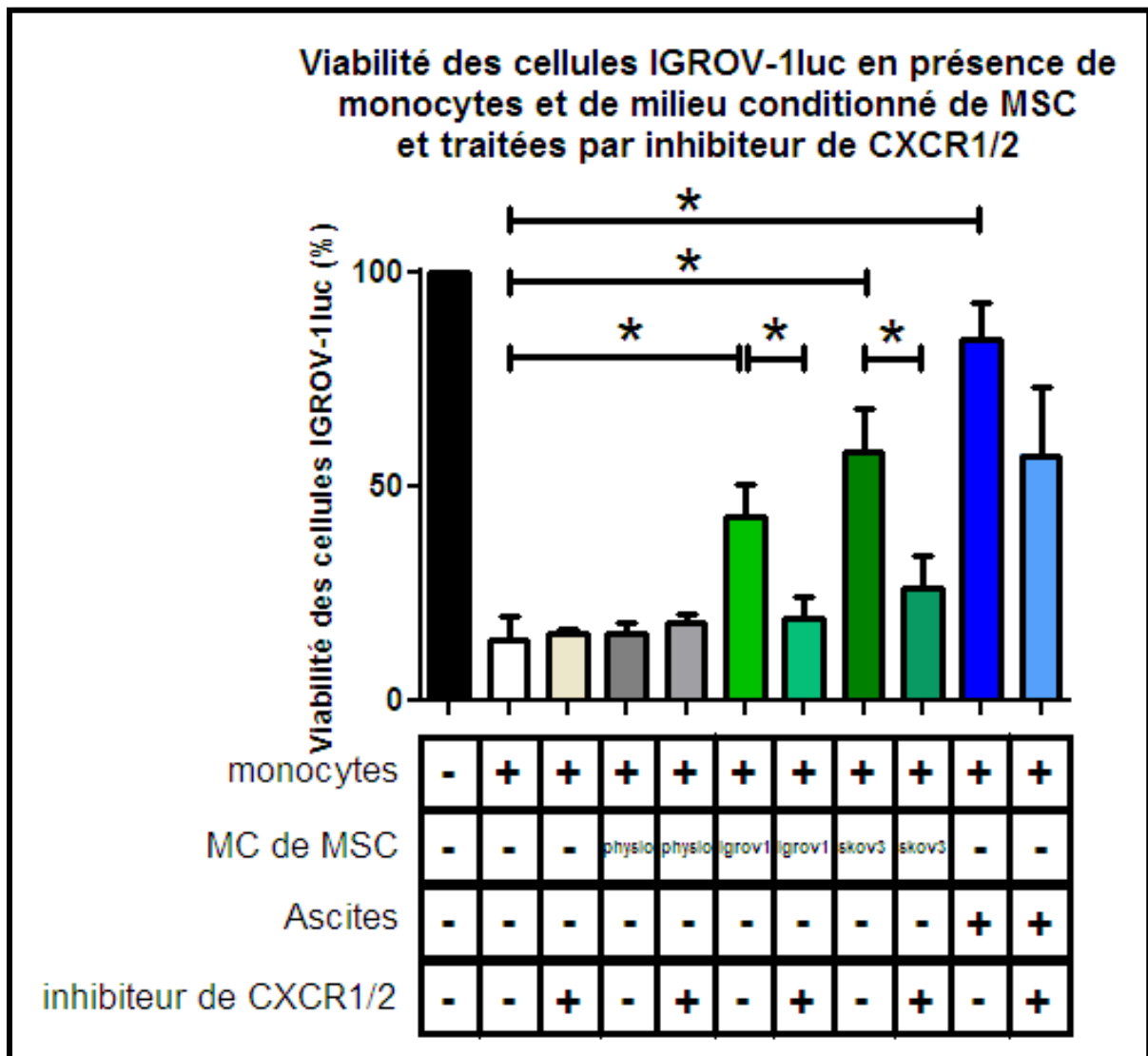
#### ***a) Effet in vitro de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sur l'activité cytotoxique des macrophages humains vis-à-vis des cellules tumorales ovariennes***

A terme, le but de nos expérimentations est de restaurer l'activité cytotoxique des monocytes vis-à-vis des cellules tumorales en présence de facteurs sécrétés par les CA-MSc. Nous avons montré que les chimiokines sont beaucoup plus sécrétées par les CA-MSc que par les BM-MSc, qui n'induisent ni modification phénotypique, ni modification fonctionnelle des monocytes. Ainsi, ces molécules sécrétées pourraient jouer un rôle dans la modification du rôle fonctionnel des macrophages. Nous avons donc réalisé une nouvelle co-culture, entre CTO

IGROV-1luc et monocytes, dans laquelle nous pouvions rajouter l'inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2.

**Figure 42 : Effet de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sur l'activité cytotoxique des monocytes en présence des sécrétions des CA-MSC**

A J0,  $5.10^5$  PBMC (correspondant à environ  $5.10^4$  monocytes) sont ensemencées dans des plaques 96 puits, blanches. Après 2h d'adhésion, le milieu est remplacé par le MC (dilué au demi dans du milieu Macrophage-SFM) de MSC, CA-MSC, CA-MSC « induites » ou d'ascites. A J1,  $2,5.10^4$  CTO IGROV-1luc sont ajoutées dans les puits. A J2, un inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 ( $100\mu\text{M}$ ) est ajouté dans la co-culture. A J4, la viabilité cellulaire des CTO IGROV-1luc est évaluée par la bioluminescence émise après ajout de luciférine.



Comme précédemment montré, nous constatons que la pré-culture des monocytes en présence de MC de CA-MSC « induites » entraîne une perte de leur capacité tumoricide. En effet, nous



observons une augmentation de la viabilité des CTO IGROV-1 co-cultivées avec ces monocytes. L'utilisation d'inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 dans ces co-cultures a permis de restaurer l'activité cytotoxique des monocytes vis-à-vis des CTO (Figure 42).

Nous montrons ainsi qu'en plus de l'effet direct chimiosensibilisant sur les CTO de l'inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2, celui-ci pourrait agir indirectement sur les cellules tumorales *via* la polarisation des monocytes/macrophage. L'utilisation de cet inhibiteur restaurerait l'activité anti-tumorale des monocytes/macrophages, observée *in vitro*.

### *b) Rôle des chimiokines se liant à CXCR1 et CXCR2 et de leur inhibition dans la polarisation des macrophages issus de modèles expérimentaux murins*

Les résultats précédents montrent que les MSC sont capables, dans un contexte de cancer ovarien de modifier le phénotype des monocytes/macrophages vers un phénotype proche des macrophages de type M2, qui sont décrits comme étant pro-tumoraux. Les macrophages semblent pouvoir retrouver leur activité cytotoxique vis-à-vis des CTO en présence d'inhibiteur de CXCR1 et CXCR2. Ainsi, nous avons vérifié que l'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 était bien capable de restaurer un phénotype M1 aux macrophages péritonéaux dans un contexte de cancer ovarien.

#### (i) Concentration en chimiokines dans le liquide de lavage péritonéal

Pour évaluer l'impact que pourrait avoir un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sur la polarisation des macrophages, nous avons dans un premier temps étudié la présence de chimiokines se liant à ces récepteurs à proximité des TAM, c'est-à-dire au niveau du péritoine.

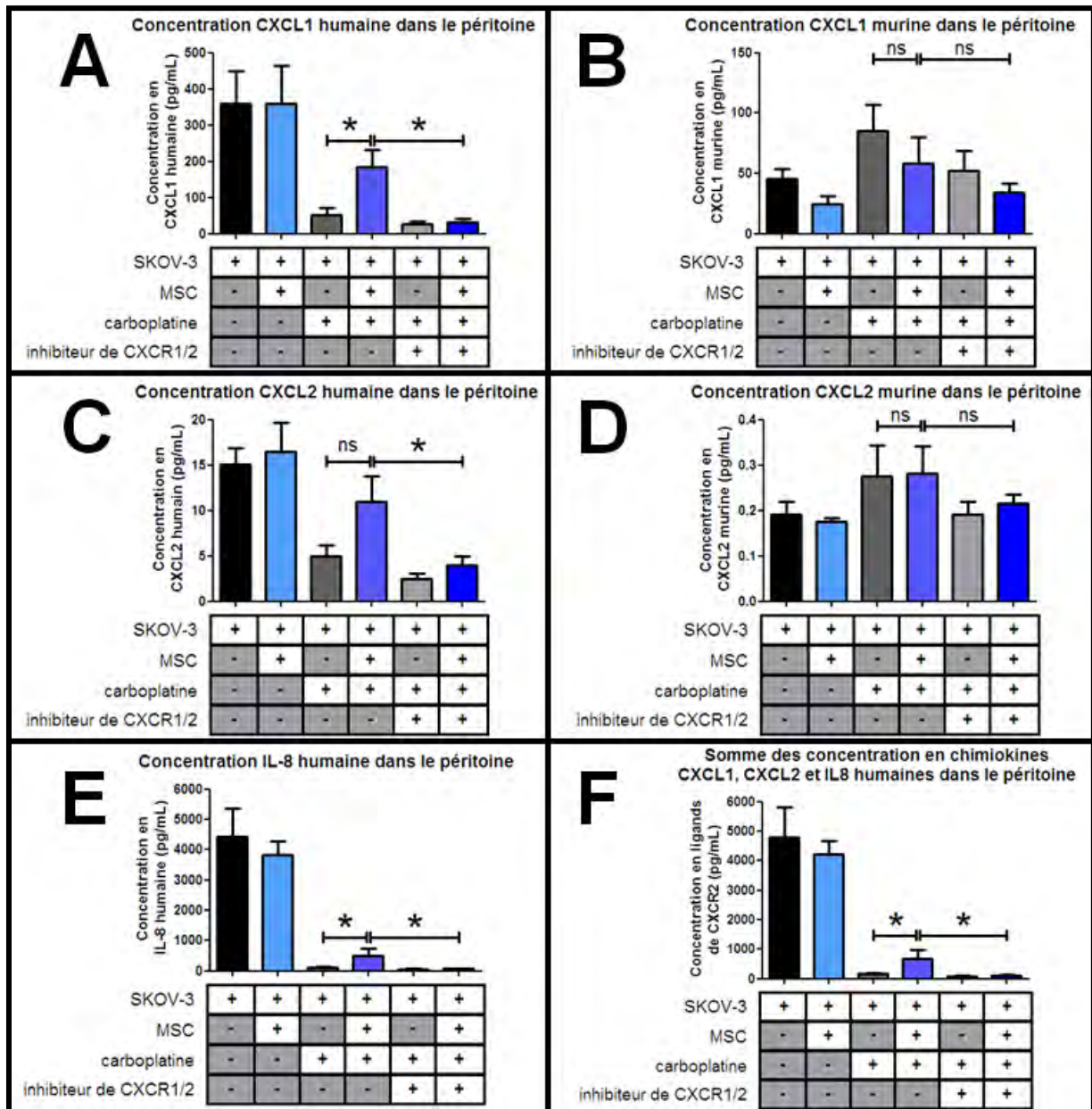
Dans le modèle expérimental complètement murin, nous avons montré que la concentration en CXCL1 était plus élevée dans le liquide de lavage péritonéal des souris ayant reçu une co-injection de MSC et de cellules ID8luc par rapport à l'injection de ces mêmes CTO seules (Figure 30). Cette augmentation de CXCL1 s'accompagnait d'une diminution de la transcription de marqueurs M1 (IL-12 et CCR2) (Figure 38A), d'une augmentation de la transcription de marqueurs M2 (CD36 et DC Sign) (Figure 38B) ainsi que de la diminution de la production de ROS dans les macrophages péritonéaux (Figure 39).

Dans le modèle expérimental murin humanisé, nous avons également déterminé la concentration en chimiokines CXCL1 (humaine et murine), CXCL2 (humaine et murine) et IL-8 (humaine) dans le liquide de lavage péritonéal (Figure 43).

#### **Figure 43 : Concentration en chimiokines dans le liquide de lavage péritonéal dans un modèle expérimental murin/humain**

A J0,  $10.10^6$  SKOV-3luc +/-  $1.10^6$  MSC (issues de têtes fémorales de donneuses ayant subi une chirurgie de la hanche et ne présentant pas de cancer au moment de cette chirurgie) sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) dans des souris nues.

Après 7 jours, les traitements sont débutés, comprenant 1 injection de carboplatine (200µL/souris d'une solution à 4,5 mg/mL) tous les 7 jours pendant 3 semaines (soit 3 injections) et 1 injection de reparixin (30 mg/kg) 3 fois par semaine pendant 3 semaines (soit 9 injections). A J36, les souris sont euthanasiées et un lavage péritonéal est réalisé avec 5mL de NaCl (0,9%). La concentration en chimiokine CXCL1 humaine (A) et murine (B), en CXCL2 humaine (C) et murine (D), et en IL-8 humaine (E) dans le liquide de lavage péritonéal est déterminée à l'aide des kits ELISA correspondant. La somme de ces trois chimiokines humaines a également été obtenue en ajoutant leurs trois concentrations (F).



En ce qui concerne les chimiokines sécrétées par les cellules murines : Les concentrations en CXCL2 murine étant inférieures au seuil de détection du kit ELISA, cette chimiokine n'a pas pu être étudiée dans ce modèle (Figure 43D). Les concentrations en CXCL1 murines ne sont pas significativement différentes entre les groupes (Figure 43B), malgré des polarisations

macrophagiques différentes dans ces groupes (Figure 43 A et B). Ceci suggère que les différences de polarisation des macrophages mises en évidence pourraient plutôt être induites par les chimiokines produites par les cellules humaines (MSC ou CTO SKOV-3luc).

S'agissant des chimiokines sécrétées par les cellules humaines, CXCL1 (Figure 43A), CXCL2 (Figure 43C) et IL-8 (Figure 43D) : Les concentrations dans le liquide de lavage péritonéal sont équivalentes pour les souris non traitées, qu'elles aient reçu ou pas des MSC même en analysant la somme des concentrations de ces chimiokines (Figure 43E). Pour rappel, dans ces souris nous n'avions pas observé de différences significatives en termes de transcription de gènes codant pour des marqueurs M1 et M2, ou pour la production de ROS. Ainsi, des concentrations quasi identiques en chimiokines à proximité des TAM semblent être associées à des phénotypes de macrophages très proches.

Pour les souris traitées au carboplatine, en revanche, la concentration mesurée dans le liquide de lavage péritonéal en chimiokines humaines, CXCL1 (Figure 43A) et IL-8 (Figure 43D) est significativement plus élevée (l'augmentation de CXCL2 n'était pas significative (Figure 43C)) dans les souris co-injectées par les cellules SKOV-3luc et les MSC par rapport à l'injection de CTO seules. Cette augmentation de la concentration intrapéritonéale en CXCL1 et en IL-8 peut donc être corrélée à l'augmentation de la transcription de marqueurs M2 (IL-10, CCL17, arginase-1 et dectine-1) (Figure 41B) et une diminution de la production de ROS par des macrophages péritonéaux (Figure 42).

En conclusion, dans un contexte de cancer ovarien, il semble qu'une augmentation de la concentration des chimiokines CXCL1 et IL-8 à proximité des TAM, due à la présence de MSC, soit associée, chez ces macrophages, à une polarisation M2.

## (ii) Effet *in vivo* de l'inhibition de CXCR1 et CXCR2 sur la polarisation des macrophages

Les résultats précédents obtenus dans des modèles expérimentaux murins montrent une association entre la concentration en chimiokines CXCL1 et IL-8 et une polarisation M2 des TAM. De plus, les résultats obtenus *in vitro* ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs de ces chimiokines, CXCR1 et CXCR2, restaurait l'activité cytotoxique des monocytes/macrophages vis-à-vis des CTO. L'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2, en plus de son rôle permettant de sensibiliser les CTO au traitement par carboplatine, semblait donc une stratégie intéressante et innovante afin de repolariser les macrophages vers un phénotype anti-tumoral. Nous avons étudié si un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 pouvait agir comme une immunothérapie capable de restaurer une activité cytotoxique des TAM envers les CTO, *in vivo*.

Nous avons évalué l'activité de la reparixin (inhibiteur de CXCR1 et CXCR2) sur la polarisation des macrophages dans le modèle expérimental murin humanisé présenté précédemment (cf. II E) 2)).

#### ❖ *Effet de la reparixin sur le phénotype des macrophages péritonéaux*

Afin d'évaluer le phénotype des macrophages péritonéaux dans le modèle expérimental murin humanisé, nous avons analysé au niveau transcriptionnel les marqueurs d'une polarisation M1 (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TLR-2) ou M2 (IL-10, CCL17, Arginase-1 et Dectine-1).

Dans les souris n'ayant pas reçu de MSC, l'ajout de la reparixin au traitement par carboplatine n'a pas entraîné de modification de la transcription des gènes codants pour l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TLR-2, l'IL-10, le CCL17, l'arginase-1 et la dectine-1 (Figure 40 A et B).

Dans les souris ayant reçu une injection de MSC et traitées par carboplatine seul ou associé à la reparixin, en revanche, la comparaison entre les TAM, montre une différence au niveau de leur polarisation. En effet, dans les macrophages péritonéaux des souris ayant reçu une co-injection de MSC et traitées par carboplatine, le traitement par reparixin entraînait une diminution de la transcription de l'IL-10 (marqueur des macrophages de type M2) par rapport aux macrophages des souris traitées uniquement par carboplatine (Figure 40B). Néanmoins, les autres marqueurs de type M2 n'étaient pas transcrits de façon significativement différente en présence ou en absence de reparixin dans les souris ayant reçu une co-injection de MSC et de cellules SKOV-3luc et traitées par carboplatine (Figure 40B).

Pour les marqueurs des macrophages de type M1, dans les macrophages péritonéaux des souris ayant reçu une co-injection de MSC et traitées par carboplatine, le traitement par reparixin induisait une tendance à l'augmentation de la transcription de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et du TLR-2 (Figure 40A), cependant, celle-ci n'était pas significative.

Ces résultats, en particulier la diminution de la transcription de l'IL-10, pourraient signifier que la reparixin influencerait la polarisation des macrophages et inhiberait leur différenciation en phénotype M2.

#### ❖ *Effet de la reparixin sur la production de ROS par les TAM*

Après avoir étudié le rôle de la reparixin au niveau de la transcription de gènes orientant vers une polarisation M1 ou M2 des macrophages, nous avons évalué la production de ROS par les macrophages péritonéaux dans ce modèle expérimental murin humanisé.

Dans des souris traitées par carboplatine ayant reçu uniquement des CTO SKOV-3luc, de même que pour la transcription, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative au

niveau de la production de ROS par les macrophages péritonéaux due au traitement par reparixin.

Dans les souris traitées au carboplatine ayant reçu une co-injection de MSC et de cellules SKOV-3luc, nous avons montré que le traitement par reparixin entraînait une augmentation de la production de ROS par les macrophages péritonéaux. Ainsi, en présence de carboplatine, les TAM pourraient acquérir une activité anti-tumorale *via* une sécrétion de ROS plus importante lorsqu'ils sont co-traités avec un inhibiteur de CXCR1 et CXCR2.

❖ *Effet de la reparixin sur la concentration intrapéritonéale en chimiokines*

Enfin, nous avons étudié si le co-traitement par reparixin modifiait également la concentration intrapéritonéale en chimiokines dans le modèle expérimental murin/humain. Nous avons mesuré la concentration en chimiokines CXCL1 (humaine et murine), CXCL2 (humaine et murine) et IL-8 (humaine) dans le liquide de lavage péritonéal des souris nues.

Dans les souris traitées par carboplatine ayant reçu uniquement des cellules SKOV-3luc, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative au niveau des concentrations intrapéritonéales en chimiokines.

En revanche, dans les souris ayant reçu une co-injection de MSC et de CTO, le co-traitement par reparixin entraînait une diminution de la concentration intrapéritonéale en chimiokines CXCL1 (Figure 43A), CXCL2 (Figure 43C) et IL-8 (Figure 43E) humaines, par rapport au traitement par carboplatine seul. De même, dans les souris ayant eu une co-injection de MSC et de CTO, la somme des concentrations de ces 3 chimiokines humaines était également diminuée dans le liquide de lavage péritonéal des souris co-traitées par reparixin par rapport au traitement par carboplatine seul (Figure 43F).

Les concentrations en CXCL2 murine étant inférieures au seuil de détection du kit ELISA, l'effet de la reparixin sur la concentration de cette chimiokine n'a pas pu être évalué dans ce modèle (Figure 43D). Les concentrations en CXCL1 murine n'étaient pas significativement différentes entre les groupes (Figure 43B) suggérant une action prépondérante de la reparixin sur les cellules humaines.

En conclusion, la reparixin entraîne une diminution de la concentration intrapéritonéale en chimiokines dans les souris traitées au carboplatine ayant reçu une co-injection de CTO et de MSC par rapport à un traitement au carboplatine seul. Cette diminution en chimiokines dans ce même groupe de souris est associée à une diminution de la transcription de l'IL-10 et une production plus importante de ROS dans les macrophages péritonéaux. La reparixin pourrait donc entraîner une diminution de la concentration en chimiokines au niveau du site tumoral qui serait accompagnée d'un phénotype de TAM potentiellement plus anti-tumoral.

### III) DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le cancer ovarien, dont 85 à 90% sont des adénocarcinomes, est la première cause de décès par cancers gynécologiques. A ce jour, le traitement de référence consiste en une exérèse la plus complète possible de la (ou de tous les nodules en cas de maladie disséminée) tumeur associée à une chimiothérapie à base de sel de platine et de taxanes. La survie globale des patientes à 5 ans est faible (proche de 40%) en raison d'un fort taux de récurrence<sup>5,6</sup> et de l'acquisition d'une résistance aux traitements par les cellules tumorales résiduelles. En plus des mutations intrinsèques des CTO, les interactions entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement semblent être impliquées dans la progression de la maladie et l'acquisition de cette résistance.

Le microenvironnement tumoral est complexe et dynamique. Sa composante englobe les cellules avoisinantes à la tumeur : cellules endothéliales, fibroblastes, adipocytes, cellules du système immunitaire ainsi que des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) qui nous intéressent plus particulièrement. Toutes les cellules stromales ainsi que les cellules tumorales peuvent sécréter des facteurs qui sont retrouvés dans le microenvironnement. Dans le cancer ovarien, la formation d'un liquide d'ascite est fréquemment retrouvée. Ce dernier contient des cellules tumorales, des cellules stromales et les facteurs sécrétés par ces différentes cellules.

#### A) L'impact de l'ascite dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes

La formation d'ascite est due principalement à une inflammation péritonéale associée au développement tumoral conduisant à une surproduction de liquide<sup>221,222</sup>. L'ascite maligne, retrouvée fréquemment dans les carcinomes de stade avancé, est associée à un mauvais pronostic<sup>221</sup>. L'ascite maligne d'origine ovarienne a été largement étudiée confirmant sa composition en CTO et cellules stromales sécrétant de nombreux facteurs dont certains sont décrits comme pro-tumoraux et chimioprotecteurs à l'instar de l'IL-6<sup>222</sup>.

Les expériences évaluant la chimiorésistance des CTO en présence d'ascite ont montré que les facteurs qu'elle contient peuvent entraîner une augmentation de la résistance des CTO au traitement par carboplatine. Dans le laboratoire, nous avons largement décrit les rôles de l'IL-8, CXCL1 et CXCL2. Des résultats complémentaires ont également montré que cette résistance des CTO pourrait être influencée également par la présence d'IL-6 aussi présente dans le liquide d'ascite et éventuellement sécrétée par les MSC (publication en cours de soumission cf. annexe 1). Toutefois, l'étude du rôle général du liquide d'ascite dans l'acquisition de la chimiorésistance reste difficile car les volumes peuvent être extrêmement différents d'une patiente à l'autre allant de quelques millilitres à plusieurs litres (parfois supérieur à 10 litres). Dès lors, des concentrations identiques en facteurs mais avec des volumes extrêmement variés pourraient avoir un rôle différent.

Nous avons donc choisi l'étude de deux types cellulaires particuliers représentés dans l'ascite car ils sont connus pour être capables de sécréter des facteurs de croissance et des chimiokines impliqués dans l'activation de voies de signalisation pouvant aboutir à l'acquisition de la chimiorésistance par les CTO..

## **B) Isolement des cellules stromales dans le cancer ovarien**

Etant donné le nombre de cellules différentes, présentes dans le liquide d'ascite, candidates à être impliquées dans l'acquisition de la chimiorésistance par les facteurs qu'elles sécrètent, nous avons choisi de nous focaliser sur deux types cellulaires. Ainsi, nous avons décidé d'étudier celles physiquement associées aux tumeurs ovariennes, soit directement au niveau de la tumeur primaire, soit au niveau de sphéroïdes retrouvées dans le liquide d'ascite<sup>125</sup>. Nous avons donc isolé des cellules stromales qui étaient étroitement associées aux tumeurs à partir de prélèvements réalisés par l'équipe chirurgicale de l'IUCT-Oncopôle lors d'exérèse tumorale ou de cœlioscopie exploratrice. A cet égard, la stratégie utilisée a consisté à mettre en culture des biopsies tumorales ovariennes. Les cellules adhérentes suivant la mise en culture ont ensuite été étudiées et phénotypées. Cette technique a permis d'isoler des cellules stromales présentes au niveau de tumeurs ovariennes. Cependant, elle ne permet de sélectionner que des cellules adhérentes. Ainsi, d'autres cellules stromales qui pourraient avoir un impact sur la progression tumorale ou la chimiorésistance, comme de nombreuses cellules immunitaires (exemple : des lymphocytes), mais qui restent en suspension, ne seront pas sélectionnées. Néanmoins, cette approche nous a permis de travailler sur une population relativement homogène, correspondant à des cellules stromales mésenchymateuses que nous avons qualifiées de CA-MSC et qui pourraient jouer un rôle dans la progression tumorale et la chimiorésistance.

## **C) Le phénotype des CA-MSC du cancer ovarien**

Avant d'évaluer le rôle des cellules isolées de tumeurs ovariennes, nous avons vérifié que ces cellules, ayant une morphologie fibroblastique évoquant des MSC, pouvaient bien être considérées comme des CA-MSC.

Les CA-MSC, retrouvées associées aux tumeurs ovariennes, expriment les marqueurs caractéristiques des MSC tels que le CD73, le CD90 et le CD105. En revanche, ces CA-MSC semblent perdre le caractère « souche » des MSC. En effet, les expériences de différenciation montrent que les CA-MSC ne sont plus capables de se différencier en adipocytes ou en ostéoblastes, contrairement aux BM-MSC. Cette perte de la différenciation des CA-MSC semble due aux sécrétions des CTO car la culture de BM-MSC en présence des sécrétions de CTO a entraîné une perte de la différenciation adipocytaire et ostéoblastique de ces MSC contrairement à leur culture dans du milieu contrôle. Ainsi, nous ne pouvons pas affirmer que

nos cellules d'intérêt sont, au sens strict, des cellules souches mésenchymateuses dont une des caractéristiques principales est la multipotence. L'hypothèse est que ces CA-MSc dérivent de MSc qui se seraient différenciées au contact de la tumeur, acquérant alors un phénotype particulier.

Le modèle de CA-MSc « induites », que nous avons établi à partir de BM-MSc, confirme cette hypothèse. En effet, il permet, à partir de BM-MSc, d'obtenir des cellules ayant un phénotype proche de celui des CA-MSc isolées de tumeurs de patientes. En effet, les CA-MSc induites par du milieu conditionné par des CTO et les CA-MSc de patientes sont similaires sur l'expression des marqueurs clés des MSc (CD73, CD90 et CD105) et sur la perte de leur capacité à se différencier en adipocytes et en ostéoblastes. Les deux populations sont équivalentes également sur leur capacité à interagir avec les CTO et les macrophages, ainsi qu'au niveau de la sécrétion de CXCL1, de CXCL2 et d'IL-8.

En revanche, nous n'avons pas réussi à obtenir des CA-MSc comparables à celles présentes chez les patientes en mettant en culture des BM-MSc en présence de liquide d'ascite, qu'il provienne d'une seule patiente ou de plusieurs (pool). Ceci souligne une fois de plus que l'utilisation d'ascites reste difficile d'interprétation en fonction de l'hétérogénéité possible (volume, avant traitement, après traitement, stade différent, *etc.*).

Si on s'intéresse à la qualification des CA-MSc des patientes, il apparaîtrait qu'elles proviennent de cellules souches multipotentes. Cette théorie est soutenue par le modèle de CA-MSc « induites », obtenues à partir de BM-MSc, qui adoptent un phénotype proche des CA-MSc retrouvées dans des adénocarcinomes ovariens. Toutefois, nous ne pouvons affirmer que les CA-MSc de patientes proviendraient de cellules de moelle ayant migré. En effet, chaque organe, dont les ovaires, présentent un pool de MSc résidentes spécifiques d'organe<sup>84-87</sup>. Il est donc probable que les CA-MSc impliquées dans l'oncogenèse ovarienne dérivent de MSc « résidentes » présentes au niveau des localisations tumorales. Une autre origine possible serait le tissu adipeux, qui est une source de MSc nommées ADSC. L'épiploon (ou omentum) correspond à une double couche de tissu adipeux qui recouvre et soutient les organes dans la partie inférieure de l'abdomen. Ainsi, notamment lors de carcinose péritonéale, les ADSC de l'épiploon pourraient constituer une source de CA-MSc compte tenu de leur localisation, à proximité des CTO disséminées dans le péritoine. De manière comparable au modèle de CA-MSc « induites » obtenues à partir de BM-MSc, nous avons tenté de différencier des ADSC en CA-MSc en présence de MC par les CTO. Cette expérience, qui devra toutefois être répétée afin de valider les résultats, n'a pas permis d'obtenir d'induction de chimiorésistance des CTO avec ces cellules, contrairement au CA-MSc « induites » dérivant de BM-MSc. Ce résultat oriente ainsi vers une origine probable des CA-MSc à partir de MSc spécifiques d'organe ou ayant migré de la moelle osseuse.

Afin d'apporter la preuve d'une éventuelle origine de la moelle osseuse des CA-MSc, ou au contraire pour écarter cette hypothèse, le recrutement et l'implication des BM-MSc pourraient être étudiés à l'aide de modèles expérimentaux murins en réalisant un transfert de moelle. En effet, le transfert de moelle issues de souris exprimant la GFP pourrait être réalisé dans des



souris mises en aplasie afin d'étudier le recrutement de MSC exprimant la GFP au niveau de la tumeur puis d'étudier leur implication dans la chimiorésistance.

Le phénotype exact des CA-MSc est encore à définir plus précisément. En effet, il semble que ces cellules aient perdu leur potentiel de différenciation en adipocytes et en ostéoblastes. Ces CA-MSc pourraient avoir perdu leur multipotence en s'engageant dans une différenciation. Cependant, l'expression d' $\alpha$ -SMA est diminuée lorsque des MSC sont mises en contact avec des sécrétions de CTO, ce qui n'oriente pas vers une différenciation en CAF, bien que cette hypothèse ne puisse pas être totalement écartée. Ainsi, ils seraient intéressant de mieux décrire le phénotype de ces CA-MSc et d'identifier vers quelle voie de différenciation elles s'engagent. Ceci pourrait, par exemple, permettre de déterminer une stratégie pour les cibler et les éliminer spécifiquement.

## D) Le rôle des MSC dans les cancers

Au début de ces travaux de thèse, nous savions que les MSC semblaient exercer un rôle pro-tumoral important en stimulant la croissance tumorale, en favorisant l'angiogenèse et en augmentant la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies<sup>121</sup>. De plus, Castells *et al.* ont mis en évidence que les facteurs sécrétés par les Hospicells (cellules, isolées d'ascites de patientes atteintes de cancer ovarien, ayant des caractéristiques de CA-MSc) sont capables d'induire une résistance au carboplatine des CTO en diminuant l'activation de caspases effectrices, bloquant ainsi les mécanismes d'apoptose<sup>127</sup>. L'ensemble de ces résultats suggérait que les MSC du stroma ovarien pouvaient induire une chimiorésistance par la libération de facteurs dans le voisinage des tumeurs.

De plus, en faisant une revue de la littérature (cf. revue ci-jointe : annexe 2), les MSC semblaient avoir un effet pro-tumoral dans plusieurs autres types de cancer et pourraient jouer un rôle chimioprotecteur par divers mécanismes nécessitant un contact direct avec les cellules tumorales ou *via* leurs sécrétions. Le contact direct des MSC avec les cellules tumorales peut induire une résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies par une modification de l'expression de canaux à la surface des cellules tumorales, par un échange membranaire de protéines MDR, par un arrêt du cycle cellulaire rendant les cellules quiescentes et insensibles aux agents cytotoxiques, par une activation de voies de signalisation telles que NF- $\kappa$ B et (Wnt)/ $\beta$ -caténine, ou encore par une modification de la transcription des cellules tumorales. De même, les MSC sont capables d'entraîner une augmentation de la chimiorésistance des cellules tumorales par la sécrétion de diverses molécules comme l'IL-6, le SDF-1, le GDF-15, des acides gras, des acides aminés, ou des exosomes contenant une multitude de molécules. Ces sécrétions peuvent conduire à l'activation de voies de signalisation comme la voie PI3K/Akt ou la voie JAK/STAT aboutissant notamment à une surexpression de protéines anti-apoptotiques responsables de la résistance à de nombreux médicaments cytotoxiques.

L'isolement de CA-MSC dans des tumeurs ovariennes nous a donc incités à évaluer leur rôle dans la chimiorésistance des tumeurs étant donné leur rôle dans de nombreux autres types de cancers.

### E) Le rôle des CA-MSC dans la chimiorésistance des cancers ovariens

De manière comparable à l'effet des MSC observé dans de nombreux cancers, les CA-MSC issues de patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien sont également capables d'induire une résistance au carboplatine des CTO *in vitro*. Nous avons montré que ces CA-MSC pourraient dériver de MSC physiologiques qui, au contact d'un environnement tumoral, acquièrent une modification de leur phénotype conduisant notamment à la sécrétion de facteurs chimioprotecteurs. En effet, ce phénomène a pu être observé grâce à la mise en place d'un modèle *in vitro* utilisant des BM-MSC issues de sujets naïfs de cancer. Ainsi, nous avons pu montrer que ces BM-MSC, lorsqu'elles sont cultivées en présence d'un environnement tumoral ovarien, sont capables de sécréter des molécules induisant une chimiorésistance des CTO, contrairement au BM-MSC cultivées dans du milieu contrôle. Nous ne savions pas à l'initiation de ce travail quelle(s) était (étaient) la (ou les) molécule(s) sécrétée(s) par les CTO pouvant être impliquée(s) dans cette activation.

Le rôle pro-tumoral des MSC observé *in vitro* a pu être confirmé *in vivo* dans deux modèles expérimentaux murins. Dans ces modèles murins, les MSC utilisées sont des BM-MSC. L'hypothèse est que ces cellules vont pouvoir acquérir un phénotype de CA-MSC au contact des cellules tumorales, de façon comparable au modèle de CA-MSC « induites » réalisé *in vitro*.

Le premier modèle totalement murin utilisant des CTO et des MSC murines a montré, après traitement par carboplatine, une charge tumorale plus importante dans les souris ayant reçu une co-injection de CTO et de MSC par rapport aux souris ayant eu une injection de CTO seules. Un mécanisme de résistance peut-être évoqué, bien que cette augmentation puisse être simplement induite par une augmentation de la prolifération tumorale. Cette prolifération est d'ailleurs indéniable au vu des résultats obtenus avec les souris non traitées. En revanche, dans un second modèle murin plus humanisé, avec des CTO et des MSC humaines, un effet chimioprotecteur des MSC sur les cellules tumorales a pu clairement être démontré.

Ainsi, même si les deux modèles semblent montrer une chimiorésistance induite par les MSC, des différences sont observées entre ces deux modèles. Ces différences pourraient être dues aux particularités entre les espèces. En effet, les CTO murines ID8 pourraient sécréter des facteurs différents des CTO humaines SKOV-3 conduisant à des CA-MSC présentant un phénotype hétérogène. De même, ces CA-MSC générées au contact des CTO *in vivo* pourraient produire des molécules différentes selon qu'elles soient d'origine murine ou humaine, et pourraient activer des voies de signalisation distinctes dans les CTO. Une autre explication pourrait concerner l'immunosuppression observée dans les souris nudes utilisées pour le modèle murin

humanisé. Le rôle immunosuppresseur des MSC<sup>100</sup>, agissant sur les lymphocytes T et B, pourrait dans un modèle immunocompétent, comme le modèle totalement murin utilisé, conduire à un effet pro-tumoral dans les conditions non traitées. En revanche, dans le modèle des souris nues dont l'immunosuppression est déjà présente, l'activité immunosuppressive des MSC, vis-à-vis des cellules T et B, ne serait pas observée. Ces hypothèses pourraient donc expliquer les différences observées entre le modèle totalement murin immunocompétent (utilisant les cellules ID8 et des MSC murines) et le modèle murin humanisé dans des souris immunodéprimées (CTO humaines SKOV-3 et BM-MSK humaines).

Pour évaluer l'impact que pourraient avoir les CA-MSK chez les patientes, notamment au niveau de la chimiorésistance, la quantification de la proportion de CA-MSK dans les tumeurs serait intéressante à déterminer. Une alternative serait de réaliser cette quantification dans les ascites, avec toutefois les réserves mentionnées plus haut. La proportion de CA-MSK pourrait s'avérer être faible au regard d'autres cellules comme les CTO. Cependant, un faible nombre semble suffisant pour entraîner un effet chimioprotecteur important. En effet, dans nos expériences *in vivo*, la proportion de 1 MSK pour 10 CTO suffit pour induire une chimiorésistance. En outre, des résultats du laboratoire (non publiés) ont montré, à l'aide de MSK marquées par un fluorochrome, que même un faible nombre de MSK (1/100) co-localisées au niveau de la tumeur suffisait pour induire une résistance importante.

La chimiorésistance induite par les CA-MSK implique, au moins en partie, des facteurs sécrétés. En effet, les expériences, évaluant la chimiorésistance des CTO, réalisées *in vitro* utilisaient les sécrétions des CA-MSK. La détermination de ces facteurs a donc été initiée dans le but de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer le traitement des cancers ovariens.

## **F) L'identification du rôle des chimiokines dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes**

Les résultats obtenus montrent que dans le cancer ovarien, comme dans de nombreux types de cancers, les MSK jouent un rôle pro-tumoral et notamment chimioprotecteur. De nombreux mécanismes peuvent être impliqués dans la chimiorésistance induite par les MSK. Dans notre modèle de cancer ovarien, il semble que les MSK acquièrent leur capacité chimioprotectrice parce qu'elles ont été « activées » en présence d'un environnement tumoral. En effet, seules les CA-MSK ou les CA-MSK « induites » (par culture dans un milieu simulant un environnement tumoral ovarien) sont capables de protéger les CTO du traitement par carboplatine contrairement aux BM-MSK d'origine, maintenues dans du milieu contrôle. Ces CA-MSK et CA-MSK « induites » sont capables d'induire cette chimiorésistance *in vitro* via leur milieu conditionné. Ainsi, cette chimiorésistance implique des facteurs sécrétés par ces cellules. Dans la bibliographie, de nombreux facteurs sécrétés par les MSK ont pu être identifiés comme étant potentiellement chimioprotecteurs tels que le SDF-1, l'IL-6, des acides gras polyinsaturés, des acides aminés, *etc.*

Pour identifier les facteurs sécrétés par les MSC et responsables de la chimiorésistance, l'analyse des CA-MSC « induites » générées par notre modèle semble être adéquate. En effet, la mise en place de ce modèle rend possible la comparaison de différentes MSC issues d'un même donneur, permettant ainsi de s'affranchir de la variabilité interindividuelle.

Nous avons pu observer qu'en présence des sécrétions de CTO, la voie NF- $\kappa$ B est activée très rapidement dans les MSC. Cette voie est responsable d'une augmentation de la transcription de nombreuses protéines telles que les chimiokines<sup>230,231</sup>. L'activation de cette voie pourrait donc être responsable de l'augmentation de la transcription de chimiokines dans les MSC. Toutefois, il serait intéressant de regarder si cette activation de la NF- $\kappa$ B perdure durant les 21 jours de culture des MSC dans un environnement tumoral. En effet, si cette activation de la voie NF- $\kappa$ B est impliquée dans l'augmentation de la transcription des chimiokines, elle devrait se prolonger durant 21 jours minimum, moment où les analyses transcriptomiques ont été réalisées. Ces 21 jours avaient été choisis par rapport au « cycle de culture » classique des MSC. Ainsi, une étude sur des temps plus courts serait intéressante afin de déterminer le temps nécessaire aux MSC, lorsqu'elles sont dans un environnement tumoral ovarien, pour acquérir un phénotype de CA-MSC.

Une analyse transcriptomique comparant des BM-MSC saines avec des CA-MSC « induites » issues du même donneur a permis d'identifier des candidats potentiellement impliqués dans cette chimiorésistance. L'identification d'une surexpression de nombreuses chimiokines, notamment celles se liant aux récepteurs CXCR1 et CXCR2 a orienté la recherche vers les molécules CXCL1, CXCL2 et l'IL-8. De plus, le rôle protecteur de l'IL-8 sur des CTO vis-à-vis des sels de platine et du paclitaxel<sup>229</sup> suggérait un rôle potentiel de ces chimiokines dans la chimiorésistance. Toutefois, d'autres facteurs différenciellement transcrits, et qui n'ont pas été explorés ici, pourraient également être impliqués dans la chimiorésistance et constituer des cibles thérapeutiques intéressantes.

En plus de l'augmentation de leur transcription, une augmentation de la sécrétion des chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8 par les CA-MSC a pu être mise en évidence en comparaison à des BM-MSC.

Le dosage de CXCL1, CXCL2 et IL-8 dans le sérum de patientes au moment du diagnostic a soutenu également le rôle potentiel de ces chimiokines dans la résistance des cancers ovariens à la chimiothérapie à base de carboplatine et de paclitaxel. En particulier, il semble que la somme des concentrations de ces 3 chimiokines soit un marqueur statistiquement associé à la réponse à la chimiothérapie. Une analyse rétrospective de plus grande ampleur et incluant différents centres impliqués dans le traitement de carcinomes ovariens serait nécessaire pour valider ces chimiokines en tant que marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements à bases de platine. Une analyse prospective pourrait s'avérer informative. Cependant, compte tenu du temps nécessaire à la réalisation de tous les cycles de chimiothérapie puis de la période minimale de 6 mois (ou plus si on veut étudier une relation entre la concentration en chimiokines et le nombre de mois avant la récurrence) nécessaire afin de déterminer la sensibilité des tumeurs au traitement, ainsi que l'échelonnement du recueil des échantillons, les contraintes

semblent constituer un frein important pour la validation de l'intérêt de ce dosage en tant que valeur pronostique de réponse aux traitements.

Pour compléter les résultats obtenus avec les concentrations sériques en CXCL1, CXCL2 et IL-8, il serait intéressant de doser également les autres ligands des récepteurs CXCR1 et CXCR2, que sont CXCL3, CXCL5, CXCL6 et CXCL7. Cette concentration totale en ligands pourrait probablement améliorer la prédiction de la réponse à la chimiothérapie. L'établissement d'une valeur seuil pourrait permettre de définir une concentration totale en ligands à partir de laquelle une thérapie « classique » ne serait pas recommandée. En effet, si le risque de survenue d'une résistance au traitement était trop élevé, la stratégie thérapeutique pourrait être adaptée, avec, pourquoi pas, l'association d'un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 au traitement de référence.

Le rôle individuel de chaque chimiokine serait intéressant à déterminer. Nous avons ainsi entrepris d'étudier séparément, *via* l'utilisation de protéines recombinantes, le rôle de chaque chimiokine. Nous avons ainsi testé l'effet du CXCL1 et de l'IL-8 sur la chimiorésistance des CTO au traitement par carboplatine (données non montrées), mais l'augmentation de la résistance observée a été faible avec les concentrations utilisées (50ng/mL). En ce qui concerne l'IL-8, il semblerait que l'IL-8 recombinante serait sous forme monomérique mais également, et en quantité non négligeable, sous forme octomérique. Cette dernière forme rend sa détection difficile et on peut lui supposer un effet antagoniste à la forme monomérique. Cela peut expliquer le manque d'activité de l'IL-8 recombinante sur l'acquisition de la chimiorésistance par les CTO. Ces expériences devront être complétées avec différentes concentrations en chimiokines et en combinant plusieurs chimiokines, afin de savoir si ces protéines sont capables d'induire seules une chimiorésistance ou si leur activité nécessite également l'intervention d'autres partenaires. Une autre stratégie a été mise en place consistant à faire surexprimer ces chimiokines dans des BM-MSC, par introduction d'ADNc codant pour ces chimiokines. La génération de MSC surexprimant chacune de ces chimiokines est en cours et devrait permettre d'évaluer individuellement le rôle de ces chimiokines. De même, le ciblage uniquement d'une chimiokine, l'IL-8, par un anticorps monoclonal n'était pas suffisant pour permettre d'empêcher la chimiorésistance induite par les CA-MSC et pourrait s'expliquer par l'action des autres chimiokines sur les récepteurs communs avec l'IL-8.

Les résultats obtenus avec un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 sont encourageants. En effet, son utilisation *in vitro* entraîne une diminution de l'IC50 du carboplatine sur les CTO, traduisant une sensibilisation des cellules tumorales au traitement par carboplatine, malgré la présence des sécrétions des CA-MSC. De façon intéressante, l'IC50 du carboplatine est également diminuée dans les cellules IGROV-1 cultivées dans du milieu contrôle lors du traitement par un inhibiteur de CXCR1 et CXCR2. Cette sensibilisation des CTO au traitement par carboplatine induite par l'inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 pourrait être due à l'inhibition des effets autocrines des chimiokines. Effectivement, la production autocrine d'IL-8 a été décrite comme pouvant entraîner une résistance des CTO aux traitements par carboplatine et paclitaxel<sup>229</sup>.

L'administration de reparixin, inhibiteur de CXCR1 et CXCR2, utilisé en association avec le carboplatine, a également entraîné une réduction significative de la charge tumorale dans le péritoine, la rate et le diaphragme des souris porteuses de tumeurs ovariennes ayant reçu une injection de MSC en comparaison au traitement par carboplatine seul. Cette diminution n'était pas significative lors de l'étude de la bioluminescence à travers le corps entier de la souris. Néanmoins, la sensibilité de cette dernière expérience, et notamment la luminescence, peut être perturbée par les différentes couches cellulaires présentes (épaisseur, densité, *etc.*), la présence de liquide (ascite, vaisseaux sanguins, *etc.*), la localisation tumorale (profondeur, derrière un organe, *etc.*) ou encore le diamètre, la densité de la tumeur, *etc.* Tous ces paramètres pourraient influencer les valeurs des intensités de bioluminescence captées et ainsi expliquer des résultats différents en termes de significativité entre les expériences sur le corps entier des souris et lors de la dissection des organes (qui permet de s'affranchir de beaucoup de situations pouvant altérer le recueil de la bioluminescence).

Donc, on peut affirmer que l'utilisation d'un inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 a permis de sensibiliser les CTO au traitement par carboplatine que ce soit dans des expériences *in vitro* ou dans un modèle expérimental murin humanisé. Ainsi, un traitement inhibant la fixation des chimiokines sur leurs récepteurs semble être une stratégie intéressante pour augmenter l'activité cytotoxique du carboplatine sur les cellules tumorales. Puisque la sensibilité de la tumeur au sel de platine est un facteur déterminant dans la survie des patientes, l'identification de ces nouvelles cibles thérapeutiques, permettant de potentialiser l'action du carboplatine, pourrait améliorer la survie globale des patientes atteintes de cancer ovarien, dont la mortalité reste considérable.

Cependant, la chimiorésistance des CTO SKOV-3, plus résistantes au carboplatine que les cellules IGROV-1, évaluée *in vitro* avec les CA-MSC « induites », est assez faible voire absente. Néanmoins, la co-injection de MSC avec les cellules SKOV-3 conduit à une augmentation de leur résistance *in vivo*, observée dans un modèle expérimental murin. Cette différence de résultats, dans un contexte de tumeur ovarienne, est observée dans des expériences *in vitro*, avec un seul type cellulaire, et *in vivo*, permettant d'intégrer la globalité des effets potentiels des MSC sur toutes les cellules d'un organisme vivant. Ces effets divergents évoquent une action indirecte des MSC sur la chimiorésistance en impliquant un autre type cellulaire. De plus, l'augmentation de la production par les CA-MSC de chimiokines, connues pour interagir avec les cellules immunitaires, suggère également une interaction entre les CA-MSC et les cellules immunitaires.

## **G) Les CA-MSC peuvent polariser les macrophages en phénotype pro-tumoral**

En plus de leur rôle dans la chimiorésistance que nous avons démontré, les chimiokines sont également décrites comme des molécules impliquées dans le chimiotactisme des cellules immunitaires. Ainsi, l'augmentation de la sécrétion des chimiokines par les CA-MSC peut conduire à une interaction avec des cellules immunitaires et notamment pourrait influencer leur recrutement au niveau du site tumoral. De plus, les résultats de l'analyse transcriptomique ont également montré une augmentation de la transcription de l'IL-6 et de LIF dans les CA-MSC « induites » qui sont des facteurs capables de polariser les macrophages vers un phénotype M2d qui est le phénotype des macrophages retrouvés dans les cancers ovariens<sup>72</sup>, suggérant une interaction avec les CA-MSC et les macrophages.

En outre, des résultats du laboratoire ont montré que des cellules assimilées à des CA-MSC (Hospicells), issues d'une patiente atteinte d'un cancer ovarien, étaient capables de recruter des macrophages au niveau du site tumoral et que ces macrophages avaient un phénotype de TAM ayant une polarisation M2<sup>66</sup>. Dans le cancer ovarien, une infiltration de macrophages de type M2 est de mauvais pronostic.

Ainsi, nous avons débuté une étude visant à caractériser les interactions entre les MSC avec d'autres cellules du microenvironnement, et plus spécifiquement les macrophages, afin de déterminer leurs rôles dans la chimiorésistance.

Nous avons montré que les sécrétions des CA-MSC « induites » entraînaient une augmentation de la transcription de nombreux marqueurs de macrophages de type M2 dans des monocytes humains primaires. Ces résultats suggèrent que les MSC, dans un contexte de tumeur ovarienne, entraîneraient une polarisation M2 des macrophages qui est décrite comme pro-tumorale. Les résultats obtenus *in vitro* montrent que des monocytes humains primaires ont une activité cytotoxique importante vis-à-vis des CTO, cependant celle-ci est diminuée en présence de sécrétions des CA-MSC « induites ». La diminution de l'effet cytotoxique des monocytes en présence des sécrétions des CA-MSC est comparable à la diminution obtenue par l'ascite. L'ascite était utilisée dans cette expérience comme témoin positif de polarisation des monocytes en TAM M2d, car ce phénomène avait été publié précédemment<sup>72</sup>. Ainsi, les sécrétions des CA-MSC semblent orienter les macrophages vers un phénotype M2d qui correspond à la polarisation des TAM retrouvés dans le cancer ovarien et associés à un mauvais pronostic.

Les expériences *in vivo* dans des modèles expérimentaux murins de cancers ovariens ont également montré que l'injection de MSC conduisait à une polarisation des macrophages péritonéaux, correspondant à des TAM, avec des caractéristiques de M2 (augmentation de la transcription d'IL-10, CCL17, etc.) et une perte de la production de ROS (la formation de ROS étant associée à l'activité antitumorale des macrophages). Ces résultats suggèrent que les MSC conduisent à une diminution de l'activité antitumorale des TAM, qui pourrait dépendre de la concentration en chimiokines.

## **H) Les chimiokines influencent la polarisation des macrophages en phénotype pro-tumoral**

Aux vues des résultats *in vitro* (Figures 24, 26 et 27) et *in vivo* (Figures 30 et 43), les MSC pourraient être les cellules entraînant une augmentation de la concentration intrapéritonéale en chimiokines (CXCL1, CXCL2 et IL-8) lorsqu'elles sont au contact de cellules tumorales. En effet, il semble que ce soient les MSC qui sécrètent une part importante des chimiokines car dans le modèle expérimental murin/humain, les concentrations qui semble être associées à la polarisation des macrophages sont les chimiokines humaines CXCL1, CXCL2 et IL-8. Ces chimiokines humaines peuvent provenir soit des CTO SKOV-3luc soit des MSC. Comme la modification du phénotype des macrophages est associée à l'injection de MSC, les cellules responsables de la sécrétion de chimiokines sont probablement les MSC.

Ces chimiokines peuvent être directement associées à la polarisation des macrophages en un phénotype M2 pro-tumoral, du fait de la corrélation entre leur présence et la polarisation de type M2 dans les TAM. L'utilisation de la reparixin, inhibant l'activité de ces chimiokines, entraîne une diminution de la transcription de l'IL-10 (un des principaux marqueurs des macrophages M2 pro-tumoraux) et une augmentation de la production de ROS (caractéristique des macrophages M1) dans les TAM et ceci en dépit de la présence de MSC. De plus, il semble qu'une polarisation vers un phénotype M2 entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2<sup>238</sup>, suggérant que l'inhibition de ces récepteurs agirait préférentiellement sur les macrophages de type M2 par rapport aux M1. Ainsi, la polarisation M2 des TAM, induite par les MSC, semble inhibée par le co-traitement à la reparixin. Ce traitement, utilisé en association avec le carboplatine, permettrait également de réduire la concentration en chimiokine au niveau intrapéritonéal.

### **I) L'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 induit un effet direct sur les CTO en les chimiosensibilisant et indirect en repolarisant les macrophages vers un phénotype anti-tumoral**

Une des hypothèses pouvant expliquer la diminution de la concentration en chimiokines en présence de l'inhibiteur des récepteurs CXCR1 et CXCR2 pourrait impliquer l'effet de cette inhibition sur la sensibilisation des CTO au traitement au carboplatine. Les MSC ont été décrites comme ayant une attraction pour les cellules tumorales, donc en réduisant le nombre de cellules tumorales due à une augmentation de leur sensibilité au carboplatine, le nombre de MSC recrutées au niveau du site tumoral pourrait être également abaissé. De plus, notre modèle de CA-MS « induites » a montré que les MSC sécrétaient une quantité importante de chimiokines uniquement après avoir été en contact avec des sécrétions de CTO. Ainsi, en diminuant le nombre de CTO, le changement de phénotype des MSC physiologiques vers un phénotype sécrétant des chimiokine est probablement aussi enrayé. En effet, des travaux antérieurs du laboratoire (non publiés) ont montré que des MSC (marquées par un fluorochrome, la GFP) étaient détectées au niveau du site tumoral uniquement lorsqu'elles étaient injectées au même moment ou après la prise tumorale mais pas lorsqu'elles étaient injectées avant les CTO. Cette



expérience montre que les MSC ont un tropisme pour les cellules tumorales, mais en absence de cellules tumorales, elles semblent rester résidentes dans l'organe et ne pas se regrouper ni s'activer. Ainsi, une diminution du nombre de CTO pourrait réduire le recrutement des MSC au niveau tumoral (péritoine) entraînant alors une diminution de la concentration péritonéale en chimiokines. L'utilisation des inhibiteurs des récepteurs aux chimiokines pourrait donc entraîner un effet direct sur les macrophages en restaurant une activité anti-tumorale mais également indirect en diminuant la sécrétion de chimiokines par les CA-MSC, ce qui diminuerait également la polarisation des macrophages en phénotype M2.

L'effet prédominant de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 *in vivo*, entre son action chimiosensibilisante directe sur les CTO ou sa polarisation des macrophages, n'a pas été défini. Etant donné que l'effet des CA-MSC « induites » sur la chimiorésistance des cellules SKOV-3 est assez faible *in vitro* mais que, *in vivo*, les MSC induisent bien une chimiorésistance, le rôle des MSC sur la polarisation des macrophages semble plus important que l'effet chimioprotecteur direct. Le co-traitement par reparixin entraînant une régression tumorale plus importante que l'effet du carboplatine seul suggère que l'effet de cette inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 pourrait être majoritairement dû à son effet sur les macrophages. Cependant, cette supposition devra être vérifiée. Pour cela, un modèle expérimental murin/humain pourrait à nouveau être utilisé en testant l'effet de la reparixin seul après une injection de CTO SKOV-3luc seules ou en présence de MSC. En effet, aucun effet cytotoxique n'a été obtenu seul avec la reparixin dans les expériences *in vitro*. Ainsi, une diminution de la charge tumorale observée dans une expérience *in vivo* orienterait plutôt pour un effet majeur de la reprogrammation des macrophages vers un phénotype anti-tumoral. Les expériences dans les modèles expérimentaux murins pourront également être répétées en déplétant les souris en macrophages (par utilisation de clodronate par exemple). Ceci permettra d'évaluer l'action de la reparixin en s'affranchissant de son effet sur les macrophages.

Préalablement à des essais cliniques qui pourraient être menés dans les carcinomes ovariens, les résultats de l'étude de phase II de la reparixin dans des cancers du sein en association avec le paclitaxel<sup>80</sup>, médicament utilisé également dans le traitement des carcinomes ovariens, pourraient constituer des données intéressantes pour son utilisation dans le cadre de cancer. En effet, une étude de phase Ib, évaluant la reparixin administrée en association avec du paclitaxel dans des cancers du sein métastatiques, a montré qu'au niveau de la toxicité, cette combinaison pouvait être utilisée dans une étude de phase II<sup>239</sup>. L'utilisation de la reparixin dans le cancer du sein était basée sur l'augmentation de l'expression des récepteurs CXCR1, observée dans les cellules souches cancéreuses, qui régule leur survie et leur auto-renouvellement<sup>240</sup>. En outre, la reparixin pourrait également permettre de sensibiliser les cellules tumorales à d'autres médicaments antitumoraux et dans divers cancers comme par exemple le cancer de la thyroïde<sup>241</sup>.

## **J) Conclusion générale**

Nous avons donc montré que le microenvironnement tumoral, notamment l'ascite, pouvait induire une chimiorésistance des CTO au traitement par carboplatine. Une part de cette

chimiorésistance semble être due aux CA-MSC qui sont retrouvées dans les tumeurs ovariennes et qui sont capables de sécréter des facteurs chimioprotecteurs, dont des chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8. Une concentration sérique élevée en chimiokines au moment du diagnostic orienterait vers une résistance de la tumeur au traitement à base de carboplatine. Afin d'éviter cette résistance, l'association d'un inhibiteur de CXCR1 et de CXCR2 à la chimiothérapie conventionnelle pourrait s'avérer prometteuse. De plus, ce traitement pourrait être considéré également comme une immunothérapie qui serait capable de repolariser les macrophages vers un phénotype antitumoral. Cette stratégie d'immunothérapie est innovante car au lieu de supprimer les TAM, comme certaines molécules développées en oncologie le feraient, elle permettrait de se servir de l'infiltrat macrophagique pour le reprogrammer avec une activité antitumorale. Compte tenu de l'importance d'une sensibilité au carboplatine dans le pronostic des patientes, ce double effet de l'inhibition des récepteurs CXCR1 et CXCR2 est encourageant dans le but d'améliorer le traitement des cancers ovariens qui restent, à l'heure actuelle, associés à une mortalité importante.

## **IV) Matériel et méthodes**

### **A) Culture cellulaire**

Les lignées humaines d'adénocarcinome ovarien utilisées IGROV-1 (don de l'Institut Gustave Roussy, Paris), SKOV-3 et OVCAR-3 (respectivement ATCC, HTB-77, HTB-161) sont cultivées dans du RPMI supplémenté en sérum de veau fœtal (10%), L-Glutamine (1%) et un mélange pénicilline/streptomycine (1%). Les cellules ID8 (don de Katherine F. Roby, The University of Kansas Medical Center) et les cellules JHOC-5 (Riken BRC, RCB1520) sont cultivées dans du DMEM supplémenté en sérum de veau fœtal (10%), L-Glutamine (1%) et un mélange pénicilline/streptomycine (1%). Les cellules IGROV-1luc, SKOV-3luc et ID8luc ont été transduites pour exprimer la luciférase firefly et sont cultivées dans les mêmes conditions que leur lignée cellulaire d'origine.

Les MSC de moelle osseuse (BM-MSC) primaires, issues de donneurs de chirurgie orthopédique (Clinique Médipole - Toulouse), les CA-MSC issues de patientes atteintes de cancer ovarien ainsi que les MSC murines (Riken BRC, RCB2295) sont cultivées dans du DMEM supplémenté en sérum de veau fœtal (10%), L-Glutamine (1%) et un mélange pénicilline/streptomycine (1%).

Les macrophages humains primaires sont récupérés à partir de cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMC) et cultivés dans du milieu Macrophage-SFM (Gibco™).

Toutes ces cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont régulièrement traitées à la Normocin™ (Invivogen) à la concentration de 100 µg/mL, pour la prévention des mycoplasmes.

### **B) Récupération des CA-MSC issues de patientes**

A partir de fragments tumoraux frais de patientes atteintes de cancer ovarien, les cellules sont séparées selon leur adhésion. Les cellules sont cultivées dans du DMEM puis triées par FACS grâce au MSC Phenotyping Kit, human (Miltenyi). Les cellules CD73+, CD90+, CD105+ et CD14-, CD20-, CD34-, CD45- sont considérées comme des CA-MSC.

### **C) Obtention des milieux conditionnés et des ascites**

L'ascite est obtenue en réalisant un pool de plusieurs ascites tumorales ovariennes (n≥10) (banque du Centre de Ressources Biologiques de l'IUCT-Oncopôle). Ces ascites sont centrifugées à 300g pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré et filtré à 0,2µm. Les MC

des CTO IGROV-1 et SKOV-3 sont obtenus en récupérant le surnageant de culture de ces cellules à confluence dans du RPMI depuis 3 jours puis filtrés à 0,2 $\mu$ m. Les MSC sont cultivées dans un mélange DMEM dilué au demi avec différents MC de CTO ou d'ascite. Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine. Après 21 jours, leur milieu est remplacé par du DMEM et 3 jours plus tard, les différents surnageants sont récupérés puis filtrés à 0,2 $\mu$ m.

## **D) Test de viabilité cellulaire**

### **1) Test de chimiosensibilité des IGROV-1 au carboplatine**

5.10<sup>3</sup> cellules CTO (IGROV-1 ou SKOV-3) sontensemencées par puits de plaques 96 puits en présence de différents MC (décrits ci-dessus) dilués au demi dans du RPMI. Le lendemain, ces cellules sont traitées par une gamme de carboplatine (Fresenius Kabi) dilué dans du RPMI entre 15,625 et 1000  $\mu$ M. L'inhibiteur de CXCR1 et CXCR2 (AS-62401, AnaSpec) est utilisé à dose fixe (100 $\mu$ M) après dissolution dans de l'H<sub>2</sub>O stérile. Une condition non traitée est également réalisée. Après 48h de traitement, la viabilité cellulaire est évaluée par test colorimétrique au WST-8 (Dojindo) selon les instructions du fournisseur.

### **2) Test de co-culture entre les macrophages et les CTO**

5.10<sup>5</sup> de PBMC (correspondant à environ 5.10<sup>4</sup> monocytes car ils représentent environ 10% des PBMC) sontensemencées dans des plaques 96 puits blanches. Après 2h d'adhésion, le milieu est remplacé par le MC (dilué au demi dans du milieu Macrophage-SFM (Gibco™)) de MSC, CA-MSC, CA-MSC « induites » ou d'ascites. Le lendemain, 2,5.10<sup>4</sup> CTO IGROV-1luc sont ajoutées dans les puits. Après 3 jours de co-culture, la viabilité cellulaire des CTO IGROV-1luc est évaluée par l'activité luciférase (mesure de la luminescence) à l'aide du kit Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega) selon les instructions du fournisseur.

## **E) Analyse de l'expression de marqueurs membranaires par cytométrie en flux**

Les MSC sont cultivées dans un mélange de milieu contrôle dilué au demi avec différents MC suivant le protocole décrit ci-dessus. Le 21<sup>ème</sup> jour, l'expression de marqueurs membranaires exprimés par les MSC (CD73, CD90 et CD105) ou non exprimés par ces cellules (CD14, CD20, CD34 et CD45) est étudiée à l'aide du kit MSC Phenotyping Kit® (Miltenyi Biotec, Allemagne), selon les recommandations du fournisseur puis mesurée par cytométrie en flux avec un FACSCalibur et analysé avec le logiciel Cell Quest.

De même, les CA-MSc issues de patientes sont analysées par cytométrie en flux sur MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec) après des marquages préalables avec le kit MSC Phenotyping Kit® (Miltenyi Biotec), selon les instructions du fournisseur.

## **F) Analyse protéique par Western Blot**

### **1) Cinétique de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les MSC**

1,5.10<sup>5</sup> MSC sont ensemencées dans des boîtes de Pétri 100mm. Les MSC sont cultivées dans du milieu contrôle (RPMI), en présence de TNF $\alpha$  (50 ng/mL dans RPMI), ou de MC de cellules IGROV-1 (dilué v/v dans du RPMI). Les protéines sont extraites à 0, 10 min, 30 min, 60 min.

### **2) Expression de CXCR1 et CXCR2 par les cellules tumorales**

5.10<sup>5</sup> CTO IGROV-1, SKOV-3, OVCAR-3, JHOC5 sont ensemencées dans des boîtes de Pétri et leurs protéines sont extraites le lendemain.

### **3) Extraction protéique et analyse par Western Blot**

Les protéines sont extraites par lyse des cellules dans du tampon RIPA (Tris 50mM, Triton 1%, SDS 0,1%, MgCl<sub>2</sub> 5mM, inhibiteurs de protéase, NaCl 150mM, Na deoxycholate 0,5%) et dosées par la méthode BiCinchoninic acid Assay. Les 15 $\mu$ g de protéines déposées sont séparées par SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide 10% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont saturées 1 heure dans du TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) /Tween 20 0,1% /lait 5% et incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (1:1000 ; Cell signaling #3033), NF- $\kappa$ B p65 (1:1000, Cell signaling #8242), CXCR1 (1:1000, Sigma-Aldrich SAB2700216), CXCR2 (1:500, Abcam ab14935), tubuline (1:1000, Cell signaling #2146) et actine (1:1000, Cell signaling #4968). Les membranes sont lavées 3 fois avec du TBS /Tween 20 0,1% (TBST) puis incubées 1 heure et 30 minutes avec un anticorps secondaire (1:5000 anti-lapin, Cell Signaling #7074) couplé à la Horse Raddish Peroxydase (HRP). Les membranes sont lavées 3 fois avec du TBST puis 2 fois avec du TBS. Les immuns-complexes sont révélés avec du «Enhanced Chemiluminescence prime» (GE Healthcare, Amersham). L'intensité des bandes est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

## **G) Analyse transcriptionnelle**

### **1) Extraction de l'ARN**

Les ARN issus des MSC, après culture cellulaire, sont extraits par l'utilisation de RNAprotect Cell Reagent et du RNeasy Plus mini kit (QIAGEN) selon les instructions du fournisseur.

Les macrophages murins, après 2h d'adhésion en plaques 48 puits, sont congelés dans du tampon de lyse du kit RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific). Les ARN sont ensuite extraits par l'utilisation de RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions du fournisseur.

### **2) Analyse transcriptionnelle par technologie Nanostring**

Les ARN totaux extraits des MSC et des CA-MSC « induites » sont détectés directement, sans nécessité d'amplification, et comptés dans les échantillons par la technologie Nanostring. L'analyse a été effectuée sur le panel « nCounter® PanCancer Immune Profiling Panel » (Nanostring), permettant d'étudier la transcription de 770 gènes. Une sélection de 29 gènes de ménage a été utilisée pour calculer la quantité relative d'ARN cible.

### **4) Analyse de la transcription par RT-qPCR**

L'ADN complémentaire (ADNc), issus des ARN totaux des MSC, CA-MSC, CA-MSC « induites » et macrophages extraits (cf. ci-dessus), est synthétisé à l'aide du kit « Verso cDNA Synthesis Kit » (Thermo Fisher Scientific), selon les instructions du fournisseur. La PCR (Polymerase Chain Reaction) est réalisée grâce au LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), selon les instructions du fournisseur.

Pour les expériences de différenciation adipocytaire et ostéoblastique, l'ADNc est synthétisé à l'aide du kit SuperScript™ VILO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific). La PCR est réalisée à l'aide de sondes TaqMan et grâce au kit Lightcycler 480 Probes Master (Thermo Fisher Scientific), selon les instructions du fournisseur.

Les amorces utilisées sont répertoriées dans les tableaux suivants :

Tableau 16 : Liste des amorces humaines et murines utilisées pour les qPCR réalisées avec du SYBR green

| Gène humains/murins sonde - SYBR green | Amorce sens                     | Amorce anti-sens                  | Espèce |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|--------|
| Arginase-1                             | GTG-AAG-AAC-CCA-CGG-TCT-GT      | CTG-GTT-GTC-AGG-GGA-GTG-TT        | Murin  |
| CCL17                                  | AGG-TCT-TGA-AGC-CTC-CTC-AC      | AGT-TCA-GAC-AAG-GGG-ATG-GG        | Humain |
| CCL17                                  | AGT-GGA-GTC-TTC-CAG-GGA-TG      | CTG-GTC-ACA-GGC-CGT-TTT-AT        | Murin  |
| CCR2                                   | AGA-GAG-CTG-CAG-CAA-AAA-GG      | GGA-AAG-AGG-CAG-TTG-CAA-AG        | Murin  |
| CD36                                   | GGT-GTG-GTG-ATG-TTT-GTT-GC      | CAG-GGC-CTA-GGA-TTT-GTT-GA        | Humain |
| CD36                                   | GCA-GAA-TCA-AGG-GAG-AGC-AC      | GAG-CAA-CTG-GTG-GAT-GGT-TT        | Murin  |
| CD163                                  | AAG-CTG-ATG-TGG-TTT-GCA-GG      | CCA-TTG-CCA-GTT-CTT-GCA-GT        | Humain |
| CXCL1                                  | AGG-GAA-TTC-ACC-CCA-AGA-AC      | CAC-CAG-TGA-GCT-TCC-TCC-TC        | Humain |
| CXCL2                                  | CGC-CCA-AAC-CGA-AGT-CAT-AG      | AGA-CAA-GCT-TTC-TGC-CCA-TTC-T     | Humain |
| DC-SIGN                                | GGC-ACG-AAA-GTG-AGG-CAC-AT      | AGC-TCA-TCT-CCG-CTC-CTA-CCT       | Murin  |
| Dectine 1                              | CAT-CGT-CTC-ACC-GTA-TTA-ATG-CAT | CCC-AGA-ACC-ATG-GCC-CTT           | Murin  |
| GAPDH                                  | GCT-CCT-GTT-CGA-CAG-TCA         | ACC-TTC-CCC-ATG-GTG-TCT-GA        | Humain |
| GAPDH                                  | AGG-TCG-GAG-TCA-ACG-GAT-TT      | ATC-TCG-CTC-CTG-GAA-GAT-GG        | Humain |
| GAPDH                                  | AAC-TTT-GGC-ATT-GTG-GAA-GG      | ACA-CAT-TGG-GGG-TAG-GAA-CA        | Murin  |
| IDO2                                   | CTG-GTC-CTG-AGC-TTC-CTC-AC      | CAG-CAC-CAA-GTC-TGA-GTG-GA        | Humain |
| IL-1 $\beta$                           | GAT-CCA-CAC-TCT-CCA-GCT-GCA     | CAA-CCA-ACA-AGT-GAT-ATT-CTC-GAT-G | Murin  |
| IL-1ra                                 | TGG-GAA-TCT-CAG-ATG-GGA-AG      | CTG-TGT-CCC-CCA-GAA-CTT-GT        | Humain |
| IL-1ra                                 | TAG-CAA-ATG-AGC-CAC-AGA-CG      | ACA-TGG-CAA-ACA-ACA-CAG-GA        | Murin  |
| IL-6                                   | TAC-CCC-CAG-GAG-AAG-ATT-CC      | TTT-TCT-GCC-AGT-GCC-TCT-TT        | Murin  |
| IL-8                                   | ACA-CTG-CGC-CAA-CAC-AGA-AAT-TA  | TTT-GCT-TGA-AGT-TTC-ACT-GGT-ATC   | Humain |
| IL-10                                  | TGC-AAA-ACC-AAA-CCA-CAA-GA      | TCT-CGG-AGA-TCT-CGA-AGC-AT        | Humain |
| IL-10                                  | CCA-AGC-CTT-ATC-GGA-AAT-GA      | TTT-TCA-CAG-GGG-AGA-AAT-CG        | Murin  |
| IL-12                                  | AGG-TCA-CAC-TGG-ACC-AAA-GG      | TGG-TTT-GAT-GAT-GTC-CCT-GA        | Murin  |
| Interféron- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )  | ACT-GGC-AAA-AGG-ATG-GTG-AC      | TGA-GCT-CAT-TGA-ATG-CTT-GG        | Murin  |
| PGES                                   | CAT-GTG-AGT-CCC-TGT-GAT-GG      | GAC-TGC-AGC-AAA-GAC-ATC-CA        | Humain |
| TGF- $\beta$                           | ACT-GAG-GGG-AAG-GGA-CAA-CT      | TCG-GTA-CCA-GGT-GAG-GGT-AG        | Humain |
| TLR-2                                  | TGC-TTT-CCT-GCT-GGA-GAT-TT      | TGT-AAC-GCA-ACA-GCT-TCA-GG        | Murin  |
| VEGF                                   | CTT-CTG-AGT-TGC-CCA-GGA-GA      | CTC-ACA-CAC-ACA-CAA-CCA-GG        | Humain |

Tableau 17 : Liste des références des sondes TaqMan humaines utilisées pour les qPCR évaluant la différenciation adipocytaire et ostéoblastique des MSC

| Gènes humains<br>Sonde TaqMan   | Références Thermo<br>Fisher Scientific | Longueur de<br>l'amplicon (pb) |
|---------------------------------|--|--------------------------------|
| Adiponectine                    | Hs00605917_m1                          | 71                             |
| GAPDH                           | Hs02758991_g1                          | 93                             |
| Leptine                         | Hs00174877_m1                          | 74                             |
| Osterix (SP7)                   | Hs01866874_s1                          | 104                            |
| Phosphatase alcaline<br>(ALPL)  | Hs01029144_m1                          | 79                             |
| PPAR- $\gamma$                  | Hs00234592_m1                          | 77                             |
| PTHR1                           | Hs00174895_m1                          | 76                             |
| RUNX2                           | Hs01047973_m1                          | 86                             |
| Sialoprotéine osseuse<br>(IBSP) | Hs00173720_m1                          | 95                             |

## H) Différenciation des MSC en adipocyte et en ostéoclastes

$1.10^4$  BM-MSC, CA-MSC ou CA-MSC « induites » sontensemencées par plaques 24 puits. Après 3 jours d'adhérence, le milieu est remplacé par du milieu contrôle (DMEM), du milieu de différenciation adipocytaire (StemMACS AdipoDiff Media (Miltenyi Biotec)) ou du milieu de différenciation ostéoblastique (StemMACS OsteoDiff Media (Miltenyi Biotec)). Le milieu est renouvelé 2 fois par semaine pendant 21 jours.

### 1) Coloration « Nile Red » après induction adipocytaire

Après les 21 jours dans du milieu de différenciation adipocytaire, le milieu est aspiré. Une solution de « Nile Red » (25 $\mu$ g/mL) est ajoutée sur les MSC. Après une incubation (30 min à 4°C et à l'abri de la lumière), les cellules sont fixées au formaldéhyde 10%. Après une nouvelle incubation (10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière), le formaldéhyde est



remplacé par une solution de Hoechst (2 µg/mL). La formation de vacuoles lipidiques est visualisée au microscope à fluorescence.

## **2) Coloration de la minéralisation par « alizarine rouge » après induction ostéoblastique**

Après les 21 jours dans du milieu de différenciation ostéoblastique, le milieu est aspiré. Les cellules sont fixées au formaldéhyde 10% puis mise en présence d'alizarine rouge (40mM). La coloration rouge par « alizarine rouge » est le reflet de la capacité de minéralisation en marquant les dépôts calciques.

## **3) Coloration de la minéralisation par « Fast violet » après induction ostéoblastique**

Après les 21 jours dans du milieu de différenciation ostéoblastique, le milieu est aspiré. Une solution composée de naphthol (0,4mg/mL) et de « Fast violet » (0,3mg/mL) est ajoutée, permettant de marquer *via* le Fast-violet les sites d'activité des phosphatases alcalines. Les cellules sont ensuite fixées à l'alcool à 70°.

## **I) Etude des concentrations en CXCL1, CXCL2 et IL-8 par ELISA**

La concentration en chimiokines CXCL1, CXCL2 et IL-8 des MC de MSC, de CA-MSC, de « CA-MSC » induite et des sérums de patientes, ainsi que des liquides de lavage péritonéal des expériences *in vivo* a été réalisé par des test ELISA (Enzyme-like immunosorbent Assay).

Le CXCL1 humain et murin et le CXCL2 murin ont été quantifiés par l'utilisation des kits ELISA, respectivement, EK0722, EK0723, EK0452 (Boster Biological Technology). Le CXCL2 humain a été quantifié par le kit ELISA ARG80185 (Arigo biolaboratories).

L'IL-8 a été quantifiée en utilisant un kit ELISA spécifique « DuoSet® ELISA Development System » (R&D Systems), selon les instructions du fournisseur.

## **J) Etude de la polarisation des macrophages en présence de milieu conditionné de CA-MSC « induites » par analyse transcriptionnelle**

$1.10^5$  PBMC sontensemencées dans des puits de plaques 48 puits. Les macrophages sont sélectionnés par adhésion (2h) puis ils sont mis en présence de MC de BM-MSC ou de CA-

MSC « induites ». 24 heures après, les macrophages sont placés dans du tampon de lyse du Kit d'extraction d'ARN (Thermo Fisher Scientific, RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit).

## ***K) Expériences *in vivo****

### ***1) Organisation des expériences *in vivo****

#### ***a) Modèle expérimental murin utilisant les cellules SKOV-3 et des MSC***

$10 \cdot 10^6$  cellules SKOV-3 +/-  $1 \cdot 10^6$  MSC sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) dans des souris nues. Après 7 jours, les traitements sont débutés, comprenant 1 injection de carboplatine ( $200 \mu\text{L}/\text{souris}$  d'une solution à  $4,5 \text{ mg/mL}$  diluée dans du NaCl 0,9%) tous les 7 jours pendant 3 semaines (soit 3 injections).

#### ***b) Modèle expérimental murin utilisant les cellules ID8luc et des MSC murines***

$5 \cdot 10^6$  cellules ID8luc +/-  $5 \cdot 10^5$  MSC sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) dans des souris C57BL/6. Après 13 jours, les traitements sont débutés, comprenant 1 injection de carboplatine ( $200 \mu\text{L}/\text{souris}$  d'une solution à  $4,5 \text{ mg/mL}$  diluée dans du NaCl 0,9%) tous les 7 jours pendant 3 semaines (soit 3 injections).

#### ***c) Modèle expérimental murin utilisant les cellules SKOV-3luc et des MSC***

$10 \cdot 10^6$  cellules SKOV-3luc +/-  $1 \cdot 10^6$  MSC sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) dans des souris nues. Après 7 jours, les traitements sont débutés, comprenant 1 injection de carboplatine ( $200 \mu\text{L}/\text{souris}$  d'une solution à  $4,5 \text{ mg/mL}$  diluée dans du NaCl 0,9%) tous les 7 jours pendant 3 semaines (soit 3 injections) et 1 injection de reparixin ( $30 \text{ mg/kg}$  diluée dans une solution de DMSO/PBS (v/v)) 3 fois par semaine pendant 3 semaines (soit 9 injections).

### ***2) Suivi de l'activité luciférase par IVIS***

Une injection de luciférine (XenoLight D-Luciferin - K+ Salt Bioluminescent Substrate, PerkinElmer's) est réalisée par voie intrapéritonéale dans chaque souris, 10 minutes avant l'analyse à l'IVIS® Imaging Systems (PerkinElmer's).

### **3) Sacrifice des souris**

L'euthanasie des souris est réalisée par inhalation de dioxyde de carbone.

### **4) Lavage péritonéal**

Une injection de 5mL de NaCl (0,9%) est réalisée dans le péritoine de souris. Après agitation, le liquide du lavage péritonéal est récupéré.

### **5) Luminescence des organes**

Après euthanasie, le péritoine, la rate, le foie et le diaphragme sont prélevés. Ces organes sont ensuite disséqués et disposés dans des plaques blanches 96 puits. Le liquide de lavage péritonéal (150µL) est également disposé dans des plaques blanches. Après ajout de luciférine (XenoLight D-Luciferin - K+ Salt Bioluminescent Substrate, PerkinElmer's) à 150 µg/mL, la luminescence des organes est mesurée par EnVision™ Multilabel Plate Readers (PerkinElmer's).

### **6) Isolement des macrophages issus du lavage péritonéal pour analyse transcriptionnelle et de leur production de ROS**

Le liquide de lavage péritonéal (cf. ci-dessus) est centrifugé (300g pendant 10 minutes). Après lyse des globules rouges (Tampon Ack), les cellules sont séparées par utilisation de percoll (GE Healthcare Life Sciences, 17-0891) selon les instructions du fournisseur.  $1.10^5$  cellules de la fraction contenant les macrophages sontensemencées dans des puits de plaques 48 puits. Les macrophages sont sélectionnés par adhésion (2h) puis ils sont soit utilisés pour évaluer leur production de ROS, soit mis dans du tampon de lyse du Kit d'extraction d'ARN (Thermo Fisher Scientific, RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit).

### **7) Mesure de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)**

Après 2h d'adhésion des macrophages péritonéaux ( $1.10^5$ ) à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, l'activité de la NADPH oxydase a été mesurée par chimioluminescence en présence de 60 µM d'une sonde chimioluminogène : luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione, Sigma-Aldrich). La production de chimioluminescence a été analysée avec un luminomètre (PerkinElmer's, EnVision™ Multilabel Plate Readers). Le luminol permet, en présence d'agents oxydants, l'émission de photons captés par le photomultiplicateur de la chambre noire du luminomètre

thermostaté à 37°C et transformés en impulsions électriques quantifiables. Les valeurs de chimioluminescence ont été enregistrées continuellement pendant 90 minutes.

## L) Analyses statistiques

Pour les tests de chimiorésistance, les RT-qPCR, les co-cultures, les données de cytométrie, et les résultats des expériences *in vivo*, la comparaison entre les groupes est réalisée par un test Wilcoxon - Mann Whitney (données non paramétriques indépendantes). Les valeurs de  $p < 0,05$  indiquent une différence significative (\*), et  $p < 0,01$  (\*\*).

L'analyse d'une éventuelle liaison entre la concentration en carboplatine et le nombre de mois avant récurrence a été réalisée par un test non paramétrique, le test de corrélation de Spearman.

Analyse transcriptomique réalisée par la technologie Nanostring : l'analyse sur la totalité des gènes ( $n=770$ ) se trouvant sur la puce, a nécessité un premier filtre ( $sd > 0.25$ ) afin d'éliminer les gènes peu variés. Après ce filtre, il reste 699 gènes. Pour l'analyse de ces gènes comme pour ceux de la liste "molécules solubles", un test ANOVA a été appliqué pour la comparaison des 6 échantillons de MSC contrôles versus les 6 MSC/igrov-1. Les valeurs  $p$  ont été corrigées pour les tests multiples en utilisant la méthode Benjamini & Hochberg (BH).

## V) ANNEXES

### Publication 1 : Article en cours de soumission en premier nom

Le Naour A., Mevel R., Thibault B., Courtais E., Chantalat E., Delord J-P., Couderc B., Guillermet-Guibert J. & Martinez A.

#### Effect of combined inhibition of p110 alpha PI3K isoform and STAT3 pathway in ovarian cancer platinum-based resistance

Cette publication, en cours de soumission, présente les résultats obtenus dans l'étude de la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes en présence d'ascite (Figure 8). Nous nous sommes intéressés au rôle chimioprotecteur de l'IL-6 retrouvée dans les ascites. En effet, parallèlement à nos travaux sur l'IL-8, CXCL1 ou CXCL2, nous avons observé une forte expression de l'IL-6 dans les ascites et cette cytokine a largement été décrite dans la littérature comme pouvant induire une chimiorésistance sur les CTO<sup>198</sup>. Les cellules étudiées ont été les cellules IGROV-1 mais également la lignée cellulaire JHOC-5, issues de carcinome ovarien à cellules claires. En effet, le carcinome à cellules claires semble être un type de cancer dans lequel l'IL-6 pourrait jouer un rôle important. Comme mentionné dans l'introduction du manuscrit, le carcinome à cellules claires est le type histologique de carcinome ovarien avec le taux le plus élevé de mutations activatrices sur les protéines clés de voies de signalisation STAT3 ou PI3K (*PIK3CA* mutée dans 33% des cas).

Nous avons pu montrer une corrélation entre la concentration en IL-6 dans les ascites et l'IC50 du carboplatine des CTO en présence de ces ascites. En plus des mutations intrinsèques des CTO (exemple : les CTO issues de carcinome à cellules claires), nous avons observé que les ascites elles-mêmes pouvaient conduire à une activation de différentes voies de signalisation dont la voie PI3K/Akt dans les CTO.

Afin de sensibiliser les différentes CTO au traitement par carboplatine, la stratégie mise en place a été de combiner un anticorps ciblant l'IL-6 (le tocilizumab) et l'inhibition de la voie PI3K/Akt activée en agissant directement sur l'expression de la sous unité p110 $\alpha$  grâce à un shRNA dirigé contre cette isoforme.

L'association de ces traitements n'a pas permis de sensibiliser les CTO au traitement par carboplatine. Au contraire, de façon surprenante, l'inhibition de l'isoforme p110 $\alpha$  a conduit à une augmentation de la résistance des CTO à la chimiothérapie.

Il semblerait donc que l'inhibition de la voie de signalisation activée par la présence de l'IL-6 ne soit pas suffisante pour empêcher la chimiorésistance induite par le microenvironnement tumoral. De même, l'inhibition de la voie de signalisation en aval de l'isoforme p110 $\alpha$  ne semble pas présenter un intérêt thérapeutique, du moins de la manière dont nous l'avons proposé (ARN interférence), dans notre modèle d'étude.

L'inhibition concomitante des deux voies (STAT3 activée par l'IL-6 et PI3K activée par l'isoforme p110 $\alpha$ ) n'a pas montrée, dans notre modèle expérimental, d'effet permettant d'empêcher la chimiorésistance des cancers de l'ovaire.

En ce qui concerne l'IL-6, il serait peut-être envisageable d'inhiber son récepteur plutôt que la cytokine directement, comme cela a été observé pour l'IL-8.

## **Effect of combined inhibition of p110 alpha PI3K isoform and STAT3 pathway in ovarian cancer platinum-based resistance**

*Le Naour A., Mevel R., Thibault B., Courtais E., Chantalat E., Delord J-P., Couderc B., Guillermet-Guibert J. & Martinez A.*

### **Background**

The 5-year overall survival for advanced ovarian cancer disease is approximately 30% (1). This low survival rate is due to the diagnosis of ovarian cancer at advanced stage of disease and to intrinsic and acquired resistance to platinum-based chemotherapy in a large number of patients. Indeed, Prognostic features, including patient's age, performance status, FIGO stage, histological tumour grade and subtype, and initial surgery results, are insufficient to capture the important individual variations in response to chemotherapy and survival. Epithelial ovarian cancer can be divided into five different diseases according to their pathology: low-grade serous carcinoma, high-grade serous carcinoma, mucinous, endometrioid and clear cell carcinoma. Each of these subtypes is genetically distinct with different underlying molecular abnormalities, different morphological, immunohistochemical and clinical characteristics.

Approximately 70% of patients will respond to a combination of platinum and taxane-based chemotherapy but more than half of these patients will recur with a frequent acquisition of a resistance against platinum. Small numbers of drug-resistant cells can persist for many months and remain dormant in the peritoneal cavity leading to recurrent disease. This unique metastatic pattern suggests that ovarian carcinoma has a strong tropism for the peritoneal cavity which most probably displays a specific permissive microenvironment for tumor growth through the release of cytokines and growth factor able to activate specific signalling pathways in tumor cells (2). In a previous study we compared transcriptomic profile of primary ovarian tumors and their matched peritoneal metastases. We evidenced that peritoneal lesions over-expressed genes involved in the cytokine-cytokine receptor interaction' and in the 'Jak-STAT signalling pathway'. Among these genes, IL-6 is one of the major immunoregulatory cytokines with a role in tumor proliferation, invasion, angiogenesis and chemoresistance (3,4). High serum levels of proinflammatory cytokines such as IL-6, are associated with a poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. Moreover, IL-6 secretion can lead to resistance of ovarian tumor cells to treatment by carboplatin and paclitaxel. In addition, we noticed copy number differences between primary and peritoneal implants on genes mainly implicated in Kinase activation network (5). Interestingly, despite the great number of genes in the global network, only a few (22 genes) are implicated in Kinase activation in early peritoneal, with the central implication of the PI3K pathway (5). In another study, we performed a combined genomic and transcriptomic analysis from multi-site samples of ovarian cancer patients and identified preferentially expressed alleles that could act as cancer drivers and be used as therapeutic target. One of the genes showing significant allele fraction differences was PIK3CA (6), which encodes the catalytic subunit of PI3K $\alpha$  isoform (p110 $\alpha$ ). In addition to the intrinsic differences

of ovarian tumor cells associated with their location, the tumor microenvironment may play a role in tumor progression. Indeed, microenvironment cells, especially those found in ascites, are capable of secreting factors involved in tumor cells progression, angiogenesis, metastasis and chemoresistance acquisition (7). Factors released in the ascites induced the stabilization of the phosphorylated form of Akt in tumor cells and the stabilization of XIAP, an anti-apoptotic protein which belongs to the IAP family (8). We evidenced a stabilization of the phosphorylated form of Akt and since the PI3K/Akt pathway plays a central role in survival, proliferation, and angiogenesis, we hypothesized that this pathway could be involved in chemoresistance acquisition. Class I PI3Ks are heterodimeric proteins constituted by a catalytic subunit (4 isoforms having non redundant activities: p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  and p110 $\gamma$ ) and one or several regulating subunits (9-11). Somatic mutations with gain of function in the PIK3CA gene, are found in 12% of high-grade serous ovarian carcinomas. Preclinical studies have implicated the activation of the PI3K pathway in resistance to chemotherapy by extended cell survival and modulation of multidrug resistance-1 (12). Blockade of the PI3K pathway sensitized tumor cells to platinum and taxanes, and combinatorial treatment with chemotherapy resulted in increased antitumor activity in multiple human xenograft models of breast, lung cancer, and glioblastoma grown in nude mice.

There are several ongoing clinical trials examining PI3K/Akt/mTORC1 axis inhibition (13). These trials involve pan-inhibitors of the PI3K and target the 4 isoforms of class I PI3K, usually also inhibiting the downstream effector mTOR. Unfortunately, these inhibitors display adverse effects at high doses and are not as active as expected probably because of the activation of alternative compensatory pathways or due to the insufficient drug dosage needed to reach the targets (13).

We have demonstrated the specific implications of the alpha isoform in tumor initiation or progression in pancreatic cancers (14,15). One of the major interests of isoform-selective PI3K inhibitors relates to their ability to completely block the relevant target whilst causing limited toxicities compared with pan-PI3K inhibitors, in particular in the case of combination therapies. Regarding the potential implication of the different isoforms of PI3K in the different stromal cells involved in tumor progression, Niedermeier et al. have identified that p110 $\alpha$  specific inhibitors could counteract the chemoresistance of chronic lymphoid leukemia by suppressing the protective effect of marrow stromal cells on fludarabine-induced apoptosis (16). However, the precise mechanism of resistance to PI3K/Akt/mTOR inhibitors remains unclear. Genetic and pharmacological data from our laboratory demonstrates that PI3K signalling in other cancers where the stromal compartment plays a major role allows for the autocrine IL-6-STAT3 loop to set up (14). In breast cancer, IL-6-STAT3 positive feedback loop mediated resistance to PI3K inhibitors through epithelial-mesenchymal transition breast cancer cell features, and through expansion of cancer stem cells. Overlapping increase in IL-6 production was associated with a significant increase in STAT3 activity and PI3K inhibitors resistance. ILT using STAT3 and PI3K inhibitors suppressed both STAT3 and Akt activities and induced the cleavage of caspase 3, a well-known apoptotic marker (17). These results suggest that dual inhibition of IL-6 and PI3K could be an interesting strategy to improve ovarian cancer treatment possibilities.



The aim of our study was to evaluate the implication of the p110 $\alpha$  PI3K subunit in ovarian cancer chemoresistance acquisition, and to evaluate whether the JAK/STAT pathway could mediate resistance to PI3K inhibitors through secretion of IL-6.

## Material and methods

### *Cell culture*

Human ovarian cancer cells (HOCC) IGROV-1, SKOV-3 and JHOC-5 were obtained respectively from the institute Gustave Roussy (18), the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) (HTB-77) and the RIKEN institute (Japan) (RCB 1520). .. MSC were obtained from EFS institute. HOCC and MSC were cultured respectively in RPMI or DMEM medium supplemented with 10% foetal calf serum, penicillin/streptomycin (100 IU/ml/100 mg/ml) and 2mM L-Glutamine (Cambrex Biosciences, Milan, Italy). Cell lines were routinely checked for mycoplasma.

### *Lentiviral vector*

LVTHM® is a lentiviral vector (LV) encoding the shRNA) under the control of the H1 promoter (17) as well as the GFP under the control of the EF1 promoter. Four different lentiviral vectors have been constructed corresponding to various targeted region of PI3KCA :

alpha 1 : 5'  
CGCGTCCCCGCGAAATTCTCACACTATTATTTCAAGAGAATAATAGTGTGAGAAT  
TTCGCTTTTTGGAAAT, alpha 2 : 5'  
CGCGTCCCCGCACAATCCATGAACAGCATTTTCAAGAGAAATGCTGTTCATGGAT  
TGTGCTTTTTGGAAAT.

### **Alpha 3**

5'  
AATTCGCATTAGAATTTACAGCAAGATCTCTTGAATCTTGCTGTAAATTCTAATG  
CC

### **Alpha 4**

TGCAGCCAGATGTATTGCTTGGTAAATTCAAGAGATTTACCAAGCAATACATCT  
GGG

The same lentiviral vector encoding a scramble shRNA 5' (AATTCCTTCTAGAGATAGTCTGTACGTTTCAAGAGAACGTACAGACTATCTCTAG AAG) was used as negative control. 293T cells were kindly provided by Genethon (France).

Generation of 293T- LVTHM-shalpha 1 to 4 or control and preparation of high titer LV pseudotyped with VSV-G protein have been described previously (18).  $50 \times 10^3$  cells were plated on 35 mm dishes 24 h prior to transduction with viral vectors at a MOI of 10:1 (I didn't check for the MOI, did you?). Genetically modified cells were sorted by FACS according to GFP expression.

#### *Conditioned media*

Ascites were collected from patients during exploratory laparoscopy for peritoneal carcinomatosis from ovarian origin. Only ascites from tumors with adenocarcinoma histology were selected. The description of the disease stages is presented in table 1. All patients had previous signed informed consent. Ascites were centrifugated 10 min 400g and the supernatant filtered at 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### *IC50 assays.*

HOCC were seeded in 96-well plates (5000 cells per well) in the presence or absence of ascites and treated 24 h after with the indicated concentrations of carboplatin between 15.625 et 1000  $\mu\text{M}$ . After 48h, cell viability was measured using WST-1 colorimetric assay (Roche). Untreated cells were used as 100% of viability. In order to inhibit IL-6 activity, HOCC were treated with tocilizumab (Roche) 1 $\mu\text{M}$  in combination with the range of carboplatin.

#### *Western-blotting analysis*

20 micrograms of proteins were separated by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel. Proteins were transferred on nitrocellulose. Membranes were saturated 1h in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl) / 0,1% Tween 20/ 5% milk or 5% Bovin Serum Albumin (BSA) for phosphorylated proteins analysis and incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal primary antibody directed against p85 (1:1000, millipore clone 06-195), p110 $\alpha$  (1:1000, Cell signaling clone 4249), p110 $\beta$  (1:1000, santacruz SC-602), p-AktS473 (1:1000, Cell signaling clone 4060S) ; pan-Akt (1:1000, Cell Signaling clone 4691S) ; p-Erk (1:1000, Cell Signaling clone 4377S), Erk (1:1000, mouse, Cell Signaling clone 4696) ; p-Stat3 (1:1000, Cell Signaling clone 9145) ; Stat3 (1:1000, Mouse, Cell Signaling #9139),  $\beta$ -Tubulin (1:1000, Cell Signaling clone 2146S). Membranes were washed 3 times with TBS/ 0,1% Tween 20 (TT) then incubated 1.5h with a secondary antibody (1:10000 anti-rabbit or 1:5000 anti-mouse Cell Signalling Technology) coupled with HRP (Horse Raddish Peroxydase). Membranes were washed 3 times with TT. Immunocomplexes were revealed by ECL (Pierce).

#### *ELISA (Enzyme-like immunosorbent assay)*

IL-6 was quantified using a specific ELISA (DuoSet® ELISA Development System (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol.

### *Statistical analysis*

Results were expressed as the mean +/- s.e.m. Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare values of test and control samples in IC50 assays. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  indicated a significant difference. The Spearman rank correlation was used to test the correlation between IC50 and IL-6 concentration in ascites.

## **Results**

### ***Ascites medium confers chemoresistance to ovarian cancer cells through secreted factors.***

Platinum-based chemotherapy induces ovarian cancer cell growth inhibition and apoptotic death and is used in management of ovarian cancer patients. We analyzed if carboplatin-mediated growth inhibition of ovarian cancer cells could be impaired by secreted factors in ascites from patients who relapsed after a first chemotherapy treatment. First, we determined the carboplatin concentration needed to inhibit 50% IGROV-1 cell growth (inhibitory concentration 50, IC50). IGROV-1 cells were chemosensitive to carboplatin treatment with a dose-dependent decrease in cell viability. Carboplatin IC50 of the carboplatin on the IGROV-1 cells grown in the control medium was used as a reference (100%). When the ovarian adenocarcinoma cells IGROV-1 were cultured in medium mixed with 50% of ascites, we observed an increase in their chemoresistance with an IC50 ranging from 192 to 253% (Fig 1) depending on the patient samples. There was no significant differences whether these ascites came from serous (1-9, 11) or clear cells (10) carcinoma, neither when the ascites came from low grade (1) or high grade cancer (10-11) and whether patients were sensitive or refractory at the beginning of the treatment (Table 1 and Figure 1). These results indicated that most of the ascites from patients contained secreted factors which could enhance chemotherapy resistance of IGROV-1 cells. The fact that secreted factors present in ascites could induce a chemoresistance acquisition was also observed using another ovarian adenocarcinoma cell line (JHOC-5), a prototype of clear cell carcinoma (19), which differ from the IGROV-1, a prototype of high serous type (20), supplementary data 1.

### ***Ascites activate both JAK/STAT and PI3K pathways on ovarian cancer cell lines.***

To study the effect of ascites in HOCC, we chose to focus on three signaling pathways that could be implicated in acquisition of carboplatin resistance. We cultured IGROV-1 in medium mixed with 50% of ascites in the presence or absence of carboplatin (50 $\mu$ M) and extracted cell proteins at different time points (0, 10min, 1h, 24h, and 48h) after ascites and carboplatin exposition. We evaluated JAK/STAT, MAPK and PI3K/Akt activation through protein phosphorylation. Results are presented in figure 2. A 48h Carboplatin-exposition induced

STAT3 phosphorylation in the presence or absence of ascites as well as the incubation of cells in presence of ascites alone for 24h. We observed an additive effect of the carboplatin exposition and ascites stimulation, suggesting that the STAT3 pathway could be involved in chemoresistance. Ascites prevented the decreased Akt phosphorylation on S473 induced by carboplatin. Indeed, an increase of the Akt phosphorylation S473 as well as Erk phosphorylation have been noticed when IGROV-1 cells were cultured with patient's ascites. Carboplatin did not interfere with the Erk phosphorylation in the presence of ascites. We evidenced here a potential implication of both PI3K/Akt and STAT3 pathways in the acquisition of chemoresistance of the ovarian cancer cells through their culture with ascites suggesting that these two pathways could be implicated in chemoresistance acquisition through factors releases in the ascites.

### ***Correlation between IL-6 concentration and ascites induced chemoresistance.***

It has been previously reported that ascites contained several factors including chemokines that could be involved in chemoresistance. Amongst others, we focused on IL-6 as this cytokine has already been implicated in chemoresistance and angiogenesis in several malignancies including ovarian cancer (21). We measured IL-6 levels in ascites by ELISA and correlated it with patients prognosis. In concordance with reported data (22) high levels of IL-6 in ascites were correlated with poor prognostic outcome. Different ascites from 8 patients induced different levels of chemoresistance (figure 1). A positive correlation was found between the level of IL-6 and the IC50 of carboplatin for IGROV-1 cells (Figure 3A). This observation was confirmed using the JHOC-5 cell line (Figure 3B).

### ***Effect of the IL-6/STAT3 pathway inhibition HOCC chemoresistance induced by ascites***

We decided to treat cells exposed to ascites with an antibody directed against IL-6 already used in clinic for polyarthritis: the tocilizumab. This antibody was added to the cell culture medium alone or in combination with ascites as described previously. Carboplatin was added 12 hours after at different concentrations and cell viability was evaluated 48 hours after. . Experiments were conducted using the IGROV-1 and JHOC-5 cell lines (material and method no?). Indeed JHOC-5 is a clear cell carcinoma cell line model bearing the ARID1A (this gene, encoding the BAF250 protein, is considered to be a tumor suppressor gene) and PIK3CA mutations, which cooperate to promote tumor growth through IL-6 overproduction (20). We used 8 different ascites as already mentioned in Figure 1. All ascites induced chemoresistance acquisition to JHOC-5 cells at different levels as it was already described for IGROV-1 cells. But in all cases, additional treatment with tocilizumab did not reverse chemoresistance acquisition. (figure 4 : JHOC-5 cells and 7 : IGROV-1 cells). Indeed, the mean of the 8 carboplatin IC50 observed in presence of these 8 ascites was not modified despite treatment with tocilizumab. The addition of an anti IL-6 antibody did not reverse chemoresistance acquisition mediated by the ascites.

### ***Expression of PI3K different isoforms in HOCC***

It seemed that the addition of an anti IL-6 antibody would not be sufficient to revert the chemoresistance acquisition mediated by the ascites. We decided to test if the combination of both JAK/STAT and PI3K/Akt inhibition could abolish chemoresistance of HOCC. We first checked the expression of the different PI3K isoforms in our model as well as in another HOCC (SKOV-3 cells). SKOV-3 and IGROV-1 were used as both are mutated for PI3K. As shown in figure 5, PI3KCA and PI3KCB were expressed in the two HOCC and to a lesser extent PI3KCD. We could not detect PI3KCD. We also checked PI3K isoform expression in one cell type belonging to the tumour microenvironment: the mesenchymal stem cells (MSC) Indeed, these cells could be involved in IL-6 secretion into the ascites as described in Castells et al. (8). These cells shown the same pattern of expression of class I PI3K isoforms as the HOCC. . Since PI3KCA polymorphism has been observed in ovarian cancer and because this isoform is implicated in oncogenesis we decided to specifically inhibit this isoform. Other cells of the microenvironment such as MSC also expressed PI3KCA, To evaluate the effect of the blockade of the PI3K pathway we decided to use RNA interference on the HOCC in order to perform both *in vitro* and *in vivo* experiments. Cells have been transduced with lentiviral vectors encoding either a scramble shRNA or shRNAs targeting various locations of the PI3KCA transcripts. The knockdown efficiency of PI3KCA expression was evaluated by western blot using different shRNA sequences (alpha 1 to alpha 4).. As shown in figure 6A, the scramble shRNA had no effect on the expression of the PI3K isoforms  $\alpha$  and  $\beta$ . The shRNA $\alpha$ 2 was the most efficient at knocking down PI3KCA expression. Also, unlike shRNA $\alpha$ 1 it effectively inhibited downstream Akt signalling as shown by a decrease in p-Akt S473 phosphorylation. We did not observe a compensation of the abolition of PI3KCA by an overexpression of PI3KCB with the shRNA $\alpha$ 2. Inhibition of PI3KCA alone was able to down regulate the Akt pathway in IGROV-1 cells. We selected the shRNA $\alpha$ 2 for following experiments.

### ***Inhibition of p110 $\alpha$ did not decrease IGROV-1 chemoresistance induced by ascites***

As previously shown, incubation of the IGROV-1 WT during 24h in the presence of ascites promoted increased IC50 to carboplatin. Akt phosphorylation on S473 could be involved in the phenomenon. We hypothesized that ascites secretions could activate the anti-apoptotic signaling pathway through p110 $\alpha$  activation. Surprisingly, when PI3KCA expression was decreased on IGROV-1 cells, the IC50 of carboplatin increased (figure 7). When cells were incubated with the ascites we observed an increase in the resistance to carboplatin whether the cells expressed or not high levels of PI3KCA. The acquisition of chemoresistance was not reverted by a decrease in PI3KCA expression.

### ***Combined Inhibition of IL-6/STAT3 pathway and p110 $\alpha$ effect in IGROV-1 chemoresistance induced by ascites***

We next investigated whether combinatorial blocking of IL-6/STAT3 and PI3K/Akt pathways would have an effect on tumor growth and response to chemotherapy. When tocilizumab was added to the mock cells or to the shp110 $\alpha$  cells there was no IC50 difference in the presence

or absence of ascites. (figure 7). There was no synergistic effect of the blockade of IL-6 and PI3KCA in reverting chemoresistance acquisition through the ascites secreted factors. Surprisingly, inhibition of the isoform p110 $\alpha$  resulted in increased resistance to carboplatin in the IGROV-1 cells line.

Taken together our results showed that treatment with an antibody against IL-6 did not revert chemoresistance to carboplatin even after PI3KCA inhibition.

## Discussion

Ascites microenvironment secreted factors can induce platinum chemoresistance in ovarian cancer. One of the potential mechanisms of chemoresistance occurs through activation of the STAT3/PI3K/Akt axis, demonstrated by increase in STAT3 and Akt phosphorylation (Figure 2). Akt stabilization induced anti-apoptotic signaling, thereby increasing cell survival. Phosphorylation of Akt increased according to exposure to ascites medium (Figure 2), suggesting that accumulation of secreted factors induced PI3K/Akt activation.

Literature data demonstrate that IL-6 is one of the major immunoregulatory cytokines present in the tumor microenvironment, and is found overexpressed in almost all types of tumors. IL-6 is produced by immune cells, MSCs and tumor cells (16). IL-6 has a number of tumor-promoting activities and is capable of inducing tumor proliferation, invasion, angiogenesis and chemoresistance (24-25). IL-6 stimulates tumor cell proliferation and survival by activating the PI3K/AKT and JAK/STAT pathways *via* gp130 tyrosine phosphorylation (21). IL-6 regulates the process of apoptosis by activating STAT-3 and NF-kB signalling, alongside the transcription of anti-apoptotic genes coding for Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1. IL-6 also supports tumour cell survival by inducing the expression of survivin through direct binding of STAT-3 to the survivin promoter. IL-6 is also implicated in the development of epithelial ovarian cancer induced ascites (26) and high levels of IL-6 have been found in ascites and serum. It is also associated with poor prognosis in patients. Moreover, upregulation of IL-6 expression have been observed in ovarian cancer samples (21, 26, 27). IL-6 has been correlated with tumor burden, optimal cytoreduction, ascites and survival in patients with ovarian cancer optimally resected disease (27-29). This effect is also controversial as other studies have failed to demonstrate a significant relation between IL-6 levels in serum, ascites or ovarian cancer samples, resistance to platinum-based chemotherapy and survival (30-32).

IL-6 could induce resistance towards anticancer therapy induced death pathways. Indeed, IL-6 confers protection from dexamethasone-induced apoptosis by activating PI3K/Akt signalling and inactivating caspase-9, thereby inhibiting apoptosis in multiple myeloma cells (21). IL-6/STAT3 is the main pathway through which IL-6 regulates tumor-promoting activities. Our results indicated that the activation of STAT3 was mediated by secreted factors present in the ascites. Therefore, we sought to block the STAT3 signalling pathway independently or in combination with conventional chemotherapy as a potential treatment strategy in tumors showing high levels of IL-6 in tumor microenvironment (21). Our results failed to demonstrate any reversion in the acquisition of chemoresistance using tocilizumab, an IL-6R blocking

antibody, both in IGROV-1 and JHOC5 cells treated with carboplatin in presence of ascites from patients. These results are concordant with other studies demonstrating poor effect of IL-6 inhibition in cell survival *in vitro*. Although IL-6 inhibition reduces constitutive production of inflammatory mediators, it does not impact tumor growth or cell survival because of the lack of stromal reaction (32). Indeed, results from *in vivo* models show that neutralizing IL-6 enhances therapeutic effect of paclitaxel in ovarian cancer mouse model, reducing tumor growth and angiogenesis (32). However, phase I/II trial of Siltuximab (anti-IL-6 monoclonal antibody) in ovarian cancer patients demonstrate a lack of clinical efficacy (33), arguing that IL-6 inhibition eliminates IL-6 sensitive clones, leading to the development of resistant clones whose growth is triggered by other pathways through such as the gp130 family (34). Indeed, serum concentrations of the gp130 subunit of the IL-6R were unaffected by siltuximab treatment in patients with ovarian cancer (33). The subunit gp130 activates cytoplasmatic tyrosine kinases, resulting in the phosphorylation of downstream transcription factors (21). In turn, IL-6 could triggers the PI3K/Akt, NF- $\kappa$ B and MAPK/ERK signalling pathways similarly to what has been observed in other tumors such as prostate cancer by upregulation of Cyclin A1 (35), or bladder cancer and multiple myeloma (21). Thus, secreted IL-6- could act in an autocrine manner on ovarian cancer cells surface receptors (34) as well as activating the PI3-Kinases.

Various genetic alterations that induce increased PI3K/AKT/mTOR signalling have been found in ovarian cancer. Somatic activating mutations in the PIK3CA gene were found in more than 10% of high grade serous and 40% of clear cell ovarian carcinoma (35) and constitutive activation of the PI3K/Akt/mTOR axis is known to confer drug resistance to many types of cancer. Therefore, we decided to investigate protein expression of the different PI3K isoforms in ovarian cancer. Isoform  $\alpha$  and  $\beta$  were highly expressed in HOCC and the acquisition of chemoresistance in HOCC through their culture with ascites was associated with the activation of PI3K/Akt and IL-6/STAT3 pathways. We focused then on the implication of p110alpha in platinum resistance, and on the combined inhibition of IL-6/STAT3 and p110alpha pathways to revert chemotherapy resistance. One of the major interests in using isoform-selective PI3K inhibitors is to reduce toxicity associated with the use of pan-PI3K inhibitors, in particular in combination therapies. We used shRNA instead of PI3KCA pharmacological specific inhibitor to better mimic the inactivation of the PI3KCA gene in tumor cells, avoiding p110alpha inhibition in stromal cells. Knockdown of p110alpha expression alone or in combination with IL-6/STAT3 inhibition did not reduce ovarian cancer cell resistance to carboplatin induced by ascites medium. This may be explained by the loss of negative feedback loops normally induced when the PI3K/AKT/mTor pathway is active (35). The effect of p110alphaA inhibition was associated with upregulation of another PI3K isoforms such as p110beta. mTOR1 and 2 expressions were not evaluated. As suggested by other authors, it is necessary to combine PI3K/AKT/mTor inhibitors with other agents to enhance their potential (36). Other ovarian cancer cell types might benefit more from targeting IL 6 and PI3K pathway, such as clear cell HOCC (JHOC5). A murine model of clear cell carcinoma of the ovary showed that PIK3CA mutations driven signalling loops to promote high levels of IL-6 production in the absence of

negative regulation by ARID1A (23). Another limitation of our study is the absence of co-culture with stromal components. Indeed, PI3K chemoresistance could be in partly mediated by other cells of tumor microenvironment as it has been shown in leukemia models. Bone marrow stroma protected acute myeloid leukemia cells from inhibition of an anti-CD44 Ab in part via PI3K/Akt signalling (37). Inhibition of p110alpha blocked stromal cell-derived migration, survival and reduced drug resistance in bone marrow stroma of chronic lymphocytic leukemia (16). In another model of osteosarcoma, mesenchymal stem cells medium promoted chemoresistance via IL6 secretion (38).

## **Conclusion**

IL-6/STAT3 and PIK3CA inhibition did not revert platinum chemoresistance in ovarian cancer and cannot be considered as a marker of sensibility to platinum-based chemotherapy. This dual inhibition could be further explored in ovarian cancer models including stromal microenvironment.

## **Conflicts of interest:**

Authors have no conflicts of interest to declare

## **Acknowledgement and funding:**

**ICR**



## References

1. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2015, *CA Cancer J. Clin.* 65 (2015) 5–29.
2. Tan, D.S.P., Agarwal, R., and Kaye, S.B. (2006). Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol.* 7, 925–934
3. Dobrzycka B et al. Serum levels of IL-6, IL-8 and CRP as prognostic factors in epithelial ovarian cancer. *Eur Cytokine Netw.* 2013
4. Wang et al. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 2010
5. Malek JA, Martinez A, et al. Gene expression analysis of matched ovarian primary tumors and peritoneal metastasis. *J Transl Med.* 2012;10:121.
6. Halabi NM, Martinez A, Al-Farsi H, Mery E, Puydenus L, Pujol P, Khalak HG, McLurcan C, Ferron G, Querleu D, Al-Azwani I, Al-Dous E, Mohamoud YA, Malek JA, Rafii A. Preferential Allele Expression Analysis Identifies Shared Germline and Somatic Driver Genes in Advanced Ovarian Cancer. *PLoS Genet.* 2016;12(1):e1005755.
7. Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie J, Mirshahi M, Couderc B. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer.* 2010;126(9):2090-101.
8. Castells M, Milhas D, Gandy C, Thibault B, Rafii A, Delord JP, Couderc B. Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis.* 2013;4:e887.
9. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:329-41.
10. Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, et al. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8292-7.
11. Berenjeno IM, Guillermet-Guibert J, Pearce W, Gray A, Fleming S, Vanhaesebroeck B. Both p110alpha and p110beta isoforms of PI3K can modulate the impact of loss-of-function of the PTEN tumour suppressor. *Biochem J* 2012;442:151-9
12. Burris HA 3rd. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Apr;71(4):829-42.
13. Pons-Tostivint E, Thibault B, Guillermet-Guibert J. Targeting PI3K Signaling in Combination Cancer Therapy. *Trends Cancer.* 2017 Jun;3(6):454-469.

14. Baer R, Cintas C, Therville N, Guillermet-Guibert J. Implication of PI3K/Akt pathway in pancreatic cancer: When PI3K isoforms matter? *Adv Biol Regul* 2015;59:19-35.
15. Baer R, Cintas C, Dufresne M, Cassant-Sourdy S, Schonhuber N, Planque L, et al. Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110alpha. *Genes Dev* 2014;28:2621-35.
16. Niedermeier M, Hennessy BT, Knight ZA, Henneberg M, Hu J, Kurtova AV, Wierda WG, Keating MJ, Shokat KM, Burger JA. Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood*. 2009;113(22):5549-57.
17. Yang L, Han S, Sun Y. An IL6-STAT3 loop mediates resistance to PI3K inhibitors by inducing epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell expansion in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;453(3):582-7.
18. J. Benard, S.J. Da, M.C. De Blois, P. Boyer, P. Duvillard, E. Chiric, and G. Riou, Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 45 (1985) 4970-4979
19. Anglesio MS, Wiegand KC, Melnyk N, Chow C, Salamanca C, Prentice LM, Senz J, Yang W, Spillman MA, Cochrane DR, Shumansky K, Shah SP, Kalloger SE, Huntsman DG. Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e72162.
- 20.
21. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol*. 2016;37(9):11553-11572.
22. Kolomeyevskaya N, Eng KH, Khan AN, Grzankowski KS, Singel KL, Moysich K, Segal BH. Cytokine profiling of ascites at primary surgery identifies an interaction of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in predicting reduced progression-free survival in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 20;138(2):352-7.
23. Chandler RL, Damrauer JS, Raab JR, Schisler JC, Wilkerson MD, Didion JP, Starmer J, Serber D, Yee D, Xiong J, Darr DB, Pardo-Manuel de Villena F, Kim WY, Magnuson T. Coexistent ARID1A-PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling. *Nat Commun*. 2015;6:6118.
24. Wang Y, Niu XL, Qu Y, Wu J, Zhu YQ, Sun WJ, et al. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*. 2010;295(1):110-23.

25. Wang Y, Li L, Guo X, Jin X, Sun W, Zhang X, et al. Interleukin-6 signaling regulates anchorage-independent growth, proliferation, adhesion and invasion in human ovarian cancer cells. *Cytokine*. 2012;59(2):228–36.
26. Lo CW, Chen MW, Hsiao M, Wang S, Chen CA, Hsiao SM, et al. IL-6 transsignaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2011;71(2):424–34.
27. Bonneau C, Rouzier R, Geyl C, Cortez A, Castela M, Lis R, Daraï E, Touboul C. Predictive markers of chemoresistance in advanced stages epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2015;136(1):112–20.
28. Berek JS, Chung C, Kaldi K, Watson JM, Knox RM, Martinez-Maza O. Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;164(4):1038–42.
29. Dobrzycka B, Mackowiak-Matejczyk B, Terlikowska KM, Kulesza-Bronczyk B, Kinalski M, Terlikowski SJ. Serum levels of IL-6, IL-8 and CRP as prognostic factors in epithelial ovarian cancer. *Eur Cytokine Netw*. 2013;24(3):106–13.
30. Masoumi-Moghaddam S, Amini A, Wei AQ, Robertson G, Morris DL. Intratumoral interleukin-6 predicts ascites formation in patients with epithelial ovarian cancer: A potential tool for close monitoring. *J Ovarian Res*. 2015;8:58.
31. Plante M, Rubin SC, Wong GY, Federici MG, Finstad CL, Gastl GA. Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 1994;73(7):1882–8.
32. Coward J, Kulbe H, Chakravarty P, Leader D, Vassileva V, Leinster DA, et al. Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:6083–96.
33. Angevin E, Tabernero J, Elez E, Cohen SJ, Bahleda R, van Laethem JL, Ottensmeier C, Lopez-Martin JA, Clive S, Joly F, Ray-Coquard I, Dirix L, Machiels JP, Steven N, Reddy M, Hall B, Puchalski TA, Bandekar R, van de Velde H, Tromp B, Vermeulen J, Kurzrock R. A phase I/II, multiple-dose, dose-escalation study of siltuximab, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2014;20(8):2192–204
34. Rossi JF, Lu ZY, Jourdan M, Klein B. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin Cancer Res*. 2015 Mar 15;21(6):1248–57.
35. Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, Persson JL. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer*. 2008;122(7):1521–9.
36. Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, Sasano T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015 Apr;137(1):173–9.

37. Chen P, Huang H, Wu J, Lu R, Wu Y, Jiang X, Yuan Q, Chen Y. Bone marrow stromal cells protect acute myeloid leukemia cells from anti-CD44 therapy partly through regulating PI3K/Akt-p27(Kip1) axis. *Mol Carcinog.* 2015;54(12):1678-85.
38. Avnet S, Di Pompo G, Chano T, Errani C, Ibrahim-Hashim A, Gillies RJ, Donati DM, Baldini N. Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF- $\kappa$ B activation. *Int J Cancer.* 2017 Mar 15;140(6):1331-1345.

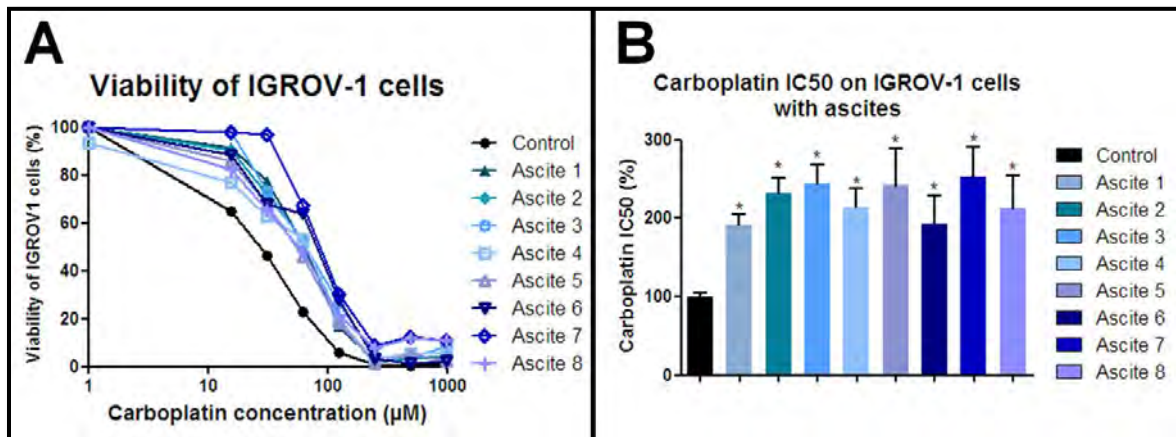
## Figure legends

Table 1

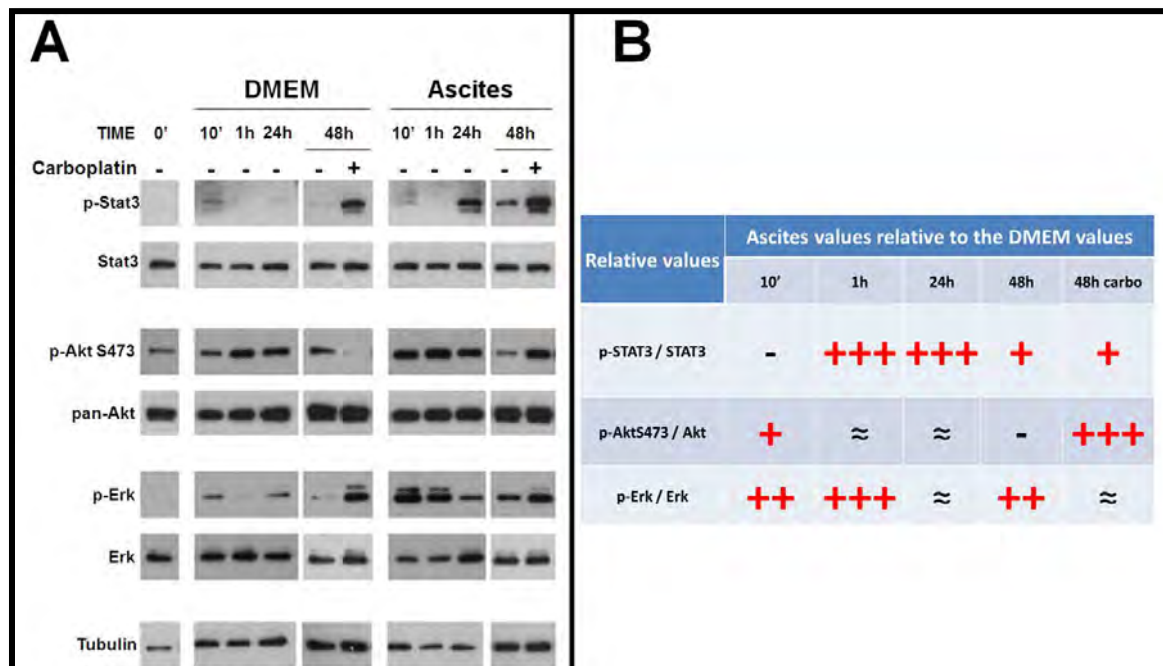
| Patient number | Age | Cancer                 | Type        | Grade      | Stade | PCI | Number of affected regions | Ascite volume (L) | Chemotherapies before collection | Chemotherapies after collection       | Sensitivity | Relapse                          | Death |
|----------------|-----|------------------------|-------------|------------|-------|-----|----------------------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------|----------------------------------|-------|
| 1              | 76  | Ovarian adenocarcinoma | Serous      | Low-grade  | IIIc  | 9   | 5                          | 1,2               | No                               | Carboplatin + paclitaxel              | Sensitive   | No recurrence even after 5 years | No    |
| 2              | 77  | Ovarian adenocarcinoma | Serous      | High-grade | III   | 34  | 13                         | 5,4               | No                               | Carboplatin monothérapie              | Refractory  | During treatment                 | Yes   |
| 3              | 80  | Ovarian adenocarcinoma | Serous      | High-grade | IV    | ND  |                            | ND                | No                               | Carboplatin + paclitaxel              | Refractory  | During treatment                 | Yes   |
| 4              | 66  | Ovarian adenocarcinoma | Serous      | High-grade | III   | 20  | 10                         | 4                 | No                               | Carboplatin + paclitaxel              | Sensitive   | 48 months                        | No    |
| 5              | 75  | Ovarian adenocarcinoma | Serous      | High-grade | III   | 20  | 13                         | 5                 | No                               | Carboplatin + paclitaxel              | Sensitive   | 20 months                        | No    |
| 6              | 59  | Ovarian adenocarcinoma | Serous      | High-grade | III   | 26  | 11                         | 0,2               | Carboplatin + paclitaxel         | Carboplatin + paclitaxel              | Refractory  | During treatment                 | Yes   |
| 7              | 74  | Ovarian adenocarcinoma | Clear cells | ND         | IIIc  | ND  | ND                         | ND                | Carboplatin + paclitaxel         | Paclitaxel + bevacizumab + everolimus | Refractory  | During treatment                 | Yes   |
| 8              | 66  | Ovarian adenocarcinoma | Serous      | High-grade | III   | 27  | 11                         | 5,4               | No                               | Carboplatine + paclitaxel             | Sensitive   | 7 months                         | Yes   |

**Figure 1.** Ascites protect HOCC from carboplatin-induced growth inhibition. HOCC cultured alone or in the presence of 8 different Ascites were treated with increasing concentrations of carboplatin for 48 h. A) Cell viability was reported for IGROV-1 cells. The IC50 correspond to 50% viability. B) IC50

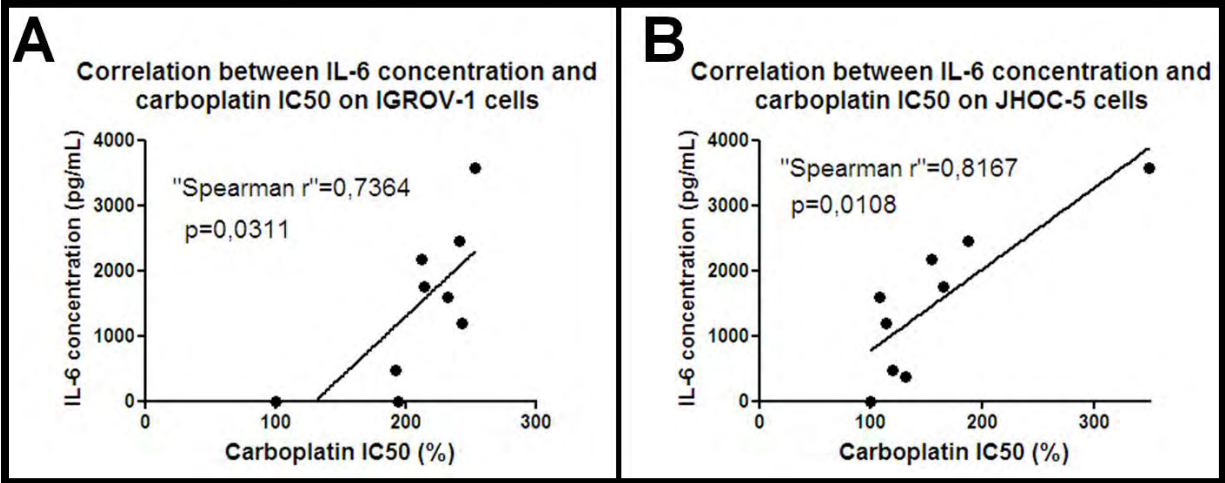
values are reported in the histograms below. Results correspond to mean  $\pm$  SEM of triplicates. Data are representative of three independent experiments.



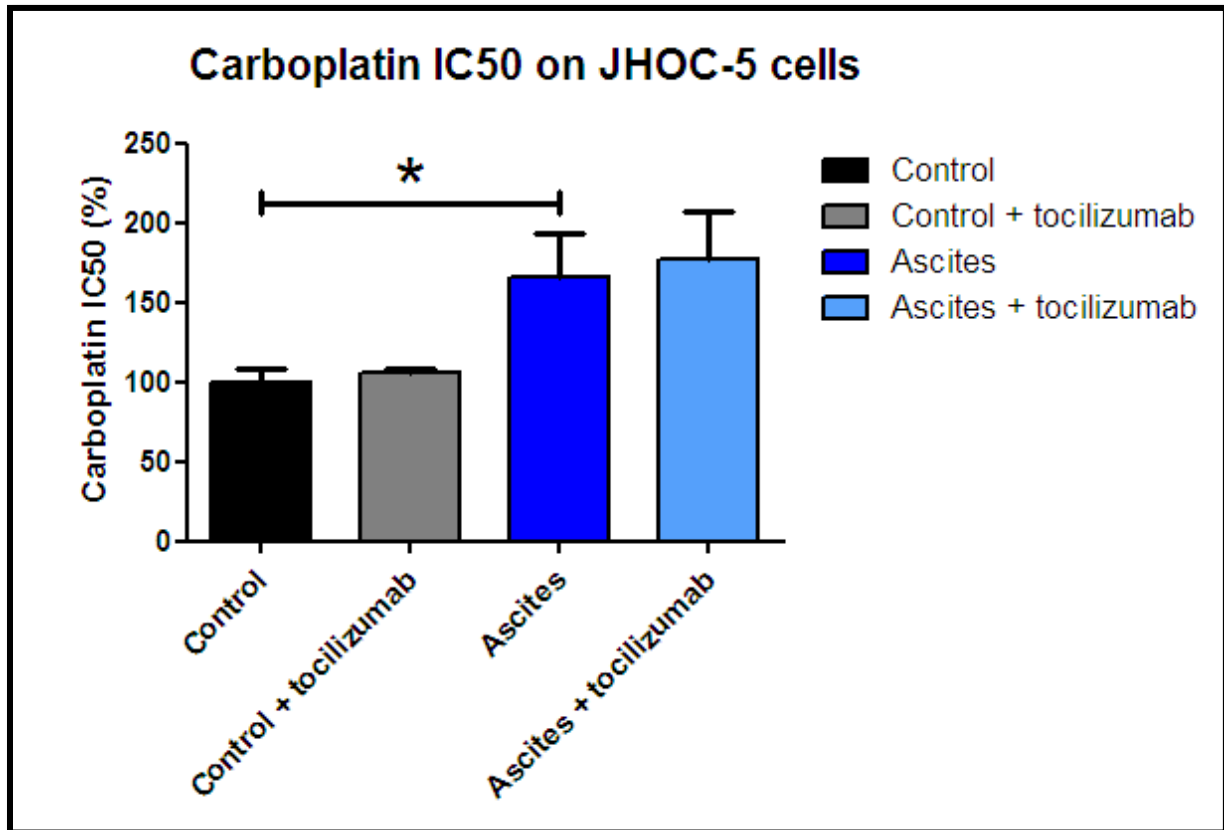
**Figure 2.** PI3K/AKT, STAT3 and MAPK protein pathway activation after IGROV-1 incubation with ascites and treatment with carboplatin. Tubulin has been used as a control. (a) IGROV-1 cells were exposed or not (DMEM) with ascites and at various time after Akt, Erk and Stat3 level and their activating phosphorylation were analyzed by Western Blot. Twelve hours after cell seeding, they were treated with or without carboplatin for 36h. The phosphorylated protein of Akt, erk and Stat 3 expression was normalized to their corresponding total protein. Results were represented in fold induction compared to the respective untreated control. + = fold induction  $\geq 1,5$  and  $< 5$ ; ++ = fold induction  $\geq 5$  and  $< 10$ ; +++ = fold induction  $\geq 10$ ; - = decreased expression;  $\approx$  = stable expression. Data are representative of three independent experiments.



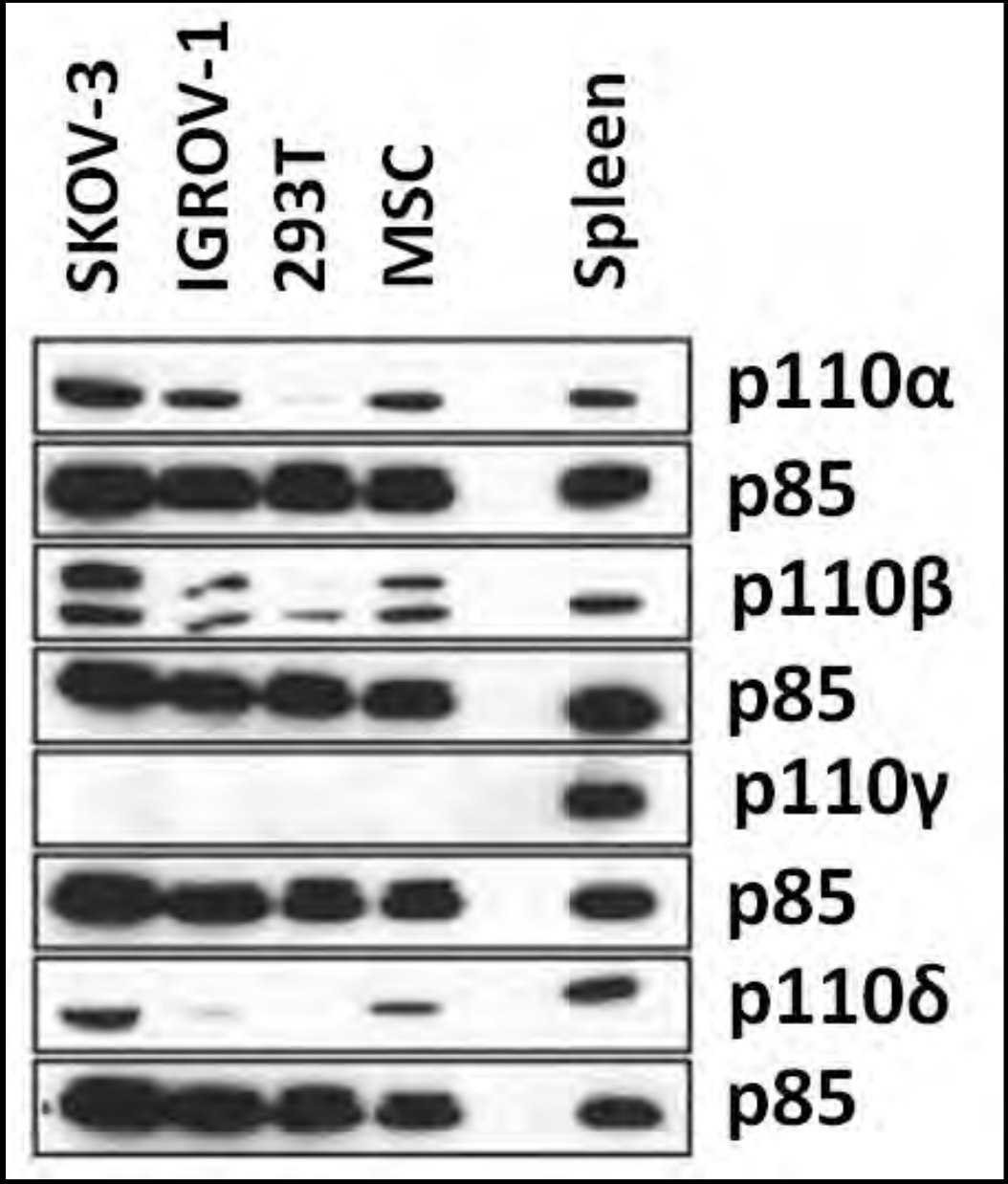
**Figure 3.** Correlation between IL-6 and chemoresistance: IGROV-1 cells (A) or JHOC-5 cells (B) were exposed to ascites containing different concentration of IL-6. 12 hours after cells were treated with different concentrations of carboplatin and cell viability was evaluated 48 hours later. IC50 of carboplatin was determined and correlated with the amount of IL-6. Spearman rank correlation was used to test the correlation between IC50 and IL-6 concentration in ascites.



**Figure 4.** Effect of tocilizumab treatment on ascites in the chemoresistance acquisition of HOCC JHOC-5. Cells were treated with 8 different ascites combined or not with tocilizumab (1 $\mu$ M) for 12 hours. Carboplatin has been added and cell viability was evaluated 48h after. Results correspond to mean  $\pm$  SEM of triplicates from 8 different ascites.

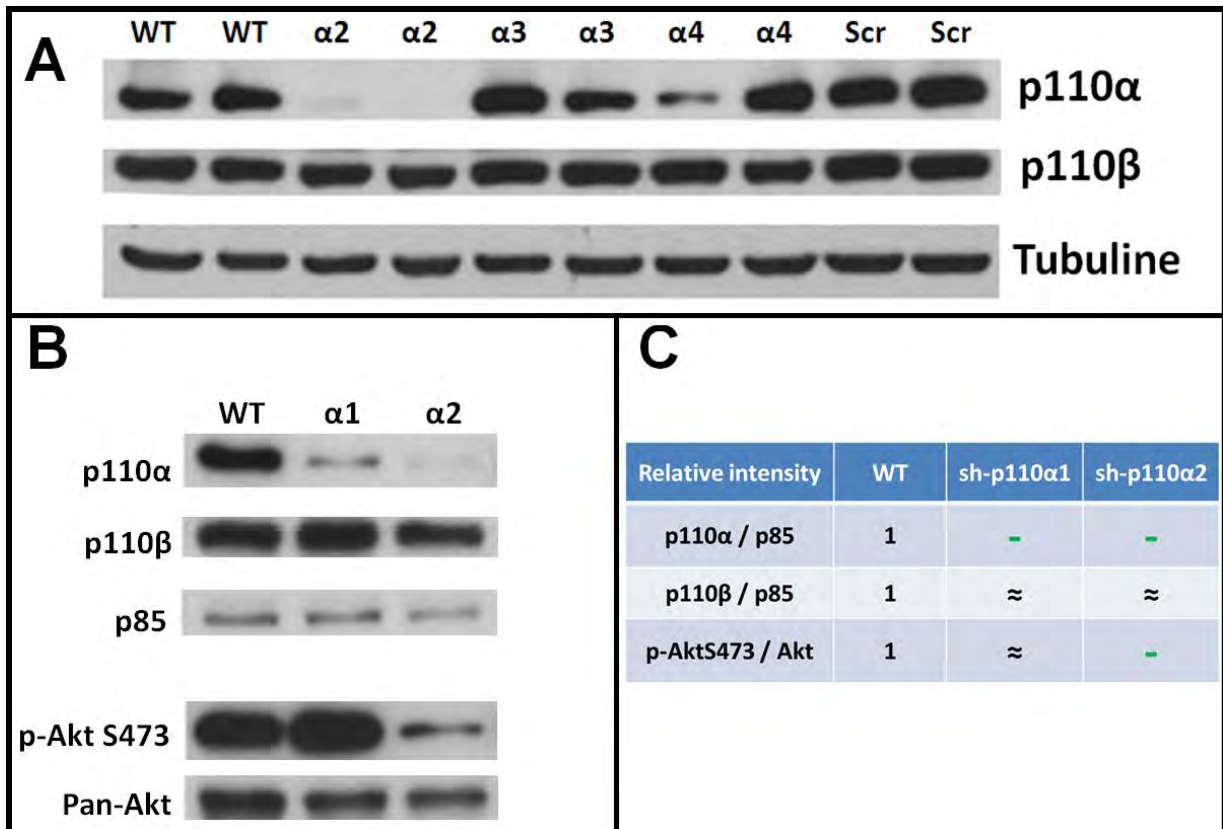


**Figure 5:** Western Blot analysis demonstrating expression of different class I PI3K isoforms on two HOCC lines as well as on tumor microenvironment cell : MSC. Human Embryonic kidney cells (HEK 293) were used as negative control while Splenic tissue was used as positive control. PI3K isoforms expression were normalized to p85 expression

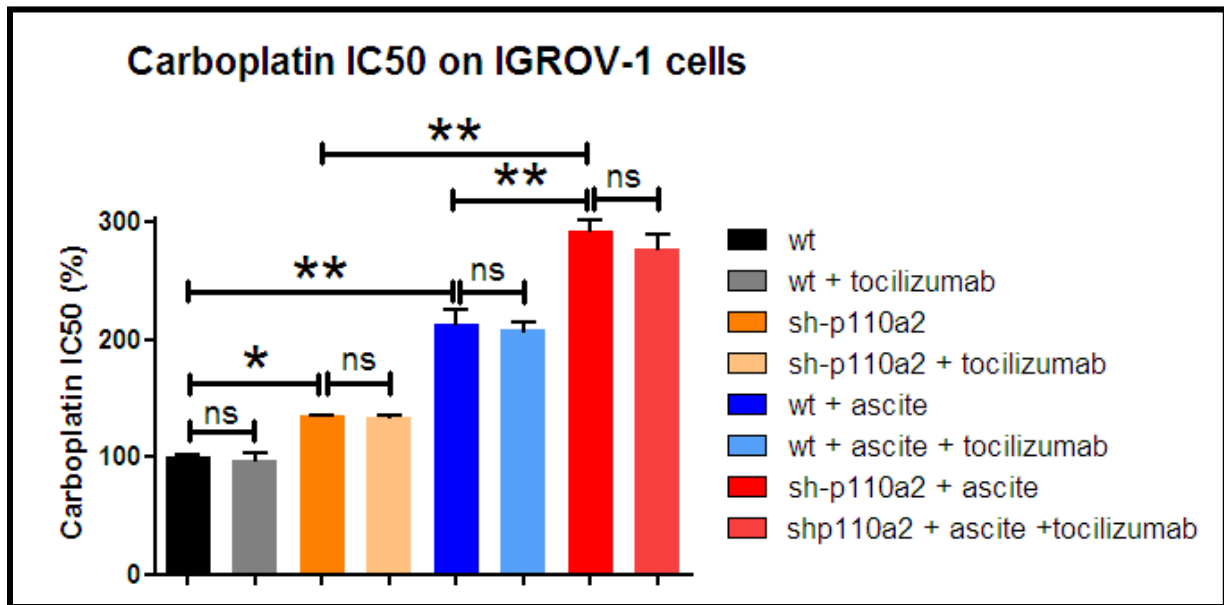




**Figure 6: A,** Western Blot analysis demonstrating the inhibition of the various type I PI3K isoforms on one ovarian cancer cell line using control scramble shRNA (wt) or shRNA directed against PI3KCA ( $\alpha 1$  to  $\alpha 4$ ). **B** Western Blot analysis demonstrating the effect of this inhibition on the phosphorylation of S473 Akt. PI3K isoforms expression as well as S473Akt expression were normalized to p85 expression



**Figure 7.** Ascites protect HOCC from carboplatin-induced growth inhibition even in the presence of tocilizumab. Control or PI3KCA inhibited IGROV-1 cells cultured alone or in the presence of a mix of different ascites in addition with tocilizumab were treated with increasing concentrations of carboplatin for 48 h. Cell viability (IC50 values) was reported for IGROV-1 cells. The results correspond to mean  $\pm$  SEM of triplicates. Data are representative of two independent experiments.



**Publication 2 : Revue bibliographique publiée dans un chapitre de livre**

**Le Naour A. & Couderc B.**

**Role of MSCs in Antitumor Drug Resistance.**

**in *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators* 295–333 (Elsevier, 2017).**

# Role of MSCs in Antitumor Drug Resistance

A. Le Naour<sup>1,2,3</sup>, B. Couderc<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>UNIVERSITY OF TOULOUSE III PAUL SABATIER, TOULOUSE, FRANCE; <sup>2</sup>CANCER RESEARCH CENTER OF TOULOUSE (CRCT), TOULOUSE, FRANCE; <sup>3</sup>INSTITUT UNIVERSITAIRE DU CANCER, TOULOUSE, FRANCE

## CHAPTER OUTLINE

|   |            |
|---|------------|
| <b>Introduction</b> .....   | <b>296</b> |
| <b>Chemoresistance</b> .....  | <b>296</b> |
| <i>Chemotherapeutic Agents</i> .....  | 296        |
| <i>Pharmacokinetic Resistance</i> .....   | 297        |
| <i>Pharmacodynamic Resistance</i> .....   | 297        |
| <i>Resistance Mechanisms Upstream of the Target</i> .....                           | 297        |
| <i>Resistance Mechanisms Located at the Target</i> .....                            | 297        |
| <i>Resistance Mechanisms Post-Target</i> .....                                      | 298        |
| <b>Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs) and Cancer</b> .....                       | <b>298</b> |
| <i>MSC/Tumor Cell Interactions</i> .....  | 299        |
| <i>Attraction of the Tumor Cells to the Bone Marrow or a Metastatic Niche</i> ..... | 299        |
| <i>Recruitment of MSCs to the Tumor Site</i> .....                                  | 299        |
| <i>Is There a Specific Phenotype for Carcinoma-Associated MSCs (CA-MSCs)?</i> ..... | 300        |
| <i>MSCs: Pro- or Antitumoral?</i> .....   | 300        |
| <b>MSCs and Chemoresistance Acquisition by Tumor Cells</b> .....                    | <b>301</b> |
| <b>Resistance Mechanisms Revealed Upon Direct Contact With Tumor Cells</b> .....    | <b>302</b> |
| Modification of Channel Expression at the Surface of Tumor Cells.....               | 302        |
| Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance (CAM-DR).....                                | 306        |
| Cell Cycle Arrest, Quiescent State.....   | 306        |
| <b>Mechanisms of Resistance Related to the Secretion of Soluble Factors</b> .....   | <b>309</b> |
| Resistance Acquisition Mediated by the SDF-1/CXCR4 Axis.....                        | 309        |
| Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived IL-6 Secretion.....                  | 313        |
| <i>MSCs and IL-6</i> .....  | 314        |
| <i>Activation of Cytokine Synthesis Through IL-6 Secreted by MSCs</i> .....         | 314        |
| <i>Activation of the STAT3 Pathways Through MSC-Secreted IL-6</i> .....             | 314        |
| Resistance Acquisition Mediated by Activation of the PI3K/Akt Pathway.....          | 316        |

|   |            |
|---|------------|
| Resistance Acquisition Mediated by Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway .....       | 316        |
| Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived Fatty Acids.....                         | 317        |
| Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived GDF-15 Secretion .....                   | 317        |
| Resistance Acquisition Mediated by Amino Acid Supplementation.....                      | 318        |
| Resistance Acquisition Mediated by Activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway..... | 318        |
| Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived miRNA .....                              | 319        |
| Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived Exosomes.....                            | 319        |
| <b>Increased Expression of Antiapoptotic Proteins.....</b>                              | <b>320</b> |
| <b>Effect of Mesenchymal Stem/Stromal Cells on Gene Expression.....</b>                 | <b>322</b> |
| <b>Discussion .....</b>   | <b>322</b> |
| <b>List of Acronyms and Abbreviations .....</b>   | <b>325</b> |
| <b>References .....</b>   | <b>326</b> |

## Introduction

### Chemoresistance

#### *Chemotherapeutic Agents*

Cancer treatment requires the use of chemotherapy acting effectively on tumor cells. Anti-cancer drugs used nowadays are often divided into two classes: cytotoxic agents and targeted therapies.

“Traditional generation” chemotherapies are also called cytotoxic agents. They target cells with quick division rates such as tumor cells and are separated into several classes according to their chemical structures and their mechanism of action: alkylating agents, antimetabolites, intercalating agents (anthracyclines), topoisomerase inhibitors, mitotic inhibitors [microtubules polymerization (vinca-alkaloids) or depolymerization (taxanes) inhibitors of the mitotic spindle], splitting agents, etc. These drugs are not very specific of tumor cells and kill healthy dividing cells. Thus, “new-generation” molecules are now developed with the aim to target, more specifically, characteristics of tumor cells to treat more effectively as well as to reduce the occurrence of adverse effects.

“New-generation” chemotherapies are often called targeted therapies. They target molecular aberrations found in a tumor. Thus, these therapies are used depending on abnormalities detected in cancer cells [eg, use of imatinib in chronic myeloid leukemia (CML) with the presence of BCR-ABL, a 210-kDa fusion protein obtained after juxtaposition of the *Abelson (Abl)* gene to a part of the *Bcr (breakpoint cluster region)* gene] or in the tumor microenvironment [eg, use of antivascular endothelial growth factor (VEGF) in cancers where angiogenesis is a key mechanism in tumor development].

However, the efficacy of these drugs may be impaired due to drug resistance mechanisms. Resistance to cytotoxic agents is a major problem facing the treatment of many cancers. The capacity of tumor cells to mutate, due to their genetic instability, leads to the acquisition of resistance during cancer development and allows their metastatic spread.

The drug resistance of tumor cells to anticancer drugs occurs via two major mechanisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic resistance.

#### *Pharmacokinetic Resistance*

Many drugs are distributed in the body and therefore into the tumor via the blood. Thus, pharmacokinetic resistance can occur in cases where the tumor is inaccessible to anticancer drugs due to it being slightly vascularized or with deficient blood flow and high interstitial pressure that prevents drugs from penetrating the tumor mass<sup>1-4</sup> or it is difficult to access in terms of location, for example, when the drug requires traversing the blood-brain barrier.<sup>5</sup> Another influencing factor is interindividual variation. Indeed, pharmacokinetic parameters such as absorption, distribution, metabolism, and excretion significantly affect the efficacy or the toxicity of drugs. In individual patients, these parameters may vary depending on genetic factors, age, sex, weight, condition of the liver or kidney function, or considerations with regards to the time of administration.<sup>6-8</sup> This can lead to resistance to certain drugs in patients (eg, inactivation of the drug by a more rapid metabolism).

#### *Pharmacodynamic Resistance*

Pharmacodynamic resistance can involve several mechanisms, each comprising several processes. One of mechanisms is prevention of the drug to reach its therapeutic target. Other pharmacodynamic resistance-related mechanisms can be due to a modification at the target (by changes in expression levels or mutations) and, finally, some mechanisms come into play post-target, which inhibit the effect of drugs.<sup>9-11</sup>

#### *Resistance Mechanisms Upstream of the Target*

There are several ways to prevent a drug from reaching its therapeutic target. These include uptake of drug, such as a decrease in the expression of transporters implicated in the drug entry. Moreover, the drug efflux is also involved. Indeed, the overexpression of efflux proteins, for example, multidrug resistance (MDR) proteins or P-glycoprotein (Pgp), results in a greater flow of drug from the cancer cell cytoplasm to the extracellular environment and an insufficient intracellular concentration to allow an effect at its target. These pre-target resistance mechanisms also involve drug activation or inactivation.<sup>9-11</sup> For example, a reduction in the metabolic activation of prodrugs thus hindering their acquiring anti-tumor potential [that is the case of the chemotherapy agents cytarabine, 5-fluorouracil (5-FU), methotrexate, doxorubicin, etc.] or an increase in the inactivation of a drug that can be either nonspecific (such as for glutathione or metallothioneins) or specific (for example, cytarabine is inactivated by cytidine deaminase, 5-FU by dihydropyrimidine dehydrogenase and bleomycin by hydrolase), all of which can confer drug resistance.<sup>9-11</sup>

#### *Resistance Mechanisms Located at the Target*

Concerning the resistance mediated through modification of the target, these can be induced by qualitative changes, for example, increased expression of class III  $\beta$ -tubulin (a microtubule protein of the tubulin family) leads to drug resistance directed against tubulin, taxanes, and

vinca alkaloids.<sup>12</sup> Changes in topoisomerase II (this enzyme is able to cause double strand breaks in order to modulate DNA supercoils) confer resistance to anthracycline, and increased enzymatic activity of thymidylate synthetase (enzyme involved in the thymine synthesis) results in resistance to 5-FU. Quantitative changes of the target, which can be either related to an increase in its expression due to overexpression, amplification, or in some cases a decrease in its expression, may also alter drug efficacy. In the case of DNA binding molecules, an overexpression of DNA repair mechanisms [for example: an increase in excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) conferring resistance to alkylating agents or platinum compounds] is implicated in resistance mechanisms located at the target.<sup>9-11</sup>

#### *Resistance Mechanisms Post-Target*

Even if the drug correctly reaches its target, several mechanisms of resistance can occur at this stage. These can be divided into the following two types.

One mechanism is the resistance to apoptosis. Indeed, some chemotherapies lead cells to apoptosis after reaching their target. However, cells may be resistant to this cell death pathway by increased expression of antiapoptotic proteins [c-inhibitor of apoptosis protein (cIAP)-1/2, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), etc.], a loss of function of p53 (transcription factor involved in the regulation of apoptosis) but also by other mechanisms such as the activation of signaling pathways involved in cell survival.<sup>9-11</sup> A modification of the cell cycle may also be involved in the post-target resistance. Indeed, especially for chemotherapies of the “traditional generation” that target rapidly dividing cells, slowing or stopping the cell cycle as a state of quiescence and senescence may lead to resistance to treatment despite drugs attaining their targets.<sup>9-11</sup>

In recent years, drug resistance has been revealed to involve not only genetic changes occurring in cancer cells, but also modifications induced by the tumor microenvironment. Indeed it has been suggested that interactions between tumor cells and both the extracellular matrix and the stromal cells are important in the acquisition of chemoresistance. Among cells of the microenvironment, mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) have been shown to induce drug resistance in many cancers (Tables 13.1–13.5). This resistance may be induced by:

- The secretion of soluble factors by MSCs or the tumor cells themselves upon their association;
- An exchange of membrane proteins between MSCs and tumor cells leading to the acquisition of new properties by the tumor cells;
- The direct contact between MSCs and tumor cells.

Together, these processes of interaction between tumor cells and their microenvironment result in the activation of several signaling pathways.

### **Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs) and Cancer**

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) belong to a heterogeneous cell population of multipotent cells able to differentiate *in vitro* into cells of mesodermal lineage, such as adipogenic,

osteogenic, and chondrogenic cells, fibroblasts, and vascular and perivascular structures. MSCs are believed to possess hallmark characteristics of stem cells with regards to their self-renewal and differentiation properties.<sup>13</sup> MSCs show plastic adherence and present surface expression of several markers such as CD73, CD90, and CD105. They do not express the hematopoietic markers CD45, CD19, CD14, CD11b, or HLA-DR.<sup>14</sup> While they were first identified as a subpopulation of bone marrow cells with osteogenic potential, MSCs can be derived from several tissues. Indeed, MSCs can be obtained not only from the bone marrow but also from adipose tissue (AT-MSCs) and from a variety of other tissues including placenta, skin, umbilical cord, blood, etc.<sup>15–18</sup> MSCs play a major role in tissue homeostasis and regeneration. They participate in tissue repair through their specific tropism toward injured sites, where they could differentiate into mesodermal cell types,<sup>19–21</sup> and could contribute toward tissue healing mainly through the secretion of paracrine factors.<sup>22–28</sup> MSCs also serve as niche cells for other cell types by regulating regenerative processes such as hematopoietic cell expansion and hematopoietic stem cell regulation. In addition, MSCs have a role in immune tolerance, through their immunosuppressive effects on T lymphocytes and dendritic cells,<sup>29,30</sup> thus preventing immunoreaction in both physiological and pathological conditions. Finally, their ability to secrete various neurotrophic and antiinflammatory factors, along with the ability to differentiate into a neural phenotype, could confer neuroprotective effects in models of amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis, Parkinson's disease, and glaucoma.<sup>31–37</sup> For all these reasons, MSCs represent a heterogeneous cell population that could be highly suitable for cell therapies in regenerative medicine.<sup>38–40</sup>

#### *MSC/Tumor Cell Interactions*

A major characteristic of MSCs is their potential to migrate to sites of injury. MSCs can thus be found closely associated with both solid and hematologic malignancies and can be either recruited to the tumor sites or attract tumor cells to the bone marrow.<sup>41</sup>

#### *Attraction of the Tumor Cells to the Bone Marrow or a Metastatic Niche*

Uchiyama et al. described that bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) may affect developing hematopoietic cells via direct cell-to-cell interactions and/or by the release of growth and differentiating factors. They showed that adhesion of myeloma cell lines to MSCs permitted cell-to-cell contact and facilitated stimulation of IL-6 secretion by MSCs in a paracrine growth mechanism, pointing at the interaction between tumor cells and MSCs.<sup>42</sup> Data shows that tumor cells could be chemoattracted by, and further interact, with MSCs. Additionally, other progenitor cells such as hematopoietic bone marrow progenitors actively participate toward constituting a permissive niche for metastatic cells by recruiting, and interacting with, tumor cells.<sup>43,44</sup>

#### *Recruitment of MSCs to the Tumor Site*

MSCs from the bone marrow are present in the tumor microenvironment.<sup>45,46</sup> Kidd et al. showed that MSCs intravenously injected into a tumor-bearing animal are attracted to the tumor.<sup>47</sup> The chemoattraction of MSCs has been shown to depend, at least in part,



on a number of chemokines and other cytokines such as IL-1<sup>48</sup> and SDF-1, among others.<sup>49</sup> MSCs are actively recruited to the tumor stroma where they interact with malignant cells via direct contact and through paracrine signaling. Through such cross talk they substantially affect the biology and phenotype of cancer cells, enhancing their migratory and metastatic capacity and conferring resistance to chemotherapy via an increase in cell adherence, invasion, proliferation, and chemoresistance.<sup>44,50-56</sup>

#### *Is There a Specific Phenotype for Carcinoma-Associated MSCs (CA-MSCs)?*

Just as the previously mentioned tumor cell biology is affected by MSCs, it is reasonable to assume that the tumor cells may in turn affect MSC biology. A difference between phenotypes of CA-MSCs and BM-MSCs has been suggested. Rafii et al. isolated a new type of stromal cell from ascites of ovarian cancer-bearing patients, that were found closely associated with the tumor cells.<sup>57</sup> They defined these cells as mesothelial-like stem cells (named hospicells), as they presented a typical fibroblast-like morphology and expressed markers such as CD9, CD10, CD29, CD73, CD146, and CD166, though lacking expression of CD45 and CD34. To evaluate whether these cells derived from MSCs, their properties were analyzed using BM-MSCs as the control. The results indicated similarities between these isolated cells and MSCs, which led them to redefine the mesothelial-like stem cells as carcinoma-associated MSCs (CA-MSCs).<sup>57-59</sup>

We and others have failed to find any major differences in terms of phenotype or properties between these CA-MSCs (hospicells) and BM-MSCs,<sup>58,59</sup> although Bochet et al. have reported that either BM-MSCs or AT-MSCs could acquire a fibroblastic phenotype upon contact with the tumor.<sup>60</sup>

#### *MSCs: Pro- or Antitumoral?*

Some publications have mentioned a potential antitumoral role of MSCs. Takahara et al. described that the injection of AT-MSCs at the same time as cancer cells into mice induced a slowing down of tumor proliferation.<sup>61</sup> However, most of the published data support a protumoral effect of MSCs, mainly through the release of activating factors such as cytokines and growth factors. MSCs are able to stimulate tumor growth in vivo, increase angiogenesis and favor metastasis development. As an example, MSCs have been shown to contribute toward ovarian cancer tumorigenicity through the altered production of the bone morphogenetic proteins (BMPs) BMP2, BMP4, and BMP6, leading to an increase in ovarian cancer cell proliferation both in vitro and in vivo.<sup>62</sup>

The protumoral effect of the CA-MSCs could be attributed to their effect on angiogenesis through the release, by themselves and by surrounding cells including tumor cells,<sup>63</sup> of proangiogenic factors such as IL-6, VEGF, IL-8, and hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ). MSCs are also able to inhibit the immune response mediated by T lymphocytes. The abrogation of the immune response contributes toward tumor expansion.<sup>29,30</sup> Karnoub et al. demonstrated that the injection of BM-MSCs plus breast cancer cells resulted in an increase in the metastatic potential of tumor cells through chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) cytokine release.<sup>54</sup> In addition, MSCs may indirectly contribute toward

tumor progression through their action on other stromal cells within the tumor, such as macrophages. Such activated macrophages present a particular phenotype, secrete high amounts of VEGF and thus promote angiogenesis.<sup>63</sup>

In summary, CA-MSCs appear not only to promote cancer cell proliferation and angiogenesis *in vivo*<sup>58</sup> but they may also be implicated in the acquisition of chemoresistance shown by cancer cells treated with different chemotherapy agents (carboplatin, paclitaxel). This acquired chemoresistance could have occurred via: (1) the release of soluble factors by MSCs (IL-6, IL-8, VEGF)<sup>58,59,63</sup>; (2) an exchange of membrane proteins between MSCs and tumor cells;<sup>57</sup> or (3) through the direct interaction within tumor cells.<sup>57</sup>

### MSCs and Chemoresistance Acquisition by Tumor Cells

If chemoresistance of tumor cells could be associated to their accumulation of genetic mutations, the same may be true for stromal cells and MSCs. Indeed, Mueller et al. mentioned that human MSCs (hMSCs) should be resistant to chemotherapeutic damage.<sup>64</sup> This assumption was supported by different reports showing an *in vitro* resistance of hMSCs to chemotherapeutic substances. Considering the proapoptotic effects of most chemotherapeutic drugs, these authors suggested that the resistance of hMSCs against drug-caused genotoxic damage could be associated with their resistance to the induction of apoptosis. Mueller et al. demonstrated that hMSCs isolated from bone marrow samples of patients after high-dose or standard chemotherapy were resistant to chemotherapeutic substances which present different mechanisms of action (cyclophosphamide, vincristine, cytarabine, mercaptopurine, methotrexate, asparaginase, doxorubicin, thioguanine, teniposide, idarubicin, melphalan, carboplatine, etoposide, ifosfamide, epirubicin, cladribine) and had maintained their characteristics (phenotype, proliferation capacity, and multipotent differentiation potential) despite the chemotherapeutic treatment.<sup>64</sup> They analyzed the *in vitro* response of hMSCs from chemotherapy-exposed and nonexposed bone marrow (BM) to chemotherapeutic substances displaying different mechanisms of action in comparison with a cell line of known high sensitivity. hMSCs from nonexposed and chemotherapy-exposed BM showed similar sensitivity to cisplatin, vincristine, and etoposide. However, hMSCs were more resistant to these drugs compared with a tumor cell line, and retained their stem cell characteristics after genotoxic treatment *in vitro*. Similarly, Beane et al. were able to show that AT-MSCs retained their regenerative potential after treatment with carboplatin.<sup>65</sup> The fact that these cells are still present even after treatment implies that they should indeed play a role in resistance to cancer treatments, their chemoprotective effect persisting after several chemotherapy cycles.

Beside their stimulatory effect on tumor progression and invasion, several reports have suggested that MSCs could contribute toward altering the resistance of tumor cells to different drugs. *In vitro* and *in vivo* data reported over the past decade highlighted the importance of the BM microenvironment and in particular of MSCs in the protection of tumor cells, including chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other leukemia cells, from drug-induced apoptosis.<sup>56,66–68</sup> This protective effect appears to concern both murine and human MSCs and be regardless of tumor cell origin, solid or hematologic. As an example,

Kurtova et al. found that both murine and human MSCs were highly effective in protecting CLL cells from chemotherapies. The mechanism involved was found to be cell adhesion-mediated drug resistance, which is increasingly recognized as that accounting for residual disease and relapses after conventional treatment of hematopoietic and other malignancies. The protective effect could be obtained with a ratio as small one MSC to 100 tumor cells.<sup>68</sup> The chemoresistance conferred by MSCs to tumor cells works against a large number of molecules belonging to different subclasses (taxans, platinum salts, fludarabine, dexamethasone, etc.). As an example, MSCs protected tumor cells from dexamethasone-fludarabine-, platinum salt-, and cyclophosphamide-induced apoptosis.<sup>68</sup> Although MSC effects on tumor cell chemoresistance are mostly described in hematologic cancers, MSCs are also implicated in the drug resistance shown by breast cancer, ovarian adenocarcinoma, and lung cancer, among others. However, mechanisms and cellular pathways which are activated by MSCs are different from one model to another. The different mechanisms will be depicted here.

## Resistance Mechanisms Revealed Upon Direct Contact With Tumor Cells

Uchiyama et al. showed that the adhesion of tumor cells to MSCs induced the secretion of IL-6 by tumor cells. The authors characterized the adhesion of tumor cells (myeloma-derived cell lines) to MSCs using 51 chromium binding assays and then analyzed the effect of this adhesion on the DNA synthesis and IL-6 secretion in tumor cells, induced by MSCs. They concluded that the cell-to-cell contact facilitated tumor cell IL-6 secretion<sup>42</sup> and this secretion was involved in the chemoresistance acquisition.<sup>56,67,69–72</sup> In the same way, Kurtova et al. showed that the protective effect conferred by MSCs on leukemia cells was largely dependent on their direct cell-to-cell contact, as that separation of the cells by micropore filters abrogated the protective function of MSCs.<sup>68</sup>

Lastly, Jin et al. reported a chemoprotective role of MSCs to imatinib that involved cell-to-cell contact between MSCs and tumor cells via integrin-linked kinase. In fact, these authors showed that the inhibition of this integrin-linked kinase leads to growth inhibition and increased apoptosis induced by imatinib on leukemia cells when cocultured with MSCs.<sup>73</sup>

## Modification of Channel Expression at the Surface of Tumor Cells

The flow of drugs is an important consideration in cancer drug efficacy, and concerns both the level of intracellular uptake of the molecule necessary to induce a cytotoxic effect and its efflux into the extracellular medium that effectively decreases the amount reaching the target and thus its efficacy. Many cellular pumps or channels are involved in mechanisms of drug resistance of tumor cells to treatment. One well-described mechanism is the overexpression of proteins involved in resistance to several drugs, leading to an MDR state. MDR proteins are ATP-dependent pumps that can confer resistance to many drugs

including taxans, vinca alkaloids, and anthracyclines.<sup>74</sup> An increase in the expression of these pumps and thus the resistance of tumor cells to treatment could be induced by the stroma (Table 13.1).

Rafii et al. showed that hospicells (assimilated to CA-MSCs isolated from patients with ovarian cancer) were able to directly interact with epithelial ovarian cancer cells. They demonstrated that hospicells specifically associated with tumor cells via their pseudopods, by membrane contact over a large surface area, and through tight junctions such as desmosomes. Using transwell experiments, the authors investigated the potential role of these hospicells in chemoresistance and found that coculturing hospicells and epithelial ovarian cancer cells induced a chemoresistant profile on the tumor cells, mediated by direct cell-to-cell contact.<sup>57</sup> They suggested different mechanisms to explain the chemoresistance acquisition by the cancer cells, including the transfer of molecules through gap junctions, or coupling through ligand–receptor interactions. Electron microscopy morphological analysis of the interactions between CA-MSCs and cancer cells finally led the authors to suggest the occurrence of “oncologic synapses” (also named oncologic trogocytosis) as compared to “immunological synapses.” These interactions induced the capturing of patches of the hospicell membrane by the cancer cell surface in an active process referred to as trogocytosis. This transfer of membrane proteins led to tumor cells to acquire new proteins at their cell surface, in particular MDR proteins, and thus to acquire new properties. The authors observed that this exchange allowed the acquisition by ovarian tumor cells of MDR proteins and Pgp, expressed initially by the CA-MSCs isolated from patients with ovarian cancer (hospicells). Coculture with these CA-MSCs led to an increase in the resistance of ovarian tumor cells to paclitaxel and carboplatin; blocking the efflux pumps restored the sensitivity to paclitaxel and carboplatin.<sup>57</sup>

Lis et al. demonstrated transcriptomic changes induced by MSCs on cancer cells. The authors performed cell sorting and transcriptomic analysis on cocultures of two different ovarian cancer cell lines with MSCs. After 24 h, the mono- or cocultures were treated for another 24 h with 90  $\mu$ M cisplatin and 6 nm paclitaxel. They found that ovarian cancer cells OVCAR-3 displayed increased levels of *growth arrest and DNA damage (GADD)* transcription,<sup>55</sup> the deficiency of which is known to increase cell sensitivity to UV irradiation or cisplatin.<sup>76,77</sup> This interaction also induces an increase in the transcription of *DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3)*, which then modulated the regulation of Pgp proteins.<sup>78</sup> In the other cell line (SKOV-3), MSCs induced a variation in expression of fibronectin implicated in resistance to paclitaxel.<sup>55</sup>

MDR proteins are not the only carriers with a potential involvement in resistance to anticancer treatments. Pillozzi et al. observed an increased expression of human ether-à-go-go related gene 1 (hERG1) on the surface of acute lymphocytic leukemia (ALL) cells when they were associated with MSCs. These hERG1 channels seem to play an important role in the acquisition of resistance to doxorubicin, prednisone, and methotrexate by tumor cells. Indeed, blockers of these channels decreased the chemoprotective effect of the MSCs.<sup>79</sup>

**Table 13.1** Role of Various Mechanisms in Tumor Cell Chemoresistance Induced by MSCs

| Resistance Mechanisms                      | Secreted Factors or Cell/Cell Contact | Various Mechanisms  |  |  |                                       | Drug Resistance to                                    | References                       |
|--|---------------------------------------|---|--|--|---------------------------------------|---|----------------------------------|
|  |                                       | Resistance Mechanisms in Stromal Cells  | Resistance Mechanisms in Cancer Cells  | Stromal Cells Used   | Origin of Cancer Cells Used           |   |                                  |
| Secretion of polyunsaturated fatty acid    | Secreted factors                      | Secretion of polyunsaturated fatty acid implicating COX-1/TXAS pathway          |  | Human and murine BM-MSCs   | Lung and colon cancer cells           | Oxaliplatin, carboplatin, cisplatin, 5-FU, irinotecan | Roodhart et al. <sup>51</sup>    |
| Secretion of GDF-15                        | Secreted factors                      | GDF-15 secretion  |  | BM-MSCs of MM patients and healthy donors                            | MM cells                              | Melphalan, lenalidomide, bortezomib                   | Corre et al. <sup>125</sup>      |
| Expression of MDR proteins                 | Coculture                             | Expression of MDR proteins  | MDR protein acquisition by oncologictrogocytosis   | Hospicells   | Ovarian cancer cell                   | Carboplatin, paclitaxel                               | Rafii et al. <sup>57</sup>       |
| Cell adhesion-mediated drug resistance ?   | Secreted factors                      |   |  | HS-5   | MM cells                              | Tipifarnib  | Yanamandra et al. <sup>82</sup>  |
| Cell adhesion-mediated antibody resistance | Coculture                             |   | Expression of VLA4   | HS-5   | B Cell lymphoma                       | Rituximab, doxorubicin                                | Mraz et al. <sup>82</sup>        |
| Modification in transcriptomic profile     | Coculture                             |   | Modification in transcriptomic profile in gene implicated in chemoresistance, increase in transcription of <i>DDIT3</i> , <i>ATF2</i> , <i>RASGRP1</i> genes and decrease in transcription of <i>BTG2</i> gene | BM-MSCs of healthy donors  | Ovarian cancer cell                   |   | Lis et al. <sup>25</sup>         |
| Increase in HERG1 expression               | Coculture                             |   | Increase in CXCR4 expression, increase in hERG1 expression, activation of pathways implicating PI3K/Akt and ERK1/2   | Human hTERT immortalized BM-MSCs                                     | ALL cells                             | Doxorubicin, prednisone, methotrexate                 | Pillozzi et al. <sup>10</sup>    |
| Notch signaling pathway                    | Coculture                             | Expression of ligands of Notch pathway: Jagged-1/-2, Delta like ligands-1/-3/-4 | Expression of Notch-1/-2/-4  | BM-MSCs of CLL patients and BM-MSCs of healthy donors                | CLL cells                             | Fludarabine, cyclophosphamide, bendamustine           | NwaboKamdje et al. <sup>89</sup> |
| NF-κB signaling pathway                    | Coculture                             |   | Increase in nuclearRelB  | Human BM-stromal cells*  | CLL cells                             | Fludarabine   | Xu et al. <sup>119</sup>         |
| Wnt signaling pathway                      | Coculture                             | Expression of Wnt pathway ligands   | Decrease in Bcl-2 cleavage, increase in gene expression implicated in Wnt pathway  | Human hTERT immortalized BM-MSCs                                     | ALL cells                             | Cytarabine  | Yang et al. <sup>132</sup>       |
| Supplementation in aminoacid               | Coculture                             | Expression of asparaginase synthetase, asparagine secretion                     |  | hTERT immortalized BM-MSCs   | ALL cells                             | Asparaginase  | Iwamoto et al. <sup>128</sup>    |
| Unknown                                    | Coculture                             |   |  | hTERT immortalized BM-MSCs   | CML cells                             | Imatinib, nilotinib, dasatinib                        | Zhang et al. <sup>160</sup>      |
| Unknown                                    | Coculture                             |   |  | BM-MSCs from voluntary trauma patients undergoing orthopedic surgery | Head and neck squamous carcinoma cell | Paclitaxel  | Scherzed et al. <sup>161</sup>   |
| Unknown                                    | Coculture                             |   |  | BM-MSCs  | Ovarian cancer cell                   | Carboplatin   | Lis et al. <sup>75</sup>         |

BM-stromal cells\*, probably BM-MSC: cells having the morphology of MSC and being positive for the surface marker CD54; hTERT, human telomerase reverse transcriptase.

### Cell Adhesion-Mediated Drug Resistance (CAM-DR)

The intercellular adhesion proteins, such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and integrin  $\beta 1$ , play a role in drug resistance.<sup>80</sup> The adhesion of myeloma cells to fibronectin specifically requires very late antigen 4 (VLA4,  $\alpha 4\beta 1$ -integrin).<sup>42</sup> VLA4 allows the adhesion of tumor cells to fibronectin and to VCAM-1 and is responsible for the resulting drug resistance induced by cell adhesion (cell adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR).<sup>81</sup> CAM-DR is the mechanism behind the resistance to many anticancer drugs such as the farnesyl transferase inhibitor tipifarnib.<sup>82</sup> Coculturing of multiple myeloma (MM) cells with BM-MSCs (bone marrow stromal cells HS-5) leads to tumor cell resistance to tipifarnib via adhesion to fibronectin.<sup>82</sup> In MM cells, Sanz-Rodriguez et al. showed an upregulation of VLA4 induced by SDF-1.<sup>81</sup> In a comparable manner to the CAM-DR, Mraz et al. demonstrated a cell adhesion-mediated antibody resistance (CAM-AR) mechanism induced by stromal cells. In their experiments, they showed that isolated HS-5 cells protected B lymphoma cells from apoptosis induced by rituximab via CAM-AR, and also a protection from apoptosis induced by doxorubicin via CAM-DR. The use of an antibody against VLA4, natalizumab, significantly reduced B-lymphocyte adhesion to fibronectin and partially reversed the chemoprotection from doxorubicin and rituximab conferred by BM-MSCs (HS-5) on lymphoma B cells<sup>83</sup> (Table 13.1).

### Cell Cycle Arrest, Quiescent State

One cause of chemoresistance of certain tumor cells and which is also responsible for tumor recurrence is the presence of tumor cells in a quiescent state. Indeed, most cytotoxics, especially older-generation ones, target rapidly multiplying cells such as tumor cells. However, the cellular heterogeneity characteristic of tumors allows some cancer cells to escape cytotoxic treatments, especially those in a quiescent state, with a slow multiplication rate. These cells represent a potential for recurrence when they reenter the cell cycle. This quiescent state may be induced by external signals, in particular those emitted by the tumor microenvironment. MSCs can modify the rate of tumor cell growth or cause a blockage of these cells in the G0/G1 phase of the cell cycle, resulting in a quiescent state with reduced sensitivity to chemotherapy (Table 13.2). Nefedova et al. reported cell cycle arrest in bone marrow myeloma cells upon their direct contact with stromal cells (such as BM-MSCs: cells having the morphology of MSC and being positive for the surface marker CD54).<sup>84</sup> They also observed a parallel increase in resistance to mitoxantrone (topoisomerase II inhibitor), with a decrease of about 50% of cells in apoptosis when the myeloma cells adhered on stromal cells as compared to those cultured alone in suspension. This resistance was not due to a decrease in the entry of drugs into cells but rather thought due to cell cycle arrest. This cycle arrest could be induced by the overexpression of the inhibitor of cyclin-dependent kinase (CDK) p21<sup>WAF1</sup>, which binds and inhibits the activity of cyclin/CDK complexes leading to cell cycle arrest in G1 phase. The protein kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup>, known to bind to cyclin E/CDK2 leading to cell cycle arrest, could also be involved. MSCs can alter the expression of both p21<sup>WAF1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>.

**Table 13.2** Role of Cell Cycle Arrest in Tumor Cell Chemoresistance Induced by MSCs

| Cell Cycle Arrest                     |   |  |                                       |   |                         |                               |
|---------------------------------------|---|--|---------------------------------------|---|-------------------------|-------------------------------|
| Secreted Factors or Cell/Cell Contact | Resistance Mechanisms in Stromal Cells                    | Resistance Mechanisms in Cancer Cells  | Stromal Cells Used                    | Origin of Cancer Cells Used   | Drug Resistance to      | References                    |
| Coculture                             |   | Cell cycle arrest  | BM-stromal cells* of healthy donors   | Myeloma cells   | Mitoxantrone            | Nefedova et al. <sup>84</sup> |
| Coculture                             | Expression of Notch pathway ligands: Jagged-1 and Delta-1 | Notch-1 expression, increase in p21 expression, cell cycle arrest in G0/G1 phase | BM-stromal cells* of healthy donors   | Myeloma cells   | Melphalan, mitoxantrone | Nefedova et al. <sup>88</sup> |
| Coculture                             |   | p21 and p27 overexpression, cell cycle arrest in G0/G1 phase                     | HS-5                                  | Lymphoma cells  |                         | Lwin et al. <sup>85</sup>     |
| Secreted factors                      |   | Cell cycle arrest in G0/G1 phase, increase in AKT and BAD phosphorylation        | BM-MSCs of CLL, CML, and AML patients | CML cells   |                         | Wei et al. <sup>86</sup>      |
| Coculture and secreted factors        |   | Cell cycle arrest in G1 phase  | BM-MSCs of healthy donors             | Immortalized line of human T lymphocyte, colon adenocarcinoma cells, lung cancer cells, B cells, CML, and AML cells |                         | Ramasamy et al. <sup>87</sup> |

BM-stromal cells\*, probably BM-MSCs (cells having the morphology of MSCs and being positive for the surface marker CD54).

Overexpression of these proteins prevents the passage of the G1 phase to S and therefore causes a cell cycle blockage. Lwin et al. observed that the adhesion of mantle lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma cells on BM-MSCs (HS-5) induced a cell cycle arrest in G1 phase by overexpression of p21<sup>WAF1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> proteins.<sup>85</sup> These proteins are regulated at the posttranscriptional level by S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2), a subunit of the ubiquitin ligase Skp, Cullin, F-box containing complex (SCF<sup>Skp2</sup>). A decrease in this ubiquitin ligase leads to an increase in the expression of p21<sup>WAF1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>, ultimately resulting in the arrest of the cell cycle in G1 phase.<sup>85</sup> Similarly, Wei et al. showed that culturing chronic myeloid leukemia (CML) cells in the presence of BM-MSCs either with direct cell-to-cell contact (coculture) or without direct contact (transwell system), or in the presence of MSC-conditioned medium, resulted in a reduction in the proliferation of CML cell lines with an increase in the percentage of cells in G0/G1 phase compared to CML cell lines cultured alone.<sup>86</sup> This MSC-induced inhibition of proliferation could play a role in cancer cell resistance to apoptosis. Indeed, coculture with MSCs causes a decrease in the percentage of tumor cells undergoing apoptosis (induced by serum deprivation) compared to these cells cultured alone. The mechanism behind such MSC-induced apoptotic resistance in leukemia cells could involve the induction by MSCs of a cell state close to quiescence.<sup>86</sup> This effect of MSCs on cell cycle regulation of tumor cells could be present in many other cancers. Indeed, Ramasamy et al. observed cell cycle arrest induced by MSCs in tumor cells of both hematopoietic and nonhematopoietic origin.<sup>87</sup> Either cocultured MSCs using the transwell system, or MSC supernatants were able to induce this antiproliferative effect by blocking tumor cells in the G1 phase. While the largest effect was achieved by coculturing, the antiproliferative effect is due, at least in part, to the secretion of soluble factors. In this experiment, coculture with BM-MSCs caused a reduction in tumor cell apoptosis.<sup>87</sup> Evidence for an MSC-induced stop in G1 involving the Notch signaling pathway was presented by Nefedova et al. with their observation of bone marrow stromal cells (such as BM-MSCs, fibroblasts, and macrophages) from five different patients expressing the ligands of the Notch pathway, Jagged-1 and delta-1.<sup>88</sup> Coculture of these stromal cells with myeloma cells induced the activation of the Notch pathway and resistance to melphalan or mitoxantrone. All the myeloma cell lines evaluated expressed Notch-1, except one. Cells which did not express Notch-1 but expressed Notch-2 and Notch-3 did not acquire this resistance. The addition of Jagged-1 peptide to myeloma cells also induced this drug resistance in Notch-1-expressing myeloma cells. This activation of Notch-1 associated with drug resistance is accompanied by a cell cycle arrest in G0/G1 phase and an increase in the expression of p21<sup>WAF190</sup>. Thus, the G1 arrest appears therefore to induce the presence of quiescent cells that are difficult to eliminate by cytotoxic drugs, particularly those acting on rapidly dividing cells. Using a model of CLL, Nwabo Kamdje et al. showed that BM-MSCs could regulate and support the survival of CLL cells treated by different chemotherapeutic molecules such as fludarabine, cyclophosphamide, and bendamustine, and the corticosteroids prednisone and hydrocortisone.<sup>89,90</sup> To investigate the role of Notch signaling in this BM-MSC-induced promotion of chemoresistance, they performed coculture of CLL



cells and BM-MSCs and applied chemotherapies in the presence or absence of a combination of anti-Notch-1, Notch 2, and Notch-4 antibodies or  $\gamma$ -secretase inhibitor XII. They showed that Notch signaling has a direct role in CLL cell survival. The presence of BM-MSCs, whether allogenic or autologous, enhanced the phenomenon and mediated an antiapoptotic effect. Activation of the Notch signaling pathway occurred upon contact between BM-MSCs and CLL cells, with both cell types expressing Notch receptors and ligands. Notch-1, -2, and -4 were found to be involved in chemoresistance to drug-induced apoptosis shown by CLL cells in direct contact with BM-MSCs. This effect may occur at least in part through Bcl-2, nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and p53-dependent mechanisms.<sup>89,90</sup> While the close contact between CLL cells and BM-MSCs is definitely associated with the acquisition of chemoresistance, soluble factors released by MSCs such as IL-7 and VEGF could also be involved in the phenomenon.<sup>84,88–90</sup>

## Mechanisms of Resistance Related to the Secretion of Soluble Factors

Numerous factors have been identified in the tumor microenvironment, many of which have protumoral properties. The mechanism behind such properties could in some cases be associated with chemoresistance acquisition, as for example, chemoresistance induced by soluble factors such as IL-6, IL-8, and SDF-1. Both tumor and stromal cells including MSCs secrete these factors.

### Resistance Acquisition Mediated by the SDF-1/CXCR4 Axis

One of the relevant factors in MSC-induced chemoresistance of tumor cells is SDF-1, also named chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12). SDF-1 binds to its receptor chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), which is expressed by tumor cells. The signaling pathway of SDF-1/CXCR4 has been implicated in MSC/tumor cell recognition, as for example, in the homing of CML cells to the bone marrow.<sup>66</sup> The level of expression of CXCR4 on tumor cells correlates with the degree of chemotaxis induced by SDF-1 or stromal cells.<sup>91</sup> Corcoran et al. demonstrated a higher expression of CXCR4 in breast tumor cell lines (MCF-7, T47D, and MDA-MB-231) compared to that in a nonmalignant mammary cell line (MCF-12A).<sup>92</sup> Small interfering ribonucleic acid (siRNA) silencing of CXCR4 in mammary tumor cells decreased their migration toward, and their adhesion to MSCs. An increasing number of studies are now devoted to the role of the SDF-1/CXCR4 axis in chemoresistance (Table 13.3).

MSCs by themselves are able to induce the overexpression of CXCR4 on the tumor cell surface. Indeed, BM-MSCs from healthy donors, when injected into mice, are able to interact with tumor cells leading to their overexpression of CXCR4.<sup>73,79,93,94</sup>

In an in vitro model of CML, the coculture of BM-MSCs with tumor cells induced resistance to treatment with the anticancer drug imatinib.<sup>73,93</sup> Since similar levels of leukemia cell chemoresistance were achieved with the MSC-conditioned medium, this effect was

**Table 13.3** Role of SDF-1/CXCR4 Signaling Pathway in Tumor Cell Chemoresistance Induced by MSCs

| SDF-1/CXCR4 Signaling Pathway         |  |  |   |   |                                       |                                    |
|---------------------------------------|--|--|---|---|---------------------------------------|------------------------------------|
| Secreted Factors or Cell/Cell Contact | Resistance Mechanisms in Stromal Cells | Resistance Mechanisms in Cancer Cells  | Stromal Cells Used                                  | Origin of Cancer Cells Used             | Drug Resistance to                    | References                         |
| Coculture                             |  | Increase in CXCR4 expression, increase in Bcl-xL   | BM-MSC of healthy donors                            | CML cells                               | Imatinib                              | Vianello et al. <sup>93</sup>      |
| Secreted factors                      |  | Increase in CXCR4 expression   | BM-MSC of healthy donors                            | CML cells                               | Imatinib                              | Jin et al. <sup>73</sup>           |
| Secreted factors                      |  | Increase in CXCR4 expression   | Human BM-MSC, hospicells                            | Ovarian cancer cells                    | Hyperthermia                          | Lis et al. <sup>94</sup>           |
| Coculture                             |  | Increase in CXCR4 expression, increase in hERG1 expression, activation of pathways implicating PI3K/AKT and ERK1/2 | Human hTERT immortalized BM-MSC                     | ALL cells                               | Doxorubicin, prednisone, methotrexate | Pillozzi et al. <sup>76</sup>      |
| Coculture                             | Increase in SDF-1 secretion            |  | BM-MSC of patients with AML                         | AML cells                               | Cytarabine                            | Kim et al. <sup>95</sup>           |
| Secreted factors                      | SDF-1 secretion                        | Increase in survivin, Bcl-xL and Mcl-1   | BM-MSC of healthy donors and BM-MSC of AML patients | AML cells                               | Anti-FLT3, doxorubicin                | Kojima et al. <sup>97</sup>        |
| Secreted factors                      | SDF-1 secretion                        |  | MS-5  | CLL cells                               | Bendamustine, fludarabine             | Hoellenriegel et al. <sup>99</sup> |
| Coculture                             |  | CXCR4 expression   | BM-MSC  | Breast cancer cells                     | Carboplatin                           | Greco et al. <sup>100</sup>        |
| Coculture                             |  | Correlation between CXCR4 expression and chemotaxis, phosphorylation of AKT by addition of SDF-1                   | MS-5  | Immortalized line of human T lymphocyte | Cytarabine                            | Zeng et al. <sup>91</sup>          |

*hTERT*, human telomerase reverse transcriptase.

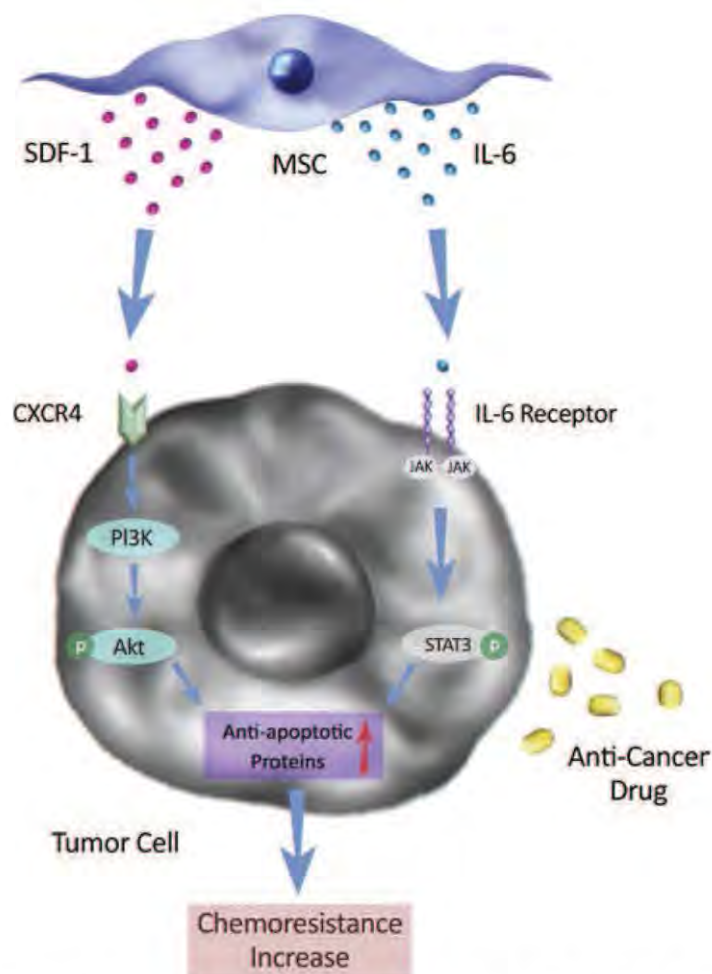
related to the secretion of soluble factors. This chemoresistance was concomitant to the increase in CXCR4 expression in tumor cells. The same coupling of chemoresistance with overexpression of CXCR4 has also been observed in ovarian tumor cells cocultured with BM-MSCs from healthy donors or with CA-MSCs isolated either from ascites of patients with ovarian adenocarcinoma<sup>94</sup> or from the blood of patients with ALL.<sup>79</sup>

Kim et al. showed that BM-MSCs from patients with acute myeloid leukemia (AML) secrete more SDF-1 than do those from healthy donors.<sup>95</sup> This oversecretion of SDF-1 is correlated to the increase in the resistance to cytarabine displayed by leukemia cells cocultured with MSCs from patients with AML. This effect was not observed when MSCs from healthy donors were used. Lis et al. demonstrated the resistance of ovarian tumor cells to hyperthermia at 42°C, a therapy used in combination with chemotherapy in the treatment of ovarian cancer, induced by both BM-MSCs and CA-MSCs from ascites of patients with ovarian cancer.<sup>94</sup> Coculture experiments of MSCs with ovarian cancer cells in transwell systems showed that resistance of tumor cells to hyperthermia does not require direct cell-cell interaction.<sup>94</sup> This indicated that secreted factors are involved in BM-MSC-mediated resistance of cancer cells to hyperthermia. SDF-1 appears to be a good candidate mediating this effect as incubation of ovarian cancer cells with SDF-1 increased their resistance to heat treatment.

SDF-1 secreted by stromal cells may regulate chemoresistance through different mechanisms. It could activate the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/Akt (protein kinase B) signaling pathway (Fig. 13.1) as will be described later, or it could act through the upregulation of the integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA4) in MM cells. This integrin mediates adhesion to fibronectin and VCAM-1,<sup>81</sup> both of which are involved in cell adhesion-mediated drug resistance (as mentioned previously).

The fusion protein p210<sup>Bcr-Abl</sup> (a 210-kDa fusion protein obtained after juxtaposition of the *Abl* gene to a part of the *Bcr* gene) resulting from the translocation (9; 22) is found in almost all patients with CML. This protein kinase decreases the SDF-1/CXCR4-mediated migration of tumor cells toward BM<sup>96</sup> and is regulated by the anticancer drug imatinib. Treatment with imatinib restores migration of CML cells toward SDF-1. Jin et al. showed that CML cells (KBM-5) acquired resistance to imatinib-mediated apoptosis when cultured in the presence of MSCs. The addition of a CXCR4 inhibitor significantly increased the imatinib-induced inhibition of tumor growth and apoptosis of KBM-5 cells in the presence of MSCs.<sup>73</sup>

Similarly, mutation of the *Fms-like tyrosine kinase-3* (*FLT3*) was described in AML and was associated with poor outcome. Kojima et al. hypothesized that MSCs might be involved in the resistance to treatment with anti-FLT3 or doxorubicin through the secretion of SDF-1.<sup>97</sup> Blocking of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway by targeting the SDF-1 ligand or its CXCR4 receptor seems to be an interesting strategy to combat chemoresistance related to the microenvironment. Hoellenriegel et al. used RNA oligonucleotides in an L configuration directed against SDF-1 in an in vitro model using CLL cells. They showed that SDF-1 targeting rendered tumor cells, cocultured with murine stromal cell lines MS-5 (probably BM-MSC: mesenchymal morphology and able to differentiate into adipocytes),<sup>98</sup>



**FIGURE 13.1** MSC secretion and mechanisms of chemoresistance in tumor cells. MSCs are able to secrete SDF-1 and IL-6. These factors activate signaling pathways implicating respectively CXCR4 and STAT3 in tumor cells, leading to an increase of antiapoptotic proteins and finally inducing resistance to many anticancer drugs.

sensitive to a combined treatment with fludarabine and bendamustine,<sup>99</sup> thus reversing the chemoprotective effects of BM-MSCs toward fludarabine and bendamustine.<sup>89</sup>

Molecules targeting the CXCR4 receptor allow the blocking of the SDF-1/CXCR4 signaling pathway. The CXCR4 antagonist AMD3100 promoted caspase 3-induced apoptosis of leukemia cells treated with imatinib, even in coculture with BM-MSCs.<sup>100</sup> In the same way, this antagonist permitted both *in vitro* and *in vivo*, the reversal of chemoresistance to carboplatin induced by MSCs in breast cancer cells, through the increase in caspase 3 and the decrease in cell viability.<sup>100</sup> Other CXCR4 inhibitors, such as the polypeptide RCP168 or the small non-peptide molecule AMD3465, partially reversed the stromal cell-dependent chemoresistance to cytarabine in leukemia cells.<sup>91</sup> Blocking the CXCR4 receptor with a monoclonal antibody also reversed the heat resistance induced by BM- or CA-MSCs.<sup>94</sup> Here, the inhibition of CXCR4 induced a decrease in SDF-1-dependent Akt phosphorylation.

In addition, an increase in the expression of the antiapoptotic protein Bcl-xL has been observed in cocultures of tumor cells and MSCs. The CXCR4 antagonist AMD3100 sensitized the tumor cells to apoptosis following anticancer treatment, without modifying the MSC-dependent expression of Bcl-xL on tumor cells.<sup>93</sup> The SDF-1/CXCR4 signaling pathway does not therefore seem to be involved in the increased expression of Bcl-xL on tumor cells. MSCs thus appear to confer chemoprotection not only through their action on the SDF-1/CXCR4 pathway but also through other mechanisms responsible for the increase in the expression and activity of antiapoptotic proteins, such as Bcl-xL, in tumor cells.

### Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived IL-6 Secretion

The growth factor and proinflammatory cytokine IL-6 is secreted by many cell types, including immune cells (B cells, T cells, and macrophages), other stromal cells (eg, endothelial cells, fibroblasts, osteoblasts, MSCs), and tumor cells. Through its pleiotropic effects, such as inducing the synthesis of other inflammatory molecules [eg, C-reactive protein, VEGF, fibroblast growth factor (FGF)-2], IL-6 is involved in various physiological processes including hematopoiesis, reproduction, and inflammation. It is also implicated in many diseases including those of the immune system and cancers.<sup>101</sup> IL-6 binds to its receptor IL-6 receptor, which can either be soluble or located on the cell membrane. This binding leads to the dimerization of gp130 and the phosphorylation and activation of the receptor-associated kinases: janus kinase (JAK)1, JAK2, and tyrosine kinase (Tyk)2. This activation in turn leads to the phosphorylation and activation of signal transducer and activator of transcription (STAT)3, which promotes cell proliferation and apoptosis resistance. For this reason, IL-6 is considered a growth factor for MM cells.<sup>102</sup>

In addition to its protumoral role, IL-6 plays an important role in drug resistance. Frasanito et al. showed that dexamethasone-resistant myeloma cells from patients with MM were able to produce IL-6 in an autocrine loop.<sup>103</sup> This IL-6 secretion was associated with drug resistance as the myeloma cells not producing the IL-6 were sensitive to dexamethasone. This resistance was associated with a decrease in spontaneous and drug-induced apoptosis mediated through the STAT3 signaling pathway which provides protection against FAS-mediated apoptosis.<sup>56,67</sup> Thus, IL-6 can protect tumor cells from apoptosis and increase their resistance to anticancer agents through the expression of antiapoptotic proteins, such as Bcl-2, Bcl-xL, survivin, and the x-linked inhibitor of myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1), and activation of the JAK/STAT3 signaling pathway<sup>69–72</sup> (Fig. 13.1). Indeed, immunohistochemistry analysis has revealed an increased expression of STAT3 and phospho-STAT3 in recurrent tumors, which are generally more resistant to treatment, than in primary tumors.

In addition, IL-6 also has the ability to increase the expression of efflux proteins, such as the multidrug resistance proteins MDR and MRP involved in resistance to many therapies.<sup>104</sup> IL-6 could also be indirectly involved in chemoresistance. Myeloma cell adhesion to fibronectin induces a cell cycle arrest, which helps the cells resist mitoxantrone- or doxorubicin-induced death.<sup>105</sup> In the presence of IL-6, the activation of the JAK/STAT3

pathway helps to maintain resistance to treatment and allows the cells to progress into the cell cycle. This demonstrates the possibility of causing drug resistance while promoting tumor progression.

Using paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines found to express higher levels of phospho-STAT3, Duan et al. presented another example of how IL-6 promotes chemoresistance through activation of STAT3.<sup>106</sup> Gene modification of this cancer cell line with siRNAs directed against STAT3 led to their chemosensitization.<sup>69,106</sup> In the same way, the use of an inhibitor of JAK and STAT3 (AG490) in combination with paclitaxel increased the number of cells undergoing apoptosis in paclitaxel-resistant ovarian cells.<sup>106</sup>

In summary, IL-6 is involved in the resistance shown by many types of cancer (MM, prostate cancer, ovarian cancer, among others) to anticancer agents (including melphalan, platinum derivatives, tamoxifen, and paclitaxel).<sup>107–109</sup> Considering that IL-6 can be synthesized by stromal cells, the microenvironment is likely involved in the chemoresistance mediated by this cytokine (Table 13.4).

#### *MSCs and IL-6*

Several authors have reported an increase in IL-6 secretion due to the presence of MSCs.<sup>110</sup> MSCs, other stromal cells such as macrophages that interact with the MSCs, or tumor cells<sup>103</sup> are a source of IL-6 secretion.<sup>63</sup> MSCs can cross talk with their surrounding cells through the release of soluble factors or through cell-to-cell contact, as will be depicted in the following paragraph, instructing them to increase their synthesis of IL-6.

#### *Activation of Cytokine Synthesis Through IL-6 Secreted by MSCs*

Corre et al. have reported that BM-MSCs isolated from MM patients secrete more IL-6 than those from healthy donors.<sup>110</sup> They associated this observation with the increase in the secretion of IL-6 by the BM-MSCs upon secretion of factors from tumor cells (VEGF and FGF). This increase in IL-6 in turn stimulates myeloma cells leading to increased synthesis of VEGF and FGF altogether resulting in an amplification loop.<sup>56,67</sup>

#### *Activation of the STAT3 Pathways Through MSC-Secreted IL-6*

In CML, Bewry et al. showed that conditioned medium from HS-5 cells resulted in the activation of the STAT3 pathway as shown by an increase in its phosphorylation.<sup>69</sup> The conditioned medium of HS-5 cells protected cells from the apoptosis induced by imatinib, nilotinib, and dasatinib, all inhibitors of BCR-ABL. As we have already mentioned for ovarian tumor cells, the use of siRNA directed against STAT3 reversed the chemoprotective effect of HS-5 cells on the CML cells treated with imatinib.

Concerning the direct targeting of IL-6 produced by the microenvironment, Golay et al. showed that the use of the histone deacetylase inhibitor ITF2357 decreased by 80–95% the production of IL-6 by MSCs.<sup>111</sup> This inhibitor greatly enhanced IL-6-dependent apoptosis on CMA-03 myeloma cells through a direct cytotoxic effect, but, more interestingly, it induced the death of AML cells that had been activated by coculture with MSC; when cells were treated after stimulation with naive BM-MSCs, the effect of the inhibitor was

**Table 13.4** Role of IL-6/STAT-3 Signaling Pathway in Tumor Cell Chemoresistance Induced by MSCs

| Secreted Factors or Cell/Cell Contact | Resistance Mechanisms in Stromal Cells   | IL-6/STAT3 Signaling Pathway  |   |                             | Drug Resistance to             | References                    |
|---------------------------------------|--|---|---|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                                       |  | Resistance Mechanisms in Cancer Cells                                     | Stromal Cells Used  | Origin of Cancer Cells Used |                                |                               |
| Secreted factors                      | BM-MSc of MM patients secretes more IL-6 than BM-MSc of healthy donors               |   | BM-MSc of MM patients and healthy donors                  |                             |                                | Corre et al. <sup>110</sup>   |
| Coculture                             | Adherence to myeloma tumor cells induces increase in IL-6 secretion by stromal cells |   | Human BM- stromal cells of MM patients and healthy donors | MM cells                    |                                | Uchiyama et al. <sup>42</sup> |
| Secreted factors                      |  | Increase in STAT3 phosphorylation, increase in survivin, Bcl-xL and Mcl-1 | HS-5  | CML cells                   | Imatinib, nilotinib, dasatinib | Bewry et al. <sup>69</sup>    |
| Coculture                             | IL-6 secretion   |   | BM-MSc of healthy donors                                  | MM and AML cells            |                                | Golay et al. <sup>111</sup>   |

less efficient. IL-6 could represent a good target on which to reverse chemoresistance and decrease tumor progression. Several drugs targeting IL-6 or its signaling pathways (for example, tocilizumab) have already been evaluated.

### Resistance Acquisition Mediated by Activation of the PI3K/Akt Pathway

Phosphatidylinositol 3 kinases (PI3Ks) are a family of lipid kinases that integrate signals from growth factors, cytokines, and other environmental cues and translate them into intracellular signals that regulate multiple signaling pathways.<sup>112,113</sup> The PI3K signaling pathway has been implicated in both tumor initiation and progression.<sup>114</sup> Indeed several tumor cell types present alterations of different isoforms of PI3K leading to a constitutive activation phenotype that is associated with tumor progression. MSC-induced PI3K signaling is also involved in the acquisition of tumor cell chemoresistance. This has been indirectly demonstrated by Castells et al., who showed that CA-MSC (hospicells)-conditioned medium induces the phosphorylation of Akt, in turn resulting in the phosphorylation and stabilization of the antiapoptotic protein XIAP. Use of siRNA directed against XIAP abolished the resistance to carboplatin acquired by ovarian adenocarcinoma cells cultured with CA-MSCs, thus confirming the involvement of this signaling pathway in chemoresistance.<sup>59</sup> Wei et al. reported similar findings on CML cells with regards to the implication of Akt phosphorylation in chemoresistance, in the presence of MSCs. Wei et al. demonstrated that Akt phosphorylation and activation is induced by the action of the soluble factor SDF-1, which binds to its receptor CXCR4, thus activating the PI3K pathway.<sup>86</sup> The involvement of SDF-1 in the regulation of the Akt signaling pathway has been described elsewhere in leukemia cells,<sup>91</sup> where SDF-1 $\alpha$  increases Akt phosphorylation. Interestingly, such activation of the Akt signaling pathway has now been firmly implicated in the resistance to the cytotoxic treatments.

Finally, Pillozzi et al. demonstrated that ALL cells cocultured with MSCs display an activation of signaling pathways that implicated both PI3K/Akt and extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2 axes and were responsible for the chemoresistance to doxorubicin, prednisone, and methotrexate observed in these tumor cells.<sup>79</sup>

### Resistance Acquisition Mediated by Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway

The transcription factor NF- $\kappa$ B pathway is implicated in inflammation and in various physiological processes such as regulation of cell proliferation, apoptosis, and cell signaling transduction. In many cancers, this pathway plays important roles in tumorigenesis and may also protect cancer cells from chemotherapy and radiotherapy.<sup>115</sup> Activation of this pathway can induce drug resistance in both solid cancers such as breast cancer<sup>116,117</sup> and hematologic cancers.<sup>118</sup> Moreover, constitutive NF- $\kappa$ B/V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (NF- $\kappa$ B/Rel) activity has been shown in several hematological malignancies. Related to this, an alternative NF- $\kappa$ B pathway involves the RelB protein, the activity of which correlates with the stage of CLL according to the Binet classification.<sup>119</sup> CLL RelA<sup>+</sup>/RelB<sup>+</sup> B cells are more resistant to apoptosis than RelA<sup>+</sup>/RelB<sup>-</sup> cells. During



culture with BM-stromal cells (probably not only BM-MSCs but also fibroblasts and macrophages), an increase in the amount of RelB is observed in the nucleus of cancer cells. In addition, coculture with BM-stromal cells increases the resistance of CLL B cells to fludarabine. RelB could be implicated in this stromal cell-induced resistance of tumor cells to fludarabine (Table 13.1).

### Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived Fatty Acids

The links between obesity and cancer have been highlighted in several recent publications. Among the potential mechanisms through which adipocytes have been implicated in tumor development and tumor cell chemoresistance to anticancer treatments is their secretion of free fatty acids or adipokines.<sup>120</sup> Adipocytes can also transdifferentiate into tumor-activated fibroblast-like cells and synthesize various protumoral factors.<sup>60</sup> Free fatty acids can be used by cancer cells as an energy source,<sup>120</sup> contributing toward their metabolism and can also lead to resistance to the cytotoxicity induced by glucocorticoids.<sup>121</sup> Such effects could be exerted via modulation in the expression of antiapoptotic proteins. Other lipids, including derivatives of arachidonic acid such as prostaglandin E2 (PGE2), may be implicated in the resistance of tumor cells to cytotoxic agents following their release into the extracellular medium.<sup>122</sup> Finally sphingolipids, for example, sphingosine-1-phosphate (S1P), may also be involved in chemoresistance.<sup>123</sup>

The stroma appears to play a role in this resistance induced by fatty acids. Dandekar et al. demonstrated that the stroma may induce increased expression of PGE2 by tumor cells and thereby stimulate their chemoresistance.<sup>124</sup> Stromal cells such as MSCs are able to secrete fatty acids directly, a property which likely contributes toward their chemoprotective effects (Table 13.1). Roodhart et al. demonstrated that injection of murine or human BM-MSCs intravenously or subcutaneously, in mice bearing subcutaneous tumor (colon carcinoma cells or lung), to mimic the recruitment of BM-MSCs to the tumor, resulted in a dose-dependent resistance to cisplatin.<sup>51</sup> A similar drug resistance effect to many anticancer drugs (oxaliplatin, carboplatin, cisplatin, 5-FU, and irinotecan) was also obtained by injecting conditioned medium from BM-MSCs cultured in the presence of platinum derivatives (oxaliplatin, carboplatin, cisplatin). This drug resistance was associated with the activation of cyclooxygenase 1 (COX-1)/thromboxane A synthase (TXAS) in MSCs, leading to the secretion of two polyunsaturated fatty acids 12-oxo-5,8,10-heptadecatrienoic acid (KHT) and hexadeca-4,7,10,13-tetraenoic acid.<sup>51</sup>

### Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived GDF-15 Secretion

Growth and differentiation factor 15 (GDF-15) is a propeptide belonging to the transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) superfamily which is able to inhibit apoptosis in different cell types, including cardiomyocytes. Its concentration is elevated in the serum of patients with colorectal, pancreatic, prostate, or neuronal (glioma) cancers. Corre et al. demonstrated that BM-MSCs isolated from patients with MM secrete more GDF-15 than those isolated from healthy donors. GDF-15 increases the resistance of MM cells (MOLP-6 and MM1.S) to treatment

with the chemotherapeutic agents melphalan, bortezomib, and lenalidomide (Table 13.1). Clinically it has been shown that plasma concentration of GDF-15 correlates with patient survival.<sup>110,125</sup>

### Resistance Acquisition Mediated by Amino Acid Supplementation

Metabolism in tumor cells differs from that in healthy cells, including an increase in glycolysis. The tumor cell microenvironment can promote cellular metabolism by supplying energy in the form of lactate, acetate, and macromolecules, but also in the form of amino acids.<sup>126</sup> Amino acids utilized by tumor cells as an energy source and also as basic constituents of proteins can promote tumor development. In addition to their protumoral role, amino acids that are secreted by the tumor microenvironment, such as glutamine or asparagine, may cause resistance to some chemotherapeutic agents<sup>127</sup> (Table 13.1).

While normal cells are able to synthesize their own asparagine, leukemia cells have a limited capacity to synthesize the amino acid asparagine, implicated in protein synthesis, which they therefore take up from the extracellular medium. Taking advantage of the asparagine dependence displayed by leukemia cells, one strategy to treat leukemia is therefore to use asparaginase, an enzyme which catalyzes the hydrolysis of asparagine into aspartic acid and ammonia resulting, in leukemic cells, in asparagine deprivation. MSCs can supplement these cells with asparagine and thus cause resistance to treatment with this enzyme. Indeed, as shown by Iwamoto et al., ALL cells expressed small amounts of asparagine synthetase (23 times less than expressed by primary MSCs) and were sensitive to asparaginase.<sup>128</sup> Coculture with BM-MSCs causes resistance of ALL cells to treatment with asparaginase. This resistance appears to involve MSCs' asparagine synthetase, which stimulates the release of asparagine by MSCs that in turn can be used by ALL cells. Inhibition of asparagine synthetase by siRNA results in the inability of MSCs to induce chemoresistance of ALL cells.<sup>128</sup>

### Resistance Acquisition Mediated by Activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway

The wingless-type MMTV integration site family (Wnt)/ $\beta$ -catenin pathway plays an important role in many cellular processes including the development and maintenance of adult tissue homeostasis. In the absence of Wnt pathway activation,  $\beta$ -catenin associates with a protein complex (the cadherin–catenin complex), leading to its ubiquitination and degradation.<sup>129</sup> Activation of the Wnt pathway inhibits this complex and stabilizes  $\beta$ -catenin, thereby allowing its translocation to the nucleus to perform its role as a transcriptional coactivator. This pathway regulates the expression of many genes involved in cell proliferation, cell differentiation, survival, cell polarity, among others.<sup>130,131</sup> Therefore and not surprisingly, Wnt/ $\beta$ -catenin dysregulation can lead to diseases such as fibrosis, neurodegenerative diseases, and cancer.<sup>131</sup> In cancer cells, the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is able to modulate cell migration, invading processes, and proliferation.<sup>130</sup> It also regulates genes involved in apoptosis and is involved in the resistance of some cancers to chemotherapy.

MSCs can activate this pathway resulting in tumor cell protection from cancer treatments (Table 13.1). Yang et al. showed that BM-MSCs (the human MSC line HS-5 and the murine MSC cell line M2-10B4) protect ALL cells from cytarabine-induced apoptosis.<sup>132</sup> A quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis showed the presence of 16 mRNA ligands from the Wnt signaling pathway in MSCs. Using microarrays to study gene expression profiles, they observed an increase in the expression of many genes involved in the Wnt pathway [*lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1)*, *c-Myc* (a transcription factor), *cyclin D-type binding-protein 1 (CCNDBP1)*] in ALL cells cocultured with MSCs as compared to noncocultured leukemia cells. Moreover, Xia et al. showed that coculture with MSCs results in a resistance of AML cells to apoptosis induced by treatment with mitoxantrone.<sup>133</sup> Adherence to MSCs leads, in AML cells, to an increase in the expression of c-Myc protein. AML drug resistance to mitoxantrone was not observed in the transwell system, demonstrating the need for direct cell-to-cell contact for AML cells to acquire resistance.<sup>135</sup> Targeting the Wnt pathway seems an attractive alternative to prevent the chemoprotective effect of MSCs on tumor cells. The use of an inhibitor of  $\beta$ -catenin, which is involved in the Wnt pathway, reduces MSC-induced resistance of ALL cells to cytarabine in vitro but potentiates it in vivo.<sup>132</sup> The inhibition of c-Myc using siRNA or a c-Myc inhibitor, increases mitoxantrone-induced apoptosis and reverses the chemoprotective effect induced by MSCs in AML cells.<sup>133</sup>

### Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived miRNA

Micro-RNAs (miRNAs) are small oligonucleotides, 18–22 base pairs long, which regulate gene expression. They bind to the 3'- and 5'-untranslated regions or into the open reading frame (ORF) of the targeted mRNAs to suppress translation. Through the targeting of specific genes, miRNAs can behave functionally as tumor suppressors, oncogenes, or chemoresistance inducers or repressors. Munoz et al. have shown that a specific miRNA named miR-9 is implicated in the resistance of glioblastoma multiforme to temozolomide. miR-9 sensitizes tumor cells to chemotherapy by affecting the increase of Pgp.<sup>134</sup>

Concerning its role in chemoresistance acquisition, Kadera et al. have shown that miR-21 has a protumorigenic function and is probably involved in chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma.<sup>135</sup> miR-21 is produced by the tumor cells themselves but also by the surrounding tumor-associated fibroblasts (TAFs). Considering that TAFs may be derived from MSCs,<sup>136</sup> these results suggest a potential role of MSC-derived TAFs in miRNA-mediated chemoresistance acquisition.

### Resistance Acquisition Mediated by MSC-Derived Exosomes

Exosomes are a type of microvesicle, a term which collectively refers to various types of membranous elements in the range of 20–1000 nm in diameter, which are released from and taken up by most cell types. Exosomes appear necessary to remove unneeded proteins from cells. In addition, they transport intercellularly mRNAs and miRNAs with the potential to alter the fate of recipient cells. Several studies have reported that MSC-derived

exosomes display similar functional properties to those of MSCs, such as the ability to repair tissue damage, suppress inflammatory responses, and modulate the immune system. Both MSCs and MSC-derived exosomes increase the incidence and growth of human gastric cancer cell line SGC-7901 and human colon adenocarcinoma cell line SW480 cell-induced tumors, suggesting that MSC-derived exosomes promote tumor progression in a manner similar to MSCs in vivo.<sup>137</sup> Lee et al. showed that MSC-derived exosomes significantly downregulated the expression of VEGF in tumor cells, which led to inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo.<sup>138</sup> Concerning chemotherapy resistance acquisition, Ono et al. suggested that inducing the dormancy of tumor cells would protect them from chemotherapy treatments.<sup>139</sup> Since exosomes carry miRNAs that could be implicated in this dormancy, the authors evaluated miRNAs for their role in chemoresistance. They demonstrated that among various miRNAs, miR-23b was increased in BM-MSC-derived exosomes as compared with adult fibroblast exosomes. When miR-23b was overexpressed in breast cancer cells, it induced dormant cancer cell phenotypes through the suppression of a target gene, *myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS)*, which encodes a protein that promotes cell cycling and motility. They suggested that exosomal transfer of miRNAs from BM-MSCs may promote breast cancer cell dormancy in a metastatic niche and therefore induce breast cancer cell chemoresistance.<sup>139</sup>

## Increased Expression of Antiapoptotic Proteins

As suggested earlier, tumor-infiltrating MSCs cross talk with tumor cells through the release of several factors, such as cytokines, growth factors, peptides, fatty acids, and miRNAs. All these compounds are able to activate signaling pathways involved in drug resistance. The pathways involved in apoptosis have been extensively described and several authors have reported that MSC secretions induce the upregulation of several antiapoptotic proteins (Table 13.5). MSCs are involved in the increased expression of Bcl-xL<sup>69,93,97,140,141</sup> and survivin<sup>69,97</sup> and act toward the stabilization or increased synthesis of Mcl-1<sup>68,69,97,142,143</sup> and XIAP.<sup>59</sup> MSCs are also associated with the upregulation of Bcl-2<sup>96,102</sup> or the decrease of Bcl-2 cleavage<sup>95</sup> (cleavage of Bcl-2 protein generates a proapoptotic fragment). These various effects appear to be independent of tumor cell origin and have been noted in both hematologic cancers (leukemic cells such as AML,<sup>97,133,141</sup> CML,<sup>69,93</sup> ALL,<sup>132</sup> CLL,<sup>68,142</sup> MM<sup>143</sup>), and solid cancers (ovarian tumor cells).<sup>59</sup> The increase in the previously mentioned proteins may be due to the secretion of IL-6 by the MSCs.<sup>56,101</sup>

In addition, BM-MSCs from patients with leukemia have been implicated in the resistance of CML cells to apoptosis, associated with an increased phosphorylation and sequestration of Bcl-2-associated death promoter (BAD).<sup>86</sup>

Pharmacologic inhibitors of the different cited proteins, or the use of targeted RNA interference could restore the sensitivity to chemotherapy in MSC-induced chemoresistant tumor cells (eg, siRNA directed against XIAP,<sup>59</sup> histone deacetylase inhibition resulting in downregulation of Bcl-2 and Mcl-1<sup>111</sup>).

**Table 13.5** Role of Antiapoptotic Proteins in Tumor Cell Chemoresistance Induced by MSCs

| Increase of Antiapoptotic Proteins    |  |   |   |                             |  |                                    |
|---------------------------------------|--|---|---|-----------------------------|--|------------------------------------|
| Secreted Factors or Cell/Cell Contact | Resistance Mechanisms in Stromal Cells | Resistance Mechanisms in Cancer Cells   | Stromal Cells Used  | Origin of Cancer Cells Used | Drug Resistance to                           | References                         |
| Secreted factors                      |  | Increase in activation of PI3K/Akt pathway, increase in XIAP stabilization by phosphorylation | BM-MSCs of healthy donors and hospicells  | Ovarian cancer cells        | Carboplatin                                  | Castells et al. <sup>59</sup>      |
| Coculture                             |  | Increase in Bcl-xL, cell cycle arrest in G0/G1 phase  | Human BM-MSCs   | Leukemia cells              | Daunoblastina                                | Lin et al. <sup>140</sup>          |
| Coculture                             |  | Decrease in PARP and Mcl-1 cleavage   | Murine cells M2-10B4, KUM4, KUSA-H1, ST2 and human stromal cells NKtert, UE6E7T-2 and UCB408E6E7TERT-33 | CLL cells                   | Fludarabine, cyclophosphamide, dexamethasone | Kurtova et al. <sup>68</sup>       |
| Coculture                             |  | Increase, in Bcl-2 and Bcl-xL and increase c-myc expression                                   | BM-MSC of healthy donors  | AML cells                   | Mitoxantrone                                 | Xia et al. <sup>138</sup>          |
| Secreted factors                      | Potentially IL-6 or IGF-1 secretion    | Increase in Mcl-1   | HS-5  | MM cells                    | Melphalan, bortezomib, dexamethasone         | Pei et al. <sup>143</sup>          |
| Coculture                             | Expression of Wnt pathway ligands      | Decrease in Bcl-2 cleavage, increase in gene expression implicated in Wnt pathway             | Human hTERT immortalized BM-MSC   | ALL cells                   | Cytarabine                                   | Yang et al. <sup>132</sup>         |
| Secreted factors                      |  | Increase in Bcl-2 and Bcl-xL, decrease in leukemia cell proliferation                         | MS-5  | AML cells                   | Cytarabine                                   | Konopleva et al. <sup>141</sup>    |
| Coculture                             |  | Stabilization and increase of Mcl-1   | Human and murine hTERT immortalized MSC   |                             | Forodesine                                   | Balakrishnan et al. <sup>142</sup> |
| Secreted factors                      |  | Increase in STAT-3 phosphorylation, increase in survivin, Bcl-xL, and Mcl-1                   | HS-5  | CML cells                   | Imatinib, nilotinib, dasatinib               | Bewry et al. <sup>69</sup>         |
| Secreted factors                      | SDF-1 secretion                        | Increase in survivin, Bcl-xL and Mcl-1  | BM-MSC of healthy donors and BM-MSC of AML patients   | AML cells                   | Anti-FLT3, doxorubicin                       | Kojima et al. <sup>97</sup>        |
| Coculture                             |  | Increase in CXCR4 expression, increase in Bcl-xL  | BM-MSC of healthy donors  | CML cells                   | Imatinib                                     | Vianello et al. <sup>93</sup>      |
| Secreted factors                      |  | Cell cycle arrest in G0/G1 phase, increase in AKT and BAD phosphorylation                     | BM-MSC of CLL, CML, and AML patients  | CML cells                   |  | Wei et al. <sup>86</sup>           |

*hTERT*, human telomerase reverse transcriptase; *IGF-1*, insulin-like growth factor-1; *IL*, interleukin; *KUM4*, murine mesenchymal cell line derived from BM with osteoblastic phenotype; *KUSA-H1*, murine multipotent BM-stromal cell line with osteoblastic phenotype; *M2-10B4*, murine multipotent BM mesenchymal cells with MSC morphology and able to osteoblast-like cell differentiation; *ST2*, murine BM-derived stromal cell line able to osteoblast-like and adipocyte-like cell differentiation; *StromaNKtert*, human cell line derived from BM-stromal cells and immortalized by hTERT; *UCB408E6E7TERT-33*, human umbilical cord blood-derived MSCs and immortalized by hTERT; *UE6E7T-2*, human BM-derived MSCs and immortalized by hTERT; *Wnt*, wingless-type MMTV integration site family; *XIAP*, X-linked inhibitor of apoptosis protein.

## Effect of Mesenchymal Stem/Stromal Cells on Gene Expression

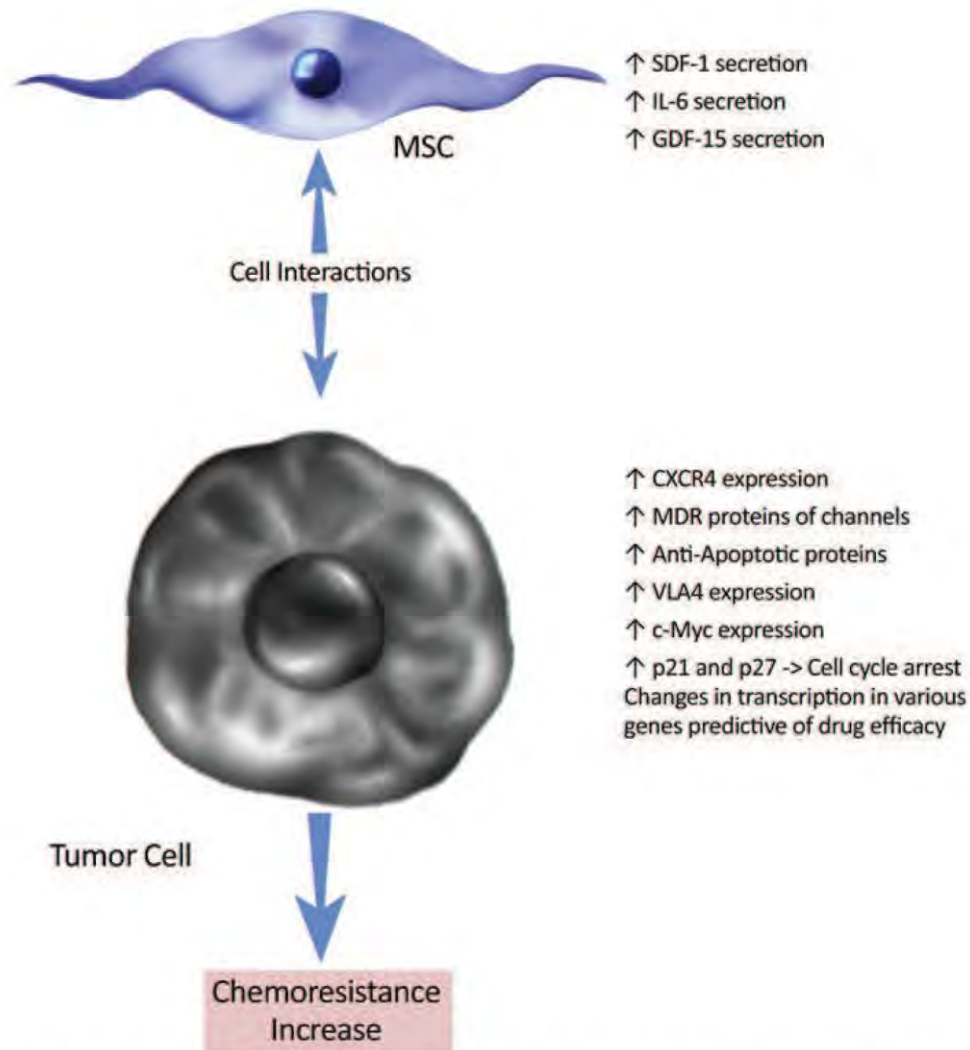
MSCs have been found to modify the transcription profile of genes that predict the response to certain treatments. Interactions between tumor cells and their microenvironment constitute part of an important process leading to the modification of the microenvironment toward a tumor-promoting one (Fig. 13.2). Microenvironment cells including MSCs can then modify the phenotype of tumor cells, which would be able to acquire changes in their ability to proliferate, migrate, and metastasize, as well as to acquire an increased resistance to treatment.<sup>50,51,53–55,144–146</sup> Indeed, coculture of BM-MSCs with ovarian tumor cells leads to a modification of the transcriptomic profile of tumor cells. Ovarian tumor cells will then overexpress genes involved in drug resistance to many anticancer drugs (Table 13.1). Thus, in the presence of BM-MSCs, Lis et al. observed an increased transcription of the *activating transcription factor 2 (ATF2)* gene in ovarian tumor cells.<sup>55</sup> ATF2 is a transcription factor involved in DNA damage<sup>147</sup> and can induce resistance to DNA-damaging treatments, such as to cisplatin in breast cancer or nonsmall-cell lung cancer cells, as well as to etoposide<sup>148</sup> and to radiotherapy in melanoma cells.<sup>149</sup> They also observed an increase in the transcription of *RAS guanyl releasing protein 1 (RASGRP1)* gene, which when overexpressed can cause resistance to mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitors,<sup>150</sup> and a decreased transcription of *B-cell translocation gene 2 (BTG2)* gene, the loss of which is predictive of resistance to tamoxifen.<sup>151</sup> Altogether, these findings demonstrate that interaction of tumor cells with MSCs leads to the transcription of genes involved in resistance to treatment in tumor cells.

## Discussion

Chemoresistance is a major problem hindering the successful treatment of many types of cancers, including ovarian or pancreatic adenocarcinoma, breast carcinoma, and hematologic diseases. It implicates the activation or downregulation of several signaling pathways.

MSCs are self-renewing, multipotent progenitors that can be isolated from various tissues. They are being widely tested in clinical trials by virtue of their multiple biological functions including multilineage differentiation, tissue-repair promotion, antiinflammatory activity, immunosuppression, and neuroprotection.<sup>13</sup> In terms of the mechanisms underlying these biological functions, MSCs were initially believed to home in injured tissues, where they would differentiate and replace the damaged cells. However, subsequent research showed that in fact rates of MSC engraftment and differentiation at injury sites are very low and transient. The current view is that MSCs exert their therapeutic effects mainly through secreted trophic factors.

MSCs are isolated mainly from the bone marrow or from adipose tissues but can be easily isolated from many tumor biopsies. Using immunohistochemistry and a panel of antibodies, MSC-like cells, including a wide range of stromal cells, can be identified inside the tumors or at their periphery. Their presence in high levels within a tumor has been correlated with poor prognosis and chemoresistance.<sup>57</sup>



**FIGURE 13.2** Interactions between tumor cells and MSCs modify the phenotype of these two cell types leading to an increase in tumor chemoresistance.

When cultured *in vitro*, MSCs derived from different tissues show very similar characteristics and functionalities, suggesting that different tissue-intrinsic stromal/stem cells might behave as MSCs when characterized *in vitro*. In this scenario, MSCs can actively participate in tissue repair upon their damage-stimulated release from blood vessels in any tissue. Whatever their origin, MSCs' multipotency allows them to differentiate easily in different cell types. This differentiation requires multiple steps and explains the different phenotypes associated with MSCs. BM-MSCs do express the MSC-associated surface antigens CD73, CD90, and CD105. MSCs also express other phenotypic markers and are also referred to as CA-MSCs, or AT-MSCs depending on the tissue of origin though they are difficult to distinguish from other stromal cells *in vivo*. It is reasonable

to assume that the different phenotypes are associated with different functions. One important consideration is the difficulty ensuring that all the published results come from comparable cells.

Properties harbored by MSCs allow their attraction to inflammation sites where they actively participate toward tissue repair and induce a decrease in T-cell immunity.<sup>29,47</sup> These properties have made them very good tools for use in cell therapy or for cell-mediated delivery of drugs, genes, or miRNAs to tumor sites. Indeed, MSCs have inherent tumor-tropic and migratory properties, which allow them to serve as vehicles for targeted drug delivery systems in isolated tumors and metastatic diseases.<sup>152,153</sup> The clinical use of MSCs began in the 1990s, after which no adverse events were linked to MSCs, and some clinical benefits were observed after MSC infusions. Today, more than 100 clinical trials are registered at [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), involving the use of bone marrow-, adipose-, or placenta-derived MSCs and covering a wide spectrum of diseases.<sup>154,155</sup> More than half of the registered trials utilize autologous MSCs. Routes of delivery include both systemic and local administrations.

The fact that MSCs play an important role in tumor progression and chemoresistance could be a problem with regards of their use as therapeutic tools.<sup>156</sup> Indeed, MSCs injected intravenously are attracted to tumor sites where they participate toward their progression and chemoresistance acquisition.<sup>51</sup> Today, patients presenting a recent history of cancer (according to the protocol) are excluded from some clinical trials involving an MSC therapeutic protocol in regenerative medicine.<sup>155</sup>

To revert chemoresistance, therapeutic drugs targeting MSCs could be proposed. However, MSCs are present throughout the body and play a physiological role that would also be impacted. It would be interesting to determine whether CA-MSCs have different characteristics compared to physiological MSCs in order to identify new therapeutic targets. Teng et al. showed by inducing targeted methylation of two tumor suppressor genes, that MSCs could differentiate into cancer-initiating cells that have acquired resistance to treatment.<sup>157</sup> Using a targeted DNA methylation technique, they hypermethylated promoters of the *hypermethylated in cancer 1 (HIC1)* and *Ras association domain family member 1 (RassF1A)* tumor suppressor gene. This hypermethylation leads to the transformation of MSCs that acquire tumor-initiating cell characteristics with loss-of-anchorage dependence, increased capacity to form colonies, pluripotency, and treatment resistance (carboplatin).<sup>157</sup> Several trials investigating drugs to target cancer stem cells are underway and may also reverse MSC-induced chemoresistance.<sup>158,159</sup>

The manner by which MSCs affect tumor progression or chemoresistance could be attributed to two different mechanisms: secreted factors or cell-to-cell contacts. It would be of great interest to target the release of factors implicated in chemoresistance acquisition, some of which were reviewed here. Clinical trials using targeted therapies are ongoing (directed against SDF-1, IL-6, among others).<sup>155</sup> More general approaches using proteomics, transcriptomics, and miRNAomics strategies to identify factors released by MSCs and implicated in chemoresistance are also underway.



## List of Acronyms and Abbreviations

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Abl</b>                      | Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1                                    |
| <b>Akt</b>                      | Protein kinase B  |
| <b>ALL</b>                      | Acute lymphocytic leukemia  |
| <b>AML</b>                      | Acute myeloid leukemia  |
| <b>ATF2</b>                     | Activating transcription factor 2   |
| <b>AT-MSC</b>                   | Adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cell                                |
| <b>BAD</b>                      | Bcl-2-associated death promoter   |
| <b>Bcl-2</b>                    | B-cell lymphoma-2   |
| <b>Bcl-xL</b>                   | B-cell lymphoma-extra large   |
| <b>Bcr</b>                      | Breakpoint cluster region   |
| <b>BM</b>                       | Bone marrow   |
| <b>BM-MSC</b>                   | Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells                                  |
| <b>BTG2</b>                     | B-cell translocation gene 2   |
| <b>CA-MSC</b>                   | Carcinoma-associated mesenchymal stem/stromal cells                                 |
| <b>CCNDBP1</b>                  | Cyclin D-type binding-protein 1   |
| <b>CCL5</b>                     | Chemokine (C-C motif) ligand 5  |
| <b>cIAP</b>                     | c-Inhibitor of apoptosis protein  |
| <b>CLL</b>                      | Chronic lymphocytic leukemia  |
| <b>CML</b>                      | Chronic myeloid leukemia  |
| <b>COX</b>                      | Cyclooxygenase  |
| <b>CXCL12</b>                   | Chemokine (C-X-C motif) ligand 12   |
| <b>CXCR4</b>                    | Chemokine (C-X-C motif) receptor 4  |
| <b>DDIT3</b>                    | DNA-damage-inducible transcript 3   |
| <b>ERCC1</b>                    | Excision repair cross-complementation group 1                                       |
| <b>ERK</b>                      | Extracellular signal-regulated kinase   |
| <b>FGF</b>                      | Fibroblast growth factor  |
| <b>5-FU</b>                     | 5-Fluorouracil  |
| <b>FLT3</b>                     | Fms-like tyrosine kinase 3  |
| <b>GADD</b>                     | Growth arrest and DNA damage  |
| <b>GDF-15</b>                   | Growth differentiation factor 15  |
| <b>hERG1</b>                    | Human ether-à-go-go related gene 1  |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Hypoxia-inducible factor 1-alpha  |
| <b>hMSC</b>                     | Human mesenchymal stem/stromal cells  |
| <b>Hospicells</b>               | Assimilated to carcinoma-associated MSCs isolated from patients with ovarian cancer |
| <b>HS-5</b>                     | Immortalized human marrow stromal cell line with MSC morphology and phenotype       |
| <b>IL</b>                       | Interleukin   |
| <b>JAK</b>                      | Janus kinase  |
| <b>JAK1</b>                     | Janus kinase 1  |
| <b>JAK2</b>                     | Janus kinase 2  |
| <b>LEF1</b>                     | Lymphoid enhancer-binding factor 1  |
| <b>MARCKS</b>                   | Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate                               |
| <b>Mcl-1</b>                    | Myeloid cell leukemia 1   |
| <b>MDR</b>                      | Multidrug resistance  |
| <b>MEK</b>                      | Mitogen-activated protein kinase kinase   |
| <b>miRNA</b>                    | Micro-ribonucleic acid  |
| <b>MM</b>                       | Multiple myeloma  |
| <b>mRNA</b>                     | Messenger ribonucleic acid  |

**MS-5** Murine stromal cell line with mesenchymal morphology and able to differentiate into adipocytes  
**MSC** Mesenchymal stem/stromal cells  
**NF- $\kappa$ B** Nuclear factor-kappa B  
**ORF** Open reading frame  
**p210<sup>Bcr-Abl</sup>** 210 kDa fusion protein obtained after juxtaposition of the *Abelson (Abl)* gene to a part of the *Bcr (breakpoint cluster region)* gene  
**PGE2** Prostaglandin E2  
**Pgp** P-glycoprotein  
**PI3K** Phosphatidylinositol 3-kinases  
**qRT-PCR** Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction  
**RASGRP1** RAS guanyl releasing protein 1  
**Rel** V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog  
**RNA** Ribonucleic acid  
**S1P** Sphingosine-1-phosphate  
**SCF** Skp, Cullin, F-box containing complex  
**SDF-1** stromal cell-derived factor-1  
**siRNA** Small interfering ribonucleic acid  
**SKP2** S-phase kinase-associated protein 2  
**STAT3** Signal transducer and activator of transcription 3  
**TAF** Tumor-associated fibroblasts  
**TGF $\beta$**  Transforming growth factor beta  
**TXAS** Thromboxane A synthase  
**Tyk2** Tyrosine kinase 2  
**VCAM-1** Vascular cell adhesion molecule-1  
**VEGF** Vascular endothelial growth factor  
**VLA4** Very late antigen-4  
**Wnt** Wingless-type MMTV integration site family  
**XIAP** X-linked inhibitor of apoptosis protein

## References

1. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011;**11**:393–410.
2. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;**307**:58–62.
3. Sefidgar M, et al. Numerical modeling of drug delivery in a dynamic solid tumor microvasculature. *Microvasc Res* 2015;**99**:43–56.
4. Cosse J-P, Michiels C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;**8**:790–7.
5. Régina A, et al. Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood–brain barrier. *Cancer Metastasis Rev* 2001;**20**:13–25.
6. Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA Cancer J Clin* 2009;**59**:42–55.
7. Wang J, Huang Y. Pharmacogenomics of sex difference in chemotherapeutic toxicity. *Curr Drug Discov Technol* 2007;**4**:59–68.
8. Milano G, Chamorey A-L. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol Int* 2002;**19**:177–89.
9. Galluzzi L, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;**31**:1869–83.

10. Chatelut E, Canal P, Bugat R. Pharmacokinetics and individual dose adjustment of carboplatin. *Bull Cancer (Paris)* 2000;**87**. Spec No. 17–23.
11. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;**13**:714–26.
12. Sève P, Reiman T, Dumontet C. The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;**67**:136–43.
13. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 2012;**10**:709–16.
14. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;**8**:315–7.
15. Mohal JS, Tailor HD, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells and their applicability for musculoskeletal applications. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012;**7**:103–9.
16. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 2007;**25**:69–77.
17. Boeuf S, Richter W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem Cell Res Ther* 2010;**1**:31.
18. Rastegar F, et al. Mesenchymal stem cells: molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2010;**2**:67–80.
19. Chen G, et al. In vivo real-time visualization of mesenchymal stem cells tropism for cutaneous regeneration using NIR-II fluorescence imaging. *Biomaterials* 2015;**53**:265–73.
20. Pittenger MF, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**:143–7.
21. Jiang Y, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;**418**:41–9.
22. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 2010;**316**:2213–9.
23. Dittmer J, Leyh B. Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression (review). *Int J Oncol* 2014;**44**:1789–98.
24. Santos JM, et al. Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Res Ther* 2015;**6**:90.
25. Akram KM, Samad S, Spiteri MA, Forsyth NR. Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms. *Respir Res* 2013;**14**:9.
26. Touboul C, Vidal F, Pasquier J, Lis R, Rafii A. Role of mesenchymal cells in the natural history of ovarian cancer: a review. *J Transl Med* 2014;**12**:271.
27. Li H, Fu X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res* 2012;**348**:371–7.
28. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008;**3**:e1886.
29. Martinet L, et al. Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *Int J Cancer* 2010;**126**:2143–52.
30. Martinet L, et al. A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2009;**39**:752–62.
31. Taran R, et al. In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci* 2014;**39**:157–69.
32. Joyce N, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med* 2010;**5**:933–46.

33. Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell Mol Life Sci* 2013;**70**:3871–82.
34. Lewis CM, Suzuki M. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells for amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cell Res Ther* 2014;**5**:32.
35. Ferroni L, et al. Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2013;**129**:89–115.
36. Sadan O, Melamed E, Offen D. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009;**9**:1487–97.
37. Frausin S, et al. Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochem* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.005>.
38. Park JS, Suryaprakash S, Lao Y-H, Leong KW. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.002>.
39. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 2013;**45**:e54.
40. Putz Todd G, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Mesenchymal stem cells as vehicles for targeted therapies. *Drug Discov Dev – Present Future* 2011;(Part 4, 21).
41. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008;**15**:730–8.
42. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 1993;**82**:3712–20.
43. Olechnowicz SWZ, Edwards CM. Contributions of the host microenvironment to cancer-induced bone disease. *Cancer Res* 2014;**74**:1625–31.
44. Kaplan RN, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;**438**:820–7.
45. Kucerova L, Skolekova S. Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells. *Neoplasma* 2013;**60**:1–10.
46. Barcellos-de-Souza P, Gori V, Bambi F, Chiarugi P. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1836**:321–35.
47. Kidd S, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 2009;**27**:2614–23.
48. Carrero R, et al. IL1 $\beta$  induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- $\kappa$ B. *Stem Cell Rev* 2012;**8**:905–16.
49. Liu X, et al. SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell* 2011;**2**:845–54.
50. Houthuijzen JM, Daenen LGM, Roodhart JML, Voest EE. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br J Cancer* 2012;**106**:1901–6.
51. Roodhart JML, et al. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* 2011;**20**:370–83.
52. Thibault B, Castells M, Delord J-P, Couderc B. Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition. *Cancer Metastasis Rev* 2014;**33**:17–39.
53. Castells M, Thibault B, Delord J-P, Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 2012;**13**:9545–71.
54. Karnoub AE, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007;**449**:557–63.

55. Lis R, et al. Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells induces a background dependent pro-metastatic transcriptomic profile. *J Transl Med* 2014;**12**:59.
56. Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:2519–26.
57. Rafii A, et al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One* 2008;**3**:e3894.
58. Pasquet M, et al. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 2010;**126**:2090–101.
59. Castells M, et al. Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis* 2013;**4**:e887.
60. Bochet L, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res* 2013;**73**:5657–68.
61. Takahara K, et al. Adipose-derived stromal cells inhibit prostate cancer cell proliferation inducing apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;**446**:1102–7.
62. McLean K, et al. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* 2011;**121**:3206–19.
63. Castells M, et al. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett* 2012;**326**:59–68.
64. Mueller LP, et al. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells* 2006;**24**:2753–65.
65. Beane OS, Fonseca VC, Darling EM. Adipose-derived stem cells retain their regenerative potential after methotrexate treatment. *Exp Cell Res* 2014;**327**:222–33.
66. Burger JA, Kipps TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma* 2002;**43**:461–6.
67. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:665–74.
68. Kurtova AV, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009;**114**:4441–50.
69. Bewry NN, et al. Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2008;**7**:3169–75.
70. Brocke-Heidrich K, et al. Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 2004;**103**:242–51.
71. Yamagiwa Y, Marienfeld C, Meng F, Holcik M, Patel T. Translational regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein by interleukin-6: a novel mechanism of tumor cell survival. *Cancer Res* 2004;**64**:1293–8.
72. Moreaux J, et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* 2004;**103**:3148–57.
73. Jin L, et al. CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther* 2008;**7**:48–58.
74. Ambudkar SV, et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;**39**:361–98.
75. Lis R, et al. Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells triggers pro-metastatic properties. *PLoS One* 2012;**7**:e38340.

76. Gupta M, et al. Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis. *Oncogene* 2005;**24**:7170–9.
77. De Smaele E, et al. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signaling. *Nature* 2001;**414**:308–13.
78. Riganti C, Kopecka J, Panada E, Barak S, Rubinstein M. The role of C/EBP- $\beta$  LIP in multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 2015;**107**.
79. Pillozzi S, et al. Chemotherapy resistance in acute lymphoblastic leukemia requires hERG1 channels and is overcome by hERG1 blockers. *Blood* 2011;**117**:902–14.
80. Borriello L, DeClerck YA. Tumor microenvironment and therapeutic resistance process. *Méd Sci* 2014;**30**:445–51.
81. Sanz-Rodríguez F, Hidalgo A, Teixidó J. Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* 2001;**97**:346–51.
82. Yanamandra N, et al. Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:591–9.
83. Mraz M, et al. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin  $\alpha$ -4- $\beta$ -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol* 2011;**155**:53–64.
84. Nefedova Y, Landowski TH, Dalton WS. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* 2003;**17**:1175–82.
85. Lwin T, et al. Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Blood* 2007;**110**:1631–8.
86. Wei Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;**28**:141.
87. Ramasamy R, et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 2007;**21**:304–10.
88. Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gibrilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood* 2004;**103**:3503–10.
89. Nwabo Kamdje AH, et al. Role of stromal cell-mediated Notch signaling in CLL resistance to chemotherapy. *Blood Cancer J* 2012;**2**:e73.
90. Nwabo Kamdje AH, et al. Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Blood* 2011;**118**:380–9.
91. Zeng Z, et al. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol Cancer Ther* 2006;**5**:3113–21.
92. Corcoran KE, et al. Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow. *PLoS One* 2008;**3**:e2563.
93. Vianello F, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* 2010;**95**:1081–9.
94. Lis R, et al. Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *Int J Cancer* 2011;**128**:715–25.
95. Kim J-A, et al. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2015;**75**:2222–31.

96. Peled A, et al. Immature leukemic CD34<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells* 2002;**20**:259–66.
97. Kojima K, et al. p53 activation of mesenchymal stromal cells partially abrogates microenvironment-mediated resistance to FLT3 inhibition in AML through HIF-1 $\alpha$ -mediated down-regulation of CXCL12. *Blood* 2011;**118**:4431–9.
98. Hubin F, et al. Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more mature progenitors. *Stem Cells* 2005;**23**:1626–33.
99. Hoellenriegel J, et al. The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* 2014;**123**:1032–9.
100. Greco SJ, et al. AMD3100-mediated production of interleukin-1 from mesenchymal stem cells is key to chemosensitivity of breast cancer cells. *Am J Cancer Res* 2011;**1**:701–15.
101. Rossi J-F, Lu Z-Y, Jourdan M, Klein B. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin Cancer Res* 2015;**21**:1248–57.
102. Lichtenstein A, Tu Y, Fady C, Vescio R, Berenson J. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol* 1995;**162**:248–55.
103. Frassanito MA, Cusmai A, Iodice G, Dammacco F. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 2001;**97**:483–9.
104. Dreuw A, et al. Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2005;**124**:28–37.
105. Shain KH, et al. Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res* 2009;**69**:1009–15.
106. Duan Z, et al. Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:5055–63.
107. Wang Y, et al. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 2010;**295**:110–23.
108. Wang Y, et al. Autocrine production of interleukin-6 confers ovarian cancer cells resistance to tamoxifen via ER isoforms and SRC-1. *Mol Cell Endocrinol* 2014;**382**:791–803.
109. Efferth T, Fabry U, Osieka R. Interleukin-6 affects melphalan-induced DNA damage and repair in human multiple myeloma cells. *Anticancer Res* 2002;**22**:231–4.
110. Corre J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* 2007;**21**:1079–88.
111. Golay J, et al. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity in vitro and in vivo and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. *Leukemia* 2007;**21**:1892–900.
112. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;**11**:329–41.
113. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 2015;**15**:7–24.
114. Baer R, et al. Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110 $\alpha$ . *Genes Dev* 2014;**28**:2621–35.
115. Dai Y, Lawrence TS, Xu L. Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B. *Am J Transl Res* 2009;**1**:1–15.
116. Antoon JW, et al. Targeting NF $\kappa$ B mediated breast cancer chemoresistance through selective inhibition of sphingosine kinase-2. *Cancer Biol Ther* 2011;**11**:678–89.

117. Lundqvist J, Yde CW, Lykkesfeldt AE.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits cell growth and NF $\kappa$ B signaling in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Steroids* 2014;**85**:30–5.
118. Cilloni D, et al. The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia* 2006;**20**:61–7.
119. Xu J, Zhou P, Wang W, Sun A, Guo F. RelB, together with RelA, sustains cell survival and confers proteasome inhibitor sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells from bone marrow. *J Mol Med* 2014;**92**:77–92.
120. Sheng X, Mittelman SD. The role of adipose tissue and obesity in causing treatment resistance of acute lymphoblastic leukemia. *Front Pediatr* 2014;**2**:53.
121. Tung S, et al. PPAR $\alpha$  and fatty acid oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;**122**:969–80.
122. Kurtova AV, et al. Blocking PGE<sub>2</sub>-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature* 2015;**517**:209–13.
123. Selvam SP, Ogretmen B. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling in cancer therapeutics and drug resistance. *Handb Exp Pharmacol* 2013:3–27. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-1511-4\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-1511-4_1).
124. Dandekar DS, Lopez M, Carey RI, Lokeshwar BL. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 2005;**115**:484–92.
125. Corre J, et al. Bioactivity and prognostic significance of growth differentiation factor GDF15 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells in multiple myeloma. *Cancer Res* 2012;**72**:1395–406.
126. Keenan MM, Chi J-T. Alternative fuels for cancer cells. *Cancer J (Sudbury Mass)* 2015;**21**:49–55.
127. Ehsanipour EA, et al. Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res* 2013;**73**:2998–3006.
128. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui C-H, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest* 2007;**117**:1049–57.
129. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997;**16**:3797–804.
130. Tian J, He H, Lei G. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in bone cancers. *Tumour Biol* 2014;**35**:9439–45.
131. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov* 2014;**13**:513–32.
132. Yang Y, et al. Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett* 2013;**333**:9–17.
133. Xia B, et al. c-Myc plays part in drug resistance mediated by bone marrow stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2015;**39**:92–9.
134. Munoz JL, et al. Delivery of functional anti-miR-9 by mesenchymal stem cell-derived exosomes to glioblastoma multiforme cells conferred chemosensitivity. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013;**2**:e126.
135. Kadera BE, et al. MicroRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor-associated fibroblasts promotes metastasis. *PLoS One* 2013;**8**:e71978.
136. Jeon ES, et al. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 2008;**26**:789–97.
137. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* 2014;**15**:4142–57.
138. Lee J-K, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One* 2013;**8**:e84256.
139. Ono M, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 2014;**7**:ra63.
140. Lin Y, et al. Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin Med J (Engl)* 2006;**119**:905–10.



141. Konopleva M, et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002;**16**:1713–24.
142. Balakrishnan K, et al. Influence of bone marrow stromal microenvironment on forodesine-induced responses in CLL primary cells. *Blood* 2010;**116**:1083–91.
143. Pei X-Y, et al. Circumvention of Mcl-1-dependent drug resistance by simultaneous Chk1 and MEK1/2 inhibition in human multiple myeloma cells. *PLoS One* 2014;**9**:e89064.
144. Cuiffo BG, Karnoub AE. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adhes Migr* 2012;**6**:220–30.
145. Koh BI, Kang Y. The pro-metastatic role of bone marrow-derived cells: a focus on MSCs and regulatory T cells. *EMBO Rep* 2012;**13**:412–22.
146. Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2010;**29**:249–61.
147. Lo Iacono M, et al. ATF2 contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and celastrol induces cisplatin resensitization through inhibition of JNK/ATF2 pathway. *Int J Cancer* 2015;**136**:2598–609.
148. Lau E, et al. Transcriptional repression of IFN $\beta$ 1 by ATF2 confers melanoma resistance to therapy. *Oncogene* 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2015.22>.
149. Ronai Z, et al. ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene* 1998;**16**:523–31.
150. Lauchle JO, et al. Response and resistance to MEK inhibition in leukaemias initiated by hyperactive Ras. *Nature* 2009;**461**:411–4.
151. Takahashi M, et al. Loss of B-cell translocation gene 2 expression in estrogen receptor-positive breast cancer predicts tamoxifen resistance. *Cancer Sci* 2014;**105**:675–82.
152. Gao Z, Zhang L, Hu J, Sun Y. Mesenchymal stem cells: a potential targeted-delivery vehicle for anti-cancer drug, loaded nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2013;**9**:174–84.
153. Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 2007;**67**:6304–13.
154. Kucerova L, Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Kozovska Z. Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer* 2013;**13**:535.
155. [www.clinicaltrials.org](http://www.clinicaltrials.org).
156. Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, Donnenberg VS, Donnenberg AD. Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie* 2013;**95**:2235–45.
157. Teng I-W, et al. Targeted methylation of two tumor suppressor genes is sufficient to transform mesenchymal stem cells into cancer stem/initiating cells. *Cancer Res* 2011;**71**:4653–63.
158. Rasheed ZA, Kowalski J, Smith BD, Matsui W. Concise review: emerging concepts in clinical targeting of cancer stem cells. *Stem Cells* 2011;**29**:883–7.
159. Ciurea ME, et al. Cancer stem cells: biological functions and therapeutically targeting. *Int J Mol Sci* 2014;**15**:8169–85.
160. Zhang B, et al. Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt- $\beta$ -catenin signaling. *Blood* 2013;**121**:1824–38.
161. Scherzed A, et al. BMSC enhance the survival of paclitaxel treated squamous cell carcinoma cells in vitro. *Cancer Biol Ther* 2011;**11**:349–57.

**Publication 3 en cours de soumission en co-auteur :**

**Thibault B., Genre L., Le Naour A., Broca C., Barbier M., Vuagniaux G., Delord JP., Wiedermann N. & Couderc B.**

**DEBIO 1143, an IAP inhibitor, reverses ovarian cancer cells carboplatin resistance and triggers apoptotic or necroptotic cell death**

**Title:** DEBIO 1143, an IAP inhibitor, reverses ovarian cancer cells carboplatin resistance and triggers apoptotic or necroptotic cell death

**Authors: Authors:** Benoît Thibault <sup>a</sup>, Ludivine Genre <sup>a</sup>, Augustin Le Naour <sup>a</sup>, Clotilde Broca <sup>a</sup>, , Maryse Barbier <sup>b</sup>, Grégoire Vuagniaux <sup>b</sup>, Jean Pierre Delord <sup>a</sup>, Norbert Wiedermann <sup>b</sup>, Bettina Couderc <sup>a, †</sup>

**Author affiliations:**

<sup>a</sup>: Institut Claudius Regaud –IUCT Oncopole, University Toulouse III, Toulouse, France

<sup>b</sup>: Debiopharm, CH-1002 Lausanne , Switzerland

†**Corresponding author:** Bettina Couderc, IUCT Oncopole, University Toulouse III,

1 avenue Irene Joliot Curie, 31059 Toulouse cedex, France

33 5 31 15 52 16

[Couderc.bettina@iuct-oncopole.fr](mailto:Couderc.bettina@iuct-oncopole.fr)

## Abstract

The poor prognosis of ovarian cancer (leading cause of death by gynecological cancers) is mainly due to the acquisition of resistance against carboplatin. Among the possible resistance pathways, resistance to apoptosis and especially the activation of inhibitor of apoptosis proteins (IAP) cIAP1 and XIAP have been implied. DEBIO 1143, a SMAC Mimetic, belongs to a new class of targeted agents already in clinical trial that activate apoptotic cell death and block pro-survival signaling in cancer cells. Here, we validated *in vitro* the cell viability inhibition effects of DEBIO 1143 on 2 carboplatin-sensitive cell lines (IGROV-1 and A2780S) and 3 carboplatin-resistant cell lines (A2780R, SKOV-3 and EFO-21). We showed that DEBIO 1143 can reverse resistance of all carboplatin-resistant cell lines to carboplatin. Its mechanism implied cell death by apoptosis and also by necroptosis depending on cell lines. In order to identify a biomarker able to predict the sensitivity of the cell lines to the DEBIO1143 treatment we analyzed the expression of DEBIO 1143 targets, cIAP1 and XIAP and one of their downstream target caspase 9. These proteins did not constitute a marker of DEBIO 1143 sensitivity/resistance. *In vivo* results showed that DEBIO 1143 highly potentiate carboplatin treatment and, contrary to *in vitro* experiments, constitutes a potent anti-tumor agent in monotherapy.

## Introduction

Ovarian cancer management still remains a great challenge. This cancer is the leading cause of death for gynecological cancers and the 4<sup>th</sup> cause of women cancer death [1]. 70% of patients are diagnosed at advanced stages (III and IV) with a 5-year survival of only 30% [2, 3]. The reference treatment is a debulking surgery associated with a chemotherapy combining carboplatin and taxanes which remains today the most effective treatment for high grade serous ovarian cancer. The success of the treatment mainly depends on the surgery which has to be complete and on the sensitivity of the potential remaining cells to carboplatin. Despite an initial clinical response in most patients (70 to 80%), a recurrence frequently occurs with the acquisition of a resistance against carboplatin [3, 4]. Since 20 years few improvements occurred for the management of ovarian cancer. Recently, oncologists suggested the addition of an antiangiogenic treatment (bevacizumab) to the standard therapy at the first recurrence [5] and more recently the addition of an anti-PARP treatment (Olaparib) for BRCA mutated patients (either germinal or somatic) [6]. However For BRCA1 non mutated ovarian cancers there is still a crucial need to develop new therapies able to reverse carboplatin resistance.

Carboplatin treatment induces the apoptosis of cancer cells. Apoptosis is a highly regulated cell death and the balance between activators and inhibitors of this pathway could be the cause of an innate or acquired chemoresistance, especially in the ovarian cancer [7, 8]. Resistance to carboplatin mediated apoptosis could be explained between others through the activation of two different pathways which activate critical apoptosis regulators such as inhibitor of apoptosis proteins (IAPs). Among the eight IAP members that have been identified in mammalian cells, cIAP1 and cIAP2 interact with tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2), blocking the formation of the caspase-8 activation complex and thereby inhibiting TNF receptor-mediated apoptosis [9-11]. X-linked IAP (XIAP), on the other hand,

binds to and antagonizes three caspases, including two effectors, caspase-3 and -7, and an initiator, caspase-9, thus blocking both intrinsic and extrinsic apoptosis (death receptor-mediated and mitochondria-mediated apoptosis) [9, 12]. Concerning gynecologic cancers, Sui and *al.* mentioned that IAPs are frequently deregulated in ovarian cancer [13]. Several publications pointed the implications of XIAP in chemoresistance acquisition in various cancers included the ovarian cancer [14-16]. In our team we showed that when the ovarian cancer cells are co-cultured with cells from their microenvironment such as mesenchymal stromal cells (MSC) they acquired resistance to apoptosis due to the activation of the Akt pathway and the stabilization of XIAP [17]. Thus, exploiting the IAP-caspase interaction may be a logical strategy for anti-cancer drug development and sensitization to carboplatin.

Several studies mentioned that the depletion of XIAP enhances cell death *in vitro* and sensitizes platinum-resistant ovarian tumor cells [15, 16, 18]. *In vivo*, the XIAP inhibition in ovarian tumor models inhibits tumor growth and increases mice survival [19, 20]. All these data highlight the necessity of targeting IAPs to sensitize ovarian tumors to carboplatin.

The IAP are characterized by the presence of one to three baculovirus IAP repeat (BIR) domains. While the third BIR domain (BIR3) of XIAP binds to and inhibits caspase-9, the second BIR domain (BIR2), together with the linker preceding it, binds to and inhibits both caspase-3 and caspase-7 [9]. Smac, the second mitochondria-derived activator of caspases, is an endogenous antagonist of cIAP1/2 and XIAP. After being released from mitochondria into the cytosol, the first 55 N-terminal residues of Smac are removed by a protease to expose an Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) tetrapeptide, the so-called IAP binding motif. The interaction of Smac with the BIR domain(s) of XIAP, cIAP1, and cIAP2 is mediated by this AVPI binding motif. In cytosol, Smac forms a homodimer and binds concurrently to both the BIR2 and BIR3 domains of XIAP. Binding of Smac with XIAP effectively blocks the inhibition of XIAP of both caspase-9 and caspase-3/7 [9].

Many laboratories have developed “Smac mimetics” molecules in order to inhibit IAP and to reverse apoptosis resistance. These Smac mimetics can induce rapid degradation of cIAP1 and cIAP2 in cells and antagonize the functions of XIAP in functional assays. We can mentioned between others SM-164, LBW242, SM83 and SM-1200 which showed an anti-tumor effects in ovarian cancer and other models when administrated alone or in combination with TNF- $\alpha$ , TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) or chemotherapies, such as cisplatin or paclitaxel [21-24].

DEBIO 1143 (AT-406, SM-406) is an orally active Smac mimetic targeting cIAP1, cIAP2 and XIAP [25]. This Smac mimetic showed a potent anti-tumor efficacy, alone or in combination with chemotherapies in breast or ovarian cancers [26, 27]. In addition, DEBIO 1143 (AT-406) is highly effective in inducing apoptosis in xenograft tumours and is currently in phase I clinical trials for the treatment of solid and hematological human tumors [27, 28]. It is the first SMAC-mimetic registered for clinical trials in patients with advanced cancer. However, little is known about the anti-tumor efficacy of DEBIO 1143 in a larger panel of ovarian tumor cells and the cell death pathways implied have to be deciphered.

Here, we tested *in vitro* the cell viability inhibition effects of DEBIO 1143 on 2 carboplatin-sensitive cell lines (IGROV-1 and A2780S) and 3 carboplatin-resistant cell lines (A2780R, SKOV-3 and EFO-21). We confirmed that DEBIO 1143 had no effect in monotherapy *in vitro* but we highlighted that it can reverse resistance of carboplatin-resistant cell lines to carboplatin. This mechanism implied cell death by apoptosis and also by necroptosis depending on cell lines. This combined effect of SMAC mimetics have been already described. As an exemple Bhatti et al. showed that SMAC mimetics/Bortezomib co-treatment primarily triggers necroptosis or alternatively, engages both apoptotic and necroptotic cell death. The discovery of this synergistic combination that is effective even when apoptosis is blocked has important implications for the development of new treatment strategies [29]. Here we showed that DEBIO 1143 is able to potentiate carboplatin treatment either in apoptosis or in necroptosis resistant ovarian cancer cells. In order to identify a biomarker able to predict the sensitivity of the cell lines to the DEBIO1143 treatment we analyzed the expression of DEBIO 1143 targets, cIAP1 and XIAP and one of their downstream targets caspase 9. These proteins did not constitute a marker of DEBIO 1143 sensitivity/resistance. *In vivo* results showed that DEBIO 1143 highly potentiate carboplatin treatment and, contrary to *in vitro* experiments, constitutes a potent anti-tumor agent in monotherapy.

## **Materials and Methods**

### **Drugs**

Carboplatin was provided by the Claudius Regaud Institut pharmacy at a concentration of 26.9mM. DEBIO 1143 was provided by Debiopharm (Lausanne, Switzerland) and was diluted in Dimethylsulfoxide (DMSO) to obtain a 100mM stock solution.

### **Cell Culture**

Human ovarian adenocarcinoma cell (HOAC) line SKOV-3 (ATCC® numbers HTB-77) was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). HOAC line IGROV-1 was a gift from the Institut Gustave Roussy, Villejuif [30]. A2780S and platinum resistant A2780R were obtained from Sigma Aldrich (France). HOAC line EFO-21 was obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Germany). HOAC were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% of fetal calf serum, supplemented with 1% L-Glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Cell lines were maintained as monolayers at 37°C in an humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. They were periodically checked for mycoplasmas.

### **shRNA-transduced cell lines generation**

pLKO-1® is a lentiviral vector (LV) encoding the shRNA under the control of the U6 promoter as well as the puromycin resistance gene under the control of the hPGK promoter (Sigma Aldrich, France). Two different lentiviral vectors have been constructed corresponding to various targeted region of caspase 9:

1 :

5'CCGGCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCTCGAGAAAGTAGAGTAGGACACAAAGTT  
TTT

2 :

CCGGCAGCTTCCAGATTGACGACAACCTCGAGTTGTCGTCAATCTGGAAGCTGTTT  
TT

The same lentiviral vector encoding a scramble shRNA (5' TTCTAGAGATAGTCTGTACGTTTCAAGAGAACGTACAGACTATCTCTAGAAG) was used as negative control. 293T cells were kindly provided by Genethon (France). Generation of 293T- pLKO-1 casp9 1 or 2 or control and preparation of high titer LV pseudotyped with VSV-G protein have been described previously.  $50 \times 10^3$  cells were plated on 35mm dishes 24h prior to transduction with viral vectors at a MOI of 10:1. Genetically modified cells were selected through their puromycin resistance at  $1 \mu\text{g/ml}$ .

### **Viability assay**

$5 \times 10^3$  HOAC (IGROV-1, A2780S, A2780R, SKOV-3 and EFO-21) were seeded in 96-well plates and treated with increasing concentrations of carboplatin (from  $1000 \mu\text{M}$  to  $15.625 \mu\text{M}$  by 2-fold dilution steps) or DEBIO 1143 (from  $1 \text{mM}$  to  $1 \text{nM}$  by log dilutions) or a combination of carboplatin (from  $1000 \mu\text{M}$  to  $15.625 \mu\text{M}$  by 2-fold dilution steps) and DEBIO 1143 ( $10 \mu\text{M}$ ) 24h after seeding. 48h or 72h after treatment, cell viability was determined by a colorimetric assay using a tetrazolium salt, WST-1 (Roche).

### **Annexin V-FITC/PI assay**

$7.5 \times 10^4$  HOAC (IGROV-1, A2780S, A2780R, SKOV-3 and EFO-21) were seeded in 12-well plates and treated with carboplatin ( $\text{IC}_{50}$  of each cell line after 48h of treatment) or DEBIO 1143 ( $10 \mu\text{M}$ ) or a combination of carboplatin and DEBIO 1143 24h after seeding. 1 or 2 days later, cells were washed twice with fresh PBS, trypsinized (supernatants are kept) and stained with a FITC-Annexin V/PI apoptosis detection kit (BD Pharmingen) according to the manufacturer's protocol. FITC-Annexin staining and PI incorporation are measured in cells with a FACS Calibur flow cytometer and analyzed with Cell Quest software.

### **Western Blot (PARP, cIAP1, XIAP, caspase 9)**

25 µg of proteins were separated by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel. Proteins are transferred on a PVDF membrane (previously activated with methanol). Membranes were saturated 1h in TBS (50mM Tris, 150mM NaCl)/0,1% Tween 20/5% milk and incubated overnight at 4°C with a rabbit primary antibody directed against: PARP (polyclonal, 1:1000, Apoptosis kit, Cell Signaling), XIAP (monoclonal, 1:1000, Apoptosis kit, Cell Signaling), cIAP1 (1:1000, Abcam) or caspase 9 (1:1000, Abcam). Membranes were washed 3 times with TBS/0.1% Tween 20 (TT) then incubated 1h and 30min with a secondary antibody anti-rabbit (1:2000, Cell Signaling) coupled with HRP (Horse Raddish Peroxydase). Membranes were washed 3 times with TT then 2 times with TBS. Immunocomplexes were revealed by Enhanced Chemiluminescence (GE Healthcare, Amersham) and visualized with a photon camera (ChemiDoc, BioRad). The picture treatment was realized with Image Lab.

### **Apoptosis and Necroptosis inhibition**

7.5x10<sup>4</sup> HOAC (SKOV-3 and EFO-21) were seeded in 12-well plates. 48h after seeding, cells were pre-treated 2h or not with z-vad 20µM (pan-caspase inhibitor, Bachem, Switzerland) or necrostatin-1 50µM (inhibitor of RIPK1 and 3, R&D systems, Lille, France) then treated with DEBIO 1143 (10µM) or a combination of carboplatin (IC50 of each cell line after 48h of treatment) and DEBIO 1143 (10µM). 24h after treatment, cell viability was determined by a colorimetric assay using a tetrazolium salt, WST-1 (Roche).

### **Animals**

Four to five week-old female Swiss Nude athymic mice (Charles River laboratories, l'Abresle, France) were included after approval from Claudius Regaud Institute animal ethics committee (ICR-2014-002). They were housed according to the European Laboratory Animal Science Association standards. Mice experimentations began after one week of quarantine.

### ***In vivo* SKOV-3 subcutaneous (s.c.) xenografts**

Seven mice per sub-group were subcutaneously implanted (in one flank) with 10<sup>7</sup> SKOV-3 cells. After 7 days, mice were treated intraperitoneally, once a week during 3 weeks with 40mg/kg of carboplatin or PBS and treated by oral gavage, 5 days per week during 3 weeks with 100mg/kg of DEBIO 1143 or vehicle (malic acid/sodium acetate buffer). The well-being and body weight of mice were checked every 2 to 3 days. Tumor lengths (L) and widths (w) were measured twice a week and the tumor volume extrapolated using the formula: (L x w<sup>2</sup>)/2. Mice were sacrificed *via* cervical dislocation 28 days after the injection of tumor cells. Tumors were sampled then conditioned for histological analysis (formol fixation).

### ***In vivo* SKOV-3 intraperitoneal (i.p.) xenografts**

Eight mice per sub-group were intraperitoneally implanted with  $2.5 \times 10^7$  SKOV-3 cells. After 7 days, mice were treated intraperitoneally, once a week during 3 weeks with 40mg/kg of carboplatin or PBS and treated by oral gavage, 5 days per week during 3 weeks with 100mg/kg of DEBIO 1143 or vehicle (malic acid/sodium acetate buffer). The well-being and body weight of mice were checked every 2 to 3 days. Mice were sacrificed *via* cervical dislocation 21 days after the injection of tumor cells. Autopsies were then performed by two double-blinded specialist surgeons in ovarian cancer surgery to evaluate the abdominal carcinosis index.

### **Histological analysis**

Proliferative indices of tumor from s.c. injections were assessed by immunohistochemical staining of paraffin embedded tumor sections for the proliferation marker Ki67 using mouse monoclonal MIB1 antibody. Ki67 positive nuclei were counted in random fields. The mitotic index was assessed by evaluating the number of cells in mitosis per high-power field (10 high-power fields per tumor).

### **Statistical analysis**

For this entire study, statistical significance was reached for  $p < 0.05$ . Group comparisons were made using the Student's t test (parametric data). Groups' correlation was determined using the non-parametric two-tailed Spearman correlation test. Each experiment was performed at least three times.

### **Results**

#### **DEBIO 1143 sensitizes carboplatin-resistant cells lines to carboplatin-induced cell viability inhibition**

We first tested the cytotoxic effects of carboplatin on 5 HOAC: IGROV-1, A2780S (wild type), A2780R (A2780S after long-term carboplatin treatment), SKOV-3 and EFO-21. We treated these cells with increased concentrations of carboplatin (from  $15.625 \mu\text{M}$  to  $1000 \mu\text{M}$ ) and evaluated their cell viability after 48h and 72h of treatment by a colorimetric assay. The carboplatin induces a concentration-dependent cell viability inhibition in each cell line (Figure 1). We extrapolated the IC<sub>50</sub> of carboplatin after 48h and 72h and concluded that IGROV-1 and A2780S cells are carboplatin-sensitive (IC<sub>50</sub> values around  $70 \mu\text{M}$ ) and A2780R, SKOV-3 and EFO-21 cells are carboplatin-resistant (IC<sub>50</sub> values  $> 100 \mu\text{M}$ ) (Figure 1).

In order to evaluate the capacities of DEBIO 1143 to sensitize cells to carboplatin, we treated our HOAC with increased concentrations of carboplatin (from  $15.625 \mu\text{M}$  to  $1000 \mu\text{M}$ ) in combination with a fixed concentration of DEBIO 1143 ( $10 \mu\text{M}$ ). DEBIO 1143 is not able to enhance the sensitivity of carboplatin-sensitive cells to carboplatin after 48h or 72h of treatment (Figure 1A and 1B). However, we observed that DEBIO 1143 significantly sensitizes



carboplatin-resistant cells to carboplatin with a 1.5 (A2780R) to 5.2-fold (EFO-21) reduction of the IC<sub>50</sub>, depending on the cells. Moreover, after 72h of treatment, DEBIO 1143 totally restored the initial carboplatin sensitivity of A2780R compared to its mother cell line A2780S (Figure 1C). DEBIO 1143 alone presented a very small effect on HOAC cell viability inhibition starting at high concentrations with the exception of A2780S and EFO-21 which showed an higher sensitivity to the compound (Supplementary Figure 1).

Thus, DEBIO 1143 showed a potent efficacy to reverse chemoresistance of carboplatin-resistant cell lines.

### **DEBIO 1143 increases carboplatin-induced apoptosis in carboplatin-resistant cell lines A2780R and SKOV-3**

Apoptosis is the most common cell death induced by carboplatin. Moreover, DEBIO 1143 is targeting IAPs which constitute key inhibitors of this cellular pathway. We so studied the capacity of DEBIO 1143 alone, or in combination with carboplatin, to induce apoptosis.

We treated our HOAC (IGROV-1, A2780S, A2780R, SKOV-3 and EFO-21) with carboplatin (IC<sub>50</sub> of each cell line after 48h of treatment) or DEBIO 1143 (10  $\mu$ M) or a combination of both treatments. After 48h of treatment, we quantified early apoptotic cells according to an Annexin-V/PI assay.

We observed that carboplatin greatly enhances the early apoptotic cells (Annexin V positive and PI negative) percentage in the chemosensitive cells (IGROV-1 and A2780S) and in one carboresistant cell line SKOV-3. The percentage of apoptotic cells in response to carboplatin increased also for A2780R and EFO-21 cells but to a lesser extend (Figure 2A). As for cell viability, DEBIO 1143 alone presented no effect on early apoptosis induction in carbosensitive cell lines (IGROV-1 and A2780S). It induced small effect on A2780R and EFO-21 cells but increased by 30% the percentage of early apoptotic SKOV-3 cells. The association of DEBIO 1143 with carboplatin had no significant effect on carboplatin-sensitive cells but highly increased the percentage of early apoptotic cells in carboplatin-resistant A2780R and SKOV-3 cells compared to both treatments alone. Surprisingly, carboplatin, DEBIO 1143 or the combination of both treatments had no effect on the apoptosis induction in EFO-21 cells whereas these cells presented a high sensitivity to this association in terms of cell viability.

In order to determine if this cell line could have undergone an earlier apoptosis induction, we repeated the experiment and measured apoptosis after 24h of treatment (Supplementary Figure 2A). We obtained the same results as for the 48h treatment and concluded that the DEBIO 1143 seems to not induce apoptosis in EFO-21 cells. To test if the DEBIO 1143 could induce any cell death in these cells, we checked the percentage of late apoptosis and necrotic cells (Annexin V and PI positive) after 24h or 48h of treatment (Figure 2B and Supplementary Figure 2B). Interestingly, we observed that the combination of carboplatin and DEBIO 1143 was able to induce a significant increase of this percentage in

EFO-21 cells indicating that in these cells, the combination of both drugs could trigger necrosis or necroptotic cell death. SKOV-3 cells presented the same pattern but to a lesser extent.

In order to confirm our apoptosis results, we treated our 5 HOAC cell lines in the same conditions than previously and observed by Western Blot the cleavage of PARP associated with early apoptosis steps (Figure 2C). We observed that the carboplatin induced PARP cleavage in all HOAC with the exception of EFO-21 cells. In carboplatin-sensitive cell lines IGROV-1 and A2780S, DEBIO 1143 did not increase the cleavage of PARP induced by the carboplatin confirming the absence of synergy between the two compounds in these cells. In A2780R, this association induced a weak increase in PARP cleavage compared to carboplatin alone whereas in SKOV-3 cells, the combination of carboplatin with DEBIO 1143 was responsible for a total cleavage of the PARP pro-form, indicating that the association of both drugs trigger cell death by apoptosis in this cell line. In EFO-21 cells, no treatment induced any PARP cleavage confirming our previous results showing that the DEBIO 1143 could be responsible of an apoptosis-independent cell death in this cell line.

Thus, DEBIO 1143 activates carboplatin-induced apoptosis in carboplatin-resistant cells lines with the exception of EFO-21 which seem to undergo an apoptosis-independent cell death pathway.

### **DEBIO 1143 is responsible for a necroptosis cell death in EFO-21 cells**

We next wanted to determine which cell death pathway could be implied in the EFO-21 cell viability inhibition induced by the DEBIO 1143. Fulda and Vucic have mentioned that cIAP1 and cIAP2 have important roles in both apoptotic and necroptotic death pathways [31]. They explained that IAPs blockade could induce the formation of a cytosolic complex that includes FADD and caspase 8 which is active on receptor-interacting serine-threonine kinase-3 (RIPK3) dependent necroptosis. Briefly, this caspase-independent cell death pathway shares some common properties with apoptosis and necrosis and is mainly regulated by receptor-interacting protein kinase 1 and 3 (RIPK-1 and RIPK-3). McCabe *et al.* described that the induction of necroptosis was common in ovarian cancer [32].

We pre-treated EFO-21 and SKOV-3 (as a control of apoptosis induction) with Z-vad (pan caspases inhibitor) or Necrostatin-1 (RIPK-1 inhibitor) during 2h and treated the cells with DEBIO 1143 alone or in combination with carboplatin. After 24h, we measured the cell viability inhibition (Figure 3).

We observed that both Z-vad and Necrostatin-1 can inhibit nearly the half of the cell viability inhibition induced by DEBIO 1143 alone or in combination with carboplatin indicating an apoptosis but also a necroptosis implication in the cell death induced by our compounds in these cells. In EFO-21, the Z-vad had no effect confirming an apoptosis-independent pathway. However, Necrostatin-1 strongly inhibited cell viability inhibition induced by the DEBIO 1143 alone and partially inhibited this parameter when our compound was combined with

carboplatin. These results indicated that the DEBIO 1143, alone or in combination with carboplatin induces a necroptosis cell death in EFO-21 cells.

### **DEBIO 1143 strongly inhibits cIAP1 but not XIAP expression in HOAC regardless of their sensitivity/resistance to the compound**

DEBIO 1143 was designed to target and trigger the proteasome degradation of IAPs. Thus, we decided to study the cIAP1 and XIAP levels by Western Blot in HOAC treated with carboplatin, DEBIO 1143 or the combination of both drugs in order to find a potential marker of DEBIO 1143 sensitivity/resistance (Figure 4).

We observed that DEBIO 1143 alone, or in combination with carboplatin, triggers a strong diminution of cIAP1 level in all our HOAC, regardless of their sensitivity/resistance to the compound. However, DEBIO 1143 alone had no effect on XIAP level with the exception of EFO-21 cells where the compound was responsible for the degradation of half of the total protein level. Carboplatin was able to reduce XIAP expression in IGROV-1, A2780S, SKOV-3 and EFO-21 cells with variable efficiency.

Thus, cIAP1 and XIAP are not reliable markers of DEBIO 1143 sensitivity/resistance.

### **DEBIO 1143 efficacy is not relied to the HOAC caspase 9 expression**

Depending on the cell lines, DEBIO 1143 had little to no effect on XIAP level. As XIAP is able to interact with caspase 9, we checked if the expression level of the latter in HOAC. Caspase 9 expression was elevated in carbo-resistant HOAC (A2780R, SKOV-3 and EFO-21) and weak in carbo-sensitive cells (IGROV-1 and A2780S). We then wondered if caspase 9 could be involved in DEBIO 1143 sensitivity. For this purpose we inhibited caspase 9 expression using a lentiviral vector encoding an anti caspase 9 shRNA on the three carboplatin resistant cell lines (A2780R, EFO-21 and SKOV-3). We checked the inhibition of the caspase 9 expression by Western Blot (Figure 5A) and determined cell viability and the associated IC50 of the genetically modified cell lines treated with carboplatin alone or in combination with DEBIO1143 (Figure 5B and C). Caspase 9 inhibition significantly increased carboplatin sensitivity to DEBIO 1143 effect in A2780R but decreased it in SKOV-3 and EFO-21 indicating that caspase 9 does not constitute a marker of DEBIO 1143 sensitivity.

### **DEBIO 1143 alone, or in combination with carboplatin, strongly inhibits tumor growth in *in vivo* SKOV-3 tumors models.**

We previously showed that *in vitro*, DEBIO 1143 presented the capacity to sensitize carboplatin-resistant HOAC to carboplatin treatment. We next wanted to test this capacity in an *in vivo* model of SKOV-3 carboplatin-resistant tumor xenograft. We first injected SKOV-3 cells subcutaneously in the flank of nude mice. 7 days after tumor establishment, we treated mice

intraperitoneally, once a week during 3 weeks with 40mg/kg of carboplatin or PBS and treated by oral gavage, 5 days per week during 3 weeks with 100mg/kg of DEBIO 1143 or vehicle (Figure 6A).

The carboplatin treatment did not affect the SKOV-3 tumor growth confirming the carboplatin-resistant status of these tumors. Contrary to *in vitro* results, DEBIO 1143 alone was able to inhibit tumor growth with a partial regression in 3 mice and a complete regression in 1 mouse (out of 7). The association between carboplatin and DEBIO 1143 triggered a strong tumor growth inhibition with a partial regression in 2 mice, a complete regression in 5 mice (out of 7) and a decreased number of mitosis per cell (Figure 6C).

As ovarian cancer is a disseminated cancer, we performed an *in vivo* experiment in a mouse model where SKOV-3 cells were injected intraperitoneally. This induces a very rapid dissemination of tumor cells and a carcinomatosis associated with ascite production within 4 weeks. 7 days after tumor establishment, we treated mice as described before and sacrificed them when they presented an alteration of their life quality (Figure 6B). The DEBIO 1143 treatment alone did not affect the SKOV-3 tumor growth. Carboplatin slowed down the alteration of the life quality of mice and the apparition of ascitic fluid. The association between carboplatin and DEBIO 1143 triggered a strong tumor growth inhibition with an absence of any sign of tumor progression in more than 60% of mice.

## Discussion

Dysregulation of the apoptotic pathways is a major contributor to cancer development and progression and plays a significant role in cancer resistance to chemotherapies, targeted therapies and radiation. Even if tumours initially respond to these treatments, they often acquire resistance during the course of treatment. Tumour cells can resist to apoptosis by, among others, increasing the expression of proteins blocking pro-apoptotic pathways. Overcoming the fundamental mechanisms of cancer resistance and survival, and activating cancer cell death through apoptosis is a focus of current trends in cancer research and drug development. One novel therapeutic approach is the development of small molecule drugs that mimic Smac (second mitochondria derived activator of caspase), a pro-apoptotic mitochondrial protein that is an endogenous inhibitor of a family of cellular proteins called the Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs). IAPs regulate apoptosis and cancer cell survival and represent the last line of defense for cancer against cell death by apoptosis. Clinically, IAPs are a key factor in cancer survival and progression. Their presence is associated with poor prognosis and tumour resistance to therapies, and as such, are recognized as important therapeutic targets to selectively induced apoptosis in tumour cells. The goal of Smac mimetics (also called IAP antagonists) is to trigger IAP degradation by the proteasome and then reestablishing apoptotic pathways and inducing cancer cell death. The unique action of Smac mimetics can also enhance the therapeutic activity of many existing cancer therapies. So far, five Smac mimetics are currently undergoing evaluation in early clinical trials as cancer therapeutics ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), including both monovalent compounds, which contain one Smac-mimicking moiety (i.e., GDC-0917/CUDC-427, LCL161, and AT-406/Debio1143), and

bivalent agents that are composed of Smac-mimicking elements connected via a chemical linker (i.e., TL32711/birinapant and HGS1029). They have been developed for the treatment of solid tumours as well as hematologic cancers [33, 34].

Concerning the particular case of ovarian cancers, despite their low incidence, they constitute the leading cause of death among gynecological cancers. Advances in therapy over the past several decades have been translated into small improvements in 5-year survival for women with ovarian cancer. The need for novel therapies targeting chemoresistant cells is underscored by the high rate of recurrence after treatment with conventional chemotherapy, especially carboplatin. The development of new therapies able to reverse this chemoresistance has become a priority in the management of ovarian cancer. IAPs are frequently dysregulated in ovarian cancer and have been described as a major regulator of TNF- $\alpha$  effect, an highly elevated cytokine in this cancer. In the presence of cIAPs, TNF- $\alpha$  activates prosurvival NF- $\kappa$ B signaling upon binding to its receptor. In the absence of cIAPs, however, TNF- $\alpha$  activates caspase 8 and extrinsic apoptosis. Then, exploiting the IAP-caspase interaction may be a logical strategy for anticancer drug development, especially in ovarian cancer [13, 26, 35].

Several SMAC mimetics are already evaluated in clinical trial for ovarian cancers[34]. As an example we can mention the Birinapant which is a divalent SMAC mimetic specifically designed to target cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2. Noonan et al. hypothesized that by inhibiting cIAPs, Birinapant had the potential to be an effective therapy for ovarian cancer. They conducted a clinical trial on 11 patients. The treatment was well tolerated and Birinapant showed consistent target suppression but without single-agent antitumor activity. They concluded on the need of studies able to identify optimal synergistic combinations for future clinical trials [34, 35]. Best responses were documented for two complete remissions following administration of GDC-0917, another Smac mimetic, in patients with ovarian carcinoma or mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (Tolcher et al. abstract)[34]. Concerning DEBIO1143, it has been used in monotherapy for solid tumors and lymphoma in phase 1 clinical trials and stable disease was noticed in 5 out of 31 patients [28]

Smac mimetics could be used to increase the efficacy of standard therapies to exploit synergistic lethalities. Indeed a review of the literature summarized by Fulda [34] or Philchenkov [36] revealed that various preclinical studies showed synergistic drug interactions of Smac mimetics with a variety of cytotoxic therapies such as chemotherapeutic drugs in solid tumors (paclitaxel, carboplatin, cisplatin, daunorubicin etc.) or in hematologic malignancies [37, 38] or targeted therapies such as TRAIL receptor agonists [39], epigenetic drugs or immunotherapies [40, 41]. Concerning clinical trials several protocols are already complete or ongoing. DEBIO1143 have been combined with carboplatin and paclitaxel for ovarian cancers as well as LCNSC (non published yet) or with daurorubicin and cytarabine and in patients with poor-risk acute myeloid leukemia (AML). In this trial a total of 13 out of 29 patients achieved complete remission [34, 42].

For all the development of the SMAC mimetics in clinic it could be valuable to have a biomarkers able to predict patient sensibility. Several markers of target engagement in surrogate tissue such as peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or tumor tissue (i.e., degradation of cIAP1 levels due to Smac mimetic – stimulated autoubiquitination and proteasomal degradation), markers of apoptosis in blood or tumor tissue (i.e., cleavage of caspases or caspase substrates such as PARP or cytokeratin-18) as well as blood markers of inflammation related to Smac mimetic – mediated activation of signaling pathways (i.e., increase in inflammatory cytokines such as TNF  $\alpha$ , MCP-1, IL6, and IL8) have been evaluated in clinical trials [34]. Concerning the clinical trials involving DEBIO1143 Dipersio et al revealed that responders more frequently showed plasma increases of TNF $\alpha$  and IL-8 post-first dose of Debio1143 during the treatment of acute myeloid leukemia (combination DEBIO1143 and daunorubicin and cytarabine) [43]. There was no obvious correlation between changes in cIAP1 and types of AML or treatment success. By contrast, neither an increase in plasma IL8 nor any correlation with DEBIO1143 exposure was observed by Hurwitz et al on their report of the clinical trial performed with patients with advanced cancers [28]. They reported that in 20 patients, cIAP1 was readily detectable at baseline but undetectable or extremely low in eight patients. In all patients with detectable cIAP1, DEBIO1143 led to rapid and persistent cIAP1 degradation regardless of dose. Nowadays no clear biomarkers of the sensitivity to DEBIO1143 have been identified.

Here, we first tested the *in vitro* capacities of DEBIO 1143 to sensitize ovarian tumor cell lines to carboplatin treatment. DEBIO 1143 had no effect on the carboplatin-sensitive cell lines. On the other hand, on resistant cell lines, this Smac mimetic was responsible for a sensitization of cells to carboplatin and allowed them to recover an IC50 similar to the sensitive cell lines. This is particularly the case with A2780R cells, which present an acquired resistance to carboplatin obtained through a long term exposition to this platinum salt and for whom DEBIO 1143 allowed to restore their initial sensitivity to carboplatin observed in their mother cell line A2780S. DEBIO 1143 alone has a very reduced effect on cell viability *in vitro*, confirming the need to associate it with carboplatin.

We then wanted to determine which cell death pathway was activated by combining DEBIO 1143 with carboplatin. Overall, we could see that there was no activation of apoptosis in so-called DEBIO 1143-resistant strains. However, the Carboplatin/DEBIO 1143 association seemed to increase, although not significantly, the early apoptosis in A2780S cells, which may precede a longer-term effect on the lineage we would not have observed during 72-hour treatments. In the platinum-resistant lines A2780R and SKOV-3, the Carboplatin/DEBIO 1143 combination resulted in an increase in the number early apoptotic cells compared to a monotherapy treatment. On the other hand, no induction of early apoptosis could be observed in EFO-21 cells, which are however extremely sensitive to the association of the two molecules from a cell viability point of view. This is confirmed with the PARP analysis by western blot where we did not observe any cleavage in this cell line. Similar results were obtained when apoptosis was analyzed at an earlier time (24h, Supplementary Figure 2). This observation, corroborated by the fact that late apoptosis and necrosis was increased in this cell line with the

Carboplatin/DEBIO 1143 combination, indicates that this treatment induces a apoptosis-independent cell death pathway in EFO-21 cells.

Necroptosis, a caspase-independent cell death pathway sharing common properties with apoptosis and depending on RIPK1 and RIPK3 activity, have been described as potentially induced by Smac mimetics several cancer included in ovarian cancer [29, 44, 45] Lecis and McCabe recently described in their respective works that Smac mimetics can trigger necroptosis by a TNF- $\alpha$  dependent way. This inflammatory process could be mainly dependent on macrophage activity, explaining why Smac mimetics, and in our case DEBIO 1143, is inactive as a monotherapy *in vitro* but showed anti-tumor activity alone *in vivo* in s.c. mice models. To test a potential activation of necroptosis in EFO-21 cells, we pre-treated them with Z-vad, an apoptosis inhibitor, or Necrostatin-1, a necroptosis inhibitor. Only the Necrostatin-1 prevented cell viability inhibition induced by DEBIO 1143 combined or not with carboplatin in EFO-21 cells, indicating that our Smac mimetic activates necroptosis in this cell line.

Here we report that induction of necroptosis is an alternative strategy to trigger programmed cell death in apoptosis resistant ovarian cells. We show that the Smac mimetic DEBIO 1143 induced necroptosis in ovarian cells in which apoptosis is blocked by the caspase inhibitor Z-vad. This could be due to the production of TNF- $\alpha$  by ovarian cells as suggested in pancreatic carcinoma cells by Hannes et al. [46].

We demonstrated that caspase 9 was highly expressed in carbo-resistant ovarian cancer cell lines but that this was independent with DEBIO 1143 sensitivity. This disappointing result does not alter the crucial need to find markers of DEBIO 1143 sensitivity that will allow defining which patients could benefit from a carbopline/DEBIO 1143 combination.

We showed that DEBIO 1143, a Smac mimetic currently in clinical trials, is able to restore sensitivity of ovarian cancer cells to carboplatin. The capacity of this new treatment to directly trigger apoptosis by inhibiting IAPs or to induce necroptosis by an indirect action on the stroma constitutes a new perspective for curing chemoresistant ovarian-cancer bearing patients. The discovery of this synergistic combination that is effective even when apoptosis is blocked has important implications for the development of new treatment strategies .

## **Acknowledgments**

The authors would like to acknowledge the animal facilities of the Institut Claudius Regaud.

The manuscript has been corrected by an independent scientific language editing service (Julia).

## **Funding**

This work was funded by the Groupe de recherche de l'Institut Claudius Regaud (GRICR).

## **Conflicts of interest**

The authors have no conflicts of interest to disclose.

## References

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225-49.
- [2] Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Jr., Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 2011;11:719-25.
- [3] Cho KR, Shih I. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:287-313.
- [4] Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *Lancet* 2014;384:1376-88.
- [5] Balasubramaniam S, Kim GS, McKee AE, Pazdur R. Regulatory considerations on endpoints in ovarian cancer drug development. *Cancer* 2017;123:2604-8.
- [6] Clamp A, Jayson G. PARP inhibitors in BRCA mutation-associated ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2015;16:10-2.
- [7] de Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol* 2012;34:200-11.
- [8] Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1441-54.
- [9] Sun H, Lu J, Liu L, Yang CY, Wang S. Potent and selective small-molecule inhibitors of cIAP1/2 proteins reveal that the binding of Smac mimetics to XIAP BIR3 is not required for their effective induction of cell death in tumor cells. *ACS Chem Biol* 2014;9:994-1002.
- [10] Samuel T, Welsh K, Lober T, Togo SH, Zapata JM, Reed JC. Distinct BIR domains of cIAP1 mediate binding to and ubiquitination of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and second mitochondrial activator of caspases. *J Biol Chem* 2006;281:1080-90.
- [11] Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:561-74.
- [12] Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 2001;6:253-61.



- [13] Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002;21:315-20.
- [14] Mansouri A, Zhang Q, Ridgway LD, Tian L, Claret FX. Cisplatin resistance in an ovarian carcinoma is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation. *Oncol Res* 2003;13:399-404.
- [15] Sasaki H, Sheng Y, Kotsuji F, Tsang BK. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2000;60:5659-66.
- [16] Yang X, Xing H, Gao Q, Chen G, Lu Y, Wang S, et al. Regulation of HtrA2/Omi by X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2005;97:413-21.
- [17] Castells M, Milhas D, Gandy C, Thibault B, Raffi A, Delord JP, et al. Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis* 2013;4:e887.
- [18] Ma JJ, Chen BL, Xin XY. XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;146:222-6.
- [19] Chen X, Gong L, Ou R, Zheng Z, Chen J, Xie F, et al. Sequential combination therapy of ovarian cancer with cisplatin and gamma-secretase inhibitor MK-0752. *Gynecol Oncol* 2016;140:537-44.
- [20] Shen W, Liang B, Yin J, Li X, Cheng J. Noscaphine Increases the Sensitivity of Drug-Resistant Ovarian Cancer Cell Line SKOV3/DDP to Cisplatin by Regulating Cell Cycle and Activating Apoptotic Pathways. *Cell Biochem Biophys* 2015;72:203-13.
- [21] Lu J, Bai L, Sun H, Nikolovska-Coleska Z, McEachern D, Qiu S, et al. SM-164: a novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP. *Cancer Res* 2008;68:9384-93.
- [22] Petrucci E, Pasquini L, Bernabei M, Saulle E, Biffoni M, Accarpio F, et al. A small molecule SMAC mimic LBW242 potentiates T. *PLoS One* 2012;7:e35073.
- [23] Sheng R, Sun H, Liu L, Lu J, McEachern D, Wang G, et al. A potent bivalent Smac mimetic (SM-1200) achieving rapid, complete, and durable tumor regression in mice. *J Med Chem* 2013;56:3969-79.
- [24] Gatti L, De CM, Ciusani E, Corna E, Arrighetti N, Cominetti D, et al. Antitumor activity of a novel homodimeric SMAC mimetic in ovarian carcinoma. *Mol Pharm* 2014;11:283-93.

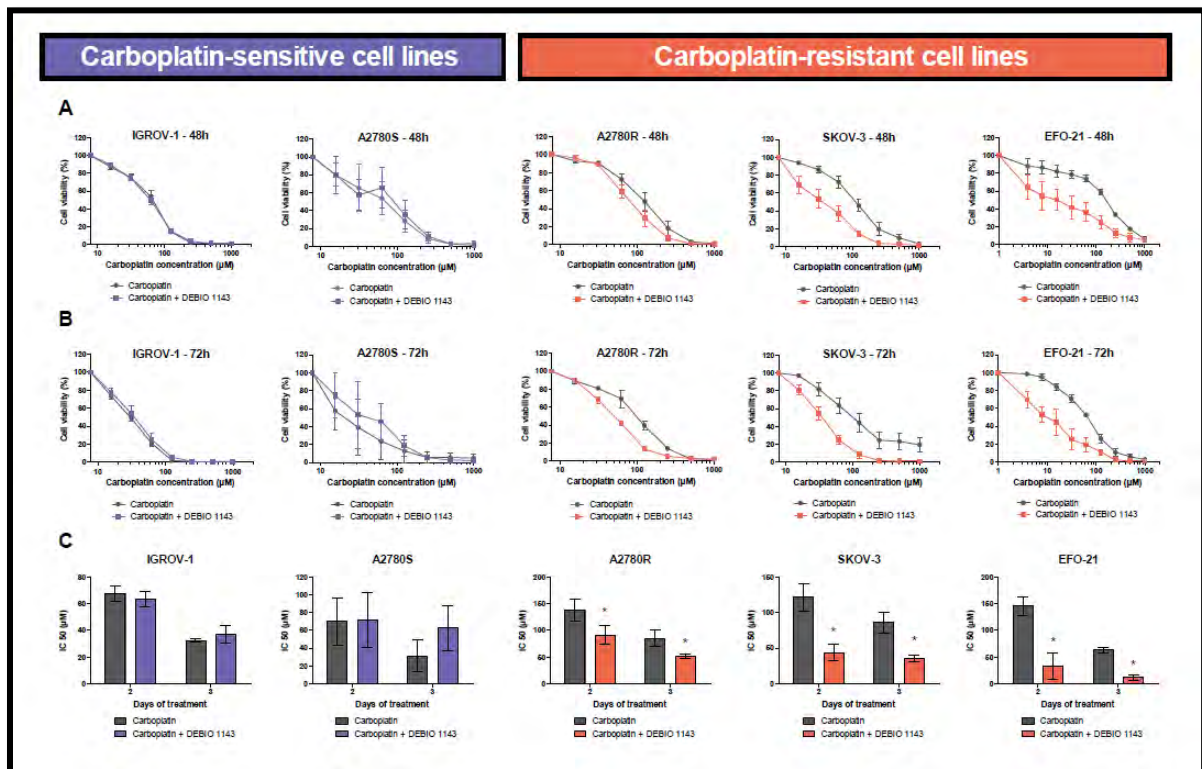
- [25] Cai Q, Sun H, Peng Y, Lu J, Nikolovska-Coleska Z, McEachern D, et al. A potent and orally active antagonist (SM-406/AT-406) of multiple inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in clinical development for cancer treatment. *J Med Chem* 2011;54:2714-26.
- [26] Brunckhorst MK, Lerner D, Wang S, Yu Q. AT-406, an orally active antagonist of multiple inhibitor of apoptosis proteins, inhibits progression of human ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2012;13:804-11.
- [27] Zhang T, Li Y, Zou P, Yu JY, McEachern D, Wang S, et al. Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of an antagonist (SM-406/AT-406) of multiple inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in a mouse xenograft model of human breast cancer. *Biopharm Drug Dispos* 2013;34:348-59.
- [28] Hurwitz HI, Smith DC, Pitot HC, Brill JM, Chugh R, Rouits E, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamic properties of oral DEBIO1143 (AT-406) in patients with advanced cancer: results of a first-in-man study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:851-9.
- [29] Bhatti IA, Abhari BA, Fulda S. Identification of a synergistic combination of Smac mimetic and Bortezomib to trigger cell death in B-cell non-Hodgkin lymphoma cells. *Cancer Lett* 2017.
- [30] Benard J, Da SJ, De Blois MC, Boyer P, Duvillard P, Chiric E, et al. Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 1985;45:4970-9.
- [31] Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:109-24.
- [32] McCabe KE, Bacos K, Lu D, Delaney JR, Axelrod J, Potter MD, et al. Triggering necroptosis in cisplatin and IAP antagonist-resistant ovarian carcinoma. *Cell Death Dis* 2014;5:e1496.
- [33] Feltham R, Bettjeman B, Budhidarmo R, Mace PD, Shirley S, Condon SM, et al. Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization. *J Biol Chem* 2011;286:17015-28.
- [34] Fulda S. Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 2015;21:5030-6.
- [35] Noonan AM, Bunch KP, Chen JQ, Herrmann MA, Lee JM, Kohn EC, et al. Pharmacodynamic markers and clinical results from the phase 2 study of the SMAC mimetic birinapant in women with relapsed platinum-resistant or -refractory epithelial ovarian cancer. *Cancer* 2016;122:588-97.
- [36] Philchenkov A, Miura K. The IAP Protein Family, SMAC Mimetics and Cancer Treatment. *Crit Rev Oncog* 2016;21:185-202.

- [37] Stadel D, Cristofanon S, Abhari BA, Deshayes K, Zobel K, Vucic D, et al. Requirement of nuclear factor kappaB for Smac mimetic-mediated sensitization of pancreatic carcinoma cells for gemcitabine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2011;13:1162-70.
- [38] Chromik J, Safferthal C, Serve H, Fulda S. Smac mimetic primes apoptosis-resistant acute myeloid leukaemia cells for cytarabine-induced cell death by triggering necroptosis. *Cancer Lett* 2014;344:101-9.
- [39] Stadel D, Mohr A, Ref C, MacFarlane M, Zhou S, Humphreys R, et al. TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors. *Clin Cancer Res* 2010;16:5734-49.
- [40] Steinwascher S, Nuges AL, Schoeneberger H, Fulda S. Identification of a novel synergistic induction of cell death by Smac mimetic and HDAC inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Cancer Lett* 2015;366:32-43.
- [41] Beug ST, Tang VA, LaCasse EC, Cheung HH, Beauregard CE, Brun J, et al. Smac mimetics and innate immune stimuli synergize to promote tumor death. *Nat Biotechnol* 2014;32:182-90.
- [42] Rettinger E, Glatthaar A, Abhari BA, Oelsner S, Pfirrmann V, Huenecke S, et al. SMAC Mimetic BV6 Enables Sensitization of Resistant Tumor Cells but also Affects Cytokine-Induced Killer (CIK) Cells: A Potential Challenge for Combination Therapy. *Front Pediatr* 2014;2:75.
- [43] DiPersio JF, Erba HP, Larson RA, Luger SM, Tallman MS, Brill JM, et al. Oral Debio1143 (AT406), an antagonist of inhibitor of apoptosis proteins, combined with daunorubicin and cytarabine in patients with poor-risk acute myeloid leukemia--results of a phase I dose-escalation study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015;15:443-9.
- [44] Safferthal C, Rohde K, Fulda S. Therapeutic targeting of necroptosis by Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in acute myeloid leukemia cells. *Oncogene* 2017;36:1487-502.
- [45] Lecis D, De CM, Perego P, Conti A, Corna E, Drago C, et al. Smac mimetics induce inflammation and necrotic tumour cell death by modulating macrophage activity. *Cell Death Dis* 2013;4:e920.
- [46] Hannes S, Abhari BA, Fulda S. Smac mimetic triggers necroptosis in pancreatic carcinoma cells when caspase activation is blocked. *Cancer Lett* 2016;380:31-8.

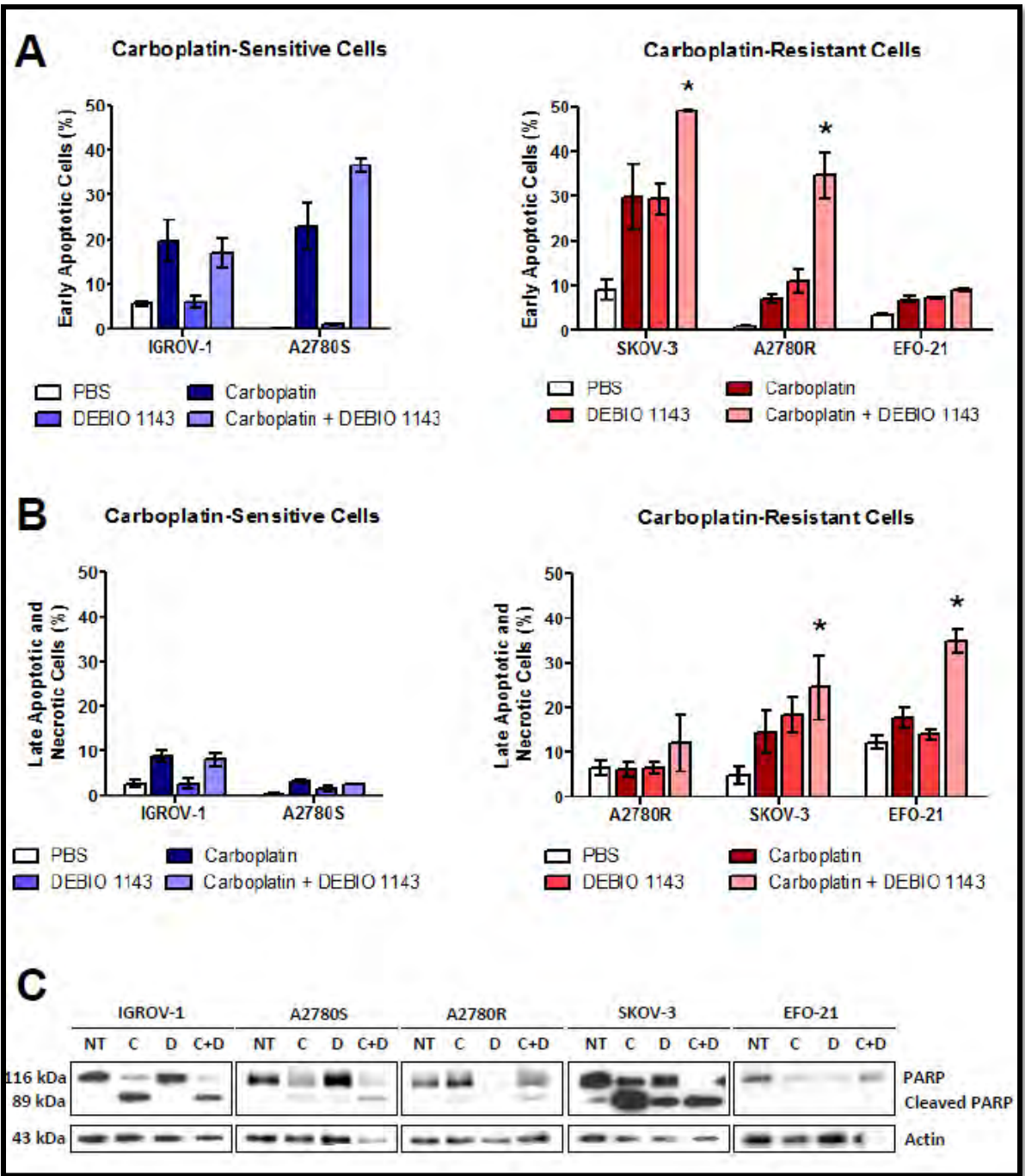


## Figures legend

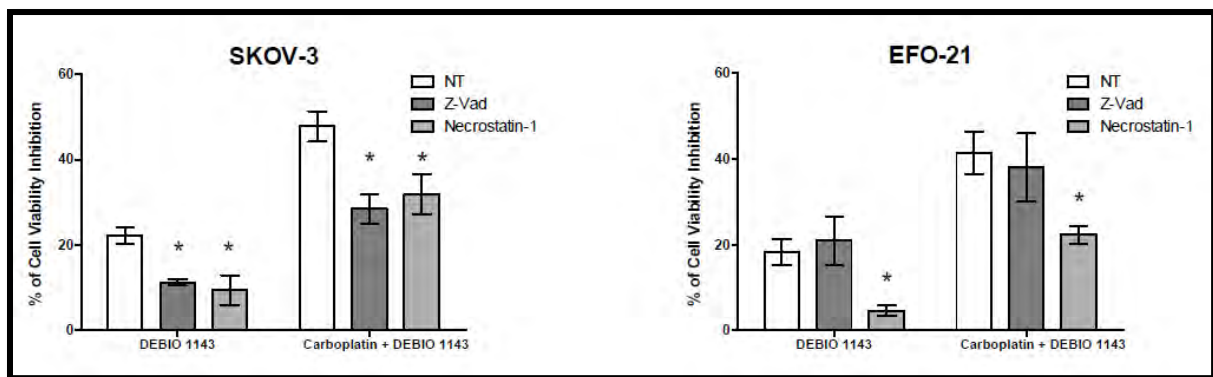
**Figure 1. *In vitro* inhibition of HOAC viability by carboplatin alone, or in combination with DEBIO 1143.** HOACs (OVCAR-3, IGROV-1, A2780S, A2780R, SKOV-3 and EFO-21) were treated with increased concentrations of carboplatin alone (from 1000 $\mu$ M to 15.625 $\mu$ M by 2-fold dilution steps) or in combination with DEBIO 1143 (10  $\mu$ M) 24h after seeding. (A) 48h or (B) 72h after treatment, cell viability was determined by a colorimetric assay using WST-1. The negative control (no drug) of each condition corresponds to the 100% cell viability. (C) The IC<sub>50</sub> of carboplatin after 48h or 72h of treatment were determined for each cell line (Mean  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).



**Figure 2. *In vitro* induction of apoptosis in HOACs by DEBIO 1143 alone or in combination with carboplatin.** HOACs (OVCAR-3, SKOV-3, A2780S and A2780R) were treated with carboplatin (IC 50 after 48h of treatment for each cell line), DEBIO 1143 (10  $\mu$ M) or a combination of both treatments. The negative control corresponds to non-treated cells. (A) and (B) 48h after treatment, cells were stained with a FITC-Annexin V/PI apoptosis detection kit. FITC-Annexin staining and PI incorporation were measured in cells with a FACS Calibur flow cytometer and analyzed with Cell Quest software. (A) Early apoptotic cells correspond to the Annexin V positive and PI negative population. (Mean  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). (B) Late apoptotic and necrosis cells correspond to the Annexin V positive and PI positive population. (Mean  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). (C) Proteins extracts were analyzed in Western Blot for the expression of PARP and cleaved PARP.

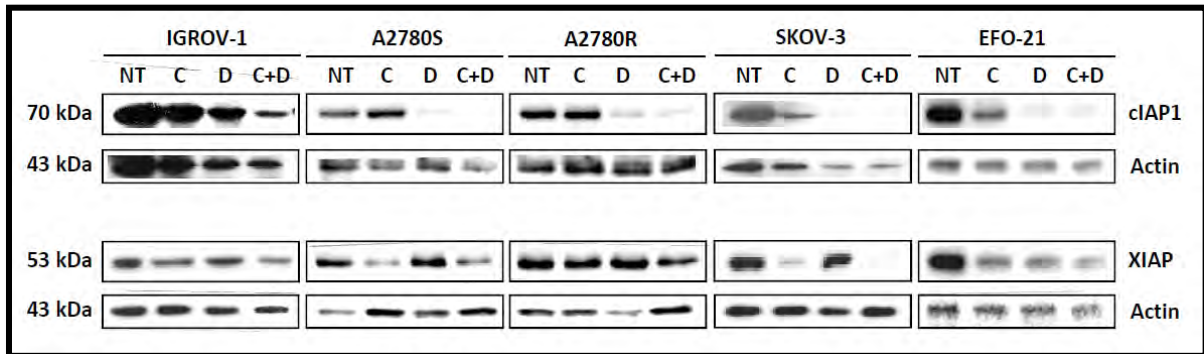


**Figure 3. *In vitro* blockade of apoptosis or necroptosis in HOAC treated with DEBIO 1143, alone or in combination with carboplatin.** HOAC (SKOV-3 and EFO-21) were pre-treated 2h or not with z-vad 20 $\mu$ M or necrostatin-1 50 $\mu$ M then treated with DEBIO 1143 (10 $\mu$ M) or a combination of carboplatin (IC50 of each cell line after 48h of treatment) and DEBIO 1143 (10 $\mu$ M). 24h after treatment, cell viability was determined by a colorimetric assay using WST-1. Cell viability inhibition percentage was determined compared to the negative control (no drug, NT) condition. (Mean  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0.05$ , n = 3).

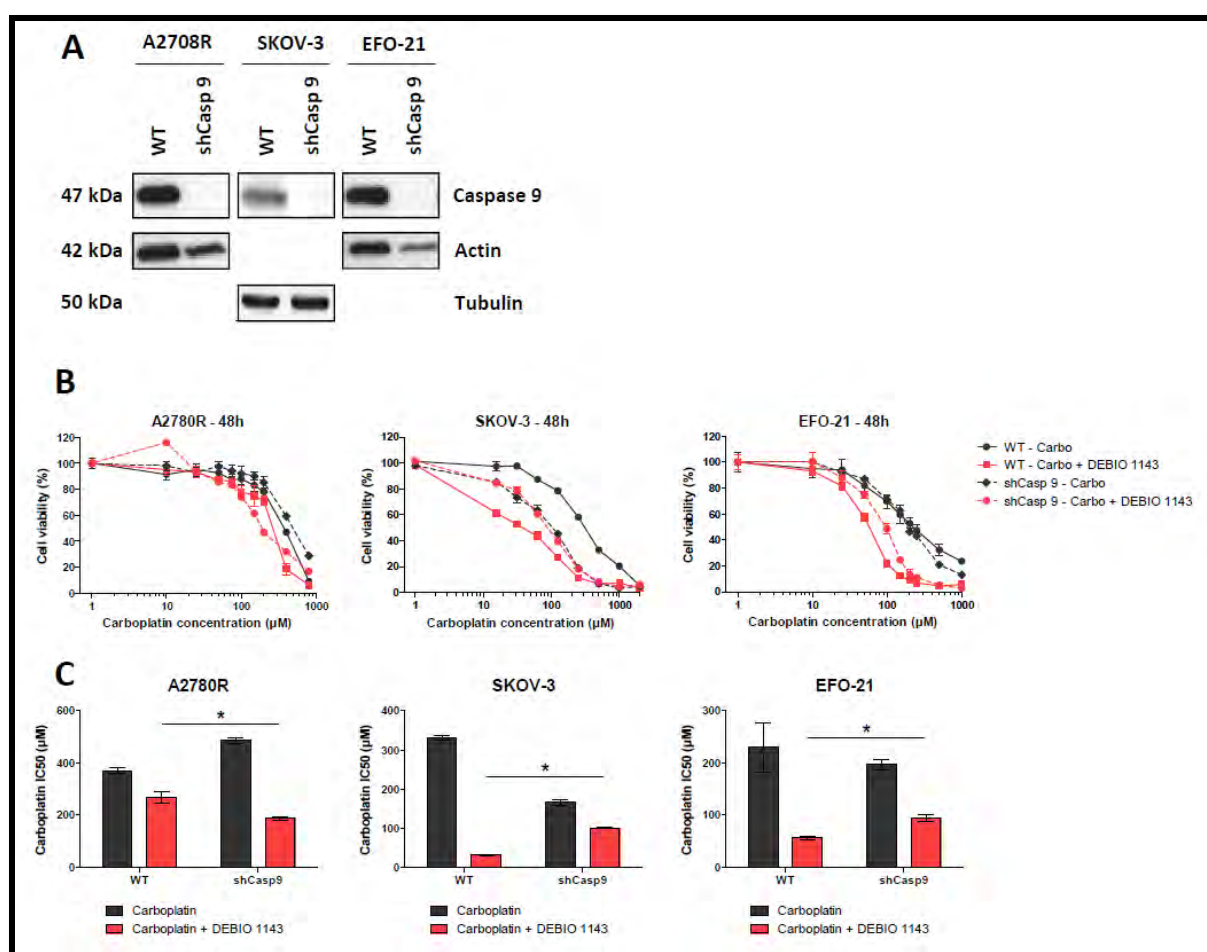




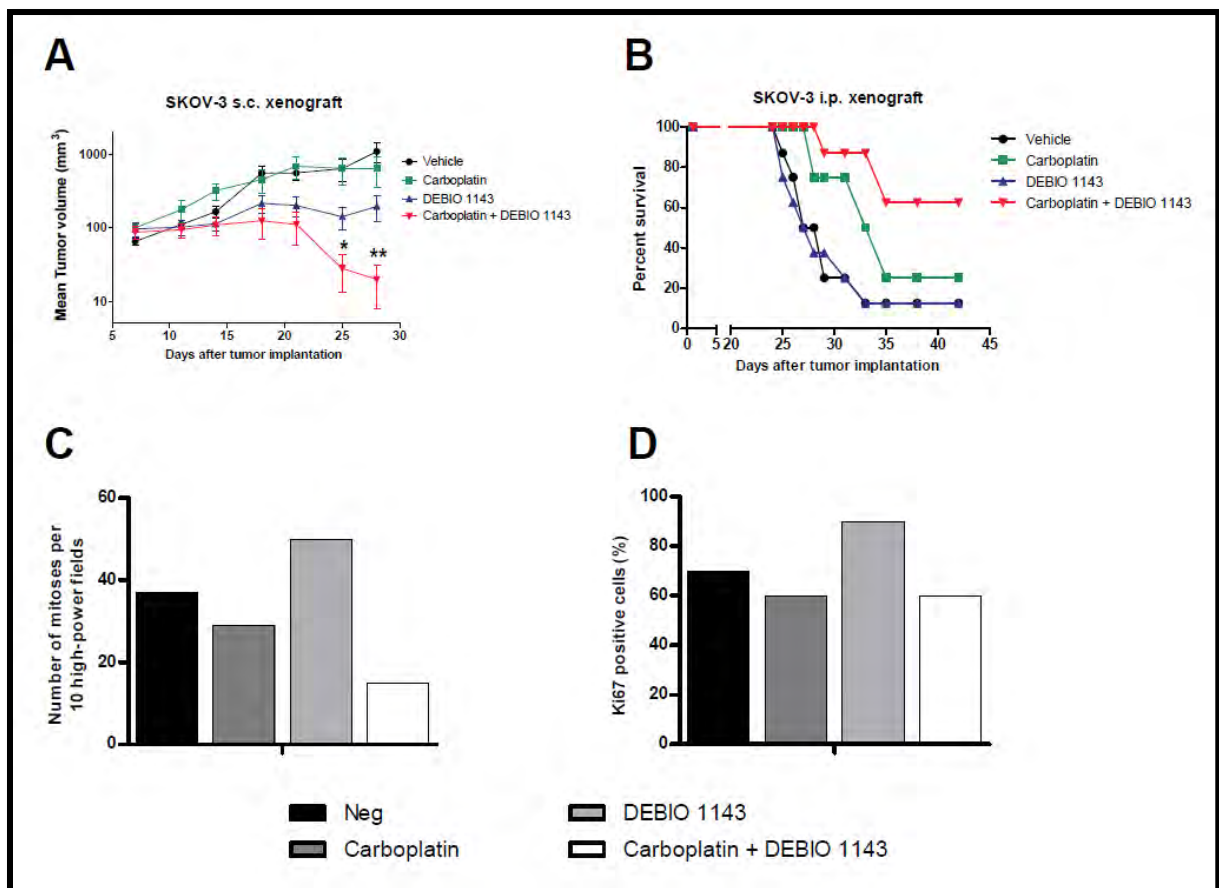
**Figure 4. Effects of DEBIO 1143, alone or in combination with carboplatin, on its molecular targets' expression.** HOACs (IGROV-1, SKOV-3, A2780S, A2780R and EFO-21) were treated with carboplatin (C)(IC 50 after 48h of treatment for each cell line), DEBIO 1143 (D)(10  $\mu$ M) or a combination of both treatments (C+D). The negative control corresponds to non-treated cells (NT). Proteins extracts were analyzed in Western Blot for the expression of cIAP1 and XIAP.



**Figure 5. *In vitro* inhibition of HOAC viability by carboplatin alone, or in combination with DEBIO 1143 and genetically modified cells.** HOACs (A2780R, SKOV-3 and EFO-21 either control or inhibited for caspase 9 expression) Proteins extracts from HOACs (A2780R, SKOV-3 and EFO-21 either control or inhibited for caspase 9 expression) were analyzed in Western Blot for the expression of caspase 9 (A). The cells were treated with increased concentrations of carboplatin alone (from 1000 $\mu$ M to 15.625 $\mu$ M by 2-fold dilution steps) or in combination with DEBIO 1143 (10  $\mu$ M) 24h after seeding. (B) 48h after treatment, cell viability was determined by a colorimetric assay using WST-1. The negative control (no drug) of each condition corresponds to the 100% cell viability. (C) The IC<sub>50</sub> of carboplatin after 48h of treatment were determined for each cell line (Mean  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0.05$ , n = 4).



**Figure 6. *In vivo* anti-tumor activity of DEBIO 1143, alone or in combination with carboplatin, in SKOV-3 tumors xenografts.** Nude mice were engrafted (A) s.c. with  $10^7$  SKOV-3 cells or (B) i.p. with  $25 \cdot 10^7$  SKOV-3 cells. One week after the injection, they were treated intraperitoneally, once a week during 3 weeks with 40mg/kg of carboplatin or PBS and treated by oral gavage, 5 days per week during 3 weeks with 100mg/kg of DEBIO 1143 or vehicle. (A) Tumor volume was extrapolated from the measurement of tumor length and width twice a week. (Mean tumor volume  $\pm$  SEM,  $n = 7$ ).



**Publication 4 en cours de révision en co-auteur dans Oncotarget.**

**Mery E., Golzio M., Guillermet S., Lanore D., Le Naour A., Thibault B., Tilkin-Mariamé AF., Bellard E., Delord JP., Querleu D., Ferron G. & Couderc B.**

**Fluorescence-guided surgery for cancer patients: a proof of concept study on human xenografts and spontaneous tumors in pets.**

**Title:** Fluorescence-guided surgery for cancer patients: a proof of concept study on human xenografts and spontaneous tumors in pets

**Authors:** Eliane Mery<sup>\*a</sup>, Muriel Golzio<sup>\*b</sup>, Stephanie Guillermet <sup>c</sup>, Didier Lanore <sup>d</sup>, Augustin Le Naour <sup>a</sup>, Benoît Thibault <sup>a</sup>, Anne Françoise Tilkin-Mariamé <sup>a</sup>, Elizabeth Bellard <sup>b</sup>, Jean Pierre Delord <sup>a</sup>, Denis Querleu <sup>a</sup>, Gwenael Ferron<sup>§a</sup>, Bettina Couderc<sup>§a, †</sup>

**Author affiliations:**

<sup>a</sup>: Institut Claudius Regaud –IUCT Oncopole, University Toulouse III, Toulouse, France

<sup>b</sup>: Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, BP 64182, 205 Route de Narbonne, F-31077, France

<sup>c</sup>: Fluoptics SAS, 7, parvis Louis Néel, CS 20050, 38040 Grenoble cedex 09, France

<sup>d</sup>: Clinique vétérinaire Alliance, 8 Boulevard Godard, 33300 Bordeaux, France

\*These authors contributed equally to this work.

§These authors contributed equally to this work.

†**Corresponding author:** Bettina Couderc, IUCT Oncopole, University Toulouse III,

1 avenue Irene Joliot Curie, 31059 Toulouse cedex, France

33 5 31 15 52 16

[Couderc.bettina@iuct-oncopole.fr](mailto:Couderc.bettina@iuct-oncopole.fr)

## Abstract

Surgery is often the first treatment option for patients with cancer. Patient survival essentially depends on the completeness of tumor resection. This is a major challenge, particularly in cases of peritoneal carcinomatosis, where tumors are widely disseminated in the large peritoneal cavity. Any development to help surgeons visualize these residual cells would improve the completeness of the surgery. For non-disseminated tumors, imaging could be used to ensure that the tumor margins and the draining lymph nodes are free of tumor deposits.

Near-infrared fluorescence imaging has been shown to be one of the most convenient imaging modalities. Our aim was to evaluate the efficacy of a near-infrared fluorescent probe targeting the  $\alpha_v\beta_3$  integrins (Angiostamp™) for intraoperative detection of tumors using the Fluobeam® device.

We determined whether different human tumor nodules from various origins could be detected in xenograft mouse models using both cancer cell lines and patient-derived tumor cells”, and found that xenografts could be imaged by fluorescent staining irrespective of their integrin expression levels. This suggests imaging of the associated angiogenesis of the tumor and a broader potential utilization of Angiostamp™. We therefore performed a veterinary clinical trial in cats and dogs with local tumors or with spontaneous disseminated peritoneal carcinomatosis. Our results demonstrate that the probe can specifically visualize both breast and ovarian nodules, and suggest that Angiostamp™ is a powerful fluorescent contrast agent that could be used in both human and veterinary clinical trials for intraoperative detection of tumors.

**Keywords:** tumor targeting, optical imaging, fluorescence-guided surgery, integrins, spontaneous animal models.

## 1. Introduction

In oncology, if tumor resection is feasible, surgery is often the first therapeutic option. For peritoneal carcinomatosis, which can occur in cases of colorectal or ovarian cancer or rare peritoneal disease, several retrospective studies demonstrate that patient survival essentially depends on the completeness of macroscopic tumor resection and on adjuvant chemotherapy [1, 2]. The current surgical standard for all peritoneal cancers is to achieve a CC0 resection according to the completeness of cytoreduction score (CC0: absence of visible residual disease), as complete cytoreductive surgery has been associated with improved survival [2, 3] [4, 5].

Unfortunately, peritoneal carcinomatous extensions, multifocal spread of the metastases, and close contact with vital organs often lead to incomplete tumor resection. In addition, smaller nodules are difficult to detect, whether preoperatively by computed tomography scans or magnetic resonance imaging (MRI), or visually during surgery.

Optimizing the extensiveness of cytoreductive surgery without collateral damage is still a major challenge. [6]. For other cancers, such as breast cancers, sarcomas, and gliomas, improved imaging could help detect small tumor deposits surrounding the main tumor. Detecting these using real-time imaging could help ensure the completeness of tumor removal with adequate tumor margins. Importantly, patients who have had complete tumor resection derive the most benefit from chemotherapy treatment compared with those who have had incomplete resection, particularly for locally invasive tumors such as gliomas [7].

Ultimately, for potentially invasive cancers such as breast cancer, some of the draining lymph nodes will likely require removal to determine the extent of cancer involvement. There are long-term side effects of lymph node removal; being able to visualize cancer cells in lymph nodes during surgery would help would help to decide how many lymph nodes (such as the

sentinel and draining lymph nodes) require removal, and could ultimately result in a reduction in the unnecessary removal of lymph nodes.[8].

An intraoperative imaging method that allows surgeons to visualize nodules smaller than 1 cm would therefore be valuable in order to minimize residual disease.

Advances in optical fluorescence imaging, and especially in intraoperative imaging devices associated with the generation of tumor–targeted contrast agents, can enhance the normal vision of surgeons [4, 6, 9, 10]. In addition to morphological changes and/or discoloration of the tissue that guide the surgeon, molecular imaging has the potential to provide additional biological information about the cancerous tissue at molecular and cellular levels [7].

Fluorescence imaging is based on materials that are optically active under near-infrared (NIR) wavelength excitations (700–1450 nm). NIR fluorescence imaging provides two key advantages for the detection of tumors that are found at a tissue depth of more than 1 cm and are smaller than 1 cm : low absorption of the tissue, and minimal autofluorescence in the NIR spectral bands. Therefore, the use of an exogenous chromophore improves the imaging contrast [4]. For example, molecular imaging with optical techniques can visualize tumors via fluorophore-conjugated probes targeting tumor markers, and may facilitate complete excision of tumors and tumor micromasses that are beyond the visual capacity of the naked eye [9]. Stummer et al. showed a clinical benefit for patients with glioma following removal of tumors using 5-aminolevulinic-acid (5-ALA)-induced fluorescence guidance, in terms of completeness of tumor removal and progression-free survival [10]. Prospective human research by Sturm et al. and Yoo et al. used targeted probe and fluorescence-guided surgery, respectively, for sentinel lymph node identification, lung segmentectomy, and cancer surgery [11, 12].

We have previously used the fact that tumors are highly vascular (due to neoangiogenesis) to investigate a fluorescent RAFT-(cRGD)<sub>4</sub> tracer molecule (Angiostamp™) able to target the  $\alpha_v\beta_3$  integrins expressed on endothelial cells. NIR fluorescence was visualized using Fluobeam®, an open fluorescent imaging system that can be used in intraoperative conditions. In a preclinical setting, we showed that the use of Angiostamp™ combined with Fluobeam® allowed the specific detection of residual tumor deposits and inframillimetric metastases derived from human ovarian adenocarcinomas [13]. Using the same approach, Dutour et al. compared the quality and sensitivity of tumor/metastasis margin delineation and tumor resection (in osteosarcomas) using intraoperative NIR imaging to those guided by preoperative imaging (i.e., MRI subsequently confirmed by histopathological analysis). They showed that intraoperative imaging is effective in improving primary tumor and lung metastasis excision [14]. Both studies showed that chemotherapy did not alter Angiostamp™ tumor-specific targeting, nor the sensitivity of tumor detection [13, 14]. Similar results have been described by Harlaar et al. for ovarian cancer [15]. Finally, Jossierand et al. showed that fluorescence detection of metastatic nodules could be also used in combination with electrochemotherapy [16].

Here, we propose a generalized use of Angiostamp™-mediated fluorescence detection of different types of tumors. Review of the literature suggests that 25–50% of tumors are expected to express  $\alpha_v\beta_3$  integrins; this low proportion of integrin-expressing tumors means that, as yet, no dye for their detection has been developed for general use in the clinic. In the present work, we evaluated the ability of Angiostamp™ combined with Fluobeam® to detect several tumor types, irrespective of their  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression.. Using genetically modified tumor cells injected into mice, we analyzed the fixation of the Angiostamp™ molecules in order to highlight the targeting of the neovessels. We further evaluated the kinetics of tumor labeling in



mice, and performed a proof of concept trial in four pets (dogs and a cat) bearing spontaneous cancers. Indeed, the comparative oncology approach, specifically referring to the study of pets with spontaneous cancer, offers a potential solution to lingering questions about drugs and their accumulation in tumors. In addition to the similarities in drug metabolism, the large size of pet dogs and their naturally occurring, biologically heterogeneous malignancies allow the validation of new anticancer agents [17, 18]. Key features of this model system are that it allows investigations to be carried out in immune-competent, large animals (pet cats or dogs) with naturally occurring tumors, which confers advantages such as the presence of naturally syngeneic tumor-associated vasculature and stroma, tumor heterogeneity, and host immune responses [17, 18]. We showed that it was feasible to perform surgery using fluorescence-guided imaging on pets bearing different types of tumors (breast tumors, ovarian cancer, and cutaneous carcinoma) whether these were subcutaneous or peritoneal tumors. The technique is nontoxic, and animals were returned to their owners after tumor removal. This procedure allowed us to specifically detect tumor cells in organs, as well as in tumor margins and draining lymph nodes. It allows a more rapid surgical intervention compared to a procedure without fluorescence detection. As many common canine cancers are comparable to common human cancers in etiology, biological behavior, response to therapy, and overall outcome, the strategy could be applied soon in clinical trials in humans.

## **2. Results**

### *2.1. Detection of non- $\alpha_v\beta_3$ -expressing nodules in many tumor cell types*

In our previous publication, we showed that all xenografts derived from ovarian adenocarcinoma biopsies of patients (patient-derived xenograft, PDX) could be visualized using Fluobeam<sup>®</sup> after an injection of Angiostamp<sup>™</sup> [19]. Nevertheless, a review of the

literature revealed that only 50% of human ovarian tumors express  $\alpha_v\beta_3$  integrins. Therefore, we decided to evaluate whether  $\alpha_v\beta_3$ -negative tumors were as fluorescent *in vivo* as  $\alpha_v\beta_3$ -positive tumors (Fig. 1). We injected tumor cells with differing integrin status from two groups of patients (four patients bearing  $\alpha_v\beta_3$ -positive tumors and four patients bearing  $\alpha_v\beta_3$ -negative tumors) into nude mice, allowed them to grow, and then visualized the tumors following Angiostamp™ injection. Both types of tumors could be visualized using Angiostamp™/Fluobeam® (Fig. 1). We quantified the emitted signals *in vivo* (Fig. 1A and 1B), using as a background value the brightest part of the image adjacent to the tumor. From previous data [13], we determined that a value above 2 represented the specific fixation of the probe to a tumor nodule. Tumor nodules in both cases (from  $\alpha_v\beta_3$ -positive patients and  $\alpha_v\beta_3$ -negative patients) exhibited the same fluorescence intensities.

Immunohistochemical examination confirmed the  $\alpha_v\beta_3$  integrin status of tumors (Fig. 1C and 1D). The  $\alpha_v\beta_3$ -positive tumors exhibited a strong labeling (Fig. 1C), while blood vessels (arrow) acted as positive controls for  $\alpha_v\beta_3$ -negative tumors.

## 2.2. Specificity of Angiostamp™ targeting

Integrins are known to be expressed on the surface of endothelial cells of blood vessels, and tumors are characterized by a strong neoangiogenesis. Because Angiostamp™ was fixed to non- $\alpha_v\beta_3$ -expressing tumor cells, we assessed whether it could label tumor-associated endothelial cells. For this purpose, we performed macroscopic and microscopic fluorescence analysis on the tumor cells and endothelial cells located inside tumor nodes tumor cells and endothelial cells) to locate the Angiostamp™ fixation to the different cells. We used GFP (green fluorescent protein)-expressing tumor cells and fluorescent antibodies against endothelial cells, and analyzed the colocalization of Angiostamp™ and the GFP-expressing tumor cells and/or the labeled endothelial cells. The genetically modified  $\alpha_v\beta_3$ -positive ovarian adenocarcinoma

cells (SKOV-3) that constitutively expressed eGFP (enhanced GFP) were injected into nude mice. The mice were sacrificed 21 days after the injection of tumor cells, and 18 h post-Angiostamp™ injection. Animals were imaged at a macroscopic level using GFP and Cy5.5 filters and biopsies were observed at the microscopic level using specific labeling (collagenase-4 and CD31) with the appropriate set of filters (Fig. 2). This experiment was reproduced in three different mice.

Macroscopic analysis of tumor nodules demonstrated that (Fig. 2A) the Angiostamp™ labeling was not as precise as the eGFP labeling. There was not a strong colocalization of the labeling of tumor cells or of other cells, such as endothelial cells. The Angiostamp™ labeling was more diffuse and was not restricted to the tumor location depicted by the eGFP expression, suggesting that other components of the microenvironment, such as endothelial cells, contributed to the overall labeling.

Tumor biopsies were then frozen and prepared as described in the Material and Methods. Sample analysis occurred either directly (Fig. 2B) after cryosectioning or after immunostaining with anti-collagenase-4 (Fig. 2C) or anti-CD31 (Fig. 2D) antibodies to visualize endothelial cells (vessels) using fluorescence microscopy. We observed an inhomogeneous staining corresponding to Angiostamp™ inside some but not all tumor cells (Fig. 2B). The colocalization of eGFP and Cy5.5 staining was not as strong as expected, but the results confirmed that Angiostamp™ was interacting with some but not all tumor cells.

We next performed immunostaining to visualize other components of the tumor, namely the vessels, using anti-collagenase-4 (Fig. 2C) and anti-CD31 (Fig. 2D) antibodies in combination with Angiostamp™ staining. As observed in Fig. 2C, Angiostamp™ did not particularly stain vessels even though we were sure of the  $\alpha v\beta 3$  expression, as we were for the SKOV-3 tumor cells (Fig. 1D).. Angiostamp™ 700 labeling was more restricted to the tumor cells; this was

confirmed using anti-CD31 antibodies. We observed a diffuse colocalization between Angiostamp™ 700 labeling and tumor vessels (Fig. 2D).

The fact that Angiostamp™ could label tumors irrespective of their  $\alpha_v\beta_3$  integrin status, and that co-staining of Angiostamp™ and tumor cells revealed greater tissue labeling than could be explained simply by staining of neoangiogenesis, led us to hypothesize that the “enhanced permeability and retention” (EPR) phenomenon could be implicated. Indeed, EPR plays an important role for passive targeting to tumor tissues, by allowing greater entrance of drugs or probes due to the endothelial cell fenestrations that occur in angiogenic tumor vessels. Angiostamp™ could then be internalized by tumor cells, regardless of their  $\alpha_v\beta_3$  integrin status.

### *2.3 Broader utilization of Angiostamp™ for tumor detection*

These observations led us to propose a broader use of Angiostamp™ for tumor detection regardless of the tumor expression of  $\alpha_v\beta_3$  integrins. We injected nude mice subcutaneously (s.c.) with  $10^7$  human tumor cells from different origins. We used: ovarian adenocarcinoma cells (SKOV-3) [20], glioma cells (U87) [22], and colorectal carcinoma cells (HCT 116), all expressing high levels of integrins (Fig. 3A); head and neck carcinoma cells (CAL33) [21], breast carcinoma cells (SKBR3) [22]), and human ovarian adenocarcinoma cells (HOAC) (OVCAR) [23], all expressing medium levels of integrins (Fig. 3B); and breast carcinoma cells (MDA-MB 231) [24], expressing low levels of integrins (Fig. 3C). Each cell type was injected into two animals in two different and independent experiments, in accordance with the ethical use guidance for animal models. Cells were allowed to grow *in vivo* for three weeks, and tumor nodules that developed were imaged without surgery. The use of Angiostamp™ resulted in successful imaging of all tumor types in all animals, including both high- $\alpha_v\beta_3$ -expressing and low- $\alpha_v\beta_3$ -expressing tumors, although we detected different levels of fluorescence intensities. For high levels of integrin expression (Fig. 3A), mean tumor fluorescence intensities were  $>15$

AU (defined as the fold increase from the background, arbitrary units) (17, 21.4, and 16 AU for SKOV-3, U87, and HCT-116, respectively), for medium levels of integrin expression (Fig. 3B), mean tumor fluorescence intensities were around 8 AU (8.1, 8.2, and 8.6 AU for CAL33, SKBR3, and OVCAR, respectively), and for low levels of integrin expression (Fig. 3C), mean tumor fluorescence intensity was 3.4 AU for MDA-MB 231. As previously stated, for quantification we used as a background value the brightest part of the image adjacent to the tumor. (square).

We also used Angiostamp™ to evaluate the tumor dissemination of peritoneal cancer cells in live animals with ascites, without the use of surgery, by imaging ascites-bearing mice (after intraperitoneal (i.p.) injection of SKOV-3, OVCAR-3, or HCT116 cells (Fig. 3D). The technique detected tumor progression despite a substantial ascite volume.

We therefore conclude that, following either s.c. or i.p. injection of tumor cells, Angiostamp™ is a powerful tracer to visualize all tumor nodules irrespective of their  $\alpha_v\beta_3$  integrin status.

#### *2.4 Kinetic analysis of Angiostamp™ fixation*

In all previous experiments, we injected 2 nmol of Angiostamp™ and analyzed the mice 18–24 h post-injection. Because of nonspecific targeting to the bladder or kidneys, before using Angiostamp™ in pets we performed a kinetic analysis of the signal, from 1 h to 48 h, to ensure the best signal/background ratio. Mice received  $10^7$  SKOV-3 cells (human ovarian adenocarcinoma cells) either i.p. or s.c. Twenty-one days later, we injected mice with Angiostamp™ and analyzed the fluorescence intensities using a Fluobeam® camera. This experiment was performed three times (three different mice). Results are presented in Fig. 4. The skin of the tail was fluorescent 10 mins after the intravenous (i.v.) injection. After 10 mins,

the signal exponentially decreased. Kidneys were rapidly fluorescent (within 1 h) and the fluorescence then decreased rapidly to stabilize at 5 h post-injection.

The probes accumulated in the bladder at 2 h 30 post-injection. The fluorescence decreased after 3 h to reach a basal fluorescence level at 5 h post-injection. The best ratio of tumor-specific fluorescence/background was obtained between 17 h 30 post-injection and 24 h post-injection (adjacent organ was used as background). After 17 h 30, fluorescence was stabilized in all organs concerned (tumor, bladder, kidneys) and then slowly decreased after 24 h (not shown). Fluorescence could be visualized until 5 days post-Angiostamp™ injection. We selected 17 h 30 as the time point for further investigations, as at this time point we were able to visualize a high intensity of fluorescence in tumor nodules whether cells had been injected s.c. or i.p.

### *2.5 Guided surgery with Angiostamp™/Fluobeam® in pets*

The Angiostamp™/Fluobeam® technology required testing for its utility in helping surgeons visualize tumor nodules during surgery. For this purpose, we initiated a proof of concept trial on pets. Here, we report four veterinary cases: one cat and three dogs bearing different tumor types (breast and ovarian cancer). All of them received a single injection of Angiostamp™ the day before surgery (between 15–18 h before surgery) at the dose of 0.15 mg/kg for dogs and 0.3 mg/kg for the cat. The injected dose of Angiostamp™ was determined by the manufacturer. Animals were anesthetized using ketamine/isoflurane; anesthesia was maintained for the entire duration of the surgery. They stayed for observation for one night in the veterinary clinic, where they received treatment for pain related to surgery. They were returned to their owners the following day with a prescription for pain relief. One (case N°4) received anticancer treatment (platinum salt) after the surgery because of ovarian cancer dissemination.

**Case N°1.** A female cat presented with palpable masses on mammary glands. The biggest mass measured 5 cm<sup>3</sup> and required removal (Fig. 5A). The veterinary surgeon wanted to determine whether an additional palpable smaller nodule (Fig. 5E) was associated with the biggest mass, and whether it was cancerous. We observed the nodules with Fluobeam® before (Fig. 5B and 5F) and after their removal (Fig. 5C and 5G, *ex vivo* imaging).

Both nodules were labeled with Angiostamp™, with differing intensities. The biggest mass was positive with an intensity of fluorescence of 8 AU (compared to the adjacent skin). Pathological analysis revealed a malignant carcinomatous tumor with heterogeneous aspects (Fig. 5D). The smaller nodule was less fluorescent (5 AU, compared to the adjacent skin). The veterinary surgeon decided this required removal because of previous data stating that a fluorescence intensity above 3 AU indicated abnormal cells. Pathological analysis revealed an adenomatous hyperplastic mammary gland without carcinomatous signs (Fig. 5H). All of the lymph node chain (not shown) exhibited varying fluorescence intensities (around 5 AU).

In this case, Angiostamp™ allowed the surgeon to visualize different nodules during surgery and to decide whether they required removal. Pathological analysis confirmed that the biggest nodule was cancerous and revealed that the second was hyperplastic. The other positive nodules corresponded to the entire lymph node chain; in this case, they were not removed.

**Case N°2.** A female dog presented with two nodules on mammary glands possibly requiring removal; veterinary surgeons wished to determine whether the nodules were cancerous or not. The dog was injected with Angiostamp™ and the nodules were analyzed the following day with Fluobeam® before their biopsy. The nodules proved negative for Angiostamp™ labeling and biopsy revealed they were free of tumor cells (not shown).

In this case, the dog also had a nodule on the sternum (Fig. 6A) that the surgeon expected to be benign. However, we analyzed it with Fluobeam® and found that it was labeled with

Angiostamp™ (Fig. 6B, fluorescence intensity >3 AU). It was removed and analyzed by a pathologist, who determined that the nodule was a carcinomatous extension of a cutaneous tumor (arrow) between the pilosebaceous units (\*) (Fig. 6C). To summarize, in this case we deliberated whether nodules on mammary glands required removal,..., and fluorescence imaging indicated that the glands were normal. Pathological analysis confirmed there was no malignancy. The dog presented with another nodule expected to be benign. However, it was labeled with Angiostamp™, and was in fact shown to be a tumor (Fig. 6 B, C).

**Case N°3:** A 10-year-old female French bulldog presented with suspected ovarian cancer in one ovary. The owner wanted the surgeon to verify that the tumor had not metastasized and requested that the ovary be removed if it had not. The dog received Angiostamp™ 18 h before surgery. We performed imaging on the whole peritoneum after incision (Fig. 7A and 7C). This imaging procedure took about 10 mins. We observed that the first ovary was labeled with Angiostamp™ (mean fluorescence intensity of 3.AU, Fig. 7D compared to the adjacent organ). The second ovary was also positive (Fig. 7E), as well as part of the colon (mean fluorescence intensity of 4 AU Fig. 7F). We decided to remove the two ovaries and part of the colon. The surgeon was able to remove all the tumors, and the dog was returned to its owner the following day.

Pathological analysis revealed that both ovaries contained tumor cells. Fig. 7G shows carcinoma of the papillary predominant architecture, with cribriform and glandular architecture, and Fig. 7I shows carcinomatous infiltration of the muscular and serous layers of the digestive resection. The colon contained external carcinomatous infiltrations of the bowel (arrows).

**Case N°4:** A 13-year-old Maltese dog presented with suspected ovarian cancer in one ovary, which was thought to have disseminated. The dog received Angiostamp™ 24 h before surgery.



The whole peritoneum was analyzed first without fluorescence and then with Fluobeam®. The entire procedure took about 15 mins. Without fluorescence imaging, there was good evidence that the colon contained tumor nodules (Fig. 8A). Detection of Angiostamp™ labeling confirmed this (Fig. 8B) (mean fluorescence intensity of 5 AU in the colon). When we examined the peritoneum as a whole with fluorescence imaging, the surgeon was, unable to detect nodules (Fig. 8E), but fluorescence emissions were found in the liver (Fig. 8F) and in the uterus (Fig. 8J) (mean fluorescence intensity of 5AU in the uterus). As in case N°3, we performed imaging on the first ovary at the beginning of the laparotomy and found that it was labeled with Angiostamp™ (mean fluorescence intensity of 13 AU Fig. 8C). The second ovary was also positive (mean fluorescence intensity of 11AU, Fig. 8G), despite the surgeon's original view that this ovary did not contain tumor nodules. It was removed, along with the uterus. Other organs were not removed in order to keep the dog alive, according to the owner's wishes. In parallel, as in case N°2, when we examined the anesthetized dog before surgery, we observed two small nodules on the mammary glands. These nodules were removed as they were labeled with Angiostamp™, with a fluorescence intensity of 8 AU on the main tumor (compared to the adjacent skin) and 5 AU for the metastatic point on the adjacent nodule (Fig. 8K). The dog was returned to its owner the following day. Because of the metastatic spread visualized with fluorescence imaging during surgery, the dog received chemotherapy treatment two weeks after surgery.

Pathological analysis revealed that both ovaries contained tumor cells (Fig. 8D and 8H), as did the uterus. Likewise, the mammary gland nodule contained carcinoma cells (Fig. 8L). This mixed mammary tumor also exhibited a benign adenomatous component and a benign chondromatous component.

These data demonstrate that intraoperative tumor-specific fluorescence imaging could improve intraoperative staging and help achieve more radical cytoreductive surgery.

### **3. Discussion**

Particularly in cases of carcinomatosis, surgeons need to be able to easily detect tumor cells at various different times. In the case of several peritoneal cancers, at the time of diagnosis, and following physical examination and imaging, an exploratory laparotomy or laparoscopy is usually carried out for histological confirmation and staging. Then, to treat the cancer, the surgeon attempts to remove all visible tumors within the peritoneal cavity, [23] a procedure termed cytoreductive surgery or tumor debulking [24]. For example, in the case of ovarian cancers, surgeons perform a total abdominal hysterectomy, remove ovaries (oophorectomy) and fallopian tubes, and examine all peritoneal surfaces. The surgeons then perform an infragastric omentectomy, pelvic and para-aortic lymphadenectomies, biopsies of clinically uninvolved areas, and extensive peritonectomies, in order to remove as many tumor cells as possible. This sequence of analysis and cytoreductive surgery is also required for other peritoneal cancers, such as colorectal cancer and rare peritoneal diseases, where a precise diagnosis of peritoneal dissemination is also necessary to determine the appropriate treatment strategy. For other tumors that are likely to be non-disseminated, surgery must also be completed with tumor-free margins, and the draining lymph nodes must be evaluated for potential tumor cell invasion. For all these purposes, a technique for imaging tumors that could be performed in intraoperative conditions would be of huge benefit.

Several dyes have previously been tested for clinical use. Indocyanine green (ICG) has been proposed as a good NIR-imaging agent candidate for the detection of peritoneal ovarian tumor nodules [4] [25]. It has been tested for staging in cancer patients [26], and Tummers et al. initiated a trial to determine the feasibility of intraoperative ovarian cancer metastases imaging

using NIR fluorescence imaging and ICG in a clinical setting. These authors concluded that, despite detection of all malignant lesions, the high false-positive rate observed highlights the need for a tumor-specific intraoperative agent [27]. As the specificity of fluorescent probes could be enhanced by combining them with a molecular targeting agent, several compounds have been suggested. Bahmani et al. constructed polymeric nanostructured particles loaded with ICG and functionalized with monoclonal antibodies directed against the HER2 receptor. They proved the efficacy of this approach in intraoperative detection and imaging in murine models [4], and will soon evaluate their compound in a clinical setting.

The fluorescent dye 5-ALA is an intermediate substrate of heme metabolism. The administration of 5-ALA to patients results in tumor-specific accumulation of protoporphyrin IX (PpIX), which emits red fluorescence with blue-light irradiation. It is currently used for fluorescence-guided resections of several tumors, such as high-grade gliomas, ovarian cancers [28], superficial bladder cancer, or colorectal metastasis. For this purpose Kondo et al. administered 5-ALA orally to patients 3 h before surgery. The abdominal cavity was observed under light and fluorescence. In one patient, a small fat lesion that was missed under white light observation was detected by ALA-induced fluorescence and was pathologically diagnosed as peritoneal metastasis [6]. The authors concluded that 5-ALA and photodynamic diagnosis is a promising candidate for diagnosing peritoneal dissemination of cancer, but that there are still the issues of undesirable accumulation of PpIX and autofluorescence of the surrounding tissues that require elimination to allow better contrast [6].

Alexander et al. used activatable galactosyl human serum albumin (hGCA)-fluorophore pairs to target lectin receptors expressed on ovarian cancer cells. They concluded, as had the previous authors, that their dye (hGCA-NMP1 in this case) is useful in imaging peritoneal ovarian cancer dissemination both superficially and deep in the abdominal cavity [29]. The limitation of these agents is the fact that they detect only 75% of all lesions, meaning that the technique requires

improvement. Moreover, the presence of hemorrhagic ascites greatly reduces the rate of detection [30].

The particular intraoperative NIR imaging that we used in this publication (Fluobeam<sup>®</sup>) has been shown to have many clinical applications. It can be used for parathyroid gland detection using autofluorescence imaging [31, 32]. In breast reconstruction, ICG visualized with Fluobeam<sup>®</sup> can be used to detect poorly perfused areas of the free flap, evaluate microvascular anastomosis for patency, and assess superficial inferior epigastric artery flap vascular territory for use as an alternative free flap with minimal donor site morbidity [33]. Swanson et al. used Fluobeam<sup>®</sup> with a 5-ALA-derived component (CLR1502) to detect tumor fluorescence for brain tumor resections (using NIR imaging). This proof of concept study for fluorescence-guided glioma surgery demonstrated high-contrast tumor visualization compatible with surgical applications in mice [34]. Using the same component (CLR1502), Deming et al. showed that intestinal tumors could be analyzed, and that the intensity of the fluorescence signal correlated with the histological characteristics for each tumor. The detection was specific, as colon adenocarcinomas demonstrated increased accumulation of CLR1502 compared to noninvasive lesions. In addition, the authors describe the use of NIR for lymph node analysis and showed that metastatic mesenteric tumors and uninvolved lymph nodes were detected [35]. In the same way, Hirche et al. analyzed the feasibility of the Fluobeam<sup>®</sup> 800 imaging system in detecting the sentinel lymph nodes using fluorescence retention (using ICG fluorescence imaging). They showed that NIR imaging can be applied to lymphatic imaging for lymphatico-reconstructive surgery and sentinel lymph node biopsy [36]. All the compounds described here could enhance the ability to properly remove all tumor cells, through better localization of the primary tumor and improved lymph node identification as well as detection of distant disease.

In this publication, we used a RAFT-c(RGDfK)<sub>4</sub>-Alexa Fluor 700, which is a fluorescent tumor-targeting probe (Angiostamp<sup>™</sup>). This compound has previously been used in work by

the JC Coll group and ourselves [13, 16, 37]. It was not expected to be specific to tumor cells, as it targets the  $\alpha_v\beta_3$  integrins, which are expressed by endothelial cells. In previous work, however, we showed that Angiostamp™ labeling of tumors was specific. We examined more than 100 mice bearing intraperitoneal disseminated ovarian adenocarcinomas; analysis of fluorescent and nonfluorescent biopsies proved that fluorescence occurs only in the presence of tumor cells. We demonstrated that unless tumor cells were present, we were only able to detect labeling in the kidneys and the eliminatory organs, the uterus for some female mice, and three lymph nodes. Angiostamp™ is therefore a good and specific targeting agent. In order to investigate the potential of Angiostamp™ for widespread clinical use, we investigated whether Angiostamp™ could be used to detect different types of tumors. We showed here that it can target several solid cancers including carcinoma, adenoma, and glioma, from various origins (breast, ovary, colon, brain, lung, head and neck, etc.). In fact, in our evaluation we were able to detect tumor nodules in all mice injected with human tumor cells (data not shown). This was surprising, as current literature suggests that integrins are expressed by only 25% of tumors. As it was initially developed to target tumor angiogenesis (endothelial cells), we investigated whether Angiostamp™ could detect tumors nodules independently of whether or not they express high levels of  $\alpha_v\beta_3$  integrins. We found no correlation between the level of tumor detection and the expression of  $\alpha_v\beta_3$  integrins, suggesting that targeting of integrins related to the tumor-associated neoangiogenesis is sufficient for a good labeling of the tumors by Angiostamp™. In order to prove the labeling of the tumor neovasculature by Angiostamp™, we built a model in which integrin-positive genetically engineered tumor cells or endothelial cells were easily identified by GFP fluorescence or fluorescent antibodies, respectively. Our aim was to demonstrate the colocalization of Angiostamp™ and the GFP-expressing tumor cells, or the colocalization of Angiostamp™ and the antibody-labeled endothelial cells, or both. Macroscopically, we observed a close correlation between Angiostamp™ labeling and GFP

expression. Microscopically, we detected Angiostamp™ labeling on some tumor cells, but not all, and on some endothelial cells, but not all. There was no strong association of the dye with all the tumor cells or endothelial cells, suggesting that the Angiostamp™ labeling of tumors could be due to the EPR effect, which plays an important role in passive targeting to tumor tissues [38]. This phenomenon has been described by Rijcker et al. in 2007, among others [38]. EPR occurs because of disordering in the epithelial cells of tumor tissue, which results in an increased permeation of drugs or probes. Indeed, EPR plays an important role for passive targeting to tumor tissues, by allowing greater entrance of drugs or probes due to the endothelial cell fenestrations that occur in angiogenic tumor vessels. In our experiments, therefore, it may be that, whatever the tumor type, Angiostamp™ is able to cross tumor blood vessels and accumulate in the interstitial tissue.

Importantly, here we were able to visualize all types of tumors tested using Angiostamp™.

Our oncology study in tumor-bearing pet dogs and a cat confirmed that use of the tracer Angiostamp™ and the Fluobeam® camera enabled intraoperative detection of carcinomatosis sites. We examined unrelated animals requiring treatment for cancer. The intraoperative detection of the animals' carcinomatosis sites made the surgery easier for the veterinarians (as it aided detection of the tumor nodules, and helped in the decision of whether or not to remove organs, such as ovaries, uterus, etc), and faster. The four veterinarians stated that the technique could be improved by knowing the value of fluorescence above which nodules should be removed in different types of cancer. Here, we used a cut-off fluorescence intensity value of 2 AU; all the nodules removed contained tumor cells. Our results can be assessed alongside those of the study described by Liberale and al. [39], in which these authors performed a clinical trial on 14 patients using free ICG to detect peritoneal metastases due to colorectal cancer. In this trial, all fluorescent nodules were removed whether they exhibited low, moderate, or high fluorescence, and there was no cut-off value for tumor-to-background fluorescence intensity; a

total of 53 resected nodules were found to be malignant, but 10 nodules were benign. However, the resection of benign nodules did not affect the outlook of the patients. Using Angiostamp™ and a cut-off value of 2 AU, all the nodules we resected from pets were found to be malignant. The study by Liberale and al. highlights that **intraoperative** fluorescence imaging is of benefit for patients; for four of the 14 patients, the surgery was modified by intraoperative ICG fluorescence imaging that detected metastatic nodules that had not been revealed during standard work-up and surgery. This fits with our observations in pets. The limit of ICG labeling is that it is not efficient for nodules from mucinous tumors. Angiostamp™ appears to have a larger application [13]. Finally, although it is reasonable to think that fluorescence exploration could be poorly informative in patients with advance peritoneal dissemination [39], the majority of patients with either colorectal or ovarian cancers have limited disease with a median PCI score of 8, and so fluorescence imaging could also be used at the time of diagnosis when surgeons perform an exploratory laparotomy or laparoscopy for staging. In conclusion, fluorescence imaging that targets  $\alpha_v\beta_3$  integrins could therefore be an important tool to aid peritoneal exploration and complete resection of tumors, with the added benefits of nontoxicity and good tolerability. Following these important results, a phase I/II study using the Angiostamp™/Fluobeam® fluorescence detection system in peritoneal carcinomatosis will be conducted.

## **4. Materials and methods**

### *4.1. Cell culture*

The HOAC line IGROV-1 was provided by the Gustave Roussy Institute [40]. HOAC SKOV-3 cells (ATCC® HTB-77), colon carcinoma cells HCT116 (ATCC® CCL-247), glioma cells U87 (ATCC® HTB-14), head and neck carcinoma cells (CAL 33), and breast adenocarcinoma

cells MDA-MB 231 (ATCC<sup>®</sup> HTB-26) and SKBR3 (ATCC HTB-30) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Human melanoma cells (LB319 MEL) were a personal gift from AF Tilkin-Mariamé (France). They were routinely cultured as previously described [41] in RPMI with 10% fetal calf serum. Cell lines were routinely checked for mycoplasma.

SKOV-3 cells were genetically modified with an eGFP coding gene using a lentiviral vector (pWPXLd-1, Trono lab, Switzerland) and selected by flow cytometry for a high and stable expression of eGFP as described previously [19].

#### *4.2. Animal experiments on mice*

Female Swiss athymic nude mice, 4–5-weeks-old (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France), were housed in filter-capped cages and kept in a sterile facility, which was maintained in accordance with the standards of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations in accordance with the AACR statement for the use of animals in cancer research. The Claudius Regaud Institute animal ethics committee approval was obtained for use of the animal model and the study protocols. A two-week quarantine period was imposed on all mice before starting the study. The i.p. and the s.c. injections used to inject ovarian adenocarcinoma cells, as well as glioblastoma, breast, and colon cancer cells, were as described previously [41, 42]. The i.v. tail vein injection of melanoma cells used to generate lung metastasis were described in Pich et al. [43].

#### *4.3. Immunohistochemistry*

Tumors were removed and fixed in formalin for 24 h. They were then paraffin embedded. Sections were cut at 4  $\mu$ m and stained using a hematoxylin and eosin procedure.



To examine the expression of  $\alpha_v\beta_3$  integrins, tumors were removed and fixed in RCL2® (Alphelys™SA, Plaisir, France). Immunohistochemistry was performed as described previously [13] using an antibody against  $\alpha_v\beta_3$  integrins (dilution 1:100 from Millipore).

#### *4.4. Detection of Angiostamp™-targeted cells in ovarian cancer xenografts*

At day 0, five mice received i.p.  $10^7$  genetically modified GFP-expressing IGROV-1 cells. After 19 days, tumor-bearing animals received 2 nmol of Angiostamp™ 18 h prior to analysis, as specified by the manufacturer. Fluorescence macroscopy was carried out using a “Macrofluor” fluorescence microscope (Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France), equipped with a Cool Snap HQ2 Camera (Roper Scientific, Photometrics, Tucson, AZ, USA) at x2 magnification. Tumors were then removed and fixed in 3% paraformaldehyde for 24 h, then 20% sucrose for another 24 h. The tissue was then mounted in optimum cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, NL) and frozen at  $-55^\circ\text{C}$ . Sections of 10  $\mu\text{m}$  thickness were cut from the OCT compound blocks using a cryostat (Leica CM3050 S) at  $-20^\circ\text{C}$ . DAPI staining in Moviol mounting medium was used for visualization of cell nuclei. Histological sections of tumors were observed under a Leica DMIRB fluorescence microscope (Leica Microsystems) with an x100 oil objective. GFP or Angiostamp™ fluorescence in tumors was detected after selective excitation produced with a compact arc source (Leica Microsystems, Wetzlar) and a GFP filter ( $\lambda_{\text{ex}}$ :480/40;  $\lambda_{\text{em}}$ :527/30) or Cy5.5 filter ( $\lambda_{\text{ex}}$ :665/45;  $\lambda_{\text{em}}$ :725/50) (Chroma Technology, Brattleboro, VT). High-resolution 16-bit images of 1392 x 1040 pixels were captured using a cooled charge-coupled device camera (CCD) camera (coolSNAP-HQ2, Roper Scientific) and processed for contrast and brightness using MetaVue 6.2 software (Universal Imaging).

#### *4.5. Intraoperative fluorescence imaging*

Tumor tracking was performed with the previously described handheld NIR 2D-fluorescence reflectance imaging device Fluobeam<sup>®</sup>700 or Fluobeam<sup>®</sup> 800 (Fluoptics, Grenoble, France) according to the Angiostamp<sup>™</sup> labeling used (700 or 800). This system consists of a control unit, with a laser source emitting at 680 or 785nm respectively; the laser beam is then fiber guided from the control unit to the optical head, allowing for a 6-cm spot diameter at a working distance of 17 cm in the field of view, and an optical head consisting of a CCD camera and white light-emitting diodes for the illumination of the field of view. The relative fluorescence intensity is the ratio between the fluorescence intensity of the considered organ and an “internal control”. To quantify the relative intensity, the respective intensity of the skin near to each organ (i.e., near to the tumor or to the elimination organs, the kidneys and bladder) was used as specific internal control.

The fluorescence intensity was evaluated by measuring the mean fluorescence intensity on several selected areas using ImageJ. For each measure, the value of the background signal was subtracted.

#### *4.6. Use of Angiostamp<sup>™</sup> in veterinary practice*

Client-owned dogs presenting at the veterinary clinic ‘Alliance’ (Bordeaux and dependencies, France) with suspected spontaneous ovarian cancers were prospectively enrolled in this study between July 2012 and July 2014. Tumor diagnosis was performed preoperatively using ultrasound imaging. Other eligibility criteria required that dogs be free of significant co-morbid illness with a favorable performance status. After diagnosis, the owner’s consent was obtained in each case. Data retrieved from the medical records included breed, sex, age, body weight, preoperative diagnosis, and anatomic location of the tumor. Complete clinical staging was performed before surgery. Real-time fluorescence imaging was performed using the compact

and portable 2D fluorescence reflectance imaging devices, Fluobeam<sup>®</sup> 700 or Fluobeam<sup>®</sup> 800, according to the Angiostamp<sup>™</sup> labeling. The Fluobeam<sup>®</sup> 800 device was used with a dedicated single-use sterile cover bearing an optical window, compatible with NIR fluorescence measurements and with the aseptic conditions of the operating room as described previously by Cabon et al.[44, 45].

Study protocol: All dogs received a single i.v. injection of Angiostamp<sup>™</sup> the day before surgery (between 15 and 18 h before surgery), at a dose of 0.15 mg/kg for dogs and 0.3 mg/kg for cats. To calculate the doses required, a table of dose equivalence was used, which is cited in the manufacturer's "drug or diagnostic agent development guidelines" relating to Angiostamp.<sup>™</sup>

. Typically, this table is used to calculate the dose that will eventually be injected into humans, depending on the dose used in animals (in preclinical trials). The factors to be applied are shown by species. The dose that was commonly used in mice was 2 mg/kg, but in an effective dose manipulation it was seen that this dose could be halved (1 mg/kg). The corrective factor between mice and dogs is 6.66, so dividing 1/6.66 gave a dose of 0.15 mg/kg for dogs. Because of the difference in body surface area between dogs and cats, we chose to inject 0.3 mg/kg in the cat to maintain an equivalent dose.

Animals were anesthetized using ketamine/isoflurane, and anesthesia was maintained for the entire duration of the surgery. All animals stayed for observation in the veterinary clinic for one night, where they received treatment for pain. Pets were considered off study the day after completion of the surgery and were free to receive any additional therapy deemed appropriate by the attending clinician. They were returned to their owners with a prescription for pain relief for pain relating to surgery.

All tumors were submitted to fluorescence acquisition after resection. The tumors were then sent for conventional histological examination. The tumor was placed in neutral-buffered 10% formalin solution for at least 48 h for fixation. Once fixed, the tumors were embedded in paraffin. Four- $\mu$ m slices obtained from the paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin and were submitted to a classic histopathological evaluation by a pathologist.

All NIR fluorescence data were collected and analyzed using the ImageJ image-analyzing computer program and Microsoft Excel software. The fluorescence intensity values of the tissue of interest was processed as described in [44]. For fluorescence analysis, in cases of wide excision, healthy tissues were defined as part of the surgical bed (the same tissue found in the tumor-free margins), far from the original tumor, and were validated as “clean” tissue following histopathological analysis.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the core IPBS facilities support at the “Toulouse Réseau Imagerie and Anexplo” (Genotoul, Toulouse, France), which was supported by the Association Recherche Cancer (n°5585), Region Midi Pyrenees (CPER), and Grand Toulouse cluster.

The manuscript has been corrected by an independent scientific language editing service (Angloscribe).

## FUNDING

This work was funded by the “Ligue nationale contre le cancer”, the ANR (biodendridot), and the Groupe de recherche de l’Institut Claudius Regaud (GRICR).

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to disclose.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

BC and GF designed experiments; MG, EM, and JG performed experiments and analyzed data; AL, BT, EB, and AFT provided help in experiments; BC and MG wrote the manuscript; DL, DQ, and JPD provided critical feedback. All authors reviewed the manuscript.

## Reference List

- [1] Gouy S, Ferron G, Glehen O, Bayar A, Marchal F, Pomel C, et al. Results of a multicenter phase I dose-finding trial of hyperthermic intraperitoneal cisplatin after neoadjuvant chemotherapy and complete cytoreductive surgery and followed by maintenance bevacizumab in initially unresectable ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2016;142:237-42.
- [2] Harter P, Hahmann M, Lueck HJ, Poelcher M, Wimberger P, Ortmann O, et al. Surgery for recurrent ovarian cancer: role of peritoneal carcinomatosis: exploratory analysis of the DESKTOP I Trial about risk factors, surgical implications, and prognostic value of peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol* 2009;16:1324-30.
- [3] Chi DS, McCaughy K, Diaz JP, Huh J, Schwabenbauer S, Hummer AJ, et al. Guidelines and selection criteria for secondary cytoreductive surgery in patients with recurrent, platinum-sensitive epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2006;106:1933-9.
- [4] Bahmani B, Guerrero Y, Bacon D, Kundra V, Vullev VI, Anvari B. Functionalized polymeric nanoparticles loaded with indocyanine green as theranostic materials for targeted molecular near infrared fluorescence imaging and photothermal destruction of ovarian cancer cells. *Lasers Surg Med* 2014;46:582-92.
- [5] Gonzalez-Moreno S, Kusamura S, Baratti D, Deraco M. Postoperative residual disease evaluation in the locoregional treatment of peritoneal surface malignancy. *J Surg Oncol* 2008;98:237-41.
- [6] Kondo Y, Murayama Y, Konishi H, Morimura R, Komatsu S, Shiozaki A, et al. Fluorescent detection of peritoneal metastasis in human colorectal cancer using 5-aminolevulinic acid. *Int J Oncol* 2014;45:41-6.
- [7] Hadjipanayis CG, Widhalm G, Stummer W. What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas? *Neurosurgery* 2015;77:663-73.
- [8] Stoffels I, Dissemond J, Poppel T, Schadendorf D, Klode J. Intraoperative Fluorescence Imaging for Sentinel Lymph Node Detection: Prospective Clinical Trial to Compare the Usefulness of Indocyanine Green vs Technetium Tc 99m for Identification of Sentinel Lymph Nodes. *JAMA Surg* 2015;150:617-23.
- [9] Orbay H, Bean J, Zhang Y, Cai W. Intraoperative targeted optical imaging: a guide towards tumor-free margins in cancer surgery. *Curr Pharm Biotechnol* 2013;14:733-42.
- [10] Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006;7:392-401.
- [11] Sturm MB, Joshi BP, Lu S, Piraka C, Khondee S, Elmunzer BJ, et al. Targeted imaging of esophageal neoplasia with a fluorescently labeled peptide: first-in-human results. *Sci Transl Med* 2013;5:184ra61.
- [12] Yoo H, Kim JW, Shishkov M, Namati E, Morse T, Shubochkin R, et al. Intra-arterial catheter for simultaneous microstructural and molecular imaging in vivo. *Nat Med* 2011;17:1680-4.

- [13] Mery E, Jouve E, Guillermet S, Bourgoignon M, Castells M, Golzio M, et al. Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study. *Gynecol Oncol* 2011.
- [14] Dutour A, Josserand V, Jury D, Guillermet S, Decouvelaere AV, Chotel F, et al. Targeted imaging of alpha(v)beta(3) expressing sarcoma tumor cells in vivo in pre-operative setting using near infrared: a potential tool to reduce incomplete surgical resection. *Bone* 2014;62:71-8.
- [15] Harlaar NJ, Kelder W, Sarantopoulos A, Bart J, Themelis G, van Dam GM, et al. Real-time near infrared fluorescence (NIRF) intra-operative imaging in ovarian cancer using an alpha(v)beta(3)-integrin targeted agent. *Gynecol Oncol* 2013;128:590-5.
- [16] Josserand V, Keramidas M, Lavaud J, Righini C, Vollaire J, Bellard E, et al. Electrochemotherapy guided by intraoperative fluorescence imaging for the treatment of inoperable peritoneal micro-metastases. *J Control Release* 2016;233:81-7.
- [17] Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* 2008;8:147-56.
- [18] Saba C, Paoloni M, Mazcko C, Kisseberth W, Burton JH, Smith A, et al. A Comparative Oncology Study of Iniparib Defines Its Pharmacokinetic Profile and Biological Activity in a Naturally-Occurring Canine Cancer Model. *PLoS One* 2016;11:e0149194.
- [19] Castells M, Thibault B, Mery E, Golzio M, Pasquet M, Hennebelle I, et al. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett* 2012;326:59-68.
- [20] Cannistra SA, Ottensmeier C, Niloff J, Orta B, DiCarlo J. Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1995;58:216-25.
- [21] Stangl S, Varga J, Freysoldt B, Trajkovic-Arsic M, Siveke JT, Greten FR, et al. Selective in vivo imaging of syngeneic, spontaneous, and xenograft tumors using a novel tumor cell-specific hsp70 peptide-based probe. *Cancer Res* 2014;74:6903-12.
- [22] Lal S, Kersch C, Beeson KA, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Interactions between alphav-Integrin and HER2 and Their Role in the Invasive Phenotype of Breast Cancer Cells In Vitro and in Rat Brain. *PLoS One* 2015;10:e0131842.
- [23] Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009;374:1371-82.
- [24] Gubbels JA, Claussen N, Kapur AK, Connor JP, Patankar MS. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2010;3:8.
- [25] Kosaka N, Mitsunaga M, Longmire MR, Choyke PL, Kobayashi H. Near infrared fluorescence-guided real-time endoscopic detection of peritoneal ovarian cancer nodules using intravenously injected indocyanine green. *Int J Cancer* 2011;129:1671-7.
- [26] Wu L, Fang S, Shi S, Deng J, Liu B, Cai L. Hybrid polypeptide micelles loading indocyanine green for tumor imaging and photothermal effect study. *Biomacromolecules* 2013;14:3027-33.

- [27] Tummers QR, Hoogstins CE, Peters AA, de Kroon CD, Trimbos JB, van de Velde CJ, et al. The Value of Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging Based on Enhanced Permeability and Retention of Indocyanine Green: Feasibility and False-Positives in Ovarian Cancer. *PLoS One* 2015;10:e0129766.
- [28] Liu Y, Endo Y, Fujita T, Ishibashi H, Nishioka T, Canbay E, et al. Cytoreductive surgery under aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer and primary peritoneal carcinoma: results of a phase I trial. *Ann Surg Oncol* 2014;21:4256-62.
- [29] Alexander VM, Sano K, Yu Z, Nakajima T, Choyke PL, Ptaszek M, et al. Galactosyl human serum albumin-NMP1 conjugate: a near infrared (NIR)-activatable fluorescence imaging agent to detect peritoneal ovarian cancer metastases. *Bioconjug Chem* 2012;23:1671-9.
- [30] Bu L, Shen B, Cheng Z. Fluorescent imaging of cancerous tissues for targeted surgery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;76:21-38.
- [31] Griffiths M, Chae MP, Rozen WM. Indocyanine green-based fluorescent angiography in breast reconstruction. *Gland Surg* 2016;5:133-49.
- [32] Antakia R, Gayet P, Guillermet S, Stephenson TJ, Brown NJ, Harrison BJ, et al. Near infrared fluorescence imaging of rabbit thyroid and parathyroid glands. *J Surg Res* 2014;192:480-6.
- [33] De LF, Breuskin I, Abbaci M, Casiraghi O, Mirghani H, Ben LA, et al. Intraoperative Near-infrared Imaging for Parathyroid Gland Identification by Auto-fluorescence: A Feasibility Study. *World J Surg* 2016;40:2131-8.
- [34] Swanson KI, Clark PA, Zhang RR, Kandela IK, Farhoud M, Weichert JP, et al. Fluorescent cancer-selective alkylphosphocholine analogs for intraoperative glioma detection. *Neurosurgery* 2015;76:115-23.
- [35] Deming DA, Maher ME, Leystra AA, Grudzinski JP, Clipson L, Albrecht DM, et al. Phospholipid ether analogs for the detection of colorectal tumors. *PLoS One* 2014;9:e109668.
- [36] Hirche C, Engel H, Kolios L, Cognie J, Hunerbein M, Lehnhardt M, et al. An experimental study to evaluate the Fluobeam 800 imaging system for fluorescence-guided lymphatic imaging and sentinel node biopsy. *Surg Innov* 2013;20:516-23.
- [37] Keramidas M, Jossierand V, Righini CA, Wenk C, Faure C, Coll JL. Intraoperative near-infrared image-guided surgery for peritoneal carcinomatosis in a preclinical experimental model. *Br J Surg* 2010;97:737-43.
- [38] Rijcken CJ, Soga O, Hennink WE, van Nostrum CF. Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: an attractive tool for drug delivery. *J Control Release* 2007;120:131-48.
- [39] Liberale G, Vankerckhove S, Caldon MG, Ahmed B, Moreau M, Nakadi IE, et al. Fluorescence Imaging After Indocyanine Green Injection for Detection of Peritoneal

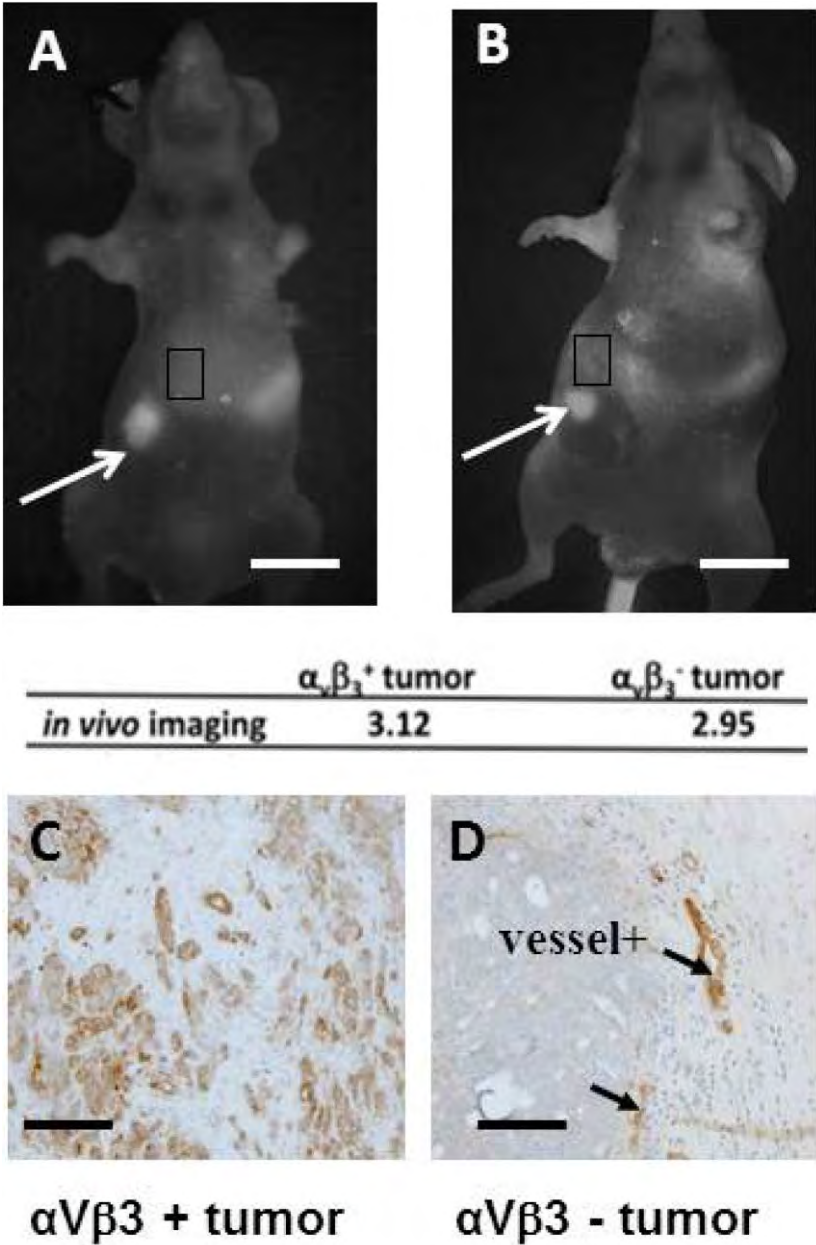


Metastases in Patients Undergoing Cytoreductive Surgery for Peritoneal Carcinomatosis From Colorectal Cancer: A Pilot Study. *Ann Surg* 2016.

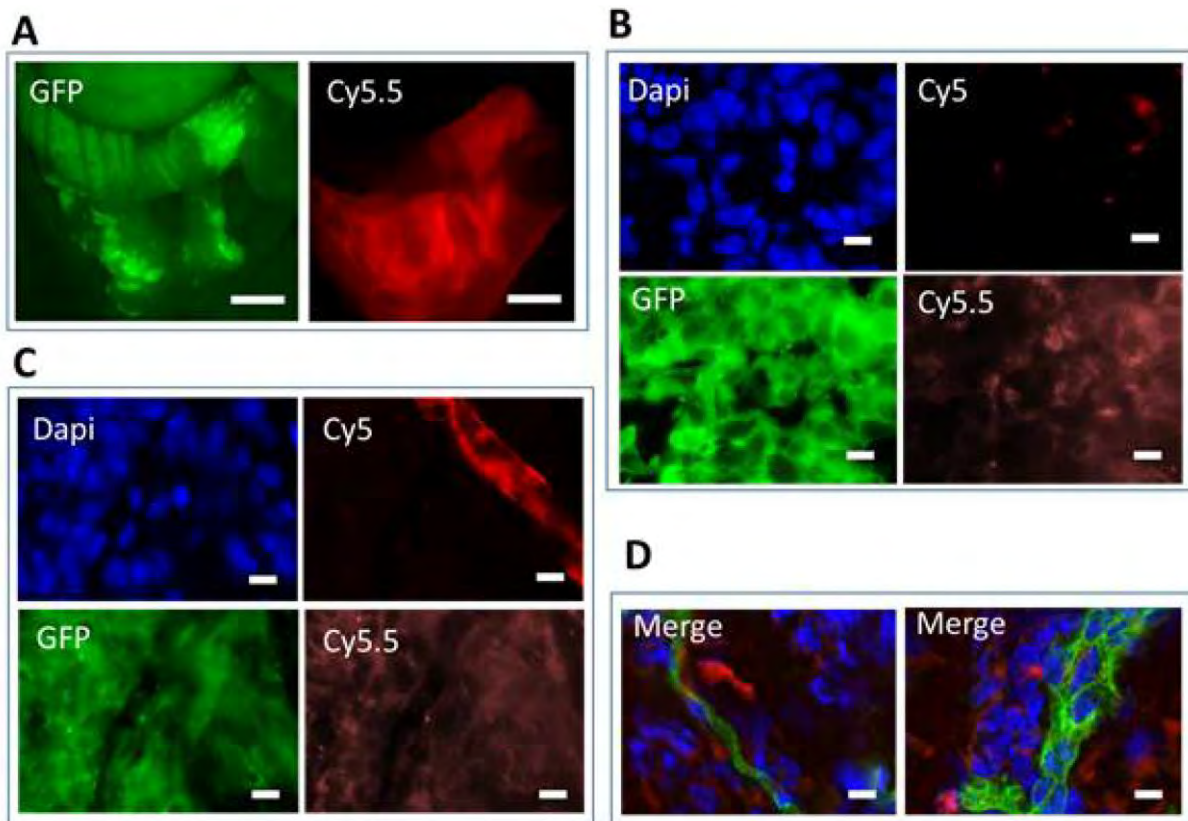
- [40] Benard J, Da SJ, De Blois MC, Boyer P, Duvillard P, Chiric E, et al. Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 1985;45:4970-9.
- [41] Pasquet M, Golzio M, Mery E, Raffi A, Benabbou N, Mirshahi P, et al. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 2010;126:2090-101.
- [42] Couderc B, Pradines A, Raffi A, Golzio M, Deviers A, Allal C, et al. In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther* 2008;15:456-64.
- [43] Pich C, Teiti I, Rochaix P, Mariame B, Couderc B, Favre G, et al. Statins Reduce Melanoma Development and Metastasis through MICA Overexpression. *Front Immunol* 2013;4:62.
- [44] Cabon Q, Sayag D, Texier I, Navarro F, Boisgard R, Virieux-Watrelet D, et al. Evaluation of intraoperative fluorescence imaging-guided surgery in cancer-bearing dogs: a prospective proof-of-concept phase II study in 9 cases. *Transl Res* 2016;170:73-88.
- [45] Sayag D, Cabon Q, Texier I, Navarro FP, Boisgard R, Virieux-Watrelet D, et al. Phase-0/phase-I study of dye-loaded lipid nanoparticles for near-infrared fluorescence imaging in healthy dogs. *Eur J Pharm Biopharm* 2016;100:85-93.

FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Angiostamp™ detects ovarian tumor nodules independently of the level of  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression.** A, B: *in vivo* real-time fluorescence images of nodules from one  $\alpha_v\beta_3^+$  tumor and one  $\alpha_v\beta_3^-$  tumor representative of three others, 24 h after Angiostamp™ 700 i.v. injection. Scale bars represent 1 cm. C, D: immunohistochemistry directed against  $\alpha_v\beta_3$  integrins to confirm the  $\alpha_v\beta_3$  status of the tumors. Scale bars represent 200 $\mu$ m.

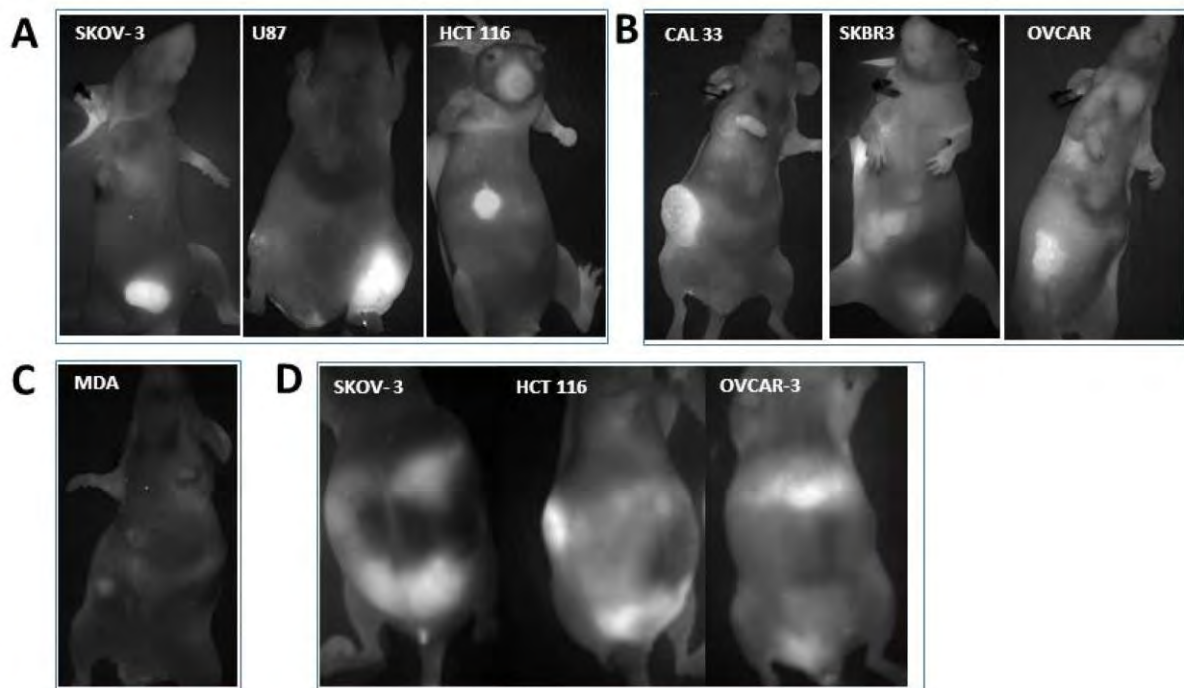


**Figure 2: Fluorescence imaging of tumor nodules using Angiostamp™.** Mice were injected i.p. with  $10^7$  eGFP-expressing SKOV-3 cells. After 20 days, mice were injected with Angiostamp™ 700. They were sacrificed 24 h after injection and analyzed after laparotomy. A: Fluorescence macroscopy shows eGFP-expressing tumor cells detected using a GFP filter set (left); Angiostamp™ 700 labeling was detected using Cy5.5 filter set (right). GFP-positive cells were found in the ovary (not shown) and on the surface layer of the uterus and colon (left image). The Angiostamp™ labeling identified the tumor localization (right). B: *Ex vivo* fluorescence microscopy on histological section (x100 objective). Nuclei were labeled with DAPI (blue), eGFP-expressing tumor cells were detected with a GFP filter set (green); autofluorescence in Cy5 is shown (red), and Angiostamp™ 700 was detected with a Cy5.5 filter set (orange). C: Fluorescence microscopy on histological sections (x100 objective) were analyzed after immunostaining performed with anti-collagenase 4 antibodies. Nuclei were labeled with DAPI (blue), eGFP-expressing tumor cells were detected with a GFP filter set (green); anti-collagenase-4 antibodies were labeled with Cy5 (red), and Angiostamp™ 700 was detected with a Cy5.5 filter set (orange). D: Fluorescence microscopy on histological sections (x100 objective) were analyzed after immunostaining performed using anti-CD31 antibodies. Merged images of two independent tumors are shown. Nuclei were labeled with DAPI (blue), anti-CD31 antibodies labeled with Cy3 (green), and Angiostamp™ 700 was detected with a Cy5.5 filter set (red). Scale bars represent 15 $\mu$ m.



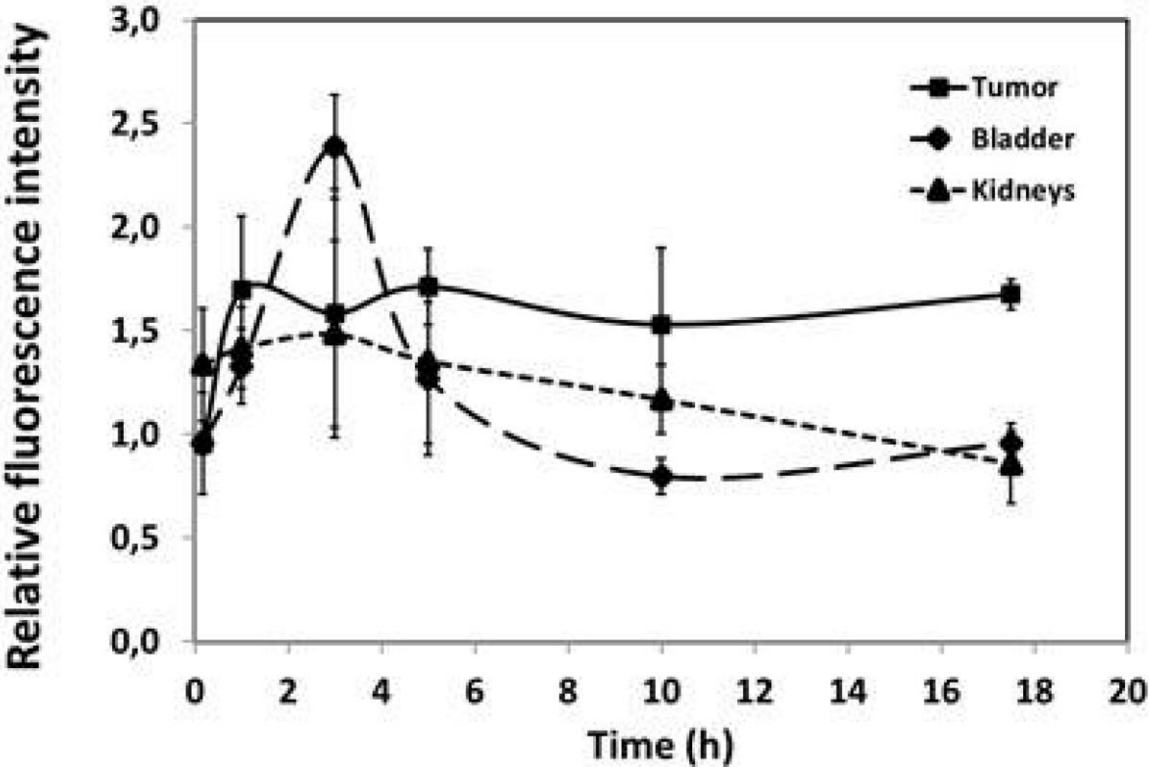
**Figure 3: Angiostamp™ clearly depicts different tumor nodules whether or not they express  $\alpha_v\beta_3$  integrins.**

*In vivo* real-time fluorescence images of A) nodules from s.c. injection of ovarian adenocarcinoma cells SKOV-3, glioma cells U87, or colorectal carcinoma (HCT116 cells). B) nodules from s.c. injection of head and neck cancer cells CAL33, breast carcinoma cells SKBR3, and ovarian adenocarcinoma cells OVCAR-3. C) nodules from s.c. injection of breast carcinoma cells MDA231 D) detection of tumor dissemination in ascite-bearing mice, following i.p. injection of ovarian adenocarcinoma SKOV-3 cells, OVCAR-3 cells, or cells of colorectal origin (HCT116 cells). Live mice were analyzed. For each cell type, one mouse is presented that is representative of two experiments in total.



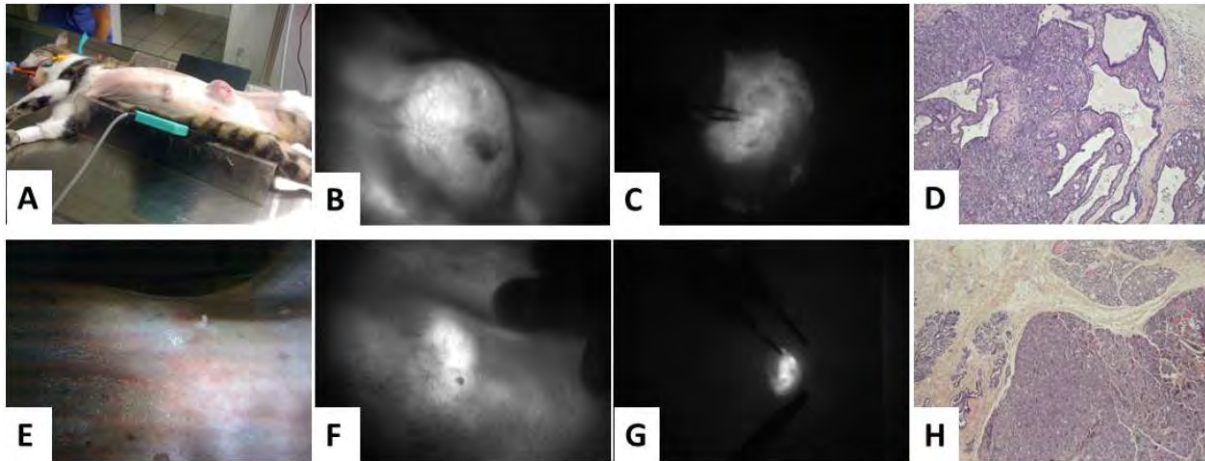
**Figure 4: Kinetic analysis of Angiostamp™ fixation.**

The relative fluorescence intensities for the tumor and the elimination organs (bladder and kidney) were plotted as a function of time. The fluorescence was relative to the skin or the adjacent organ.



**Figure 5: Angiostamp™ allowed visualization of mammary carcinoma as well as the draining lymph nodes.**

A) The cat had a single visible tumor. B) *In vivo* real-time fluorescence images of the tumor nodule before and C) after resection. D) Pathological analysis revealed the carcinoma component of the tumor. E) There was no evidence of other visible tumor. F) *In vivo* real-time fluorescence images revealed fluorescent draining lymph nodes before G) and after resection. H) Pathological analysis revealed the carcinoma component of the draining lymph nodes.

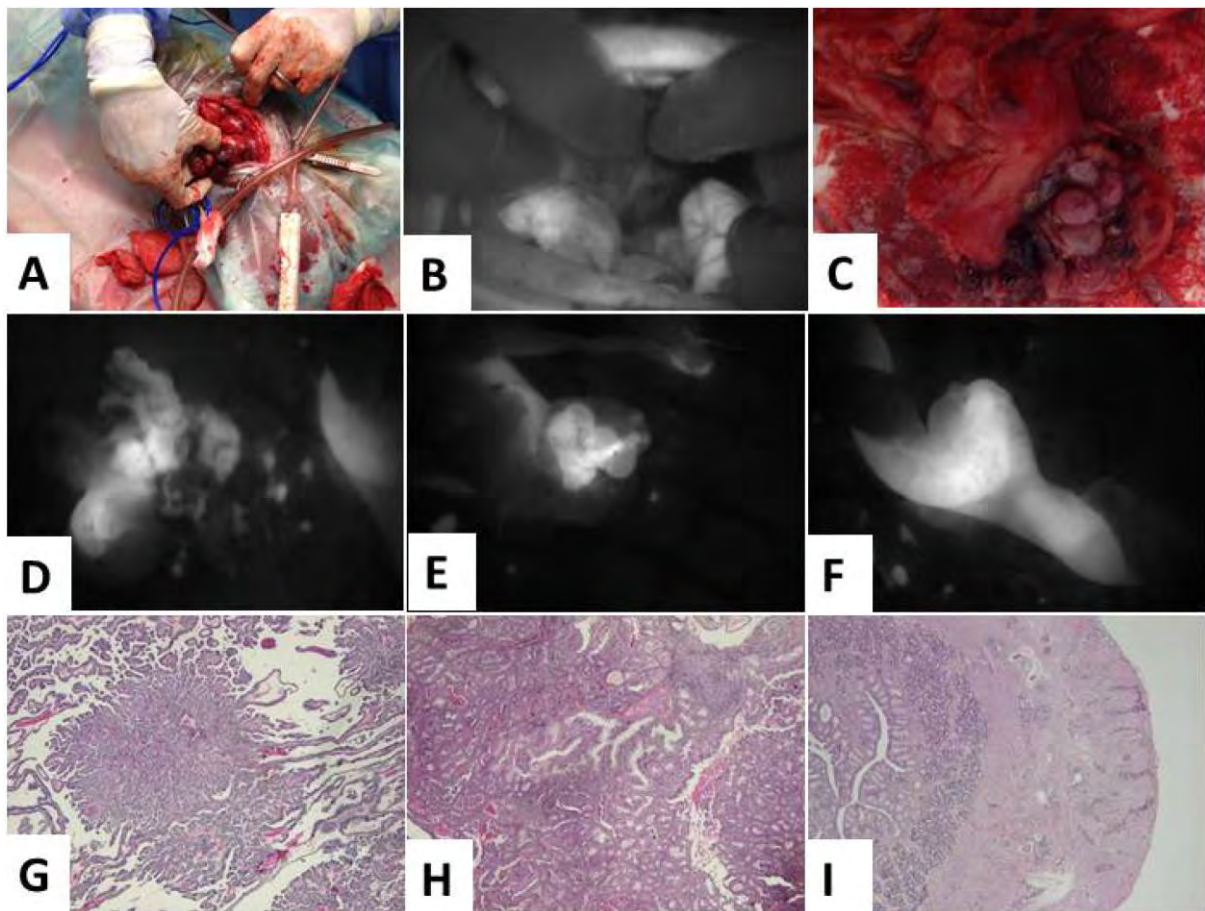


**Figure 6: Angiostamp™ allowed intraoperative detection of a canine carcinomatous extension cutaneous tumor.**

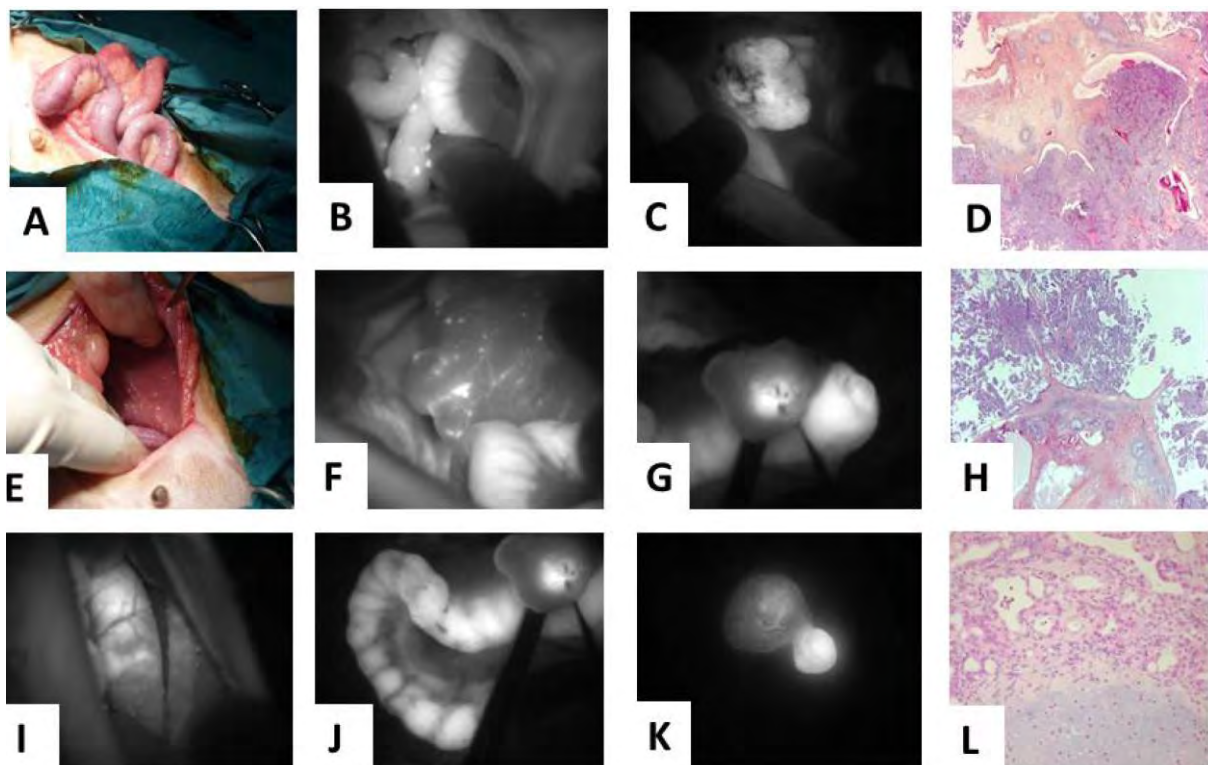
A) The dog displayed only one nodule, which was expected to be benign. B) *In vivo* real-time fluorescence images of the nodule. C) Pathological analysis revealed a carcinomatous extension of a cutaneous tumor.



**Figure 7: Angiostamp™ allowed intraoperative detection of a canine ovarian carcinoma and peritoneal carcinomatosis.** A) The dog had an ovarian carcinoma in one ovary. B) *In vivo* real-time fluorescence images of the peritoneum. C) There was no visual sign of carcinogenesis. D) *In vivo* real-time fluorescence images of the right and E) the left ovary, as well as F) the colon. G and H) pathological analysis revealed carcinoma of the papillary predominant architecture, with cribriform and glandular architecture on the two ovaries. I) Carcinomatous infiltration of the muscular and serous layers of the part of colon resection.



**Figure 8: Veterinary clinical trial of fluorescence molecular imaging-guided surgery using Angiostamp™ in a case of disseminated canine ovarian cancer.** A) Color image of the abdominal cavity of the colon and E) the liver. B) Fluorescence image of the abdominal cavity (same area as in A) and F) same area as in E. C) Tumor-specific fluorescence image of the right and G) of the left ovary. I) and J) uterine tract. K) Fluorescence image of two small nodules on the mammary glands. D) Pathological analysis of the right and H) the left ovary. L) Pathological analysis of a mixed mammary tumor with a benign adenomatous component and a benign chondromatous component.





**Publication 5 soumise en co-auteur dans Annals of Plastic Surgery :**

**Ferron G., Le Naour A., Mezghani B., Martinez A., Martinez Gomez C., Boulet B., Couderc B. & Gangloff D.**

**Contribution of Acellular Dermal Matrices in abdominal wall reconstruction in Surgical Oncology. A change of paradigm.**

**Acellular Dermal Matrices in abdominal wall reconstruction in  
Surgical Oncology. A change of paradigm.**

Ferron G<sup>1,2</sup>, Le Naour A<sup>2</sup>, Mezghani B<sup>1</sup>, Martinez A<sup>1,2</sup>, Martinez Gomez C<sup>1</sup>, Boulet B<sup>3</sup>,  
Couderc B<sup>2</sup>, Gangloff D<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Department of Surgical Oncology, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du  
Cancer, Toulouse - France*

*<sup>2</sup>EA 4553 - Translational Research Unit, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire  
du Cancer, Toulouse - France*

*<sup>3</sup>Department of Imaging, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer,  
Toulouse - France*

*<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du  
Cancer, Toulouse - France*

Corresponding author:

Gwenael FERRON, MD, PhD

Department of Surgical Oncology

Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer

1 avenue Joliot Curie

31058 Toulouse France

Email address: [ferron.gwenael@iuct-oncopole.fr](mailto:ferron.gwenael@iuct-oncopole.fr)

Phone: +33531155355

**Contribution of Acellular Dermal Matrices in abdominal wall reconstruction in Surgical Oncology. A change of paradigm.**

Ferron G<sup>1,2</sup>, Le Naour A<sup>2</sup>, Mezghani B<sup>1</sup>, Martinez A<sup>1,2</sup>, Martinez Gomez C<sup>1</sup>, Boulet B<sup>3</sup>, Couderc B<sup>2</sup>, Gangloff D<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Department of Surgical Oncology, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer, Toulouse - France*

*<sup>2</sup>EA 4553 - Translational Research Unit, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer, Toulouse - France*

*<sup>3</sup>Department of Imaging, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer, Toulouse - France*

Corresponding author:

Gwenael FERRON, MD, PhD

Department of Surgical Oncology

Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer

1 avenue Joliot Curie

31058 Toulouse France

Email address: [ferron.gwenael@iuct-oncopole.fr](mailto:ferron.gwenael@iuct-oncopole.fr)

Phone: +33531155355

**Abstract:**

Abdominal wall reconstruction represents a real challenge in surgical oncology. Strategy of reconstruction changes with the development of acellular dermal matrices (ADM) for clinical use. We presented our experience of the use of ADM for abdominal wall reconstruction in a tertiary cancer center.

From January 2013 to December 2015, clinical data from 22 patients who underwent an abdominal wall resection with an ADM reconstruction were recorded, including 9 sarcoma resections and 10 abdominal wall metastasis from peritoneal carcinomatosis. All of these cases would have traditionally required flap reconstruction. Postoperative complications occurred in 8 patients (36%): 4 mesh exposures and two local infections or seroma. No mesh explantation was necessary. Eight patients (36%) presented at least one late complication of the reconstruction within 17 months median follow-up: 2 symptomatic incisional hernias, 5 laxity of the abdominal wall, and 1 chronic seroma. No patient was reoperated for the treatment of the parietal hernia.

The use of ADM in parietal abdominal reconstruction represents a very interesting option in case of resection involving soft tissue sarcoma, parietal resection for infected tumor, parietal en-bloc excision with digestive resection, and finally for the reconstruction of transfixing port site metastasis excision.

Using ADM in oncologic abdominal wall reconstruction allows us to delay, in case of hernia recurrence, the second-stage reconstruction with the guarantee of tumor local control.

**Keywords:** Abdominal wall; Reconstruction; Acellular dermal Matrice; Surgical Oncology; Peritoneal Carcinomatosis; Soft tissue sarcoma

## **Introduction**

The strategy for the reconstruction of the abdominal wall represents a real challenge in surgical oncology. A global review of the potential risks related to this reconstruction is mandatory with regards to the oncological, technical and infection background. The use of myocutaneous flaps, perforator flaps or free flaps allowed for the reconstruction of complex defects in surgical oncology out of the donor site sequelae. Moreover, the risk of an insufficient margin surgery, especially in case of soft tissue sarcoma, is renders any redo surgery with a flap in place difficult. Because of the risk of tumoral contamination, in case of parietal metastasis excision of a peritoneal carcinomatosis, abdominal wall reconstruction using non absorbable prosthesis is not indicated. Reconstruction by flaps is rare in parietal resection for peritoneal carcinomatosis since these patients may have several successive surgical treatments in their oncologic pathway and sometimes hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC).

Recent developments of acellular dermal matrices (ADM) have extensively changed the possibilities of the reconstruction of abdominal wall defects. These implants allow for an aponeurotic reconstruction and coverage of the intra-abdominal viscera.

The actual literature data regarding their use in abdominal oncology surgery is infrequent. The goal of this study is to evaluate the interest of this type of reconstruction in our comprehensive cancer center experience, in the management of soft tissues sarcomas (NetSARC network) and in rare peritoneal disease (RENAPE network).

## **Patients and Methods**

Clinical and surgical records from all patients who underwent an abdominal wall resection including reconstruction with biologic implants at the Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer Toulouse, comprehensive cancer center from January 2013 to December 2015 were reviewed. All of these cases would have traditionally required flap reconstruction.

Patients who had a prosthetic implantation for incisional hernia and a repair following abdominal compartment syndrome were excluded from the study.

The study was approved by the Institutional Review Board from our institution.

Data regarding patients and defect characteristics, surgical indication, complications and their surgical outcome were registered. Follow-up included serial physical examinations and medical imaging (CT or MRI) depending to the type of cancer.

## Results

From January 2013 to December 2015, 35 patients experienced biologic matrix placement for abdominal wall reconstruction at our cancer center. Thirteen patients were excluded because of the indication: secondary incisional hernia treatment, abdominal wall reconstruction during laparostomy closure. Twenty-two patients underwent immediate abdominal wall reconstruction using biologic matrix at the time to the cancer treatment. All the reconstruction was performed using natural cross linked freeze-dry ADM (Cellis ® - Meccellis Biotech)

Patient's clinical data's are reported in table 1.

Median age of patients at surgery is 66 years (range: 48 – 89) with a median BMI of 27 Kg/m<sup>2</sup> (range: 19 – 44). Six patients are respectively overweight (BMI range between 25 to 30) and 6 are obese (Up to 30).

Eight patients are treated for diabetes at the time of surgery and 3 have tobacco intoxication. Ten patients were presenting pre-existent parietal hernia.

For 6 patients, the parietal resection was performed in a previous irradiated zone.

For 13 patients, the surgery was performed in a contaminated field due to the necessity of a digestive resection gesture. In 4 cases, it concerned an infected tumor.

Two main indications were identified for the parietal reconstruction with biologic implants:

- management of a sarcoma requiring a parietal resection and digestive resection or a contaminated field or infected (9 cases) including tree sarcomas of the spermatic cord requiring a large scrotoectomy with orchidectomy and

resection of the crural arch (Fig. 1-2).

- resection of the abdominal wall due to extension of a peritoneal carcinomatosis (10 cases) of which 5 patients had, at the time of the procedure, an HIPEC for pseudomyxoma peritonei (Fig. 3-4).

- regarding the 3 remaining cases, a parietal reconstruction following total pelvic exenteration with harvesting of a VRAM (Vertical rectus abdominis myocutaneous flap) after digestive resection and continent urinary diversion construction (Miami pouch); one femoral and iliac node recurrence of a vulva cancer in irradiated and secondary infected area with resection of the inferior abdominal wall and vascular reconstruction with biologic prosthesis ; one recurrence of a granulosa tumor situated exclusively on a synthetic prosthesis for parietal reconstruction.

For all patients except 5, the surgery was performed in a contaminated field (including bowel resection) or in infected field (N=4). In 5 cases, a synthetic prosthesis required resection due to tumoral invasion. Eight patients experienced postoperative complications: 4 meshes exposure and two local infections or seroma. All of these complications were treated by wound care, drainage and negative pressure therapy without mesh explantation. Eight patients presented at least one late complication of the reconstruction with 17 months' median follow-up: 2 patients presented a symptomatic incisional hernia. These two patients presented a postoperative exposure of the prosthesis. Five patients presented laxity of the abdominal wall without real hernia. One patient presented a chronic seroma needing several exhaustive punctures. No patient was reoperated for the treatment of the parietal hernia.



## **Discussion**

Oncologic and reconstructive surgeons are often faced with difficult abdominal wall defects after tumor resection especially in the setting of contaminated or irradiated fields and with local ongoing infection. The goals of abdominal wall reconstruction are to protect the abdominal contents and restore functional support. Multiple strategies have been described: component's separation, meshes (synthetic or biologic), pedicled or free flap reconstruction and sometimes the association of several techniques. Algorithms have been published regarding the technique used depending on the size of the defect (especially in case of previous hernia), the absence of stable skin coverage and compromised tissues (infection, irradiation, enterocutaneous fistula)[1-3].

The use of pedicled or free flap is widely accepted in the field of surgical oncology to fill large defect after tumor resection. For abdominal wall reconstruction, pedicled flaps are selected based on their availability and arc of rotation due to their blood supply. Rectus abdominis and external oblique flaps are frequently used. Tensor fascia lata flap is useful for lower abdominal coverage [4]. For lateral parietal defect, latissimus dorsi flap represents also a good option [5].

Since the introduction of perforators flaps, new options were offered to the reconstructive surgeon for abdominal reconstruction with the used of deep inferior epigastric perforator (DIEP) flap, anterolateral thigh flap, Thoracodorsal Artery Perforator (TAP) flap [6]. Technically demanding, free flap harvesting and vascular anastomosis require specific skills and training.

Combination repair with flap and mesh is frequent in oncology due to the large size of defect and the rate of full-thickness resection, although both non-resorbable polypropylene (Marlex, Prolene) and polytetrafluoroethylene mesh (Gore-Tex) are advocated [7]. To prevent visceral complication, omentum should be placed between the

bowel and mesh [8]. Because of the frequent situation of contaminated field in surgical oncologic patient (infection, irradiation, en-bloc removal with digestive resection, presence of ostomy), placement of non-resorbable mesh is frequently considered as posing a high risk of postoperative complications. Since its introduction in 2003, acellular dermal matrix (ADM) provides an alternative to synthetic meshes [9]. With a high capacity to integrate with surrounding tissues, the rate of postoperative infection, erosion or explantation is lower compared to synthetic materials even in contaminated fields [10]. For some authors, ADM experiences lower rate of surgical site infection than synthetic meshes for complex abdominal wall reconstruction in the setting of wound contamination [11]. In our experience, the use of ADM allowed us to reduce the number of reconstructive flaps or to perform definitive reconstruction in a second procedure several months later, once negative margins were obtained after adjuvant therapy realized.

Several advantages were reported in the literature regarding the use of ADM in abdominal wall reconstruction.

- Low infection rate and reduced fistula formation

Traditionally, skin necrosis and prosthesis exposure can lead to early exploration, debridement and frequent mesh explantation. The risk is even higher in oncologic surgery, particularly in case of prior irradiation or chemotherapy. In our series, this complication occurred in 5 cases. Complete wound healing was secondarily obtained without mesh explantation. Biologic tissue matrices are frequently used in contaminated fields, which has allowed for a one-stage repair [10, 12]. Coupled with the improvements in wound healing adjuncts, the tissue incorporation properties of ADM will allow for

conservative management with dressing. Postoperative infection occurred in 40% of patients when ADM are placed in a compromised surgical field [13]. Despite this high rate of infection, no matrix removal was needed. In a trial regarding repair of infected grade III-IV hernia, postoperative infection occurred in 21% of patients and operative treatment was required in 67% of them, without mesh explantation [14]. For the authors, single stage reconstruction was successful in 70% of patients followed for 24 months after repair. For surgical oncologic patients, previous radiation therapy traditionally increased risk for wound healing complications and mesh exposure. But using a propensity score analysis, Giordano demonstrated that prior radiotherapy did not lead to higher complications [15]. Soft tissue defect frequently need myocutaneous or free flap transfer for reconstruction [16]. Seroma was commonly reported in 30% of patients with a strong reduction by using perforated ADM.

#### - Absence of bowel adhesion

The use of prosthetic mesh for reconstruction of trunk defects is undesirable particularly when local tissues are not available for interposition between the synthetic mesh and viscera. Extremely dense bowel adhesion occurred after intraperitoneal placement of non-resorbable meshes. This complication represents a limitation for patients who required another intra-abdominal procedure or reexploration, for example for peritoneal carcinomatosis recurrence and patients requiring a full-thickness abdominal resection. There is also a major risk of intestinal fistulas developing with the intraperitoneal placement of the mesh. The benefits of ADM include the minimal adhesion formation when it is placed directly on the bowel [17].

#### - Oncologic outcomes

Obtaining negative tumor margins is essential during tumor resection in order to reduce the risk of recurrence and to avoid the need for re-resection. In case of a high risk of recurrence, guidelines recommend minimizing rearrangement of adjacent tissues [18]. As the technique of resection is planned preoperatively using adequate imaging, technique of reconstruction has to be anticipated with the reconstructive surgeon. Surgical resection of a tumor induces a local inflow of growth factors, increased in case of synthetic prosthesis implantation resulting in risk of local evolving continuation in case of insufficient margins. Knowledge of the tumor characteristics and risk of recurrence must modify the strategies of patient care. Indeed, as an example, in case of sarcoma resection, reconstruction by flap can only be performed with the guarantee to obtain negative margins.

In case of peritoneal carcinomatosis, the risk of contamination of non-absorbable prosthesis is major. Picaud et al. [19] demonstrated in an ovarian peritoneal carcinomatosis model the promoting effect of tumoral growth on presence of non-absorbable prosthesis. In this study, the implantation of tumoral cells on the ADM could not be seen (data not shown) although it has been published that placement of ADM between two layers of vascularized tissue promotes fibroblast invasion and angiogenesis [20]. Revascularization rate for porcine-derived ADM was found to be less than human derived matrix. The use of ADM for parietal reconstruction of port site metastasis or parietal extension of carcinomatosis represents in our opinion, a good indication.

- Postoperative hernia

Reconstruction with ADM, however, presents disadvantages, particularly in terms of the risk of secondary incisional hernia especially in case of transfixing abdominal wall resection or in case of pre existing hernia. In our experience, 7 patients presented laxity (n=5) or incisional hernia (n=2), but none required a surgical revision. Functional disturbance described by patients is minor if tacking into account their oncologic situation.

Data from the existing literature are rarely specific to the parietal reconstruction in oncology. In general abdominal surgery, recurrent hernias after ADM abdominal wall repairs ranged widely from 0% to 80% [21]. In contaminated ventral hernias it occurred in 10 to 30% of case. Placement of the mesh in the retro-rectus compartment resulted in a similar recurrence rate to intraperitoneal mesh placement [22]. Recurrence typically occurred at the ADM-fascia or ADM-ADM interface. Incidence of recurrence is lower by using porcine ADM than human ADM. Significant risk factors of postoperative hernia have been described to be: female gender, obesity, surgical site infection, enterocutaneous fistula, size of the defect (more than 100cm<sup>2</sup>), and duration of surgery [23-25].

Incidence of abdominal wall laxity is largely unreported. Laxity occurred more frequently in large abdominal wall defect and following surgical site infection. Different techniques to avoid recurrence were published: using an adequate mesh/fascia overlap; suturing using permanent suture at least 1 cm from the edge of the mesh [13]; avoiding excessive manipulation of mesh during implantation; placing the mesh under near-maximal tension to prevent early bulging [26]. Bridged repair for abdominal wall reconstruction seems to be associated with worse outcomes than mesh-reinforced reconstruction [15]. Hernia recurrences occurred in 33.3 to 80% in bridge reconstruction compared to 6.2 to 20% for reinforced repairs with components

separation [15, 27]. This statement invites us to perform muscular translation to ensure reconstruction in oncology possibly allowing for full coverage of the ADM with a muscular flap. In case of large resection of the abdominal wall, it is sometimes necessary to use specific fixation to anchor the mesh to the iliac crest. Long-term reports (more than 5-year follow-up) for ADM in abdominal wall reconstruction are missing in the current literature.

## **Conclusion**

The use of ADM in parietal abdominal reconstruction represents a very interesting option in case of resection involving soft tissue sarcoma, parietal resection for infected tumor, parietal en-bloc excision with digestive resection and finally for the reconstruction of transfixing port site metastasis excision.

Even if there is a risk of secondary hernia, ADM clearly offers to solve the problem of parietal reconstruction in oncology surgery.

Using ADM in oncologic abdominal wall reconstruction allows us to delay, in case of hernia recurrence, the second-stage reconstruction with the guarantee of tumor local control. In our experience, the use of ADM did reduce the indications of first intention reconstructions with flaps, dramatically simplifying the time of tumor excision.

The use of non-resorbable prosthesis is currently limited to the secondary parietal repair of incisional hernia outside the field of peritoneal carcinomatosis.

## **Conflicts of interest:**

The authors indicated no potential conflicts of interest.

Dr Carlos Martinez Gomez M.D. is supported by grants from the Fundacion Martin Escudero – Madrid Spain during his PhD.

## **Acknowledgments:**

The authors would like to thank Julia A Wittman for English editing.

**Figures:**

Fig. 1: Resection of the iliac muscle and the inguinal canal for retroperitoneal sarcoma recurrence (Patient n°7)

Fig. 2: Reconstruction of the abdominal wall and the inguinal canal. ADM mesh is anchored to the iliac crest.

Fig. 3: Large parietal contamination of McBurney's incision from pseudomyxoma peritonei (Patient n°21).

Fig. 4: Parietal reconstruction with ADM after full thickness abdominal wall resection, peritonectomies, right colectomy and oxaliplatin based HIPEC (Patient n°21)



## References:

- [1] Mathes SJ, Steinwald PM, Foster RD, Hoffman WY, Anthony JP. Complex abdominal wall reconstruction: a comparison of flap and mesh closure. *Ann Surg.* 2000 Oct;232(4):586-96.
- [2] Leppäniemi A, Tukiainen E. Reconstruction of complex abdominal wall defects. *Scand J Surg.* 2013;102(1):14-9.
- [3] Shestak KC, Edington HJ, Johnson RR. The separation of anatomic components technique for the reconstruction of massive midline abdominal wall defects: anatomy, surgical technique, applications, and limitations revisited. *Plast Reconstr Surg.* 2000 Feb;105(2):731-8
- [4] Gruen RL, Morrison WA, Vellar ID. The tensor fasciae latae myocutaneous flap closure of major chest and abdominal wall defects. *Aust N Z J Surg.* 1998 Sep;68(9):666-9.
- [5] Ninković M, Kronberger P, Harpf C, Rumer A, Anderl H. Free innervated latissimus dorsi muscle flap for reconstruction of full-thickness abdominal wall defects. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Apr;101(4):971-8.
- [6] Hallock GG. A paradigm shift for soft-tissue coverage of the zones of the abdominal wall using perforator flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2012 Sep;130(3):590-9.
- [7] Mathes SJ, Steinwald PM, Foster RD, Hoffman WY, Anthony JP. Complex abdominal wall reconstruction: a comparison of flap and mesh closure. *Ann Surg.* 2000 Oct;232(4):586-96.
- [8] Hultman CS, Carlson GW, Losken A, Jones G, Culbertson J, Mackay G, Bostwick J 3rd, Jurkiewicz MJ. Utility of the omentum in the reconstruction of complex extraperitoneal wounds and defects: donor-site complications in 135 patients from 1975 to 2000. *Ann Surg.* 2002 Jun;235(6):782-95.
- [9] Beale EW, Hoxworth RE, Livingston EH, Trussler AP. The role of biologic mesh in abdominal wall reconstruction: a systematic review of the current literature. *Am J Surg.* 2012 Oct;204(4):510-7.
- [10] Tang R, Gu Y, Gong DQ, Qian YL. Immediate repair of major abdominal wall defect after extensive tumor excision in patients with abdominal wall neoplasm: a retrospective review of 27 cases [corrected]. *Ann Surg Oncol.* 2009 Oct;16(10):2895-907.
- [11] Garvey PB, Martinez RA, Baumann DP, Liu J, Butler CE. Outcomes of abdominal wall reconstruction with acellular dermal matrix are not affected by wound contamination. *J Am Coll Surg.* 2014 Nov;219(5):853-64.
- [12] Yezhelyev MV, Deigni O, Losken A. Management of full-thickness abdominal wall defects following tumor resection. *Ann Plast Surg.* 2012 Aug;69(2):186-91.

- [13] Diaz JJ Jr, Conquest AM, Ferzoco SJ, Vargo D, Miller P, Wu YC, Donahue R. Multi-institutional experience using human acellular dermal matrix for ventral hernia repair in a compromised surgical field. *Arch Surg*. 2009 Mar;144(3):209-15.
- [14] Itani KM, Rosen M, Vargo D, Awad SS, Denoto G 3rd, Butler CE; RICH Study Group. Prospective study of single-stage repair of contaminated hernias using a biologic porcine tissue matrix: the RICH Study. *Surgery*. 2012 Sep;152(3):498-505.
- [15] Giordano S, Garvey PB, Baumann DP, Liu J, Butler CE. Prior Radiotherapy Does Not Affect Abdominal Wall Reconstruction Outcomes: Evidence from Propensity Score Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2016 Sep 30. [Epub ahead of print]
- [16] Khansa I, Janis JE. Modern reconstructive techniques for abdominal wall defects after oncologic resection. *J Surg Oncol*. 2015 Apr;111(5):587-98.
- [17] Butler CE, Prieto VG. Reduction of adhesions with composite AlloDerm/polypropylene mesh implants for abdominal wall reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Aug;114(2):464-73.
- [18] National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology: Dermatofibrosarcoma protuberans. 2012. Available at [http://www.nccn.org/professionals/physicians\\_gls/PDF/dfsp.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physicians_gls/PDF/dfsp.pdf) Accessed August 24, 2014.
- [19] Picaud L, Thibault B, Mery E, Ouali M, Martinez A, Delord JP, Couderc B, Ferron G. Evaluation of the effects of hyaluronic acid-carboxymethyl cellulose barrier on ovarian tumor progression. *J Ovarian Res*. 2014 Apr 16;7:40.
- [20] Campbell KT, Burns NK, Rios CN, Mathur AB, Butler CE. Human versus non-cross-linked porcine acellular dermal matrix used for ventral hernia repair: comparison of in vivo fibrovascular remodeling and mechanical repair strength. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Jun;127(6):2321-32.
- [21] Zhong T, Janis JE, Ahmad J, Hofer SO. Outcomes after abdominal wall reconstruction using acellular dermal matrix: a systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011 Dec;64(12):1562-71.
- [22] Rosen MJ, Denoto G, Itani KM, Butler C, Vargo D, Smiell J, Rutan R. Evaluation of surgical outcomes of retro-rectus versus intraperitoneal reinforcement with bio-prosthetic mesh in the repair of contaminated ventral hernias. *Hernia*. 2013 Feb;17(1):31-5.
- [23] Schuster R, Singh J, Safadi BY, Wren SM. The use of acellular dermal matrix for contaminated abdominal wall defects: wound status predicts success. *Am J Surg*. 2006 Nov;192(5):594-7.
- [24] Maurice SM, Skeete DA. Use of human acellular dermal matrix for abdominal wall reconstructions. *Am J Surg*. 2009 Jan;197(1):35-42.
- [25] Lee EI, Chike-Obi CJ, Gonzalez P, Garza R, Leong M, Subramanian A, Bullocks J, Awad SS. Abdominal wall repair using human acellular dermal matrix: a follow-up study. *Am J Surg*. 2009 Nov;198(5):650-7.

[26] Patel KM, Bhanot P. Complications of acellular dermal matrices in abdominal wall reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2012 Nov;130(5 Suppl 2):216S-24S

[27] Jin J, Rosen MJ, Blatnik J, McGee MF, Williams CP, Marks J, Ponsky J. Use of acellular dermal matrix for complicated ventral hernia repair: does technique affect outcomes? *J Am Coll Surg.* 2007 Nov;205(5):654-60.

**Contribution of Acellular Dermal Matrices in abdominal wall reconstruction in Surgical Oncology. A change of paradigm.**

FERRON Gwénael, MD, PhD<sup>1,2</sup>; LE NAOUR Augustin, PharmD <sup>2</sup>; MEZGHANI Bassem, MD<sup>1</sup>; MARTINEZ Alejandra, MD, PhD<sup>1,2</sup>; MARTINEZ GOMEZ Carlos, MD<sup>1</sup>; BOULET Berenice, MD<sup>3</sup>, COUDERC Bettina, PhD, Pr<sup>2</sup>; GANGLOFF Dimitri, MD<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Department of Surgical Oncology, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer, Toulouse - France*

*<sup>2</sup>EA 4553 - Translational Research Unit, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer, Toulouse - France*

*<sup>3</sup>Department of Imaging, Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer, Toulouse - France*

Corresponding author:

Gwénael FERRON, MD, PhD

Department of Surgical Oncology

Institut Claudius Regaud – Institut Universitaire du Cancer

1 avenue Joliot Curie

31058 Toulouse France

Email address: [ferron.gwenael@iuct-oncopole.fr](mailto:ferron.gwenael@iuct-oncopole.fr)

Phone: +33531155355

Fax: +33531156046

**Conflicts of interest:**

The authors indicated no potential conflicts of interest.

Dr Carlos Martinez Gomez M.D. is supported by grants from the Fundacion Martin Escudero – Madrid Spain during his PhD.

**Acknowledgments:**

The authors would like to thank Julia A Wittman for English editing.

Table

| Patient | Age | BMI | Co-morbidity | Cancer                            | Previous hernia | Previous RT | Surgical field | Bowel resection | Reason for abdominal wall resection | Postoperative complications | Long term result |
|---------|-----|-----|--------------|-----------------------------------|-----------------|-------------|----------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| 1       | 73  | 21  | Tabacco      | RetroP Sarcoma Recurrence         | Yes             | Yes         | Contaminated   | Yes             | Tumor extension                     | Seroma infection            | Laxity           |
| 2       | 55  | 30  |              | PMP + HIPEC                       | Yes             | No          | Contaminated   | Yes             | Port site Metastasis                |                             | Laxity           |
| 3       | 66  | 22  |              | PMP + HIPEC                       | No              | No          | Contaminated   | Yes             | Port site Metastasis                | Mesh exposure               |                  |
| 4       | 54  | 19  |              | Granulosa recurrence              | Yes             | No          | Contaminated   | Yes             | Mesh involvement                    | Mesh exposure               | Hernia           |
| 5       | 62  | 20  |              | PMP + HIPEC                       | No              | No          | Contaminated   | Yes             | Port site Metastasis                |                             |                  |
| 6       | 54  | 36  | Tabacco      | Diabe PMP + HIPEC                 | No              | No          | Contaminated   | Yes             | Port site Metastasis                | Sepsis                      | Died             |
| 7       | 66  | 27  |              | RetroP Sarcoma Recurrence         | Yes             | Yes         | Infected       | Yes             | Mesh involvement                    |                             |                  |
| 8       | 58  | 34  | Diabetes     | Carcinomatosis                    | No              | No          | Contaminated   | Yes             | Port site Metastasis                |                             |                  |
| 9       | 68  | 23  |              | Sarcoma Abdominal wall            | No              | No          | Contaminated   | Yes             | Tumor extension                     | Seroma                      | Chronic seroma   |
| 10      | 77  | 29  | Diabetes     | Carcinomatosis                    | Yes             | No          | No             | No              | Mesh involvement                    |                             |                  |
| 11      | 73  | 44  | Diabetes     | Sarcoma of spermatic cord         | Yes             | No          | No             | No              | Tumor extension + Mesh involvement  | Mesh exposure               |                  |
| 12      | 75  | 20  |              | Sarcoma Abdominal wall Recurrence | Yes             | Yes         | Contaminated   | Yes             | Tumor extension                     | Seroma                      | Laxity           |
| 13      | 72  | 29  | Diabetes     | Carcinomatosis                    | Yes             | No          | Infected       | No              | Mesh involvement                    |                             |                  |
| 14      | 77  | 24  |              | Carcinomatosis                    | Yes             | No          | No             | Yes             | Mesh involvement                    |                             |                  |
| 15      | 63  | 32  | Diabetes     | Vulvar K recurrence               | No              | Yes         | Contaminated   | No              | Tumor extension                     | Mesh exposure               | Hernia           |
| 16      | 74  | 19  | Tabacco      | RetroP Sarcoma Recurrence         | Yes             | Yes         | Contaminated   | Yes             | Tumor extension                     |                             | Laxity           |
| 17      | 48  | 29  |              | Carcinomatosis                    | No              | No          | Contaminated   | Yes             | Port site Metastasis                |                             |                  |
| 18      | 84  | 27  | Diabetes     | Sarcoma of spermatic cord         | No              | No          | No             | No              | Tumor extension                     |                             | Laxity           |
| 19      | 66  | 25  |              | Pelvic exenteration               | No              | Yes         | Contaminated   | Yes             | Flap harvesting                     |                             |                  |
| 20      | 89  | 24  |              | Sarcoma of spermatic cord         | No              | No          | Infected       | No              | Tumor extension                     |                             |                  |
| 21      | 59  | 35  | Diabetes     | PMP + HIPEC                       | No              | No          | Infected       | Yes             | Port site Metastasis                |                             |                  |
| 22      | 56  | 41  |              | Chondrosarcoma 12th rib           | No              | No          | No             | No              | Tumor extension                     |                             |                  |

Figure 1

[Click here to download Figure 1.tif](#)

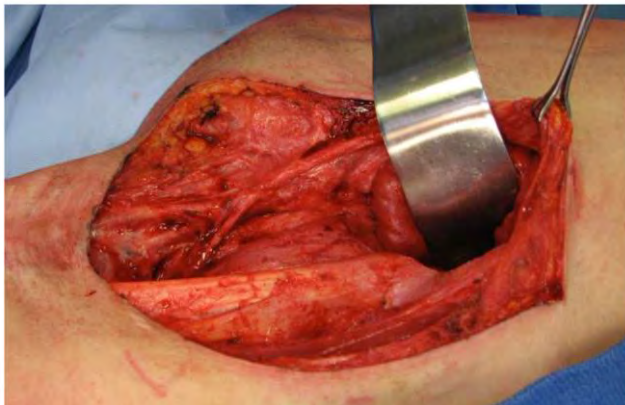


Figure 2

[Click here to download Figure 2.tif](#)



Figure 3

[Click here to download Figure 3.tif](#)



Figure 4

[Click here to download Figure 4.tif](#)





## VI) BIBLIOGRAPHIE

1. Bénard, J. & Grynberg, M. Physiologie ovarienne. *Gynécologie* **11**, 1–9 [Article 30–A–05] (2015).
2. Bazot, M., Fédida, B., Dechoux-Vodovar, S., Beldjord, S. & Thomassin-Naggara, I. Ovaires : variations physiologiques et pathologies fonctionnelles. *Feuill. Radiol.* **56**, 65–84 (2016).
3. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 87–108 (2015).
4. Coburn, S. B., Bray, F., Sherman, M. E. & Trabert, B. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype: Ovarian cancer trends. *Int. J. Cancer* **140**, 2451–2460 (2017).
5. *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim.* (Institut de veille sanitaire, 2013).
6. Anonyme. Guide affection de longue durée 30 'cancer de l'ovaire'. (2010).
7. Les cancers en France. *Données INCa édition 2016*, (2017).
8. Chêne, G. *et al.* La cancérogenèse ovarienne : théories actuelles et passées. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* **39**, 216–223 (2011).
9. Synthèse. Femmes porteuses d'une mutation de BRCA1 ou BRCA2 /Détection précoce du cancer du sein et des annexes et stratégies de réduction du risque. *Collect. Recomm. Réf. INCa* (2017).
10. Ford, D. *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 676–689 (1998).



11. Antoniou, A. *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1117–1130 (2003).
12. Bats, A.-S. & Barranger, E. [Management of ovarian cancer]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* **37 Spec No 2**, F64–68 (2008).
13. Devouassoux-Shisheboran, M., Genestie, C. & Ray-Coquard, I. La classification histomoléculaire des cancers épithéliaux ovariens en 2 types est-elle pertinente? *Bull. Cancer (Paris)* **103**, 252–258 (2016).
14. Meinhold-Heerlein, I. *et al.* The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch. Gynecol. Obstet.* **293**, 695–700 (2016).
15. Classe, J.-M. *et al.* Cancer de l’ovaire : prise en charge pluridisciplinaire du cancer de l’ovaire en première ligne: Recommandations Saint-Paul-de-Vence 2016. *Bull. Cancer (Paris)* **104**, S6–S15 (2017).
16. Devouassoux-Shisheboran, M., Genestie, C. & Ray-Coquard, I. [Dualistic classification of epithelial ovarian cancer: Is it clinically relevant?]. *Bull. Cancer (Paris)* **103**, 252–258 (2016).
17. Kurman, R. J. & Shih, I.-M. Seromucinous Tumors of the Ovary. What’s in a Name?: *Int. J. Gynecol. Pathol.* **35**, 78–81 (2016).
18. Ray-Coquard, I. *et al.* Tumeurs rares malignes de l’ovaire. *Oncologie* **7**, 556–563 (2005).
19. Bats, A.-S., Larousserie, F., Le Frère Belda, M.-A., Metzger, U. & Lécuru, F. Tumeurs non épithéliales malignes de l’ovaire. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* **37**, 627–632 (2009).
20. Aucouturier, J. . *et al.* Choriocarcinome ovarien : à propos d’un cas. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* **31**, 539–542 (2003).

21. Ray-Coquard, I. *et al.* [Rare ovarian tumours: therapeutic strategies in 2010, national website observatory for rare ovarian cancers and delineation of referent centers in France]. *Bull. Cancer (Paris)* **97**, 123–135 (2010).
22. Horta, M. & Cunha, T. M. Sex cord-stromal tumors of the ovary: a comprehensive review and update for radiologists. *Diagn. Interv. Radiol. Ank. Turk.* **21**, 277–286 (2015).
23. D’Souza, L., Burgis, J. T., Bacon, J. L. & Camps, J. I. A Pure Sertoli Cell Tumor of the Ovary in a 10-Year-Old Female. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* **20**, 257–259 (2007).
24. Zhao, C., Bratthauer, G. L., Barner, R. & Vang, R. Comparative analysis of alternative and traditional immunohistochemical markers for the distinction of ovarian sertoli cell tumor from endometrioid tumors and carcinoid tumor: A study of 160 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **31**, 255–266 (2007).
25. Fleming, J. S., Beaugié, C. R., Haviv, I., Chenevix-Trench, G. & Tan, O. L. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Mol. Cell. Endocrinol.* **247**, 4–21 (2006).
26. Shih, I.-M. & Kurman, R. J. Ovarian Tumorigenesis. *Am. J. Pathol.* **164**, 1511–1518 (2004).
27. Hennessy, B. T., Coleman, R. L. & Markman, M. Ovarian cancer. *The Lancet* **374**, 1371–1382 (2009).
28. Delpech, Y. & Barranger, E. Évaluation des facteurs pronostiques des tumeurs épithéliales malignes de l’ovaire. *Médecine Thérapeutique Médecine Reprod. Gynécologie Endocrinol.* **14**, 63–69. (2012).
29. Prat, J. & FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int. J. Gynaecol. Obstet. Off. Organ Int. Fed. Gynaecol. Obstet.* **124**, 1–5 (2014).

30. Javadi, S., Ganeshan, D. M., Qayyum, A., Iyer, R. B. & Bhosale, P. Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging. *AJR Am. J. Roentgenol.* **206**, 1351–1360 (2016).
31. Joly, F., Querleu, D., Namer, M. & Pujade-Lauraine, E. Mise à jour 2016 des recommandations pour la pratique clinique de Nice/Saint-Paul-de-Vence dans le cancer de l’ovaire et du col de l’utérus à un stade avancé. *Bull. Cancer (Paris)* **104**, S1–S5 (2017).
32. Thomas, F. & Chatelut, E. Les dérivés du platine. *Oncologie* **9**, 741–745 (2007).
33. Gennigens, C. & Jerusalem, G. [Trabectedin (ET-743/Yondelis) for treating soft tissue sarcomas and ovarian cancer]. *Rev. Med. Liege* **66**, 452–455 (2011).
34. *Vidal 2017: le dictionnaire.* (Vidal, 2017).
35. D’Incalci, M. Trabectedin mechanism of action: what’s new? *Future Oncol. Lond. Engl.* **9**, 5–10 (2013).
36. Markman, M. *et al.* Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **9**, 389–393 (1991).
37. Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 393–410 (2011).
38. Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**, 58–62 (2005).
39. Sefidgar, M. *et al.* Numerical modeling of drug delivery in a dynamic solid tumor microvasculature. *Microvasc. Res.* **99**, 43–56 (2015).
40. Cosse, J.-P. & Michiels, C. Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents Med. Chem.* **8**, 790–797 (2008).

41. Régina, A. *et al.* Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. *Cancer Metastasis Rev.* **20**, 13–25 (2001).
42. Huang, R. S. & Ratain, M. J. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents. *CA. Cancer J. Clin.* **59**, 42–55 (2009).
43. Wang, J. & Huang, Y. Pharmacogenomics of sex difference in chemotherapeutic toxicity. *Curr. Drug Discov. Technol.* **4**, 59–68 (2007).
44. Milano, G. & Chamorey, A.-L. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol. Int.* **19**, 177–189 (2002).
45. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869–1883 (2012).
46. Chatelut, E., Canal, P. & Bugat, R. [Pharmacokinetics and individual dose adjustment of carboplatin]. *Bull. Cancer (Paris)* **87 Spec No**, 17–23 (2000).
47. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. & Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 714–726 (2013).
48. Sève, P., Reiman, T. & Dumontet, C. The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **67**, 136–143 (2010).
49. McGee, J. *et al.* Fifth Ovarian Cancer Consensus Conference: individualized therapy and patient factors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 702–710 (2017).
50. Pautier, P., Kalbacher, E., de la Motte Rouge, T., Bonnetain, F. & Lesoin, A. Cancer de l’ovaire : la rechute précoce. *Bull. Cancer (Paris)* **104**, S32–S38 (2017).
51. Wolford, J. E. & Tewari, K. S. Highlights from the Gynecologic Oncology Track at the 2017 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. *J. Gynecol. Oncol.* **28**, e74 (2017).

52. Floquet, A. *et al.* Traitement des rechutes tardives du cancer de l'ovaire. *Bull. Cancer (Paris)* **104**, S24–S31 (2017).
53. Roskelley, C. D. & Bissell, M. J. The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Semin. Cancer Biol.* **12**, 97–104 (2002).
54. Hui, L. & Chen, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* **368**, 7–13 (2015).
55. Castells, M., Thibault, B., Delord, J.-P. & Couderc, B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 9545–9571 (2012).
56. Thibault, B., Castells, M., Delord, J.-P. & Couderc, B. Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 17–39 (2014).
57. Hamanishi, J. *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3360–3365 (2007).
58. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18538–18543 (2005).
59. Bokemeyer, C. *et al.* A phase II study of catumaxomab administered intra- and postoperatively as part of a multimodal approach in primarily resectable gastric cancer. *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.* **18**, 833–842 (2015).
60. Goebeler, M.-E. & Bargou, R. Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy. *Leuk. Lymphoma* **57**, 1021–1032 (2016).

61. Wu, J., Fu, J., Zhang, M. & Liu, D. Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **8**, 104 (2015).
62. Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 669–692 (2009).
63. Gordon, S., Plüddemann, A. & Martinez Estrada, F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* **262**, 36–55 (2014).
64. De Palma, M. & Lewis, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* **23**, 277–286 (2013).
65. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 71–78 (2004).
66. Castells, M. *et al.* Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* **326**, 59–68 (2012).
67. Guo, C., Buranych, A., Sarkar, D., Fisher, P. B. & Wang, X.-Y. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. *Vasc. Cell* **5**, 20 (2013).
68. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
69. Chen, P. & Bonaldo, P. Role of macrophage polarization in tumor angiogenesis and vessel normalization: implications for new anticancer therapies. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **301**, 1–35 (2013).
70. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
71. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 7303–7311 (2006).

72. Duluc, D. *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110**, 4319–4330 (2007).
73. Gelhorn, H. L. *et al.* Patient-reported Symptoms of Tenosynovial Giant Cell Tumors. *Clin. Ther.* **38**, 778–793 (2016).
74. Nath, S. & Mukherjee, P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* **20**, 332–342 (2014).
75. Arriola, E. & Ottensmeier, C. TG4010: a vaccine with a therapeutic role in cancer. *Immunotherapy* **8**, 511–519 (2016).
76. Kotla, V. *et al.* Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2**, 36 (2009).
77. Leleu, X. *et al.* [Thalidomide: mechanisms of action and new insights in hematology]. *Rev. Med. Interne* **26**, 119–127 (2005).
78. Fouquet, G. *et al.* [Pomalidomide for multiple myeloma]. *Rev. Med. Interne* **36**, 613–618 (2015).
79. Leclers, D. *et al.* [Lymphatic vessels and cancer]. *Med. Sci. MS* **21**, 839–847 (2005).
80. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov).
81. Wang, Y. Y. *et al.* Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight* **2**, e87489 (2017).
82. Keating, A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* **10**, 709–716 (2012).
83. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).

84. Mohal, J. S., Tailor, H. D. & Khan, W. S. Sources of adult mesenchymal stem cells and their applicability for musculoskeletal applications. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **7**, 103–109 (2012).
85. He, Q., Wan, C. & Li, G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 69–77 (2007).
86. Boeuf, S. & Richter, W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem Cell Res. Ther.* **1**, 31 (2010).
87. Rastegar, F. *et al.* Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J. Stem Cells* **2**, 67–80 (2010).
88. Chen, G. *et al.* In vivo real-time visualization of mesenchymal stem cells tropism for cutaneous regeneration using NIR-II fluorescence imaging. *Biomaterials* **53**, 265–273 (2015).
89. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).
90. Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–49 (2002).
91. Hocking, A. M. & Gibran, N. S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp. Cell Res.* **316**, 2213–2219 (2010).
92. Dittmer, J. & Leyh, B. Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression (Review). *Int. J. Oncol.* **44**, 1789–1798 (2014).
93. Santos, J. M. *et al.* Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 90 (2015).



94. Akram, K. M., Samad, S., Spiteri, M. A. & Forsyth, N. R. Mesenchymal stem cells promote alveolar epithelial cell wound repair in vitro through distinct migratory and paracrine mechanisms. *Respir. Res.* **14**, 9 (2013).
95. Touboul, C., Vidal, F., Pasquier, J., Lis, R. & Rafii, A. Role of mesenchymal cells in the natural history of ovarian cancer: a review. *J. Transl. Med.* **12**, 271 (2014).
96. Li, H. & Fu, X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res.* **348**, 371–377 (2012).
97. Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. G. & Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* **3**, e1886 (2008).
98. Martinet, L. *et al.* Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **126**, 2143–2152 (2010).
99. Martinet, L. *et al.* A regulatory cross-talk between Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 752–762 (2009).
100. Djouad, F. *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* **102**, 3837–3844 (2003).
101. Taran, R. *et al.* In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J. Biosci.* **39**, 157–169 (2014).
102. Joyce, N. *et al.* Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen. Med.* **5**, 933–946 (2010).
103. Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Sousa, N. & Salgado, A. J. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 3871–3882 (2013).
104. Lewis, C. M. & Suzuki, M. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells for amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 32 (2014).

105. Ferroni, L. *et al.* Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **129**, 89–115 (2013).
106. Sadan, O., Melamed, E. & Offen, D. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**, 1487–1497 (2009).
107. Frausin, S. *et al.* Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochem.* **117**, 329–338 (2015).
108. Park, J. S., Suryaprakash, S., Lao, Y.-H. & Leong, K. W. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods San Diego Calif* **84**, 3–16 (2015).
109. Murphy, M. B., Moncivais, K. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* **45**, e54 (2013).
110. Putz Todd, G., Danilkovitch-Miagkova, A. & LeRoux, M. A. *Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Targeted Therapies*. (INTECH Open Access Publisher, 2011).
111. Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M. & Marini, F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* **15**, 730–738 (2008).
112. Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D. & Anderson, K. C. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* **82**, 3712–3720 (1993).
113. Olechnowicz, S. W. Z. & Edwards, C. M. Contributions of the host microenvironment to cancer-induced bone disease. *Cancer Res.* **74**, 1625–1631 (2014).
114. Kaplan, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820–827 (2005).

115. Kucerova, L. & Skolekova, S. Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells. *Neoplasma* **60**, 1–10 (2013).
116. Barcellos-de-Souza, P., Gori, V., Bambi, F. & Chiarugi, P. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim. Biophys. Acta* **1836**, 321–335 (2013).
117. Kidd, S. *et al.* Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 2614–2623 (2009).
118. Carrero, R. *et al.* IL1 $\beta$  induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- $\kappa$ B. *Stem Cell Rev.* **8**, 905–916 (2012).
119. Liu, X. *et al.* SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell* **2**, 845–854 (2011).
120. Houthuijzen, J. M., Daenen, L. G. M., Roodhart, J. M. L. & Voest, E. E. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br. J. Cancer* **106**, 1901–1906 (2012).
121. Roodhart, J. M. L. *et al.* Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* **20**, 370–383 (2011).
122. Karnoub, A. E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557–563 (2007).
123. Lis, R. *et al.* Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells induces a background dependent pro-metastatic transcriptomic profile. *J. Transl. Med.* **12**, 59 (2014).
124. Meads, M. B., Hazlehurst, L. A. & Dalton, W. S. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 2519–2526 (2008).

125. Rafii, A. *et al.* Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PloS One* **3**, e3894 (2008).
126. Pasquet, M. *et al.* Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **126**, 2090–2101 (2010).
127. Castells, M. *et al.* Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis.* **4**, e887 (2013).
128. Bochet, L. *et al.* Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 5657–5668 (2013).
129. Garcia-Gomez, A. *et al.* Transcriptomic profile induced in bone marrow mesenchymal stromal cells after interaction with multiple myeloma cells: implications in myeloma progression and myeloma bone disease. *Oncotarget* **5**, 8284–8305 (2014).
130. Corre, J. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* **21**, 1079–1088 (2007).
131. Gottschling, S. *et al.* Mesenchymal stem cells in non-small cell lung cancer—Different from others? Insights from comparative molecular and functional analyses. *Lung Cancer* **80**, 19–29 (2013).
132. Apparailly, F., Jorgensen, C. & Lazenec, G. [Multipotent stromal cells: controversial impact on tumor development and metastasis]. *Med. Sci. MS* **24**, 359–360 (2008).
133. Takahara, K. *et al.* Adipose-derived stromal cells inhibit prostate cancer cell proliferation inducing apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 1102–1107 (2014).
134. Nefedova, Y., Cheng, P., Alsina, M., Dalton, W. S. & Gabrilovich, D. I. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood* **103**, 3503–3510 (2004).

135. Yang, Y. *et al.* Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett.* **333**, 9–17 (2013).
136. Mueller, L. P. *et al.* Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells Dayt. Ohio* **24**, 2753–2765 (2006).
137. Beane, O. S., Fonseca, V. C. & Darling, E. M. Adipose-derived stem cells retain their regenerative potential after methotrexate treatment. *Exp. Cell Res.* **327**, 222–233 (2014).
138. Burger, J. A. & Kipps, T. J. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk. Lymphoma* **43**, 461–466 (2002).
139. Meads, M. B., Gatenby, R. A. & Dalton, W. S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 665–674 (2009).
140. Kurtova, A. V. *et al.* Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* **114**, 4441–4450 (2009).
141. Bewry, N. N. *et al.* Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3169–3175 (2008).
142. Brocke-Heidrich, K. *et al.* Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* **103**, 242–251 (2004).
143. Yamagiwa, Y., Marienfeld, C., Meng, F., Holcik, M. & Patel, T. Translational regulation of x-linked inhibitor of apoptosis protein by interleukin-6: a novel mechanism of tumor cell survival. *Cancer Res.* **64**, 1293–1298 (2004).

144. Moreaux, J. *et al.* BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* **103**, 3148–3157 (2004).
145. Jin, L. *et al.* CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 48–58 (2008).
146. Ji, R. *et al.* Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* **14**, 2473–2483 (2015).
147. Lis, R. *et al.* Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells triggers pro-metastatic properties. *PloS One* **7**, e38340 (2012).
148. Gupta, M. *et al.* Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis. *Oncogene* **24**, 7170–7179 (2005).
149. De Smaele, E. *et al.* Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* **414**, 308–313 (2001).
150. Riganti, C., Kopecka, J., Panada, E., Barak, S. & Rubinstein, M. The role of C/EBP- $\beta$  LIP in multidrug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, (2015).
151. Pillozzi, S. *et al.* Chemotherapy resistance in acute lymphoblastic leukemia requires hERG1 channels and is overcome by hERG1 blockers. *Blood* **117**, 902–914 (2011).
152. Mraz, M. *et al.* Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin  $\alpha$ -4- $\beta$ -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br. J. Haematol.* **155**, 53–64 (2011).
153. Xu, J., Zhou, P., Wang, W., Sun, A. & Guo, F. RelB, together with RelA, sustains cell survival and confers proteasome inhibitor sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells from bone marrow. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **92**, 77–92 (2014).

154. Zhang, B. *et al.* Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt- $\beta$ -catenin signaling. *Blood* **121**, 1824–1838 (2013).
155. Scherzed, A. *et al.* BMSC enhance the survival of paclitaxel treated squamous cell carcinoma cells in vitro. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 349–357 (2011).
156. Borriello, L. & DeClerck, Y. A. [Tumor microenvironment and therapeutic resistance process]. *Médecine Sci. MS* **30**, 445–451 (2014).
157. Sanz-Rodríguez, F., Hidalgo, A. & Teixidó, J. Chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood* **97**, 346–351 (2001).
158. Yanamandra, N. *et al.* Tipifarnib and bortezomib are synergistic and overcome cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 591–599 (2006).
159. Dai, Y., Lawrence, T. S. & Xu, L. Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B. *Am. J. Transl. Res.* **1**, 1–15 (2009).
160. Antoon, J. W. *et al.* Targeting NF $\kappa$ B mediated breast cancer chemoresistance through selective inhibition of sphingosine kinase-2. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 678–689 (2011).
161. Lundqvist, J., Yde, C. W. & Lykkesfeldt, A. E. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits cell growth and NF $\kappa$ B signaling in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Steroids* **85**, 30–35 (2014).
162. Cilloni, D. *et al.* The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia* **20**, 61–67 (2006).
163. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**, 3797–3804 (1997).

164. Tian, J., He, H. & Lei, G. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in bone cancers. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**, 9439–9445 (2014).
165. Kahn, M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 513–532 (2014).
166. Xia, B. *et al.* c-Myc plays part in drug resistance mediated by bone marrow stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **39**, 92–99 (2015).
167. Kadera, B. E. *et al.* MicroRNA-21 in pancreatic ductal adenocarcinoma tumor-associated fibroblasts promotes metastasis. *PloS One* **8**, e71978 (2013).
168. Cuiffo, B. G. & Karnoub, A. E. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 220–230 (2012).
169. Koh, B. I. & Kang, Y. The pro-metastatic role of bone marrow-derived cells: a focus on MSCs and regulatory T cells. *EMBO Rep.* **13**, 412–422 (2012).
170. Bergfeld, S. A. & DeClerck, Y. A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 249–261 (2010).
171. Lo Iacono, M. *et al.* ATF2 contributes to cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and celastrol induces cisplatin resensitization through inhibition of JNK/ATF2 pathway. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **136**, 2598–2609 (2015).
172. Lau, E. *et al.* Transcriptional repression of IFN $\beta$ 1 by ATF2 confers melanoma resistance to therapy. *Oncogene* (2015). doi:10.1038/onc.2015.22
173. Ronai, Z. *et al.* ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene* **16**, 523–531 (1998).
174. Lauchle, J. O. *et al.* Response and resistance to MEK inhibition in leukaemias initiated by hyperactive Ras. *Nature* **461**, 411–414 (2009).
175. Takahashi, M. *et al.* Loss of B-cell translocation gene 2 expression in estrogen receptor-positive breast cancer predicts tamoxifen resistance. *Cancer Sci.* **105**, 675–682 (2014).



176. Nefedova, Y., Landowski, T. H. & Dalton, W. S. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* **17**, 1175–1182 (2003).
177. Lwin, T. *et al.* Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Blood* **110**, 1631–1638 (2007).
178. Wei, Z. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **28**, 141 (2009).
179. Ramasamy, R. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* **21**, 304–310 (2007).
180. Nwabo Kamdje, A. H. *et al.* Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Blood* **118**, 380–389 (2011).
181. Nwabo Kamdje, A. H. *et al.* Role of stromal cell-mediated Notch signaling in CLL resistance to chemotherapy. *Blood Cancer J.* **2**, e73 (2012).
182. Zeng, Z. *et al.* Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 3113–3121 (2006).
183. Corcoran, K. E. *et al.* Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow. *PloS One* **3**, e2563 (2008).
184. Vianello, F. *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* **95**, 1081–1089 (2010).

185. Lis, R. *et al.* Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **128**, 715–725 (2011).
186. Kim, J.-A. *et al.* Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **75**, 2222–2231 (2015).
187. Peled, A. *et al.* Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem Cells Dayt. Ohio* **20**, 259–266 (2002).
188. Kojima, K. *et al.* p53 activation of mesenchymal stromal cells partially abrogates microenvironment-mediated resistance to FLT3 inhibition in AML through HIF-1 $\alpha$ -mediated down-regulation of CXCL12. *Blood* **118**, 4431–4439 (2011).
189. Hubin, F. *et al.* Murine bone marrow stromal cells sustain in vivo the survival of hematopoietic stem cells and the granulopoietic differentiation of more mature progenitors. *Stem Cells Dayt. Ohio* **23**, 1626–1633 (2005).
190. Hoellenriegel, J. *et al.* The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* **123**, 1032–1039 (2014).
191. Greco, S. J. *et al.* AMD3100-mediated production of interleukin-1 from mesenchymal stem cells is key to chemosensitivity of breast cancer cells. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 701–715 (2011).
192. Rossi, J.-F., Lu, Z.-Y., Jourdan, M. & Klein, B. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 1248–1257 (2015).
193. Lichtenstein, A., Tu, Y., Fady, C., Vescio, R. & Berenson, J. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell. Immunol.* **162**, 248–255 (1995).

194. Frassanito, M. A., Cusmai, A., Iodice, G. & Dammacco, F. Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* **97**, 483–489 (2001).
195. Duan, Z. *et al.* Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 5055–5063 (2006).
196. Dreuw, A. *et al.* Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 28–37 (2005).
197. Shain, K. H. *et al.* Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res.* **69**, 1009–1015 (2009).
198. Wang, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* **295**, 110–123 (2010).
199. Wang, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-6 confers ovarian cancer cells resistance to tamoxifen via ER isoforms and SRC-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**, 791–803 (2014).
200. Efferth, T., Fabry, U. & Osieka, R. Interleukin-6 affects melphalan-induced DNA damage and repair in human multiple myeloma cells. *Anticancer Res.* **22**, 231–234 (2002).
201. Golay, J. *et al.* The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity in vitro and in vivo and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. *Leukemia* **21**, 1892–1900 (2007).
202. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 329–341 (2010).

203. Thorpe, L. M., Yuzugullu, H. & Zhao, J. J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 7–24 (2015).
204. Sheng, X. & Mittelman, S. D. The role of adipose tissue and obesity in causing treatment resistance of acute lymphoblastic leukemia. *Front. Pediatr.* **2**, 53 (2014).
205. Tung, S. *et al.* PPAR $\alpha$  and fatty acid oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **122**, 969–980 (2013).
206. Kurtova, A. V. *et al.* Blocking PGE<sub>2</sub>-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature* **517**, 209–213 (2015).
207. Selvam, S. P. & Ogretmen, B. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signaling in cancer therapeutics and drug resistance. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3–27 (2013). doi:10.1007/978-3-7091-1511-4\_1
208. Dandekar, D. S., Lopez, M., Carey, R. I. & Lokeshwar, B. L. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **115**, 484–492 (2005).
209. Corre, J. *et al.* Bioactivity and prognostic significance of growth differentiation factor GDF15 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells in multiple myeloma. *Cancer Res.* **72**, 1395–1406 (2012).
210. Keenan, M. M. & Chi, J.-T. Alternative fuels for cancer cells. *Cancer J. Sudbury Mass* **21**, 49–55 (2015).
211. Ehsanipour, E. A. *et al.* Adipocytes cause leukemia cell resistance to L-asparaginase via release of glutamine. *Cancer Res.* **73**, 2998–3006 (2013).
212. Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J. R., Pui, C.-H. & Campana, D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J. Clin. Invest.* **117**, 1049–1057 (2007).

213. Yu, B., Zhang, X. & Li, X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 4142–4157 (2014).
214. Lee, J.-K. *et al.* Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One* **8**, e84256 (2013).
215. Ono, M. *et al.* Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci. Signal.* **7**, ra63 (2014).
216. Lin, Y. *et al.* Study on the bone marrow mesenchymal stem cells induced drug resistance in the U937 cells and its mechanism. *Chin. Med. J. (Engl.)* **119**, 905–910 (2006).
217. Konopleva, M. *et al.* Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* **16**, 1713–1724 (2002).
218. Balakrishnan, K. *et al.* Influence of bone marrow stromal microenvironment on forodesine-induced responses in CLL primary cells. *Blood* **116**, 1083–1091 (2010).
219. Pei, X.-Y. *et al.* Circumvention of Mcl-1-dependent drug resistance by simultaneous Chk1 and MEK1/2 inhibition in human multiple myeloma cells. *PLoS One* **9**, e89064 (2014).
220. Brotin, E. *et al.* Bcl-x<sub>L</sub> and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int. J. Cancer* NA–NA (2009). doi:10.1002/ijc.24787
221. Huang, H. *et al.* Clinical significance of ascites in epithelial ovarian cancer. *Neoplasma* **60**, 546–552 (2013).
222. Cohen, S. *et al.* Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **91**, 357–368 (2013).
223. Smolle, E., Taucher, V. & Haybaeck, J. Malignant ascites in ovarian cancer and the role of targeted therapeutics. *Anticancer Res.* **34**, 1553–1561 (2014).

224. Bénard, J. *et al.* Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res.* **45**, 4970–4979 (1985).
225. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv. Exp. Med. Biol.* **658**, 43–49 (2010).
226. Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C. & Schultz, N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat. Commun.* **4**, 2126 (2013).
227. Roby, K. F. *et al.* Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* **21**, 585–591 (2000).
228. Picaud, L. *et al.* Evaluation of the effects of hyaluronic acid-carboxymethyl cellulose barrier on ovarian tumor progression. *J. Ovarian Res.* **7**, 40 (2014).
229. Wang, Y. *et al.* Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine* **56**, 365–375 (2011).
230. Burke, S. J. *et al.* NF- $\kappa$ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **306**, E131–149 (2014).
231. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. & Kracht, M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 847–855 (2002).
232. Hayashi, S. *et al.* Synthetic hexa- and heptapeptides that inhibit IL-8 from binding to and activating human blood neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **154**, 814–824 (1995).
233. Le Naour, A. & Couderc, B. Role of MSCs in Antitumor Drug Resistance. in *Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators* 295–333 (Elsevier, 2017).
234. Zhang, M. *et al.* A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J. Ovarian Res.* **7**, 19 (2014).
235. Yuan, X. *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol. Oncol.* (2017). doi:10.1016/j.ygyno.2017.07.007

236. Dijkgraaf, E. M. *et al.* Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* **73**, 2480–2492 (2013).
237. Zhu, Y. *et al.* CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* **74**, 5057–5069 (2014).
238. Bonecchi, R. *et al.* Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **164**, 3862–3869 (2000).
239. Schott, A. F. *et al.* Phase Ib Pilot Study to Evaluate Reparixin in Combination with Weekly Paclitaxel in Patients with HER-2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* (2017). doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2748
240. Brandolini, L. *et al.* Targeting CXCR1 on breast cancer stem cells: signaling pathways and clinical application modelling. *Oncotarget* **6**, 43375–43394 (2015).
241. Liotti, F., De Pizzol, M., Allegretti, M., Prevete, N. & Melillo, R. M. Multiple anti-tumor effects of Reparixin on thyroid cancer. *Oncotarget* **8**, 35946–35961 (2017).