



HAL
open science

Etude de l'implantation péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens dans un modèle in vitro de co-culture tridimensionnel en ascites

Carine Laurent-Issartel

► **To cite this version:**

Carine Laurent-Issartel. Etude de l'implantation péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens dans un modèle in vitro de co-culture tridimensionnel en ascites. Cancer. CY Cergy Paris Université, 2021. Français. NNT : 2021CYUN1034 . tel-03456649

HAL Id: tel-03456649

<https://theses.hal.science/tel-03456649>

Submitted on 30 Nov 2021

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.

CY PARIS CERGY UNIVERSITE

Ecole doctorale Sciences et Ingénierie

THESE

Présentée par

Carine LAURENT-ISSARTEL

Le 16 février 2021

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE CY PARIS CERGY UNIVERSITE

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Sur le sujet

« Etude de l'implantation péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens dans un modèle *in vitro* de co-culture tridimensionnel en ascites »

ERRMECe : Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules

Octobre 2017- Février 2021

Membres du jury

Maxime LEHMANN, Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Rapporteur

Christophe DENOYELLE, Maître de Conférences (HDR), Université de Caen

Rapporteur

Juliette VERGNAUD, Maître de Conférences (HDR), Université Paris Saclay

Examineur

Olivier GALLET, Professeur des Universités, CY Cergy Paris Université

Examineur

Franck CARREIRAS, Professeur des Universités, CY Cergy Paris Université

Directeur de thèse

Sabrina KELLOUCHE-GAILLARD, Maître de Conférences, CY Cergy Paris Université

Co-encadrante de thèse

CY PARIS CERGY UNIVERSITE

Ecole doctorale Sciences et Ingénierie

THESE

Présentée par

Carine LAURENT-ISSARTEL

Le 16 février 2021

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE CY PARIS CERGY UNIVERSITE

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Sur le sujet

« Etude de l'implantation péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens dans un modèle *in vitro* de co-culture tridimensionnel en ascites »

ERRMECe : Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules

Octobre 2017- Février 2021

Membres du jury

Maxime LEHMANN, Professeur des Universités, Université de Strasbourg	Rapporteur
Christophe DENOYELLE, Maître de Conférences (HDR), Université de Caen	Rapporteur
Juliette VERGNAUD, Maître de Conférences (HDR), Université Paris Saclay	Examineur
Olivier GALLET, Professeur des Universités, CY Cergy Paris Université	Examineur
Franck CARREIRAS, Professeur des Universités, CY Cergy Paris Université	Directeur de thèse
Sabrina KELLOUCHE-GAILLARD, Maître de Conférences, CY Cergy Paris Université	Co-encadrante de thèse

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

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

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire ERRMECe (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule), dans le groupe thématique MEC-uP (Matrice Extracellulaire-Comportement cellulaire et Physiopathologie) à CY Cergy Paris Université.

Je tiens à remercier vivement les deux rapporteurs qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : le **Professeur Maxime Lehmann**, chercheur dans l'équipe "Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques" du Laboratoire de Bioimagerie et de Pathologie (UMR CNRS 7021) à la Faculté de pharmacie de Strasbourg, et le **Docteur Christophe Denoyelle**, chercheur au sein de l'unité Biologie et Thérapie Innovantes des Cancers Localement Agressifs (BioTICLA, Inserm U1086 ANTICIPE) à l'Université de Caen.

Je remercie également le **Docteur Juliette Vergnaud**, chercheuse à l'institut Galien Paris-Sud (UMR CNRS 8612) à la Faculté de Pharmacie de Paris-Saclay et le **Professeur Olivier Gallet**, chercheur dans l'équipe MEC-uP du laboratoire ERRMECe (EA 1391) à CY Cergy Paris Université, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Je remercie le **Professeur Olivier Gallet** et le **Professeur Emmanuel Pauthe**, directeurs successifs du laboratoire ERRMECe au cours de mes trois années de thèse, de m'avoir acceptée dans leur laboratoire.

Mes plus grands remerciements vont au **Professeur Franck Carreiras**, mon directeur de Thèse. Tout d'abord merci de m'avoir donné le goût de la biologie cellulaire pendant mon cursus universitaire, tes cours ont toujours été passionnants et vivants. Merci également de m'avoir permis de réaliser mon stage de M1 dans ton équipe et de m'avoir permis de découvrir ton intérêt immense pour ce sujet qu'est le cancer de l'ovaire. Enfin, je te remercie grandement pour ces trois années de thèse. Tu as été un directeur qui m'a permis d'avancer et de grandir tant professionnellement que personnellement. Tes connaissances scientifiques et ton objectivité professionnelle m'ont permis de me dépasser et d'essayer de toujours proposer de nouvelles idées. De plus, ton empathie et tes conseils m'ont permis de réaliser cette thèse avec le sourire, alors pour ça : Merci !

Je tiens à dire un énorme merci au **Docteur Sabrina Kellouche Gaillard**, co-encadrante de ma thèse, de m'avoir guidée pendant ces trois années et de m'avoir transmis ses connaissances interdisciplinaires et son savoir-faire méticuleux. Sabrina, tous tes conseils, qu'ils portent sur le travail ou sur la vie à côté, ont toujours été donnés avec la plus grande objectivité et bienveillance, alors merci d'être une personne aussi gentille et altruiste. Merci pour ces nombreux échanges et confidences dans ton bureau, tes prochains doctorants auront beaucoup de chance de travailler avec toi. Je sais que ce trèfle m'aura porté chance ces derniers mois, merci.

Franck et Sabrina, vos qualités professionnelles et humaines m'ont aidée à m'épanouir durant cette thèse alors je vous remercie également ensemble pour ce duo que vous formez ! Je n'oublierai pas ces moments où vous m'avez énormément soutenue.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du groupe **MEC-uP** pour leur bonne humeur ainsi que leurs nombreux conseils : **Johanne** et **Charlotte**, merci d'avoir toujours essayé de répondre à mes interrogations même lorsque le temps ne vous le permettait pas. Merci également pour la répétition de mon oral et pour vos conseils. J'aurais aimé que l'on puisse se trouver un peu plus de temps pour échanger sur bien des sujets. Sachez que je garde un super souvenir de ce congrès à Reims ensemble ! **Cédric**, merci avant tout pour la bonne humeur et les rires que tu mets avec nous les doctorants mais également pour m'avoir donné de nombreux conseils en biochimie. **Olivier**, merci pour ta bonne humeur et ton dynamisme et ce dès 7h du matin avec de la musique dans le labo. Tes goûts musicaux éclectiques reflètent bien ta personnalité. Merci de nous avoir fait partager tes connaissances pluridisciplinaires et ta culture qui est incroyable. **Carine**, cela a été un vrai plaisir de travailler et de pouvoir échanger avec toi sur la transcriptomique, merci également pour tes conseils sur l'avenir. **Ambroise**, j'espère qu'être notre voisin de bureau n'a pas été trop pénible et que nos rires ne t'ont pas dérangé. Je te remercie pour les analyses communes de certaines expériences et te souhaite bon courage pour tes projets en cours.

Mes remerciements s'adressent également au STAFF technique : **Rémy, Lamia, Mathilde** et **Isabelle**. Merci à vous quatre pour votre réactivité et votre professionnalisme à chacune de mes demandes. **Mathilde** tu as toujours répondu présente pour m'aider et ce particulièrement lors des péripéties du Li-Cor. **Rémy**, que dire ? Merci pour ces nombreuses heures de travail en microscopie, pour ta grande aide mais surtout pour toutes ces conversations qui n'avaient parfois ni queue ni tête ! Je n'oublie pas certaines de tes théories ni cette ambiance tamisée en salle de microscopie !

Merci à tous les membres du laboratoire **ERRMECe** pour nos différents échanges et ces moments « café ». **Damien**, merci pour ton côté très taquin que tu partages avec **Cédric** et **Rémy**, il faut s'accrocher avec vous ! Mais tu as su également être là dans de nombreuses conversations plus sérieuses. **Agnès, Gilles** et **Michel** je vous remercie également pour nos différents échanges.

J'adresse également un merci particulier au **SPEX** pour les échanges de P96 et de Trypsine mais surtout pour vos encouragements et votre intérêt pour les thésards qui font chaud au cœur.

Un grand merci à **Jacques** qui a toujours réussi à se dégager du temps pour aider les doctorants dans l'organisation des événements ERRMECe ou dans la préparation de leur soutenance à la MIR et ce toujours avec le sourire.

Je tiens également à remercier **Chloé** et **Nieves** pour leur bonne humeur durant leur stage mais également pour la qualité de leur travail, ces quelques mois passés à travailler ensemble ont été un vrai plaisir.

Merci, Merci, Merci à tous les anciens, **Audrey, Rony, Hassan, Audrey, Mathieu, Thomas, Eléonore**, pour tous ces moments partagés ensemble qu'ils soient passés, présents et même à venir (alors merci également **Alice** pour tous les apéros préparés avec soin). Il y en a eu des rires et des conversations, entre les « Brigitte » et les « Avocat du diable ». Vous avez été d'un soutien inestimable, aussi bien pour la thèse que personnellement.

Aux filles du bureau : MERCI ! **Amel, Audrey, Mathilde, Amel** et **Lamia** (c'était presque ton bureau), vous avez été essentielles à cette thèse, je ne sais pas ce que j'aurais fait si vous n'aviez pas été présentes. Vous avez été là dans les périodes difficiles qu'elles soient pro ou perso. Mais vous avez surtout été là quand tout allait bien avec votre positivité, votre bonne humeur (quoi que, ahah) et votre générosité. Vous êtes des filles géniales, n'en doutez jamais. A tous ces cafés, restos et confidences ! Ne plus vous faire les « debriefs du lundi matin » va me manquer, vous allez me manquer.

Un grand merci à **Maxime**, que ce soit pour tes good vibes, tes boutures, les moments potins et vins, mais aussi pour les conversations plus sérieuses. En espérant pouvoir reprendre notre journée annuelle Dieppoise.

Je remercie également tous les autres doctorants, stagiaires et post-doc pour leur bonne humeur au quotidien dans le labo : **Anamar, Carla, Chahrazed, Clotilde, Hiba, Phuong-Anh, Rosa, Solène, Sahil, Rümeyza**, merci !

Audrey, Quentin, Romain, Quentin, Marine, Hugo et **Fantine**. Ah, les copains ! Je crois qu'on est bien au-delà du remerciement. Il y a des amis qu'on a l'impression d'avoir depuis toujours et sur qui l'on pourra toujours compter. Alors je ne vous remercie pas d'avoir été là pendant cette thèse mais d'être là tout court et d'être mes amis. Nous sommes certes un groupe d'amis du lycée, mais nous nous destinons à être ces vieux potes qui profiteront encore ensemble à la retraite. Un merci tout particulier à **Romain** qui aura su me supporter et me soutenir durant ces derniers mois, ton aide m'a été essentielle.

Alexandra, Amandine, Amine, Blaise, Jérémie, Jo, Maxime et Ophélie, les potes de fac c'est quelque chose ! Merci d'être ceux que vous êtes, merci de m'avoir apporté de sacrés moments de détente pendant cette thèse ! Les vacances, weekends, festivals, soirées, sorties culturelles, apéros et autres sont de nombreux souvenirs qui ne sont pas près de s'envoler ! Ne plus passer des journées entières ensemble comme à la fac me manque.

Je tiens également à remercier **Brigitte, Christian, Annick et Véronique**. Merci d'être présents et surtout ces dernières années. Il paraît que l'on peut choisir sa famille, alors sachez que vous faites partie de la mienne... Votre soutien est inestimable pour moi.

Enfin, je remercie mes parents Anna & Patrick qui ont su faire de nous une famille plus forte et liée que jamais. Vous m'avez laissée choisir ma voie tout en me donnant les moyens de réussir et vous m'avez toujours poussée à croire en moi et à aller le plus loin possible, alors pour ça merci. Merci également de m'avoir transmis de nombreuses valeurs qui font de moi celle que je suis aujourd'hui et qui me permettent d'avancer.

Je vous aime.

« Avant de disparaître, deviens ce que tu dois être »

Listes des abréviations

2D : Deux dimensions	ERK : Extracellular signal-Régulated kinases
3D : Trois dimensions	FACs : Fibroblastes Associés au Cancer
AACs : Adipocytes Associés au Cancer	FAK : Focal Adhesion Kinase
Ac : Anticorps	Fg : Fibrinogène
ADN : Acide Désoxyribonucléique	FGF : Fibroblast Growth Factor
AFM : microscope à force atomique	FHS : Follicules-Stimulating Hormone
AKT : Protéine Kinase B	FIGO : Fédération Internationale des Gynécologues
AP-1 : Activator Protein 1	FITC : Fluorescein Isothiocyanate
ARN : Acide Ribonucléique	Fn : Fibronectine
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	GAG : Glycosaminoglycane
ASC : Ascite	GTP : Guanosine Triphosphate
BRCA (1 / 2) : Breast Cancer 1 / 2	HGF : Hepatocyte Growth Factor
BSA : Bovine Serum Albumine	IGF : Insulin-like Growth Factor
CCL : Chemokine (C-C motif) ligand	IL : Interleukine
CD : Cluster of Differentiation	ILK : Integrin-Linked Kinase
Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog	IP : Immunoprécipitation
Cdk : Cycline Dependent Kinase	kDA : Kilo Dalton
Cil : Cilengitide	kPa : Kilo Pascal
CLEM : microscopie électronique à lumière corrélative	LDH : Lactate deshydrogénase :
Col IV : Collagène IV	LH : Luteinising Hormone
Ctrl : contrôle	Lm : Laminine
CXCR4 : C-X-C motif Chemokine Receptor type 4	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
Cy : Cyanine	MATs : Macrophages Associés aux Tumeurs
DAPI : 4,6-diamidino-2-phénylindole	MC : Milieu de Culture
DOCK : Deducator-of-cytokinesis	MCF : Milieu Conditionné de Fibroblastes
E / N / P / VE-Cadhérine : Epithéliale / Nerveuse / Placentaire / Endothélium Vasculaire Cadhérine	mDia : mammalian homolog of Diaphanous
EDTA : acide ethylene diamine tétraacétique	MEC : Matrice Extracellulaire
EGF : Epidermal Growth Factor	MMP : Matrix MetalloProteinase
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin
PARP : Poly ADP Ribose Polymerase	NPs : Nanoparticules
PBS : Phosphate Buffered Saline	OPG : Ostéoprotégérine
PGs : Protéoglycanes	RGD : Arginine-Glycine-Aspartate
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase	RhoA : Ras homolog family member A
PKC/A : Protéine Kinase C/A	ROCK : Rho-associated coiled-coil containing kinases
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	SDF-1 : Stromal cell-derived factor
	SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SEM : Erreur standard de la moyenne

SP-1 : Specificity Protein 1

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TBS : Tris Buffered Saline

TEM : Transition Épithélio-Mésenchymateuse

TGF- β 1 : Transforming Growth Factor- β 1

TME : Transition Mésenchymo-Epithéliale

TNM : Tumeur, Node, Métastases

t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène

TRAIL : Tumor-necrosis-factor related
apoptosis inducing ligand

uPA : urokinase Plasminogen
Activator/urokinase

uPAR : Plasminogen Activator Receptor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Vn : Vitronectine

Table des illustrations

Figure 1 : Localisation anatomique des ovaires dans le corps humain.	12
Figure 2 : Coupe transversale d'un ovaire.	13
Figure 3 : Observation histologique des principaux sous-types des cancer de l'épithélium ovarien de surface.	14
Figure 4 : Stade de classification FIGO.	15
Figure 5 : Les différents microenvironnements du cancer de l'ovaire.	18
Figure 6 : Emplacement du « microenvironnement ovarien ».	19
Figure 7 : Les « Hallmarks » du cancer.	20
Figure 8 : Le foyer tumoral.	26
Figure 9 : Vue d'ensemble schématique des matrices extracellulaires.	27
Figure 10 : Structure des collagènes fibrillaires.	29
Figure 11 : Structure de la fibronectine et ses domaines de liaison.	30
Figure 12 : Structure de la vitronectine et de ses domaines de liaison.	32
Figure 13 : Structure de la laminine et de ses domaines de liaison.	33
Figure 14 : Structure du fibrinogène et de la fibrine.	34
Figure 15 : Etapes de la fibrinoformation.	35
Figure 16 : Structure de la fibrine dégradée.	36
Figure 17 : Schéma d'une intégrine et répertoire des intégrines liant des protéines de la MEC.	37
Figure 18 : Schéma d'un complexe multimoléculaire formant une adhésion focale.	39
Figure 19 : Interactions entre les principales protéines formant les jonctions serrées et adhérentes. .	39
Figure 20 : Représentation du microenvironnement tumoral et des différentes cellules stromales qui le composent.	41
Figure 21 : Emplacement du « microenvironnement ascitique ».	45
Figure 22 : Localisation de l'ascite chez les patientes malades.	46
Figure 23 : Composition cellulaire et acellulaire de l'ascite.	48
Figure 24 : Organisation des différentes voies de communication des divers composants cellulaires de l'ascite.	49
Figure 25 : Représentation schématique des voies de signalisation dans le microenvironnement du cancer de l'ovaire, impactant la réponse des cellules cancéreuses aux médicaments chimiothérapeutiques.	53
Figure 26 : Emplacement du « microenvironnement mésothélial ».	55
Figure 27 : Implantation péritonéale des cellules cancéreuses ovariennes.	56
Figure 28 : Communication entre les cellules cancéreuses ovariennes et les cellules mésothéliales au cours des étapes initiales des métastases.	59
Figure 29 : Schéma des forces contractiles générées par les sphéroïdes favorisant la clairance mésothéliale.	62
Figure 30 : Nouvelle stratégie d'implantation péritonéale par les cellules cancéreuses de l'ovaire.	64
Figure 31 : Processus de la collecte et du stockage des ascites.	71
Figure 32 : Lignées cellulaires d'adénocarcinome ovarien cultivées en conditions adhérentes.	72
Figure 33: Lignées cellulaires saines cultivées en conditions adhérentes.	73
Figure 34 : Deux techniques différentes de culture en condition non adhérentes.	74
Figure 35 : Exemples de différents types de « Roundness ».	75

Figure 36 : Acquisitions au microscope optique à contraste de phase après coloration des chambres de Boyden au bleu de Coomassie.....	77
Figure 37 : Observation des cellules avec la caméra du microscope à force atomique	84
Figure 38 : Vérification de l'incorporation des nanoparticules par les cellules Met-5a	85
Figure 39 : Protocole d'observation de la clairance avec les nanoparticules	86
Figure 40 : Caractérisation du fibrinogène et de la thrombine dans les ascites.	91
Figure 41 : Caractérisation de la fibrine dans l'ascite.....	92
Figure 42 : Comparaison de deux techniques expérimentales de formation de sphéroïdes tumoraux.....	94
Figure 43 : Effet de l'ascite sur la formation des sphéroïdes.	95
Figure 44 : Effet de l'ascite sur la taille et la compaction des sphéroïdes.....	96
Figure 45 : Localisation et organisation des protéines matricielles des sphéroïdes générées <i>in vitro</i>	98
Figure 46 : Présence de fibrinogène/fibrine associés aux sphéroïdes <i>ex vivo</i>	99
Figure 47 : Effet de l'ascite sur la localisation et l'organisation des protéines matricielles de la monocouche mésothéliale.....	102
Figure 48 : Présence du fibrinogène et de la fibrine sur les monocouches mésothéliales.	103
Figure 49 : Co-localisation de fibrinogène et de fibrine sur le mésothélium.	104
Figure 50 : Effet de l'ascite sur l'état morphologique de la monocouche mésothéliale.	105
Figure 51 : Effet de l'ascite sur la cytotoxicité cellulaire des cellules mésothéliales.....	106
Figure 52 : Effet de l'ascite sur la viabilité cellulaire des cellules mésothéliales.....	107
Figure 53 : Effet de l'ascite sur le cycle cellulaire des cellules mésothéliales.....	108
Figure 54 : Effet de l'ascite sur l'intégrité du mésothélium.	109
Figure 55 : Effet de l'ascite sur la N-Cadhérine et ZO-1	110
Figure 56 : Effets de l'ascite sur le cytosquelette et l'ancrage des cellules mésothéliales.	111
Figure 57 : Effet de l'ascite sur le cytosquelette d'actine et organisation en « membrane ruffle ».	112
Figure 58 : Effet de l'ascite sur l'actine.....	113
Figure 59 : Effet de l'ascite sur la rétraction des cellules mésothéliales.	114
Figure 60 : Effet de l'ascite sur l'élasticité des cellules mésothéliales.	115
Figure 61 : Effet de l'ascite sur les effecteurs de la dynamique du cytosquelette : RhoA, Cdc42 et Rac1.	116
Figure 62 : Effet de l'ascite sur la localisation de Rac1.....	118
Figure 63 : Effet de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur différents supports.....	121
Figure 64 : Visualisation des intégrines dans la dispersion des sphéroïdes sur les revêtements protéiques.....	122
Figure 65 : Effet de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur les revêtements matriciels : implication des intégrines.	125
Figure 66 : Effet des ascites sur la cinétique de dispersion des sphéroïdes sur la monocouche mésothéliale.....	127
Figure 67 : Fibrinogène/fibrine et co-culture <i>in vitro</i> au cours du temps.	129
Figure 68 : Expression du fibrinogène <i>ex vivo</i> aux abords du mésothélium de souris après l'implantation de cellules cancéreuses ovariennes.	129
Figure 69 : Observation de la clairance du mésothélium par les sphéroïdes.	131
Figure 70 : Effet de l'ascite sur la clairance du mésothélium par les sphéroïdes.	132

Figure 71 : Implication des intégrines dans la clairance du mésothélium par les sphéroïdes tumoraux ovariens.	134
Figure 72 : Effets de l'ascite et du milieu conditionné de fibroblastes sur la migration des cellules SKOV3.	137
Figure 73 : Effet de l'ascite sur l'élasticité des cellules SKOV3.	138
Figure 74 : Effet de l'ascite sur l'invasion des cellules SKOV3 isolées.	139
Figure 75 : Effet de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes dans des gels de fibrine.....	140
Figure 76 : Dispersion de sphéroïdes mixtes SKOV3/IGROV1 sur le mésothélium.	142
Figure 77 : Effet de l'ascite sur la répartition des cellules SKOV3 et IGROV1 dans la co-culture entre les sphéroïdes mixtes et la monocouche mésothéliale.	144
Figure 78 : L'ascite déstabilise le mésothélium et facilite l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes	176
Tableau 1 : Correspondance des stades FIGO et TNM.....	15
Tableau 2 : Séquences peptidiques portées par les ligands matriciels et reconnues par les intégrines.	38
Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence	81
Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence	81
Tableau 5 : Inhibition de l'adhérence des sphéroïdes par blocage des intégrines.	123

Table des matières

Publications et communications	1
Avant-propos	5
Synthèse bibliographique	9
Généralité cancer de l’ovaire, stades et les différents microenvironnements	11
1. Généralités et données épidémiologiques.....	11
2. Les ovaires	12
3. Les stades de disséminations et les microenvironnements rencontrés	14
4. Prise en charge thérapeutique.....	16
4.1. Traitements de base.....	16
4.2. Traitements ciblés	17
Chapitre 1 : Foyer primaire et microenvironnement ovarien	19
1. Génétique et épigénétique	20
1.1. Proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs	21
1.1.1. Les proto-oncogènes	21
1.1.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	22
1.2. L’hérédité génétique	22
1.3. Epigénétique	23
2. Cancérogénèse de l’épithélium ovarien de surface	24
2.1. Remodelage de l’épithélium ovarien de surface.....	24
2.2. Régulation Hormonale.....	24
2.3. Inflammation.....	24
3. Organisation moléculaire et cellulaire du foyer tumoral primaire ovarien	26
3.1. La Matrice Extracellulaire	26
3.1.1. Les collagènes.....	28
3.1.2. La fibronectine	30
3.1.3. La vitronectine	31
3.1.4. Les laminines.....	32
3.1.5. Le fibrinogène	33
3.2. Les récepteurs d’adhésion cellulaire	36
3.2.1. Interactions cellules – matrice extracellulaire : les intégrines un élément essentiel.....	37
3.2.2. Interactions cellules – cellules	39
3.2.2.1. Les Cadhérines	40
3.2.2.2. Les Occludines	40
3.3. Les cellules stromales	41
3.3.1. Les fibroblastes associés au cancer.....	41
3.3.2. Les cellules immunitaires et les macrophages associés au cancer	42
3.3.3. Les adipocytes associés au cancer	43
3.4. La vascularisation tumorale et la voie lymphatique	43
3.4.1. La vascularisation sanguine	43
3.4.2. La vascularisation lymphatique.....	44
Chapitre 2 : Dissémination métastatique et microenvironnement ascitique	45
1. L’ascite, un microenvironnement unique et complexe	45

1.1.	Formation de l'ascite	46
1.2.	Composition de l'ascite et impact sur le comportement cellulaire	47
1.2.1.	Composante cellulaire de l'ascite	47
1.2.2.	Composante acellulaire de l'ascite	48
2.	Organisation des cellules cancéreuses en sphéroïdes.....	50
2.1.	Formation des sphéroïdes.....	50
2.2.	Capacité de survie des cellules en sphéroïdes	51
2.2.1.	Resistance à la mort cellulaire par anoïkis	51
2.2.2.	Acquisition de chimiorésistance.....	52
3.	Intégrines, MEC et sphéroïdes	53
Chapitre 3 : Implantation des métastases et microenvironnement mésothélial		55
1.	Mésothélium, cellules mésothéliales et matrice extracellulaire.....	56
1.1.	Le mésothélium, une barrière efficace.....	56
1.2.	Cellules mésothéliales et matrice extracellulaire	57
2.	Implantation péritonéale	58
3.	Clairance et transmigration mésothéliale.....	61
4.	Mise en place des foyers secondaires : la carcinose péritonéale et son microenvironnement endothélial 63	
Objectifs		65
Matériel et méthodes		69
1.	Collecte des échantillons d'ascites	71
2.	Culture cellulaire.....	72
2.1.	Lignées cellulaires cancéreuses et saines	72
2.1.1.	Lignées cellulaires cancéreuses	72
2.1.2.	Lignées cellulaires saines.....	72
2.2.	Conditions et analyse des cultures.....	73
2.2.1.	Culture des cellules en condition adhérente	73
2.2.2.	Préparation du milieu conditionné des fibroblastes.....	74
2.3.	Formation et analyse des sphéroïdes	74
2.3.1.	Technique de culture non-adhérente sur substrat non adhésif.....	74
2.3.2.	Technique « Hanging drop »	75
2.3.3.	Caractérisation des sphéroïdes	75
3.	Etude du comportement cellulaire	76
3.1.	Test de viabilité cellulaire	76
3.2.	Analyse de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire.....	76
3.3.	Test de Migration et d'invasion cellulaire en chambre de Boyden.....	76
3.4.	Etude de la désagrégation des sphéroïdes sur la Fibronectine et le Fibrinogène	77
4.	Caractérisation et localisation des protéines étudiées.....	78
4.1.	Dosage ELISA.....	78
4.2.	Western blot	78
4.3.	Tests d'activités protéiques : RhoA, cdc42 et Rac1	79
4.4.	Localisation moléculaire / Immunofluorescence	80
4.4.1.	Immunomarquage.....	80

4.4.2. Immunohistochimie : Analyse <i>ex vivo</i>	82
5. Analyse aux microscopes électronique à balayage et à force atomique	82
5.1. Préparation des échantillons pour l'analyse au MEB	82
5.2. Microscopie corrélative.....	83
5.3. Microscopie à force atomique.....	83
6. Mise au point du modèle de co-culture.....	84
6.1. Réalisation de la co-culture	84
6.2. Utilisation de Nanoparticules pour quantifier la clairance et observer les sphéroïdes mixtes.....	84
6.2.1. Etude de la clairance	85
6.2.2. Essai de formation de sphéroïdes mixtes (IGROV1-SKOV3).....	86
6.2.3. Etude de l'implication des intégrines dans la désagrégation des sphéroïdes et dans la clairance des cellules mésothéliales.....	86
6.3. Gel de fibrine avec sphéroïdes : modèle de culture 3D.....	87
7. Analyses statistiques	87
Présentation des résultats.....	89
1. L'ascite, un « réservoir » de molécules bioactives : Caractérisation du fibrinogène et de la fibrine dans les ascites	91
2. L'ascite, un acteur clé de la formation des sphéroïdes tumoraux : Impact de l'ascite sur les sphéroïdes tumoraux ovariens	94
2.1. Deux techniques expérimentales pour l'obtention de sphéroïdes tumoraux.....	94
2.2. Le microenvironnement matriciel des sphéroïdes : Caractérisation de la matrice extracellulaire présente au sein des sphéroïdes	97
3. Impact de l'ascite sur le mésothélium.....	101
3.1. Le microenvironnement mésothélial : Caractérisation de la matrice extracellulaire des cellules mésothéliales	101
3.2. Impact de l'ascite sur le fonctionnement cellulaire : Etude de la cytotoxicité, viabilité et du cycle cellulaire des cellules mésothéliales.....	104
3.3. Ascites et déstabilisation de la barrière mésothéliale : Caractérisation des jonctions cellulaires des cellules mésothéliales	108
3.4. Ascite et perturbation du « squelette » et de l'élasticité cellulaire : Etude de l'organisation du cytosquelette des cellules mésothéliales.....	111
3.5. Ascite et signalisation : Etude de la voie de signalisation RhoA/Rac1/Cdc42 dans les cellules mésothéliales	115
4. Impact de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur un revêtement matriciel	120
4.1. Impact de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur la fibronectine et sur le fibrinogène.....	120
4.2. Localisation et implication des intégrines dans les sphéroïdes tumoraux ovariens	121
4.3. Implication des intégrines dans la dispersion des sphéroïdes tumoraux ovariens sur la fibronectine et le fibrinogène.....	122
5. Ascite et co-culture : Impact de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes tumoraux ovariens sur le mésothélium	127
5.1. Cinétique de dispersion des sphéroïdes tumoraux ovariens sur le mésothélium	127
5.2. Localisation du fibrinogène/fibrine en co-culture <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	128
6. Ascite et clairance : Impact de l'ascite sur la clairance du mésothélium.....	131
6.1. Visualisation et définition de la clairance	131
6.2. Quantification de la clairance	131
6.3. Rôle des intégrines dans la clairance	133
7. Ascite et transmigration mésothéliale	136

7.1. Migration des cellules cancéreuses ovariennes isolées	136
7.2. Invasion de gels de fibrine par les cellules cancéreuses isolées ou en sphéroïdes et implication des intégrines.....	138
8. Impact de l'ascite sur les sphéroïdes tumoraux mixtes	142
9. Conception du modèle tridimensionnel : étape par étape.....	146
Discussion	151
Conclusion et perspectives	173
Références bibliographiques	181
Annexes.....	193

Publications et communications

Publications

Ascites microenvironment conditions the peritoneal pre-metastatic niche to promote the implantation of ovarian tumor spheroids: involvement of fibrinogen/fibrin and αV and $\alpha 5\beta 1$ integrin family. (*Annexe*)

C. Laurent-Issartel, R. Agniel, F. Giffard, C. Blanc-Fournier, E. Da Silva Cruz, C. Habes, J. Leroy-Dudal, F. Carreiras and S. Kellouche.

En cours de soumission, Janvier 2021

Evaluation of the potential of a new ribavirin analog impairing the dissemination of ovarian cancer cells. (*Annexe*)

A. Wambecke, C. Laurent-Issartel, J. Leroy-Dudal, F. Giffard, F. Cosson, N. Lubin-Germain, J. Uziel, S. Kellouche, F. Carreiras.

PLoS One. 2019 Dec 11;14(12):e0225860. doi: 10.1371/journal.pone.0225860.

A biomimetic model of 3D fluid extracellular macromolecular crowding microenvironment fine-tunes ovarian cancer cells dissemination phenotype.

R. Bascetin, C. Laurent-Issartel, C. Blanc-Fournier; C. Vendrely, S. Kellouche, F. Carreiras, O. Gallet, J. Leroy-Dudal

Biomaterials. 2020 Dec 16;269:120610. doi: 10.1016/j.biomaterials

Communications orales

Ascites, the tumoral environment of ovarian cancer, impacts the integrity of mesothelium during peritoneal implantation of ovarian carcinoma.

C. Laurent-Issartel, R. Agniel, F. Giffard, A. Lambert, J. Leroy-Dudal, F. Carreiras, S. Kellouche
Annual meeting of the french society for extracellular matrix biology. Reims, 2019.

Etude de l'implantation péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens dans un modèle *in vitro* de co-culture tridimensionnel en ascites.

C. Laurent-Issartel

Rencontres des Microscopistes Zeiss 2019 (RMZ). Cergy-Pontoise, 2019.

Communications par affiches

Ascites, the tumoral environment of ovarian cancer, impact the integrity of mesothelium during peritoneal implantation of ovarian carcinoma. (Annexe)

C. Laurent-Issartel, R. Agniel, F Giffard, A. Lambert, J. Leroy-Dudal, F. Carreiras, S. Kellouche
Journée de l'Ecole Doctorale Sciences et ingénierie. Cergy-Pontoise, 2019.

Peritoneal implantation of ovarian carcinoma in ascites conditions: *In vitro* 3D (three-dimensional) model of co-culture. (Annexe)

C. Laurent-Issartel, E. Trzpis, C. Maspimby, C.R Picot, J. Leroy-Dudal, F. Carreiras & S. Kellouche*

French cell adhesion club symposium. Strasbourg, 2018.

Superresolution microscopy for the study of ovarian cancer cytoskeletal dynamics in ascites.

Lambert, A. Wagner, C. Laurent-Issartel, M. Briand, S. Kellouche, F. Carreiras

Annual meeting of the french society for extracellular matrix biology. Reims, 2019.

Avant-propos

Les cancers ont longtemps été considérés comme des pathologies dont le déclenchement et l'évolution dépendaient seulement des altérations génétiques. Au cours de ces dernières années, le rôle crucial du microenvironnement tumoral environnant les cellules cancéreuses a été mis en évidence. Sa composition est particulièrement hétérogène, seule une partie des cellules sont malignes. Les cellules non malignes assurent plusieurs fonctions dans le développement tumoral. La matrice extracellulaire est également un constituant majeur du microenvironnement tumoral. Les protéines matricielles participent à l'organisation architecturale du tissu et régulent de nombreux aspects du comportement cellulaire. Lors du développement d'un foyer tumoral, la composition de la matrice extracellulaire est modifiée et peut réguler certains événements responsables de la dissémination tumorale.

Les carcinomes ovariens représentent la première cause de décès par cancer gynécologique en occident et ont un mauvais pronostic principalement en raison de la découverte tardive de la maladie ainsi qu'un taux élevé de récurrence.

Au moins un tiers des patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire présentent une accumulation de liquide inflammatoire, l'ascite, au moment du diagnostic et presque toutes ont de l'ascite au moment de la récurrence. Par sa richesse en molécules bioactives, l'ascite constitue un microenvironnement tumoral unique.

L'une des particularités de ce cancer est la capacité des cellules cancéreuses ovariennes à se propager dans la cavité abdominale, conduisant à des métastases péritonéales. Cette dissémination s'illustre notamment par le détachement, à partir de l'épithélium ovarien de surface, de cellules isolées ou sous forme d'agrégats multicellulaires appelés sphéroïdes tumoraux. Ces sphéroïdes baignant dans l'ascite sont capables de résister à l'anoïkis (apoptose) et de se réimplanter sur le mésothélium péritonéal, site privilégié de dissémination du cancer de l'ovaire, entraînant ainsi la formation de foyers tumoraux secondaires.

Néanmoins, l'influence de l'ascite sur le développement des niches pré-métastatiques et son impact sur les mécanismes biologiques conduisant à l'implantation des cellules cancéreuses au mésothélium, restent mal compris et peu étudiés.

Les deux objectifs globaux du travail de thèse ont été : d'une part d'appréhender le rôle de l'ascite lors de l'implantation des cellules cancéreuses métastatiques sur le mésothélium péritonéal et de décrypter les mécanismes sous-jacents à ce processus ; et d'autre part le développement d'un modèle de co-culture tridimensionnel entre les sphéroïdes tumoraux ovariens et les cellules mésothéliales en condition ascitique, mimant ainsi les étapes précoces de la dissémination métastatique péritonéale.

Approfondir les connaissances des processus cellulaires et moléculaires conduisant à la dissémination intrapéritonéale ainsi que déterminer le rôle potentiel de protéines ascitiques dans ce processus pourraient permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans le cadre des travaux de Doctorat présentés, le manuscrit comporte une première partie bibliographique divisée en trois volets. Après une présentation des généralités sur les cancers de l'ovaire, les parties sont divisées selon le type de microenvironnement qui peut être présent au cours de l'initiation, du développement et de la métastase tumorale. Chaque microenvironnement présenté se compose de différents protagonistes, qu'ils soient moléculaires ou cellulaires, qui impactent le comportement des cellules cancéreuses dans les différentes étapes de développement des cancers de l'ovaire. La composition riche et complexe de ces microenvironnements est présentée. De plus, les interactions entre les cellules et la matrice et les voies de signalisation modulant le comportement cellulaire qui en découlent sont décrites. L'ensemble de cette partie de bibliographie vise à présenter des protagonistes cellulaires et acellulaires, retrouvés dans les différents microenvironnements du cancer de l'ovaire, qui jouent un rôle dans la dissémination métastatique péritonéale.

A la suite de cette synthèse bibliographique, les objectifs de l'étude sont annoncés puis les méthodes expérimentales et matériels utilisés dans le cadre de ces travaux sont décrits.

Les résultats obtenus pendant ces trois ans de travaux de thèse sont ensuite présentés. Premièrement, la composition de l'ascite en fibrinogène/fibrine a été décrite. L'impact de l'ascite sur les deux modèles cellulaires étudiés, les sphéroïdes tumoraux ovariens et les monocouches mésothéliales, ainsi que sur leurs interactions a ensuite été investigué. De plus, le rôle des récepteurs d'adhérence de type intégrines a été étudié dans différents mécanismes qui permettent la dissémination métastatique péritonéale. Enfin, la conception du modèle tridimensionnel est détaillée.

L'ensemble des résultats obtenus sont ensuite discutés et les perspectives de ce travail sont énoncées. Les références bibliographiques sont ensuite répertoriées. Une partie annexe comporte les communications par affiches réalisées et les résumés des communications orales présentées pendant ce travail de thèse. La partie annexe comporte également deux articles publiés sur des projets transverses mais complémentaires de mon projet doctoral et un article en cours de soumission concernant ce travail de thèse.

Synthèse bibliographique

Généralité cancer de l'ovaire, stades et les différents microenvironnements

1. Généralités et données épidémiologiques

Le cancer de l'ovaire est une pathologie grave, complexe et insidieuse, responsable d'environ 239 000 cas et 152 000 décès par an dans le monde. Ces chiffres en font la 7^{ème} cause de décès tous cancers confondus chez les femmes et la 1^{ère} cause de mortalité par un cancer gynécologique. Ce cancer apparaît le plus souvent après la ménopause. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 65 ans. Le taux de mortalité augmente avec l'âge, étant de 3 pour 100 000 femmes entre 40 et 44 ans, et de 28 pour 100 000 femmes au-delà de 74 ans [1].

En France, le cancer de l'ovaire est un cancer peu fréquent, touchant environ 4 400 femmes chaque année et représentant 3% des nouveaux cancers féminins. Les taux d'incidence sont les plus élevés dans les régions les plus développées, avec des taux dépassant 7,5 pour 100 000 et les plus faibles en Afrique subsaharienne avec des taux inférieurs à 5 pour 100 000 [1].

Si l'incidence du cancer ovarien reste faible, c'est une pathologie au sombre pronostic avec une mortalité très élevée, du fait d'un diagnostic tardif. Le cancer de l'ovaire provoque peu de symptômes à un stade débutant. Les symptômes sont le plus souvent digestifs (ballonnements, indigestion, constipation, douleur dans le ventre) ou urinaires (envie fréquente d'uriner, difficulté à se retenir) et s'apparentent à des symptômes du quotidien. L'absence de symptôme précis à un stade débutant et le manque de dépistage aboutit à un diagnostic tardif. De ce fait, le cancer de l'ovaire est souvent diagnostiqué à un stade avancé (70 % à 75 % des cas aux stades III ou IV) c'est-à-dire lorsque des cellules cancéreuses ont atteint d'autres organes du bassin ou de l'abdomen. A ces stades, la survie à 5 ans est alors d'environ 30 à 40%. A l'inverse, lorsque la pathologie est détectée lorsque la tumeur présente une localisation limitée aux ovaires, le taux de survie des patientes à 5 ans est de 90% [2-4].

De plus, les cellules développent une capacité de chimiorésistance ce qui favorise les cas de récurrences et du faible taux de survie [5]. 20% des patientes rechutent dans les 6 mois suivant une chirurgie et une chimiothérapie, les 80 % restant sont sensibles aux chimiothérapies mais le danger de rechute plus tardive reste très importante [6]. Les sites de récurrences des cancers ovariens sont variables, et concernent le pelvis, le parenchyme splénique ou toute autre région de l'abdomen. La carcinose péritonéale reste la forme de récurrence la plus fréquente.

2. Les ovaires

Au nombre de deux, les ovaires sont des organes appartenant à l'appareil reproducteur de la femme. De forme ovoïde et d'une longueur de 3 à 4 cm, ils sont situés dans le bassin, de chaque côté de l'utérus (Figure 1). Ils ont comme fonctions principales la production des ovocytes et d'hormones, principalement les œstrogènes et la progestérone.

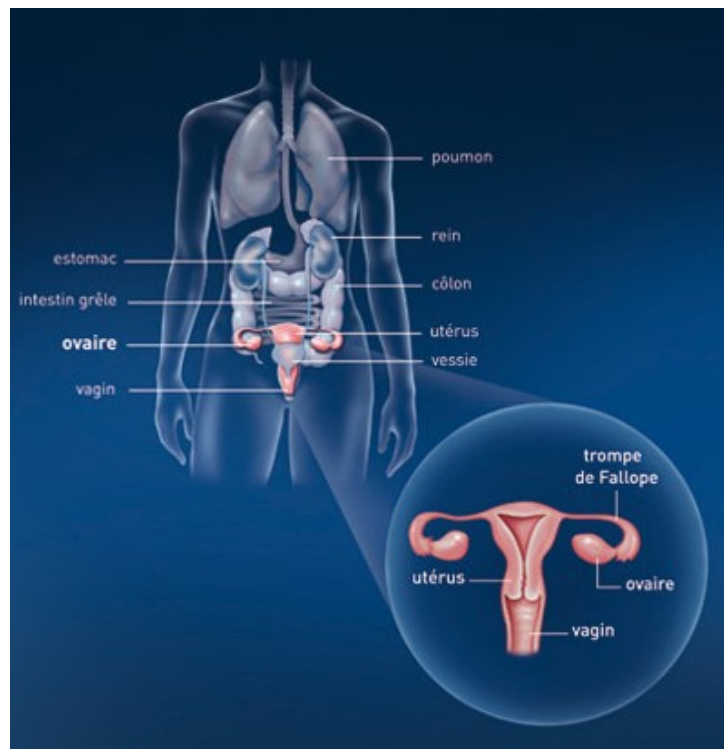


Figure 1 : Localisation anatomique des ovaires dans le corps humain.

Institut national du cancer

L'estrogène, est une hormone impliquée dans le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires chez la jeune femme à la puberté. Les œstrogènes agissent sur le système uro-génital, la glande mammaire, le squelette, la peau et les muqueuses, le système cardiovasculaire, le cerveau, le système digestif. Ce sont ces hormones qui entraînent la croissance des seins, l'arrivée des règles, la pilosité pubienne et l'ovulation à la puberté. Après la ménopause, les taux d'œstrogènes diminuent de manière importante puisque les ovaires cessent d'en produire. Les tissus qui étaient sensibles aux œstrogènes subissent différentes modifications et notamment une atrophie, par exemple au niveau de la peau, des muqueuses et du squelette qui se décalcifie.

La progestérone est une hormone qui sert à préparer l'utérus pour une grossesse. Elle est produite dans la seconde moitié du cycle menstruel après l'ovulation, période pendant laquelle ses taux augmentent pendant quelques jours puis diminuent en l'absence de fécondation. Au fur et à mesure que la femme vieillit, les ovaires produisent de moins en moins d'hormones et ses cycles menstruels finissent par s'arrêter au moment de la ménopause.

L'équilibre entre ces deux hormones est nécessaire, en l'absence de progestérone, la muqueuse de l'utérus se développe trop sous l'effet des œstrogènes, ce qui peut se traduire par des hémorragies génitales, une augmentation du volume de l'utérus et favoriser le développement de tumeurs de l'utérus (fibromes).

Chaque ovaire est entouré d'une mince couche de tissu appelée capsule. Les ovaires sont constitués de trois différents types de cellules (Figure 2) :

- Les cellules épithéliales de surface, qui forment la couche externe des ovaires ;
- Les follicules ovariens (cellules germinales), situés sous les cellules épithéliales et à partir desquels les ovules sont fabriqués ;
- Les cellules du stroma, présentent au niveau du tissu conjonctif qui remplit l'intérieur des ovaires, qui font le lien entre le corps de l'ovaire et la surface épithéliale.

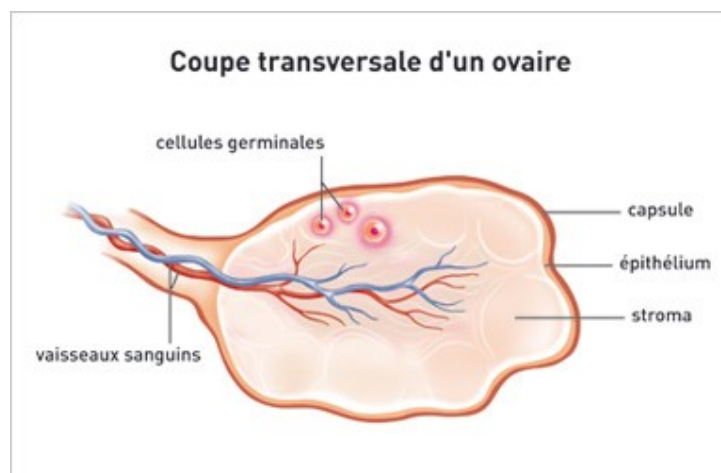


Figure 2 : Coupe transversale d'un ovaire.

Institut nationale du cancer

Les ovaires peuvent être le siège de tumeurs, souvent bénignes, comme les kystes (tumeur remplie de liquide), mais parfois malignes. Cela survient lorsque des cellules de l'ovaire, initialement normales, se transforment et se multiplient de façon « anarchique », jusqu'à former une tumeur maligne. Dans 90% des cas, les cancers de l'ovaire se développent à partir des cellules épithéliales de surface, on parle alors d'adénocarcinome [4,7]. D'autres formes

de cancers peuvent se développer à partir des follicules ovariens (tumeurs germinales malignes) ou du tissu de soutien qui forme le corps des ovaires (tumeurs du stroma et des cordons sexuels).

Les tumeurs de l'épithélium ovarien de surface peuvent être classés selon 8 sous-types histologiques : séreux, endométrioïde, mucineux, à cellules claires, à cellules intermédiaires, à cellules squameuses, à cellules épithéliales mixtes et indifférenciées (Figure 3). Quel que soit le sous-type de tumeurs, il convient de différencier les tumeurs bénignes appelées adénomes, les tumeurs à la limite de la malignité que l'on appelle des tumeurs « borderline » ou des tumeurs à faible potentiel invasif et les tumeurs malignes appelées adénocarcinomes [8].

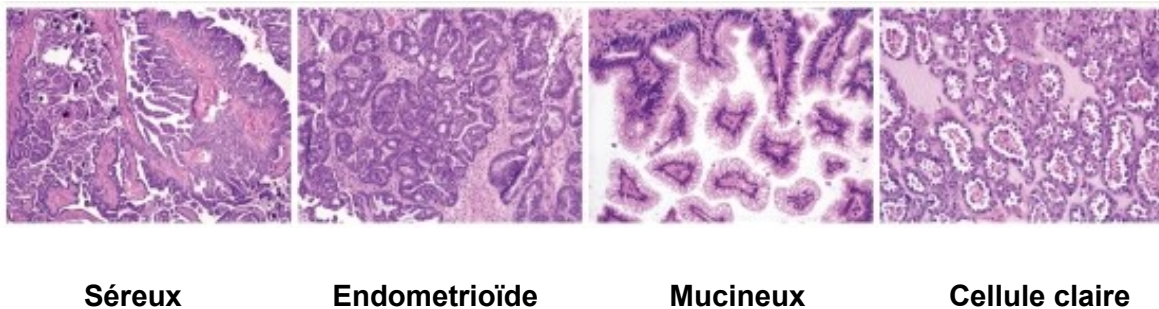


Figure 3 : Observation histologique des principaux sous-types des cancer de l'épithélium ovarien de surface.

D'après Karts et al. [8]

3. Les stades de disséminations et les microenvironnements rencontrés

L'extension des tumeurs épithéliale de l'ovaire suit plusieurs stades caractérisés par la taille et la localisation des tissus atteints.

Selon la classification de la Fédération Internationale des Gynécologues (FIGO), les stades précoces regroupent les stades I et II et les stades avancés les stades III et IV (Figure 4). De manière générale :

- Au stade I, la tumeur est limitée à l'ovaire.
- Au stade II, la tumeur s'est étendue au petit bassin.
- Au stade III, la tumeur s'est étendue au-delà du petit bassin. Le péritoine et/ou des ganglions lymphatiques sont touchés. C'est généralement à ce stade qu'il y a l'apparition d'un liquide inflammatoire, retrouvé dans l'abdomen, appelé ascite.
- Au stade IV le cancer de l'ovaire est disséminé à d'autres organes. Il existe des métastases à distance.

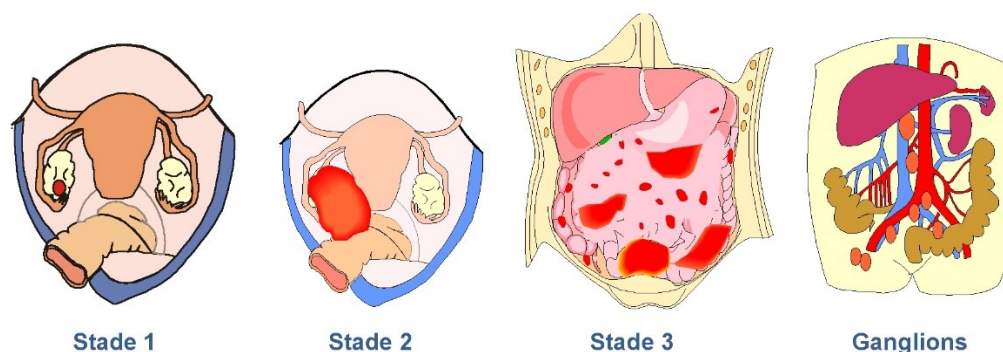


Figure 4 : Stade de classification FIGO.

D'après Labidi-Galy SI. [9]

La classification TNM (Tumeur, Node, Métastases) s'applique aux tumeurs malignes épithéliales et stromales. Contrairement aux stades FIGO, basés sur les données chirurgicales, les stades TNM sont basés sur les données cliniques et histopathologiques (Tableau 1) [10,11]. Les catégories T s'intéressent à la tumeur primitive, les catégories N à l'absence ou à la présence d'une extension locorégionale au niveau des ganglions et les catégories M à l'absence ou la présence d'une extension métastatique à distance.

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

Tableau 1 : Correspondance des stades FIGO et TNM.

D'après Doctinews.

4. Prise en charge thérapeutique

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

4.1. Traitements de base

La prise en charge thérapeutique des cancers ovariens se fait dans des centres spécialisés. Elle repose sur la chirurgie et la chimiothérapie, la radiothérapie restant peu prescrite. Effectivement, la radiothérapie (rayons ou particules de haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses) est rarement employée pour traiter le cancer de l'ovaire, car ce cancer touche généralement trop d'organes et plusieurs tissus dans la région atteinte pour que la radiothérapie soit efficace. La chirurgie cyto-réductrice a pour objectif premier l'exérèse des lésions mais permet aussi de compléter le diagnostic, notamment en précisant l'extension intra-abdominale.

Les protocoles standards de chimiothérapie du cancer épithélial de l'ovaire consistent habituellement en une association de deux médicaments, ou plus, administrés toutes les 3 à 4 semaines par voie intraveineuse. La chimiothérapie intrapéritonéale peut également être utilisée afin de délivrer des doses plus élevées d'agents chimiothérapeutiques au sein de la cavité péritonéale, site d'implantation métastatique des cancers ovariens.

Généralement il y a une association des sels de platine, induisant des dommages à l'ADN et aboutissant à l'apoptose des cellules, avec un autre agent, généralement de la classe des taxanes, qui inhibe la dynamique des microtubules ayant un effet cytostatique sur les cellules [12]. Les principaux agents chimiothérapeutiques proposés aux patientes sont les sels de platine, notamment le cisplatine. Ils provoquent l'arrêt de la prolifération des cellules après s'être liés à l'ADN.

Les associations d'agents chimiothérapeutiques les plus souvent employées sont les suivantes :

- carboplatine et paclitaxel
- carboplatine et docétaxel
- cisplatine et paclitaxel

4.2. Traitements ciblés

Certaines femmes atteintes d'un cancer de l'ovaire reçoivent un traitement ciblé. De nombreux essais cliniques visent à utiliser de petites molécules pharmacologiques inhibitrices ciblant les processus participant à la croissance et/ou à la dissémination tumorale.

Un anti-angiogénique ciblant les néo-vaisseaux tumoraux peut-être associé selon les cas et le traitement ciblé mis en place. Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un médiateur clé de l'angiogenèse, un processus important dans la croissance et les métastases du cancer de l'ovaire. Les agents anti-angiogéniques ont été introduits dans les protocoles de traitements des cancers de l'ovaire. Ils ciblent la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal qui se lie au facteur pro-angiogénique VEGF et empêche son interaction avec ses récepteurs (VEGFR-1 et 2) localisés à la surface des cellules endothéliales. [7]

Les inhibiteurs de PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) sont aussi utilisés en traitement ciblé. Ils agissent sur le système de réparation de l'ADN en synergie avec la perte de la fonction du gène BRCA par les cellules cancéreuses, provoquant une importante instabilité génétique qui mène à l'apoptose des cellules cibles. Les patients porteurs de mutations de *BRCA1 / 2* sont très sensibles au traitement par inhibiteurs de PARP [7].

Des molécules interférant avec les voies de signalisation altérées dans les cancers de l'ovaire sont également développées. Elles ciblent notamment les voies de survie MAP-Kinases et PI3-Kinase/Akt. Des stratégies d'immunothérapies sont également envisagées (anticorps, inhibiteur de checkpoints immunologiques, vaccins).

Les récepteurs d'adhérences cellulaires jouent des rôles clé dans les comportements cellulaires physiologiques mais aussi pathologiques tel que le cancer. Les intégrines sont les responsables essentielles des interactions cellule-matrice extracellulaire. Les intégrines sont impliquées dans plusieurs processus du cancer de l'ovaire : la formation des sphéroïdes, la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses, leurs interactions avec les protéines matricielles des différents microenvironnements, leur implantation sur le mésothélium ... Plusieurs études et essais cliniques portent sur les intégrines comme cible thérapeutique dans le cancer [13]. Des études précliniques ont montré l'efficacité de plusieurs inhibiteurs des intégrines pour bloquer la progression du cancer, notamment en bloquant l'angiogenèse [14].

Tous ces essais ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques avec l'espoir de voir de nouvelles molécules émerger dans les prochaines années.

Comprendre les interactions entre les divers protagonistes du cancer de l'ovaire et les différents types de microenvironnement rencontrés a permis de mettre en place des thérapies.

Au cours des différentes étapes métastatiques, les cellules cancéreuses rencontrent différents types de microenvironnement qui vont pouvoir influencer leur comportement cellulaire et favoriser le processus de métastases. Cette dissémination atypique et multi-sites rencontre trois microenvironnements différents : le microenvironnement « ovarien », « ascitique » et « mésothélial » (Figure 5).

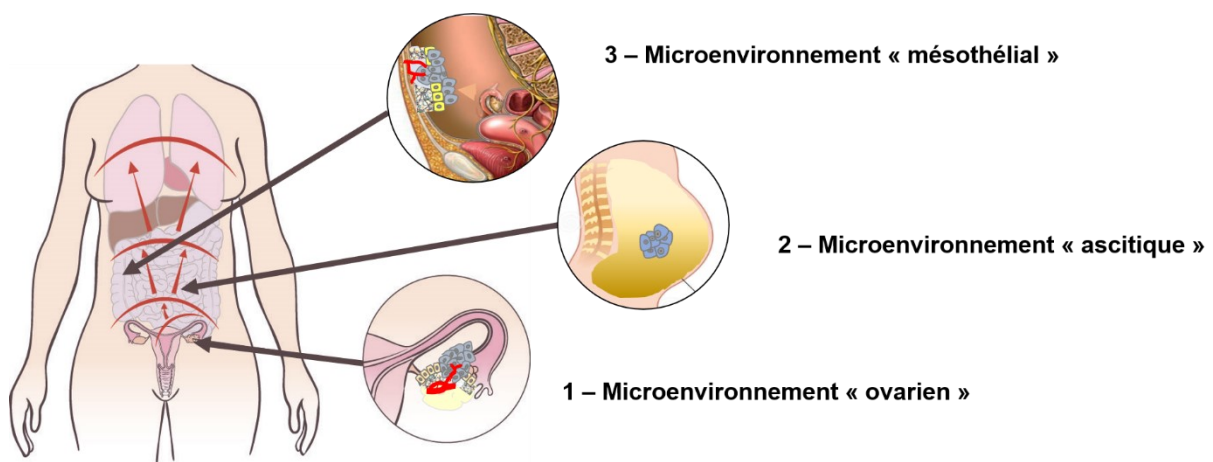


Figure 5 : Les différents microenvironnements du cancer de l'ovaire.

Modifié d'après « Vivre avec un cancer de l'ovaire ».

Chapitre 1 : Foyer primaire et microenvironnement ovarien

Le foyer primaire du cancer ovarien de l'épithélium est situé sur la surface épithéliale de l'ovaire, un site qui est au cœur de beaucoup de mécanismes moléculaires et hormonaux. De plus, l'initiation de ce cancer peut être dû à plusieurs phénomènes mutationnels dont des mutations héréditaires. Le microenvironnement ovarien participe à l'initiation du foyer primaire ainsi qu'à la croissance tumorale (Figure 6).

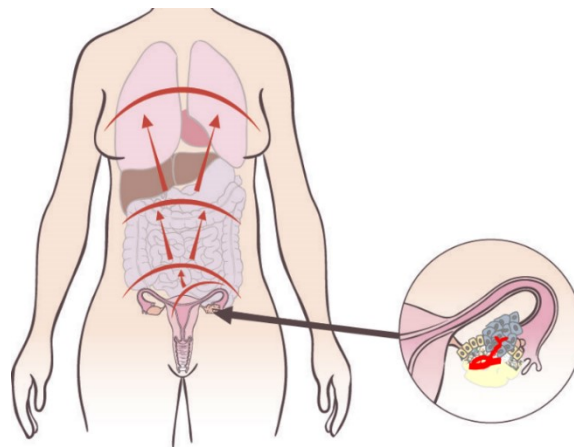


Figure 6 : Emplacement du « microenvironnement ovarien ».

Modifié d'après « Vivre avec un cancer de l'ovaire ».

Une cellule cancéreuse est une cellule « anormale » ayant acquis des caractères spécifiques à l'origine d'un cancer. Les cellules cancéreuses se différencient des cellules normales /saines par les « hallmarks » (Figure 7). Ces marques et capacités distinctives des cellules cancéreuses sont nombreuses et diverses : l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, la capacité à échapper à l'apoptose, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogénèse, la capacité à former des métastases, la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, la capacité à échapper au système immunitaire, la mise en place de l'inflammation et de mutations du génome [15].

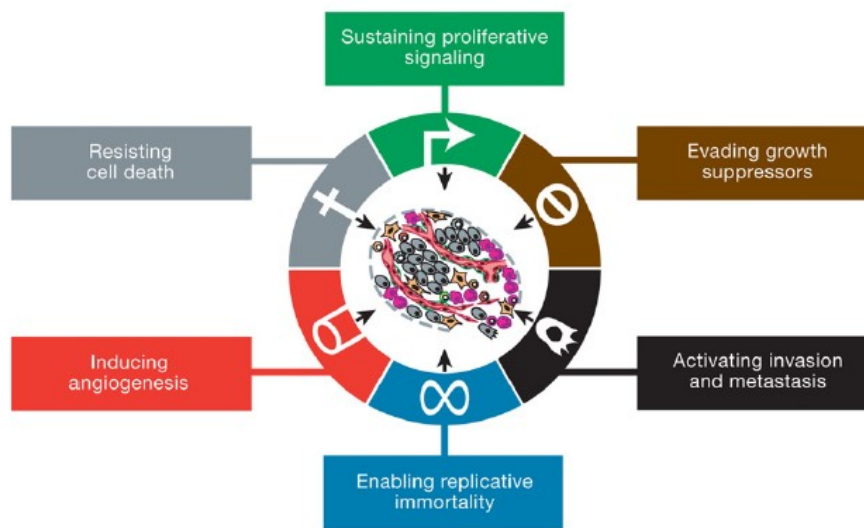


Figure 7 : Les « Hallmarks » du cancer.

D'après Hanahan et al. [15]

Une tumeur maligne composée de cellules cancéreuses se développe grâce à la combinaison de plusieurs processus : des mutations génétiques au niveau des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, des événements épigénétiques et l'influence de facteurs environnementaux. Le remodelage de l'épithélium ovarien de surface associé à l'activité génitale de la femme ainsi que son microenvironnement sont propices à la formation et la croissance d'une tumeur primaire.

1. Génétique et épigénétique

Sous l'influence de facteurs de l'environnement, de certains agents chimiques ou physiques, ou de certains virus, le génome humain subit des altérations, appelées mutations génétiques. Lorsque les systèmes de maintien de l'intégrité du génome et de réparation des dommages de l'ADN sont défectueux, la cellule conserve ces mutations et devient anormale, ne répondant plus aux signaux de régulation. Ces mutations transforment notamment les proto-oncogènes en oncogènes. Ces oncogènes acquièrent alors le pouvoir de transformer une cellule normale en cellule maligne par la stimulation « incontrôlée » de divisions cellulaires. Les gènes suppresseurs de tumeur ou anti-oncogènes ont pour fonction de freiner le déclenchement de la division cellulaire. Ce sont des gènes capables d'inhiber la prolifération cellulaire en bloquant le cycle cellulaire. Le plus important d'entre eux est le gène p53, dont les mutations sont impliquées dans plus de la moitié des cancers [16]. Au-delà des mutations génétiques, les modifications épigénétiques sont également impliquées dans le développement des cancers. Ces modifications ne créent pas de lésions/mutations ou délétions de l'ADN, elles se

traduisent par des modifications des profils de méthylation de l'ADN et des modifications covalentes des histones. On peut citer comme exemples des hyperméthylations localisées au niveau de promoteur des gènes suppresseurs de tumeur entraînant alors la répression de leur expression. L'hérédité et l'environnement génèrent des mutations génétiques et épigénétiques qui dérèglent l'activité et l'intégrité du génome aboutissant à des pathologies telle que le cancer. Ces modifications jouent sur le gain de fonctions (constitutives) des proto-oncogènes et sur la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs, conduisant à des changements des voies de signalisation et dérégulant le cycle cellulaire.

1.1. Proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Des mutations, translocations ou amplifications d'oncogènes tels que HER-2 / neu, c-myc, K-ras et des gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53, BRCA1 et BRCA2 ont été impliqués dans un large éventail de tumeurs malignes humaines, et en particulier dans le cancer de l'ovaire [17].

1.1.1. Les proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont des gènes normalement présents dans le génome qui stimulent la croissance cellulaire. Suite à des transformations telles que des mutations, les proto-oncogènes deviennent des oncogènes et favorisent la survenue d'un cancer.

Les chercheurs tendent à trouver des liens entre les modifications de certains oncogènes et leur rôle dans les stades de la tumeur mais aussi dans la survie globale et dans la chimiorésistance.

D'après plusieurs études, il y aurait une corrélation entre les altérations de K-ras et le type histologique, les mutations de K-ras étant détectées plus fréquemment dans les tumeurs ovariennes mucineuses (bénignes, limites ou malignes) que dans les autres types. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'activation de K-ras suite à une mutation est un événement précoce de tumorigenèse ovarienne mucineuse [17]. D'autre part, il a été montré que c-myc est particulièrement surexprimé dans les tissus des adénocarcinomes séreux et que l'amplification de c-myc est le plus souvent découvert aux stades avancés, ce qui peut suggérer que c-myc joue un rôle critique dans la progression de la maladie [18]. Au-delà de leur rôle dans l'initiation ou la progression de la maladie, plus de 25 oncogènes ont été détectés comme favorisant la résistance aux médicaments [19].

1.1.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs

A l'inverse des proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur inhibent la division cellulaire et / ou favorisent la mort cellulaire. Leur inactivation suite à des transformations ne leur permet plus d'assurer leur rôle de régulateur négatif de la prolifération. Parmi eux, p53 est un régulateur de transcription nucléaire qui participe à de multiples processus cellulaires. En se liant à l'ADN, p53 contrôle l'expression de certaines de gènes cibles afin de maintenir l'homéostasie et l'intégrité du génome. P53 peut activer les protéines de réparation de l'ADN lorsque l'ADN a subi des dommages, arrêter la croissance cellulaire en maintenant le cycle cellulaire à la transition G1 / S, permettant la réparation de l'ADN et initier l'apoptose si les dommages à l'ADN s'avèrent irréparables.

Des altérations de p53 ont été détectées dans environ 50% des carcinomes ovariens [17] et dans 97% des cas de cancer ovarien séreux de haut grade [20]. Certains auteurs suggèrent que les altérations de p53 pourraient représenter une étape précoce dans la carcinogenèse ovarienne [17,20].

1.2. L'hérédité génétique

Dans environ 10 % des cas, le cancer de l'ovaire à une cause génétique. Cette prédisposition génétique est due à des mutations affectant les gènes BRCA1 et BRCA2. Plus de 200 mutations différentes du gène BRCA1 et 80 du gène BRCA2 ont été répertoriées. Plus de 80 % des mutations conduisent à une protéine absente ou tronquée non fonctionnelle. Ces mutations augmentent le risque de développer un cancer de l'ovaire de 10 à 25 fois. Une mutation du gène BRCA1 accroît davantage le risque de cancer de l'ovaire qu'une mutation du gène BRCA2 : le risque est de 22-59% pour le BRCA1 et de 4-18% pour le BRCA2. Il y a aussi une différence sur l'âge des patientes atteintes, les femmes porteuses d'une mutation du BRCA1 sont plus susceptibles d'avoir un cancer de l'ovaire avant l'âge de 50 ans et les femmes porteuses d'une mutation du BRCA2 après l'âge de 60 ans.

Ces gènes sont impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN, ils appartiennent à la famille des gènes suppresseurs de tumeurs. Ils codent pour des protéines qui permettent de maintenir l'intégrité du génome en réparant les cassures doubles brins de l'ADN, leur rôle physiologique est donc le contrôle négatif du cycle cellulaire lors de cassures double brin d'ADN. La présence de mutations dans l'un de ces deux gènes perturbe cette fonction et fait augmenter fortement le risque de cancer de l'ovaire.

L'identification de ces gènes (proto-oncogène et gène suppresseur de tumeur) devrait permettre des avancées dans le diagnostic et dans les applications thérapeutiques, telles que

la capacité d'inactiver des formes mutantes ou de restaurer la fonction normale de ces gènes. Un certain nombre de protocoles de thérapie génique pour le cancer de l'ovaire comprennent des stratégies utilisant des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur tels que p53.

1.3. Epigénétique

Le terme épigénétique désigne les processus moléculaires permettant de moduler l'expression des gènes, mais qui ne sont pas fondés sur des changements dans la séquence de l'ADN. L'épigénétique est la régulation dynamique de l'expression génique par modification de la chromatine au niveau de l'ADN (méthylation) et des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation...) en réponse à des signaux de l'environnement. Les modifications épigénétiques sont dynamiques et réversibles. Cette instabilité est sous l'influence de l'environnement mais aussi du vieillissement.

L'importance de la dérégulation épigénétique pour la progression du cancer ne peut être sous-estimée, car diverses modifications épigénétiques aberrantes sont des « hot spot » de mutations et déclenchent l'activation des oncogènes, la répression des gènes suppresseurs de tumeur et la transcription altérée des gènes codant pour les protéines nécessaires au bon fonctionnement physiologique des cellules. Ces modifications épigénétiques participent donc à la tumorigenèse.

Des études ont montré que l'épigénome est altéré dans le cancer épithélial ovarien. De plus, un lien entre le degré de méthylation et les sous-types de cancer épithélial de l'ovaire a été démontré. Les carcinomes à cellules claires et endométrioïde sont plus susceptibles d'avoir un phénotype hyperméthylé par rapport aux cancers séreux de l'ovaire de haut grade qui sont globalement hypométhylés [21]. Les gènes suppresseurs de tumeurs communément inactivés par des modifications épigénétiques lors de la tumorigenèse du cancer de l'ovaire sont les gènes hMLH1 et DPH2L1 [22].

Tout comme les modifications génétiques, les modifications épigénétiques permettent elles aussi l'initiation et la progression tumorale ainsi que la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Cependant, contrairement aux causes génétiques du cancer affectant la séquence de l'ADN qui sont irréversibles, les modifications épigénétiques sont réversibles. De ce fait, de nouvelles approches thérapeutiques s'ouvrent avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des méthyltransférases de l'ADN ou des histone-désacétylases.

2. Cancérogénèse de l'épithélium ovarien de surface

L'initiation du processus tumoral a donc pour origine un dérèglement du génome suite à des modifications génétiques et épigénétiques. Cependant, l'activité physiologique des ovaires entraîne la survenue d'évènements, modifiant le microenvironnement de l'épithélium, le rendant plus propice à la survenue de mutations et la cancérogénèse.

2.1. Remodelage de l'épithélium ovarien de surface

Au cours de la vie d'une femme, l'épithélium ovarien de surface est fragilisé à chaque libération d'ovocyte, favorisant les processus de cicatrisation et de proliférations par les cellules épithéliales. Durant les mécanismes de réparation, les cellules épithéliales remodelent la matrice extracellulaire et peuvent se retrouver dans le stroma, ce qui entraîne des kystes d'inclusion. A répétition, ces mécanismes pourraient engendrer des tumeurs [23]. C'est pourquoi, les hypothèses favorisant les grossesses sont aujourd'hui avancées comme étant préventives contre le cancer de l'ovaire [24] ainsi qu'une limitation de l'ovulation par des moyens contraceptifs ou l'allaitement [25].

2.2. Régulation Hormonale

L'ovaire est un site qui entraîne une exposition accrue des hormones stéroïdiennes et de gonadotrophines dans l'environnement de la tumeur. Effectivement, les ovaires sont à la fois le site de production de certaines hormones (œstrogène et progestérone) mais aussi un site qui est sous l'influence d'autres hormones. Les hormones FHS (Follicules-Stimulating Hormone) et LH (Luteinising Hormone) stimulent la prolifération cellulaire en activant des oncoprotéines ce qui favoriserait la malignité *via* la signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR), les MAPK (ERK1/2) et d'autres protéines kinases (PKA, PKC, PI3K) [26].

Concernant les hormones produites par les ovaires, l'utilisation d'œstrogènes post-ménopausique comme traitement hormonal substitutif à la ménopause a été associée à un risque accru de cancer de l'ovaire en cas de traitement durant plus de 5 ans [27,28].

2.3. Inflammation

Au cours de chaque ovulation et pendant l'étape de cicatrisation, un processus inflammatoire a lieu ce qui constitue un environnement pro-inflammatoire favorisant la survenue de transformation maligne des cellules. Durant ce processus, les cellules sont soumises à un stress chronique engendré par les cytokines inflammatoires, les espèces réactives de

l'oxygène, les facteurs de croissances et les cellules immunitaires. C'est pourquoi les patientes traitées par des anti-inflammatoires de manière chronique, tel que l'aspirine, seraient moins sujettes à ce cancer [29]. De plus, l'ocytocine qui a été dosée dans l'ascite tumorale ovarienne, avec un taux jusqu'à 200 fois plus élevés que dans le plasma, possède des propriétés anti-inflammatoires qui apporteraient un effet protecteur contre le cancer ovarien [30].

3. Organisation moléculaire et cellulaire du foyer tumoral ovarien

Le foyer tumoral regroupe une population hétérogène de cellules, dont une partie seulement est maligne, ainsi qu'un tissu environnant, le stroma (Figure 8). Le stroma tumoral inclut une matrice extracellulaire dense et complexe, sécrétée par les cellules cancéreuses et non cancéreuses. Cette dernière forme la trame de soutien du tissu mais peut-être remaniée de façon exacerbée avec une synthèse/dégradation accrue, des modifications de sa composition biochimique et de ses propriétés biophysiques. Les cellules du stroma interagissent physiquement *via* l'établissement de complexes jonctionnels et communiquent *via* des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire comme des chimiokines, des facteurs de croissance ou des hormones. L'irrigation du foyer tumoral est assurée par les vaisseaux sanguins et lymphatiques [31].

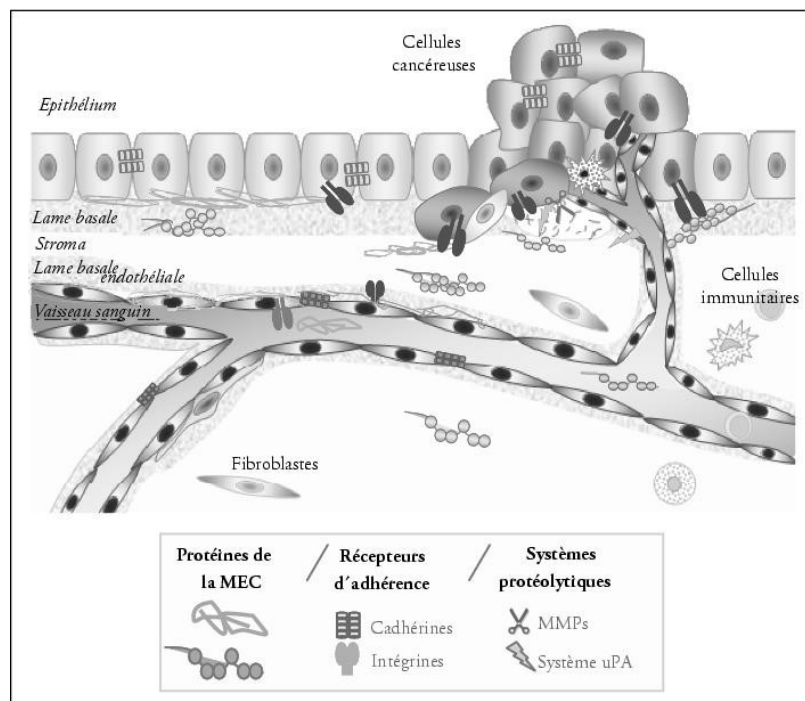


Figure 8 : Le foyer tumoral.

D'après Leroy-Dudal et al. [31].

3.1. La Matrice Extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est en enchevêtrement hétérogène et complexe de macromolécules fibreuses et adhésives présent entre les cellules. La MEC constitue une structure 3D acellulaire dynamique qui facilite les interactions et l'adhérence entre les cellules et leur environnement et permet une organisation en tissu. La MEC a donc un rôle de soutien aux tissus mais aussi un rôle sur le fonctionnement cellulaire. Effectivement, la MEC maintient

l'intégrité cellulaire mais régule aussi différents comportements cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la migration dans des processus physiologiques et pathologiques. La MEC se compose de glycoprotéines, de protéines fibreuses, de protéoglycanes (PGs), de facteurs de croissance piégés, des polysaccharide assemblés en un maillage interagissant avec la surface des cellules [32].

Il existe deux principaux types de MEC qui diffèrent selon leur localisation et leur composition (Figure 9) :

- La MEC interstitielle ou stromale, retrouvée au niveau des tissus conjonctifs. Elle sert de tissu de soutien et entoure les cellules. La MEC interstitielle est abondante et riche en fibres de collagène et d'élastine. On y trouve de façon éparses des fibroblastes qui synthétisent cette matrice, des cellules inflammatoires et des vaisseaux sanguins.
- La lame basale est une MEC qui sépare l'épithélium du stroma sous-jacent. C'est une MEC plus fine et étroitement associée à la face inférieure des cellules. Les constituants majeurs des lames basales sont le collagène de type IV, la laminine, les protéoglycanes à héparane-sulfate et le nidogène.

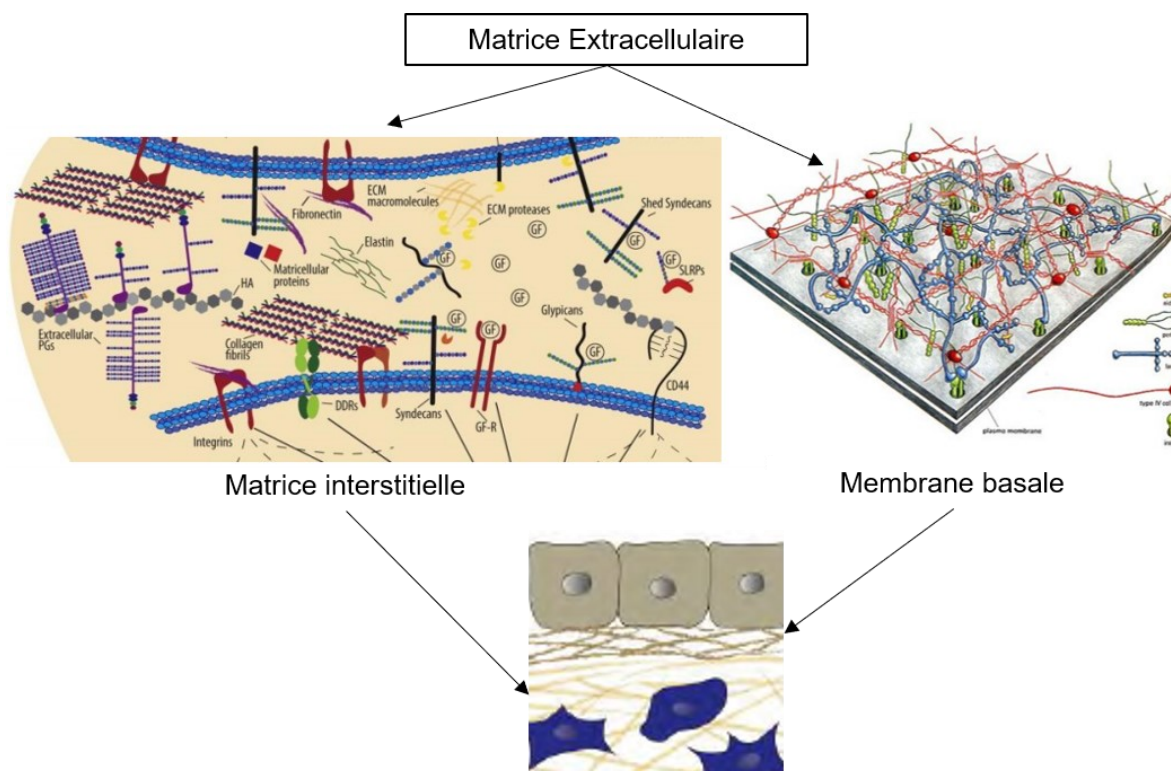


Figure 9 : Vue d'ensemble schématique des matrices extracellulaires.

Modifié d'après Theocharis et al. [32] et « Molecular Biology of the cell, 4th edition, Bruce Albert et al. »

La proportion et l'organisation de ces protéines peuvent varier dans le foyer tumoral par rapport à la matrice d'origine d'un individu sain. Ces modifications d'architecture et de composition favorisent la dissémination des cellules cancéreuses. L'acquisition d'un caractère invasif et migratoire est fortement influencée par le contenu de la MEC notamment en fibronectine, en collagène, en vitronectine et en laminine. Les cellules cancéreuses ovariennes sont capables de remodeler et modifier la composition de cette matrice pour faciliter l'invasion tumorale, les métastases et la résistance à certains traitements [33]. Dans le cancer de l'ovaire, la MEC joue un rôle primordial dans le comportement cellulaire et dans l'évolution des stades. La MEC des carcinomes ovariens est constituée de protéines fibreuses comme les collagènes de type I, II, III et plus rarement de type IV, de PGs comme les syndécans et les perlécans, des glycoprotéines adhésives comme la vitronectine, la fibronectine ou la laminine [34,35]. Ici, nous développons l'importance des protéines de la MEC (collagène, fibronectine, vitronectine et laminine) au niveau du foyer primaire.

3.1.1. Les collagènes

Les collagènes font partie d'une famille de protéines dites structurales, le plus souvent présente sous forme fibrillaire. Les collagènes sont les protéines la plus abondantes de la MEC représentant près de 30 % de la masse totale de protéines du corps humain. Le collagène est sécrété principalement par les cellules des tissus conjonctifs : les fibroblastes. Cette protéine s'associe à d'autres collagènes et interagit avec les protéines extracellulaires, les glycosaminoglycanes et les acides nucléiques. Les collagènes sont présents dans les os, le cartilage, l'interstitium pulmonaire, les muscles ainsi que les parois des vaisseaux.

A ce jour, 28 types de collagènes sont recensés selon leurs structures et fonctions. Ils sont classés en sept groupes en fonction des assemblages supramoléculaires qu'ils génèrent. Dans le cas du cancer de l'ovaire, c'est essentiellement deux groupes qui sont étudiés :

- Les collagènes formant des fibres (collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII). L'association de plusieurs molécules de collagènes permet la formation de fibrilles puis de fibres. Ce sont les éléments structuraux majeurs des tissus conjonctifs. Les collagènes fibrillaires sont le sous-groupe prédominant présent dans la MEC, et leurs fonctions uniques sont régies par leur conformation et leur structure, ce qui leur permet de former des fibrilles hautement organisées (Figure 10).
- Les collagènes formant des réseaux (collagènes de type IV, VIII et X). Ils s'associent entre eux et forment des réseaux. Ils peuvent également interagir avec d'autres

macromolécules matricielles et créer des complexes multimoléculaires comme celui entre le collagène IV et la laminine dans les lames basales.

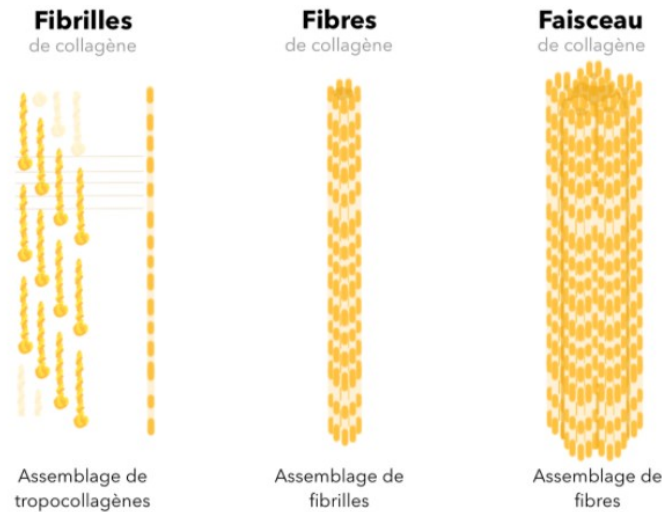


Figure 10 : Structure des collagènes fibrillaires.

Modifié d'après Cellulyod.

Dans le tissu de l'ovaire normal, le collagène est organisé sous forme de fibrilles minces, longues et ondulées, parallèles à la limite épithéliale et fournissant une élasticité à la MEC. En revanche, le remodelage du collagène dans le stroma tumoral se traduit par des fibrilles plus épaisses et plus courtes, regroupées en faisceaux à des angles tendant vers la perpendiculaire à la limite épithéliale [36]. Le collagène fibrillaire de type I est le composant structurel le plus abondant de la MEC ovarienne. Plusieurs études *in vitro* ont établi l'importance de ce collagène de type I dans l'adhésion et la migration des cancers épithéliaux ovariens, démontrant avec succès que le collagène I améliorait la migration de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ovariennes [37,38].

Une étude a mis en avant que les gènes de remodelage du collagène (AEBP1, COL11A1, COL5A1, COL6A2, LOX, POSTN, SNAI2, THBS2, TIMP3 et VCAN) régulés par la signalisation du TGF- β 1 favorisent les métastases et contribuent à une mauvaise survie globale chez les patientes atteintes d'un cancer sévère de l'ovaire. De plus, les niveaux de COL11A1 augmentent continuellement au cours de la progression de la maladie du cancer de l'ovaire. Le knockdown de COL11A1 diminue la migration cellulaire *in vitro*, l'invasion et la progression tumorale chez la souris. Cette signature de 10 gènes, qui est à la fois une valeur prédictive et une pertinence biologique, peut donc être utile comme cible thérapeutique [39].

3.1.2. La fibronectine

La fibronectine, du latin *fibro-* fibre, *necto-* adhérer, est une glycoprotéine dimérique ubiquitaire de 500 kDa environ. La fibronectine est une glycoprotéine présente sous forme soluble, dans les fluides physiologiques mais aussi sous forme fibrillaire dans la MEC. La fibronectine est synthétisée et sécrétée dans le plasma par les hépatocytes à la concentration de 300 µg/mL. Elle est également retrouvée dans les fluides biologiques tels que les urines ou encore le liquide amniotique mais peut également être retrouvée dans des fluides pathologiques comme l'ascite [40]. La fibronectine retrouvée en fibrilles insolubles dans les matrices extracellulaires est quant à elle synthétisée par différents types cellulaires, notamment, les fibroblastes, les chondrocytes ou les cellules endothéliales. Dans les MECs, la fibronectine forme un réseau dense de fibres interconnectées entre elles.

Les différents domaines de la fibronectine lui permettent différents types de liaisons :

- Le domaine situé à l'extrémité N-terminale permet la liaison avec divers ligands matriciels tels que le collagène, l'héparine ou encore la fibrine.
- Le domaine de liaison central contient les sites de reconnaissance par les récepteurs d'adhérence de type intégrines, en particulier la séquence RGD. Les principaux récepteurs reconnaissant la fibronectine sont les intégrines $\alpha 5\beta 1$ [41].
- Le domaine situé à l'extrémité C-terminale confère à la molécule de fibronectine une affinité avec les chaînes de GAGs des protéoglycanes.

Grâce à ses nombreuses interactions avec différentes molécules, la fibronectine régule la stabilité et l'architecture de la MEC. De plus, son organisation en fibrilles constitue un support structural idéal pour l'adhérence des cellules induisant la transduction de signaux régulant le comportement cellulaire. Effectivement, au-delà de son rôle structural, la fibronectine est impliquée dans la prolifération cellulaire, la migration et la différenciation dans des processus tels que la réparation tissulaire, le développement embryonnaire et la tumorigenèse.

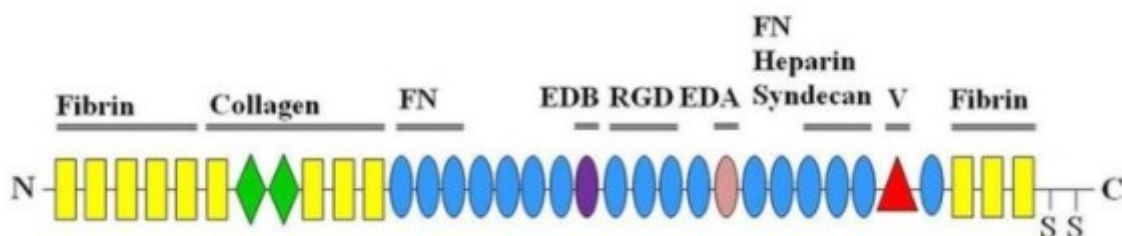


Figure 11 : Structure de la fibronectine et ses domaines de liaison.

D'après Freire-de-Lima. [42]

Dans les stades initiaux du carcinome ovarien, des niveaux élevés de fibronectine sont présents dans le stroma tumoral entourant les tumeurs [43] et les niveaux de fibronectine sont significativement corrélés avec le stade de la tumeur et la croissance de la tumeur [44,45]. L'augmentation de l'expression de la fibronectine est corrélée de manière significative et défavorable avec la survie globale des patientes [45].

3.1.3. La vitronectine

Le nom vitronectine dérive du latin *vitro- verre*, *necto- adhérer*. La vitronectine est une glycoprotéine synthétisée par les hépatocytes et sécrétée dans le plasma à une concentration d'environ 300 µg/mL. La vitronectine est également retrouvée dans d'autres fluides corporels. La vitronectine de poids moléculaire de 75 kDa, existe aussi sous une forme insoluble dans les MECs où elle est sécrétée par d'autres types cellulaires telles que les cellules endothéliales ou encore les cellules cancéreuses ovariennes [46].

La vitronectine est composée de plusieurs domaines fonctionnels qui lui permettent différents types d'interactions :

- Son domaine situé à l'extrémité N-terminale lui permet d'interagir avec le récepteur de l'urokinase (uPAR) et l'inhibiteur de l'urokinase PAI-1.
- Comme pour la fibronectine, la vitronectine est constituée d'une séquence RGD reconnue par les récepteurs cellulaires de types intégrines. Les principaux récepteurs de la vitronectine sont les intégrines de la famille αv , en particulier l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Toutefois, elle est également reconnue par les intégrines $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$ et $\alpha 11\beta 3$ [47].
- Le domaine central de la vitronectine interagit avec le complexe thrombine-anti-thrombine III.
- Le domaine C-terminal de la protéine permet l'interaction à l'héparine, aux collagènes, aux GAGS, au plasminogène et aux composants du système du complément.

La vitronectine est une protéine, tout comme la fibronectine, qui a plusieurs fonctions. La vitronectine joue un rôle dans l'adhérence, l'étalement et la migration des cellules. Elle joue le rôle de molécule d'adhérence cellulaire *via* les intégrines, et particulièrement l' $\alpha v\beta 3$. Elle intervient dans la régulation des cascades d'enzymes protéolytiques de la coagulation sanguine, de la fibrinolyse et du système du complément. La vitronectine régule la dégradation protéolytique de la MEC en interagissant avec des composants du système uPA/uPAR (urokinase Plasminogen Activator/urokinase Plasminogen Activator Receptor). La vitronectine a donc un rôle dans différents processus physiologiques et pathologiques.

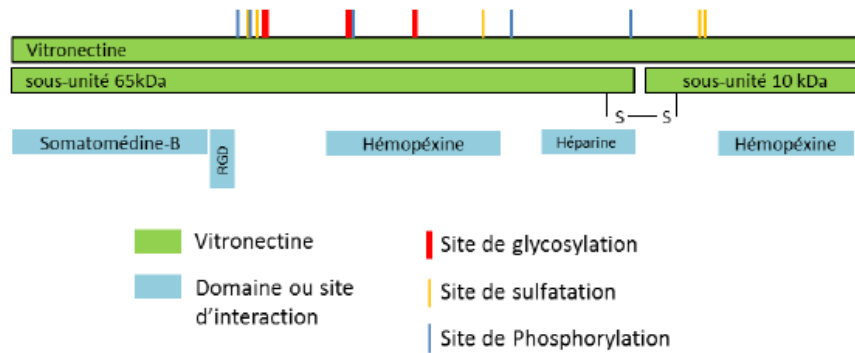


Figure 12 : Structure de la vitronectine et de ses domaines de liaison.

D'après la Protein Data Bank #P04004.

Il a été montré que la vitronectine est exprimée par différentes lignées cancéreuses ovarienne [46]. Il a aussi été démontré qu'une grande proportion d'épithélium ovarien normaux et de tumeurs hautement différenciées exprimaient simultanément les sous-unité αv , $\beta 3$ et la vitronectine, en revanche, dans tous les carcinomes modérément et peu différenciés, il n'y avait pas la présence de la sous-unité $\beta 3$ ou de vitronectine [48].

3.1.4. Les laminines

Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques de grande taille avec un poids moléculaire de 400 à 1000 kDa. Les laminines sont composées par l'assemblage de 3 chaînes polypeptidiques : α (alpha), β (bêta) et γ (gamma). Il existe 5 sous-unités de chaînes α , 3 pour β et 3 pour γ . Cette diversité des chaînes permet des combinaisons différentes portant le nombre d'isoforme de la laminine à 15.

Les laminines sont l'un des constituants protéiques majeurs de la lame basale. En plus de ses fonctions structurales, la laminine régule également l'adhésion cellulaire et la migration, ce qui montre un rôle dans l'homéostasie tissulaire et la morphogenèse. Ceci est partiellement médié par les interactions entre la laminine et d'autres molécules de la MEC. Effectivement la chaîne α de la laminine permet la liaison avec plusieurs protéines telles que les intégrines *via* la séquence RGD, les protéoglycanes ou bien l'héparane sulfate. Les chaînes β et γ fixent les molécules de collagène et particulièrement le collagène IV (Figure 13).

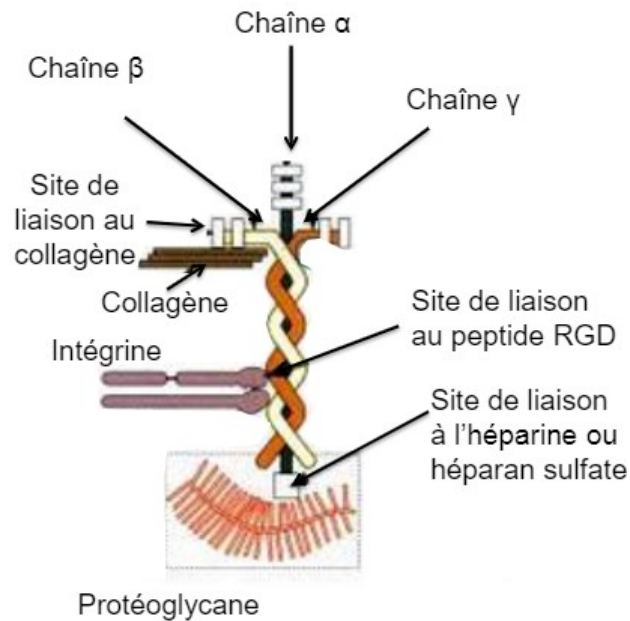


Figure 13 : Structure de la laminine et de ses domaines de liaison.

Modifié d'après « *Histologie et biologie cellulaire : Une introduction à l'anatomie pathologique*, Kierszenbaum, 2015 »

Les stromas des carcinomes ovariens sont constitués en partie de laminine [49]. Les chaînes $\alpha 1$ et $\beta 2$ de la laminine sont typiques des carcinomes séreux tandis que la chaîne $\alpha 4$ est associée aux carcinomes mucineux [31]. Une augmentation de la prolifération, de l'adhérence et de la migration a été observée dans des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire en réponse à la laminine [37].

3.1.5. Le fibrinogène

Le fibrinogène est une protéine qui a plusieurs similitudes avec la fibronectine. Appelée aussi facteur I de la coagulation, le fibrinogène est une protéine soluble présente abondamment dans le plasma à une concentration variant entre 2 à 4 g/L. Cette protéine est synthétisée et sécrétée par les cellules du foie.

En termes de fonction, le fibrinogène possède un rôle majeur dans le processus d'hémostase lors d'une brèche vasculaire. C'est une protéine de l'inflammation impliquée lors de la réparation tissulaire qui module l'activité des plaquettes sanguines et des cellules endothéliales. Cette protéine participe au phénomène d'agrégation plaquettaire lors de l'hémostase primaire et représente également la protéine de la phase finale de la coagulation, en permettant la formation du caillot de fibrine. Plusieurs situations pathologiques vont conduire à une hyperfibrinogénémie (excès de fibrinogène) telles que les cancers, les

syndromes inflammatoires, le syndrome néphrotique, l'utilisation de traitements antirétroviraux.

En termes de structure, le fibrinogène est une molécule de 340 kD mesurant environ 45 nm de long. La molécule est constituée de 3 paires de chaînes polypeptidiques α , β et γ enroulées de façon hélicoïdale de masse molaire comprise entre 48 et 70 kDa. Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures et forment ainsi la protéine comportant plusieurs domaines : deux domaines D présents à chaque extrémité de la molécule, et en son centre, un domaine E. L'extrémité NH₂-terminale des chaînes α et β correspond respectivement au fibrinopeptide A et au fibrinopeptide B. Le clivage des deux paires de fibrinopeptides (A et B), localisées sur le domaine central E, convertit le fibrinogène en fibrine. Les monomères de fibrine se polymérisent en un réseau de fibres de fibrine (Figure 14).

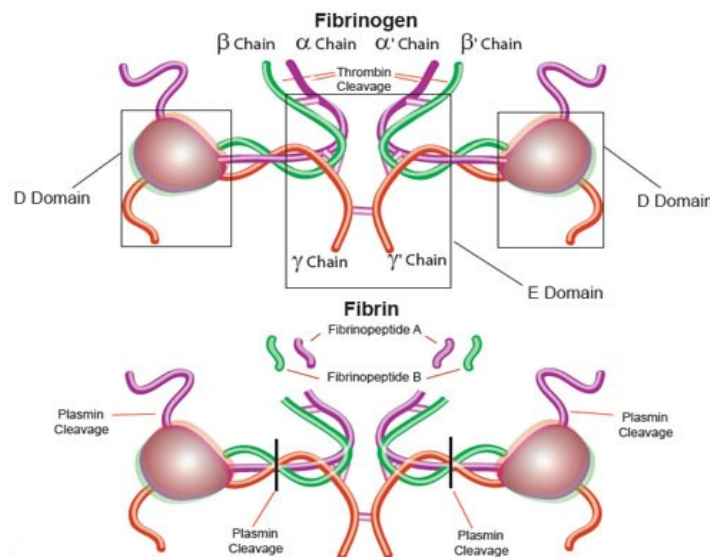


Figure 14 : Structure du fibrinogène et de la fibrine.

Modifié d'après Sigma-Aldrich

Ce mécanisme est appelé fibrinogenèse, c'est un processus ordonné et complexe comprenant plusieurs étapes (Figure 15) :

- La polymérisation de la fibrine est initiée par le clivage des extrémités NH₂-terminales des chaînes peptidiques A α et B β du fibrinogène par la thrombine, entraînant le relargage des fibrinopeptides A. Cette modification catalytique donne naissance à un monomère de fibrine.
- La formation d'oligomères de fibrine se met en place puis celles de protofibrilles, structures composées de plusieurs monomères de fibrine liés entre eux de façon longitudinale.

- L'agrégation latérale des protofibrilles s'en suit, conduisant à la formation de fibres de fibrine : l'élongation et l'épaississement des fibres de fibrine et le branchement entre protofibrilles permet la structure tridimensionnelle et la réticulation du réseau de fibrine.
- La consolidation de la structure par le FXIIIa clôt le processus de fibrinoformation. Le FXIII est une transglutaminase qui nécessite une activation calcium-dépendante par la thrombine. Lorsque ce facteur est activé, il permet de former des liaisons covalentes entre les monomères de fibrine, ce qui permet de consolider le réseau de fibrine. Ce phénomène est appelé le « cross-linking » de la fibrine.

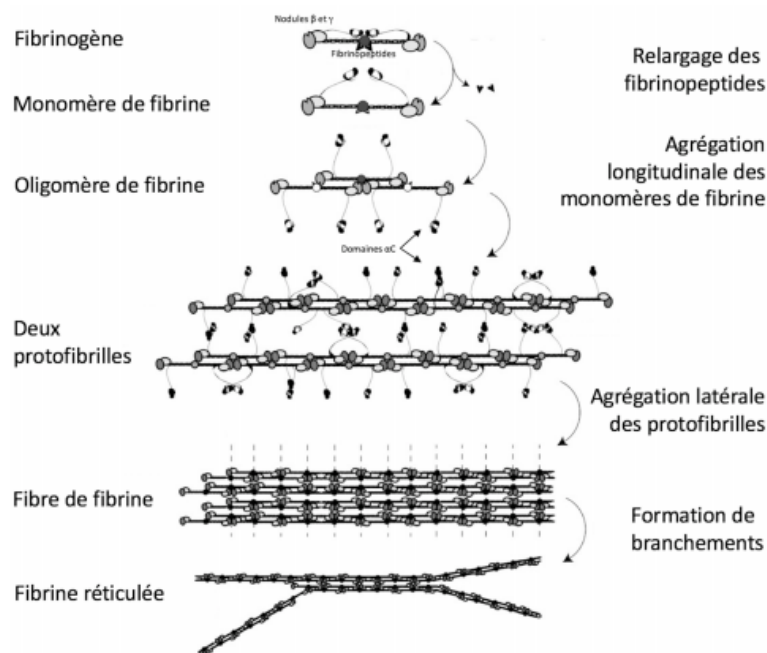


Figure 15 : Etapes de la fibrinoformation.

Modifié d'après Weisel et al. [50]

Un autre mécanisme existe concernant la fibrine : la fibrinolyse. C'est un processus physiologique complexe de dissolution des caillots sanguins (qui sont constitués de fibrine) par la plasmine. Par ce mécanisme, la fibrinolyse diminue la quantité de fibrine dans le sang, par conséquent contribue à protéger l'organisme contre les risques de thrombose (caillot de sang). La lyse du maillage de fibrine est assurée par la plasmine, forme activée du plasminogène. Cette dernière est activée par l'urokinase qui provient de la pro-urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). L'hydrolyse de la fibrine polymérisée se produit lorsque le plasminogène est activé à proximité de la fibrine. La plasmine clive la fibrine dans la région enroulée entre les domaines D et E ainsi que le clivage d'un peptide de la région C-

terminale de la chaîne a produisant ainsi des produits de dégradation de la fibrine appelés D-Dimères (Figure 16).



Figure 16 : Structure de la fibrine dégradée.

Modifié d'après Sigma-Aldrich.

Les multiples domaines du fibrinogène et de la fibrine leur permettent de jouer un rôle non seulement dans l'hémostase mais aussi dans la cicatrisation, la migration et la prolifération cellulaire grâce à des interactions avec les cellules endothéliales, les leucocytes ainsi que les composants de la MEC.

Le fibrogène est présent dans le plasma sanguin dont les taux augmentent dans les états inflammatoires tels que le cancer de l'ovaire [51]. Le fibrinogène et la fibrine sont aussi des composants réguliers du stroma de tumeurs solides. Une grande partie du fibrinogène extravasé est rapidement coagulé en fibrine par la tumeur.

3.2. Les récepteurs d'adhésion cellulaire

Les récepteurs d'adhérence cellulaire permettent aux cellules d'interagir avec d'autres cellules et avec leur environnement. Les interactions entre les récepteurs d'adhérence cellulaire et leurs ligands organisent les cellules au sein des tissus. Toutes les molécules d'adhérence cellulaire sont des protéines transmembranaires et possèdent un domaine extracellulaire en interaction avec les ligands matriciels et un domaine cytosolique interagissant avec des protéines adaptatrices, de structure et de signalisation, en contact avec le cytosquelette. Ces interactions cellulaires peuvent être fortes et stables ou alors transitoires. Les récepteurs d'adhésion cellulaire ont donc pour propriété fondamentale l'ancrage des cellules entre elles ou à la MEC pour assurer la cohésion d'un tissu. Outre leur rôle structural, ces récepteurs d'adhésion ont comme fonction la capacité de transformer une information extracellulaire en un message intracellulaire biochimique. En réponse à ses signaux, les cellules modulent leur comportement cellulaire (modifient leur adhésion à la MEC ou régulent la prolifération, la

différenciation, la migration, l'apoptose...). Ainsi, les récepteurs d'adhésion cellulaire sont des instruments de signalisation bidirectionnelle à travers la membrane plasmique. Il existe quatre principales familles de récepteurs d'adhérence cellulaire : les intégrines, les cadhérines, la superfamille des immunoglobulines et les sélectines.

3.2.1. Interactions cellules – matrice extracellulaire : les intégrines un élément essentiel

Bien que certains protéoglycanes, notamment de la famille des syndécanes, remplissent le rôle d'adhésion entre les cellules et la MEC, les principaux récepteurs d'adhérence sont les intégrines.

Les intégrines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités α et β . Elles constituent une large famille de glycoprotéines situées à la surface de la membrane cellulaire, ce sont des récepteurs de diverses molécules de la MEC. A ce jour, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été répertoriées. Leur combinaison génère 24 intégrines différentes. Ces différentes combinaisons confèrent aux intégrines leurs spécificités de liaison, de fonction et de localisation.

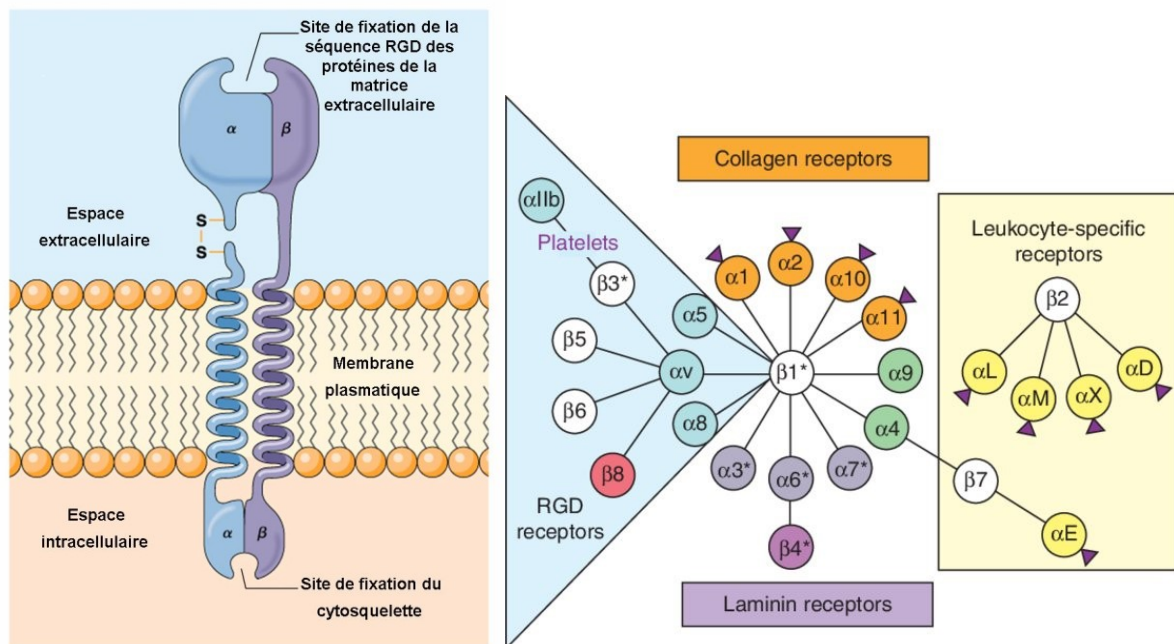


Figure 17 : Schéma d'une intégrine et répertoire des intégrines liant des protéines de la MEC

D'après « *Biology, 5th edition, Campbell et al.* » et Hynes et Naba [52]

Les intégrines sont essentiellement les molécules responsables des interactions cellule-MEC. Leurs principaux ligands extra-cellulaires sont les collagènes I et IV, la laminine, la fibronectine,

la vitronectine, le fibrinogène (Figure 17). Certaines sous-unités α ne peuvent s'associer qu'avec une seule sous-unité β , c'est le cas de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, qui est le récepteur spécifique de la fibronectine [41].

Les intégrines interagissent avec les ligands matriciels *via* des séquences spécifiques et peuvent être classées en fonctions des séquences reconnues (Tableau 2).

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

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

Les deux principales fonctions des intégrines sont donc l'attachement de la cellule à la MEC, mais aussi la transduction de signaux de la MEC vers la cellule. Ce type de signaux « outside-in » résulte de l'interaction des intégrines avec des macromolécules de la MEC et a pour conséquence de moduler le comportement cellulaire : forme, polarité, prolifération, migration, survie, différenciation...

Les intégrines jouent un rôle central dans la signalisation cellulaire. Suite à la fixation du ligand sur les intégrines, les intégrines se regroupent (cluster d'intégrines) et activent des voies de transduction intracellulaires faisant intervenir des protéines kinases. Ces dernières, dépourvues d'activité enzymatique intrinsèques, interagissent avec des molécules intracellulaires de structure, comme la vinculine, la taline ou la paxiline (Figure 18) et des molécules de signalisation comme FAK (Focal Adhesion Kinase) ou Src [53]. Ces complexes multimoléculaires forment des adhésions focales qui sont des transducteurs qui convertissent les informations mécaniques du microenvironnement en signaux biologiques. Ces informations peuvent être la composition biochimique, la topographie ou encore la rigidité de l'environnement extracellulaire [54].

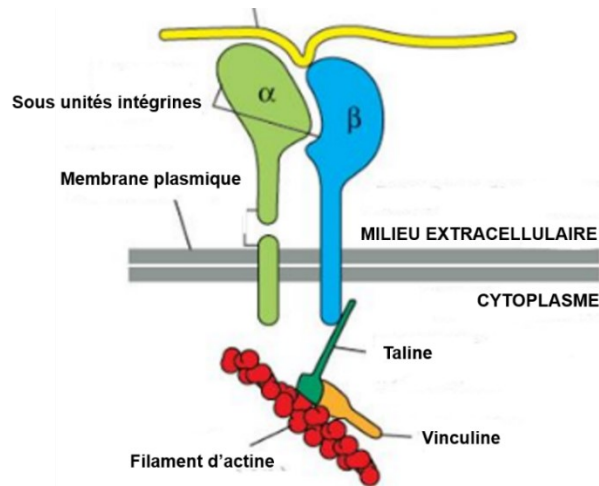


Figure 18 : Schéma d'un complexe multimoléculaire formant une adhésion focale.

Modifié d'après « *Molécular Biology of the cell, 4th edition, Bruce Albert et al.* »

3.2.2. Interactions cellules – cellules

Le contact cellule-cellule est un élément central pour le contrôle de la polarité cellulaire, de l'organisation des tissus et de la compartimentation des organes.

Les jonctions adhérentes permettent un maintien de la morphologie et des fonctions normales des cellules épithéliales. Elles interviennent également dans la stabilisation des cellules dans le phénotype de différenciation. Les cadhérines forment ces jonctions adhérentes. Les jonctions serrées appelées aussi étanches ou imperméables sont caractéristiques des tissus épithéliaux. Elles bloquent la circulation de fluides entre les cellules et assurent ainsi l'étanchéité entre deux compartiments tissulaires. Les éléments principaux contribuant à la formation de ces jonctions sont deux protéines nommées claudine et occludine (Figure 19). L'ensemble de ces jonctions assurent la cohésion entre les cellules et le maintien des tissus.

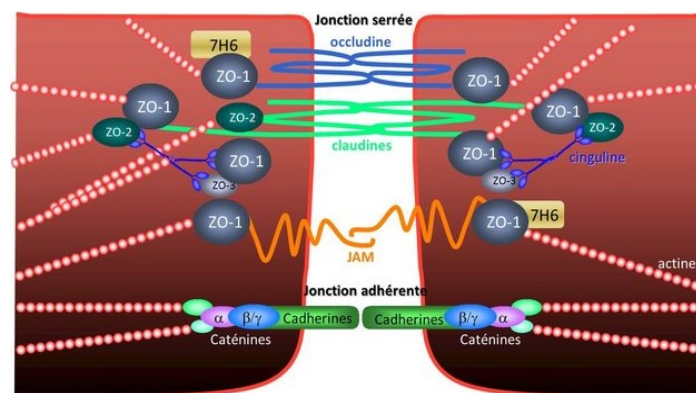


Figure 19 : Interactions entre les principales protéines formant les jonctions serrées et adhérentes.

D'après Abbott et al. [55]

3.2.2.1. Les Cadhérines

Les cadhérines, principales protéines de l'adhérence intercellulaire, sont des glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle important dans les processus du développement embryonnaire ainsi que dans les processus pathologiques. Les cadhérines sont une grande famille de protéines transmembranaires comprenant plus de 350 membres très divers en termes de structure et de fonctions. La famille des cadhérines comporte différents membres identifiés, dont l'expression est spécifique du tissu : la E-Cadhérine (Epithéliale), la N-Cadhérine (Nerveuse), la P-Cadhérine (Placentaire), la VE-Cadhérine (Endothélium Vasculaire) ... Les cadhérines sont indispensables à la formation des complexes de jonction adhérentes : les domaines extracellulaires d'une cadhérine interagissent avec les domaines d'une autre cadhérine sur une cellule voisine et le domaine cytoplasmique permet de lier les filaments d'actine ou les microtubules par l'intermédiaire des caténines (Figure 19).

La perte de fonction ou d'expression des cadhérines peut entraîner de sérieuses conséquences physiopathologiques tel que le développement tumoral [56]. Par exemple, la dérégulation de l'E-cadhérine contribue à l'acquisition d'un phénotype invasif dans de nombreuses tumeurs de type épithéliales [57,58].

3.2.2.2. Les Occludines

La claudine et l'occludine sont des protéines transmembranaires présentent notamment dans les jonctions serrées pour assurer les fonctions de cohésion de cette structure cellulaire spécifique. Ce sont des molécules qui traversent quatre fois la membrane et présentent deux boucles extracellulaires. Ces protéines transmembranaires sont associées à d'autres protéines comme la ZO-1, la ZO-2, la ZO-3. La ZO-1 interagit avec la spectrine, elle-même reliée aux microfilaments d'actine du cytosquelette (Figure 19).

Plusieurs études ont révélé que la dissociation des jonctions serrées est une étape clé dans la progression tumorale. Effectivement, plusieurs carcinomes sont associés à une perte de polarité cellulaire et à la dissociation des jonctions serrées. Par exemple, la claudine 1 est fortement exprimée dans plusieurs cancers colorectaux et la claudine 4 dans les cancers de l'ovaire. De plus, les oncogènes Ras et Raf-1 entraînent la délocalisation de l'occludine et la dissociation des jonctions serrées [59].

3.3. Les cellules stromales

En plus du microenvironnement matriciel, les cellules du stroma jouent aussi un rôle essentiel sur le développement tumoral. Au sein du microenvironnement tumoral ovarien, différents types cellulaires sont retrouvés : fibroblastes, cellules endothéliales, les adipocytes, cellules immunitaires ... (Figure 20)

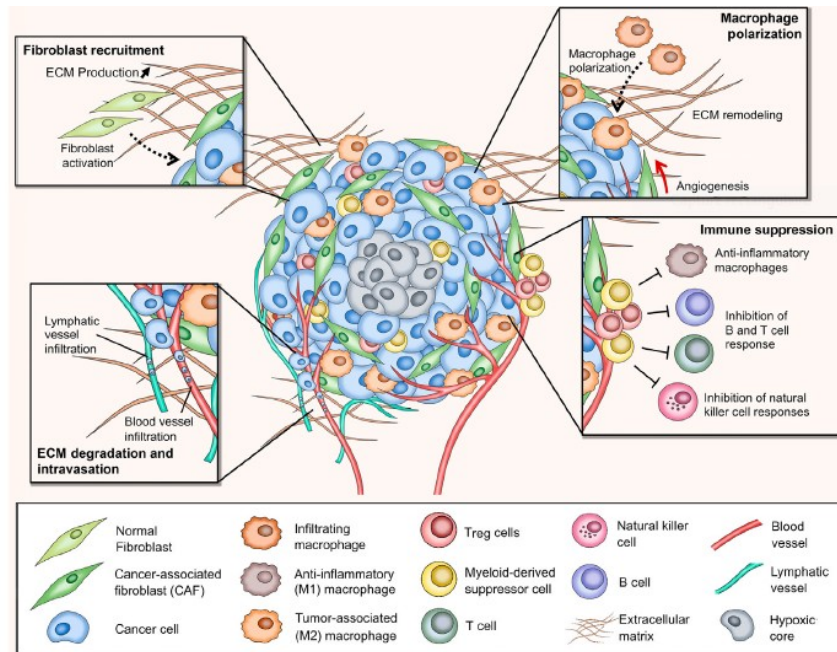


Figure 20 : Représentation du microenvironnement tumoral et des différentes cellules stromales qui le composent

D'après Rodrigues et al. [60].

3.3.1. Les fibroblastes associés au cancer

Les fibroblastes quiescents constituent la population cellulaire la plus abondante du stroma. Dans le contexte des tumeurs épithéliales, les fibroblastes sont dans un état activé et sont appelés FACs (Fibroblastes Associés au Cancer). La détection des FACs est généralement associée à un pronostic clinique défavorable, car ces cellules sont connues pour jouer un rôle à chaque étape de la tumorigenèse : l'initiation, la croissance, l'invasion ou les métastases. Dans cette partie nous nous intéressons aux fibroblastes retrouvés au niveau du site primaire de la tumeur.

C'est un échange entre les cellules cancéreuses et fibroblastiques qui intervient puisque le TGF- β , produit et sécrété par les cellules cancéreuses, favorise l'activation des fibroblastes en FACs. A leur tour, les fibroblastes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-6), des chimiokines (SDF-1), des facteurs de croissances (VEGF), des protéases (MMPs) et des

molécules de la MEC (Fibronectine) ce qui stimulent la progression tumorale et le développement d'une résistance aux chimiothérapies [61,62].

Les fibroblastes sont les cellules produisant le plus de MEC que ce soit dans des conditions pathologiques ou physiologique [63]. Cette sécrétion de MEC accrue par les fibroblastes aboutit à une activité pro-tumorale qui favorise la création d'une niche métastatique [64,65]. De plus, la rigidité de la MEC joue aussi un rôle primordial dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules cancéreuses, cette rigidité est due à un dépôt accru de protéines de la MEC, notamment de collagène I, et de modifications post-traductionnelles des protéines qui la composent. Les FACs sont les principaux médiateurs de ces changements [63].

En plus d'une production abondante de MEC, les FACs produisent une grande quantité de protéases, ce qui dérégule l'équilibre entre la production et la dégradation des protéines par les cellules saines. Il y a donc une action couplée des cellules cancéreuses et des FACs, qui produisent toutes deux des métalloprotéases matricielles (MMPs), notamment MMP2, MMP9, MMP13 et MMP14 [66].

Les FACs créent donc un environnement inflammatoire favorisant ainsi le recrutement de cellules immunitaires, l'angiogenèse, la croissance et l'invasion tumorale [67].

3.3.2. Les cellules immunitaires et les macrophages associés au cancer

Le stroma se compose également de cellules immunitaires comme les lymphocytes T et les macrophages. La pathologie cancéreuse entraîne un état inflammatoire proche d'un état d'inflammation chronique. Le recrutement des macrophages dans les tumeurs est assuré par les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissances provenant des cellules cancéreuses et des cellules du stroma. Les chimiokines les plus importants pour ces cellules sont les CCL (chemokine (C-C motif) ligand) : CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CCL22 [68]. Les macrophages associés aux tumeurs (MAT), sont généralement observés aux limites de la tumeur, ils sont capables d'induire une immunosuppression dirigée principalement vers les lymphocytes T [69]. Dans les phases initiales, les macrophages infiltrant une tumeur présentent le phénotype M1 et expriment une série de cytokines, chimiokines et molécules effectrices pro-inflammatoires, telles que l'Interleukine-12 (IL-12), IL-23, TNF- α , iNOS et MHCI / II ce qui tend à réduire la malignité. Au fur et à mesure que la pathologie progresse, les macrophages adoptent la fonction M2 et expriment un large éventail de molécules anti-inflammatoires, telles que l'IL-10, le TGF- β et commencent à modifier le microenvironnement en un phénotype favorisant la progression cancéreuse [68]. Les macrophages associés aux tumeurs et leurs sécrétions telles que les cytokines, chimiokines et MMPs

favorisent l'angiogenèse, la croissance, les métastases et l'immuno-modulation de la tumeur [70].

3.3.3. Les adipocytes associés au cancer

Les adipocytes, présents dans l'environnement de la tumeur, semblent eux aussi jouer un rôle dans la malignité tumorale. Au cours de leur interaction avec les cellules cancéreuses, les adipocytes se différencient en pré-adipocytes ou sont reprogrammés en adipocytes associés au cancer (AACs). Nieman et al montrent que les adipocytes omentaux humains primaires favorisent la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de l'ovaire et que les adipokines, notamment l'interleukine-8 (IL-8), assurent la médiation de ces activités. La co-culture de cellules adipocytaires et de cellules cancéreuses ovariennes a entraîné le transfert direct de lipides des adipocytes vers les cellules cancéreuses de l'ovaire ce qui a favorisé la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Les cellules cancéreuses et les AACs participent également à un échange dynamique de métabolites. Plus précisément, les AACs libèrent des acides gras par lipolyse, lesquels sont ensuite transférés aux cellules cancéreuses et utilisés pour la production d'énergie par β -oxydation [71,72].

3.4. La vascularisation tumorale et la voie lymphatique

La survie et le développement des tumeurs dépendent d'événements et d'échanges biologiques assurés par le sang et la lymphe.

3.4.1. La vascularisation sanguine

Une tumeur peut grossir jusqu'à un volume de 1-2 mm³ avant que la diffusion de l'oxygène et des nutriments soit rendue impossible. Pour pallier à ce problème les cellules endothéliales acquièrent un phénotype pro-angiogénique qui permet d'initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux existants dans le stroma environnant [73]. La néoangiogenèse est sous le contrôle de différents facteurs pro- et anti-angiogénique. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) et le FGF (fibroblast growth factor) sont sécrétés par les cellules cancéreuses ce qui active les cellules endothéliales qui vont proliférer et migrer conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux. Les FACs participent également à l'angiogenèse tumorale par la production du VEGF ou du facteur SDF-1 (stromal cell-derived factor)/CXCL12, ce dernier étant impliqué à la fois dans le recrutement de progéniteurs endothéliaux au sein même de la tumeur, et dans la croissance tumorale par la liaison à son

récepteur CXCR4 (C-X-C motif Chemokine Receptor type 4) à la surface des cellules cancéreuses [74]. Les carcinomes ovariens sont donc des tumeurs solides et vascularisées, cependant la dissémination hématogène de cellules cancéreuses ovariennes reste un phénomène extrêmement rare [75]. L'approche thérapeutique pour empêcher cette vascularisation repose sur des molécules anti-angiogéniques ciblant le VEGF et ses récepteurs ce qui a pour but de limiter la croissance de la tumeur [76]. La mise en place de ce système vasculaire permet la survie du foyer primaire, cependant, cette vascularisation n'est pas la première cause de dissémination des cellules cancéreuses ovariennes puisque la voie hématogène est un mode de dissémination rare dans le cancer de l'ovaire épithélial.

3.4.2. La vascularisation lymphatique

Le système lymphatique constitue un vaste ensemble de vaisseaux qui drainent une partie des liquides interstitiels sous forme de lymphe vers les organes lymphoïdes et vers le cœur. La lymphe passe par des ganglions lymphatiques qui sont à la fois des filtres mécaniques et des barrières immunitaires s'opposant à la progression d'éléments pathogènes véhiculés par celle-ci. Parmi ces éléments peuvent se trouver des cellules cancéreuses qui peuvent soit être détruites dans les ganglions soit s'y développer avant de poursuivre leur propagation vers d'autres organes [77]. La production, par les cellules cancéreuses, de facteurs de croissance stimule la néoformation des vaisseaux lymphatiques. Au cours du développement tumoral, le système lymphatique est considéré dans de nombreux cas de cancers comme la voie primaire de dissémination des métastases. Dans le cas du cancer de l'ovaire, cela est extrêmement rare et ce sont majoritairement les ganglions lymphatiques qui sont colonisés par dissémination *via* la lymphe. Une lymphadénectomie qui est l'ablation chirurgicale de certains ganglions lymphatiques ne semble pas permettre un taux de survie plus élevé, ceci démontre que la voie de dissémination lymphatique n'est pas la voie principale dans la dissémination cancéreuse ovarienne [78].

Chapitre 2 : Dissémination métastatique et microenvironnement ascitique

Dans le cancer de l'ovaire, la dissémination métastatique ne se fait que très rarement par voie sanguine et lymphatique. Dans les cas de tumeur épithéliale de l'ovaire, il y a une dissémination par extension aux organes avoisinants : les trompes de Fallope, l'utérus et le colon. Les cellules sont capables de se détacher de la tumeur primaire et se retrouver dans des fluides péritonéaux, appelés ascites, ce qui permet aux cellules de se propager dans la cavité péritonéale pour venir coloniser des niches métastatiques du péritoine. (Figure 21)

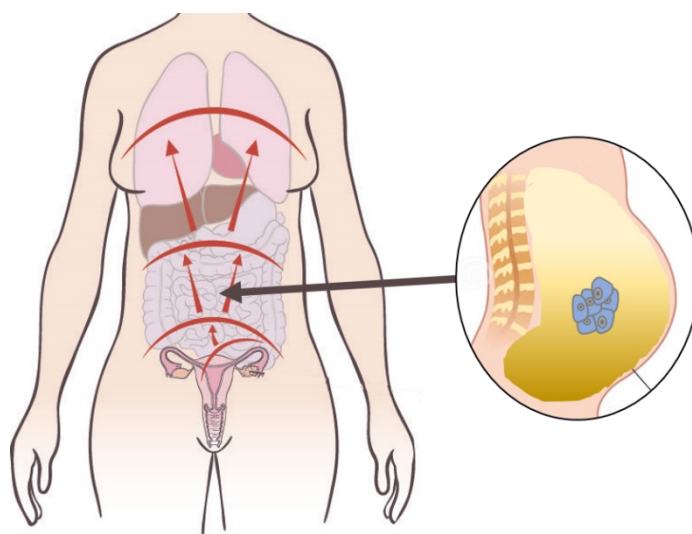


Figure 21 : Emplacement du « microenvironnement ascitique ».

Modifié d'après « Vivre avec un cancer de l'ovaire ».

1. L'ascite, un microenvironnement unique et complexe

L'ascite est une accumulation anormale de liquide inflammatoire dans l'abdomen qui peut atteindre plusieurs litres (Figure 22). La présence d'ascite est généralement liée à une cirrhose hépatique, cependant dans 10% des cas elle est associée au développement tumoral. Le principal cancer associé à la présence d'ascite est le cancer de l'ovaire, représentant 38 % des ascites malignes chez la femme [79]. Au moment du diagnostic, plus d'un tiers des patientes atteintes de carcinomes ovariens présente une accumulation d'ascite dans la cavité péritonéale. L'incidence d'apparition de l'ascite varie allant de 45 à 75 % selon le sous-type histologique de carcinome ovarien, le type séreux étant le plus fréquemment associé à la présence d'ascite [80]. De plus, au-delà du sous-type histologique, il semble aussi y avoir une relation entre la présence d'ascite et le stade tumoral. Effectivement, aux stades « précoces » (I-II, selon la classification FIGO) le taux d'apparition de l'ascite est d'environ 17% contre 89% pour les stades « avancés » (III-IV, selon la classification FIGO). Il y a aussi un parallèle entre

l'apparition de l'ascite et sa quantité dans l'abdomen, puisque les volumes d'ascite sont généralement inférieurs à 0,5 litres au moment de la chirurgie pour les patientes atteintes d'un cancer ovarien de stades I-II, alors qu'ils sont largement supérieurs chez la plupart des patientes à un stade avancé de la maladie (III-IV) [81]. Lorsque l'accumulation d'ascite dépasse un certain volume, environ 1,5 L, elle devient cliniquement détectable. Le volume important d'ascite dans l'abdomen entraîne des symptômes tels que l'augmentation du volume de l'abdomen, des nausées, une gêne respiratoire... [79]. La survie à 5 ans est de 45 % pour des patientes ne présentant pas d'apparition d'ascites contre 5 % pour des femmes avec un carcinome ovarien à un stade avancé avec présence d'ascite [82]. Avec toutes ces données, la présence d'ascite est considérée comme un facteur de mauvais pronostic [83].

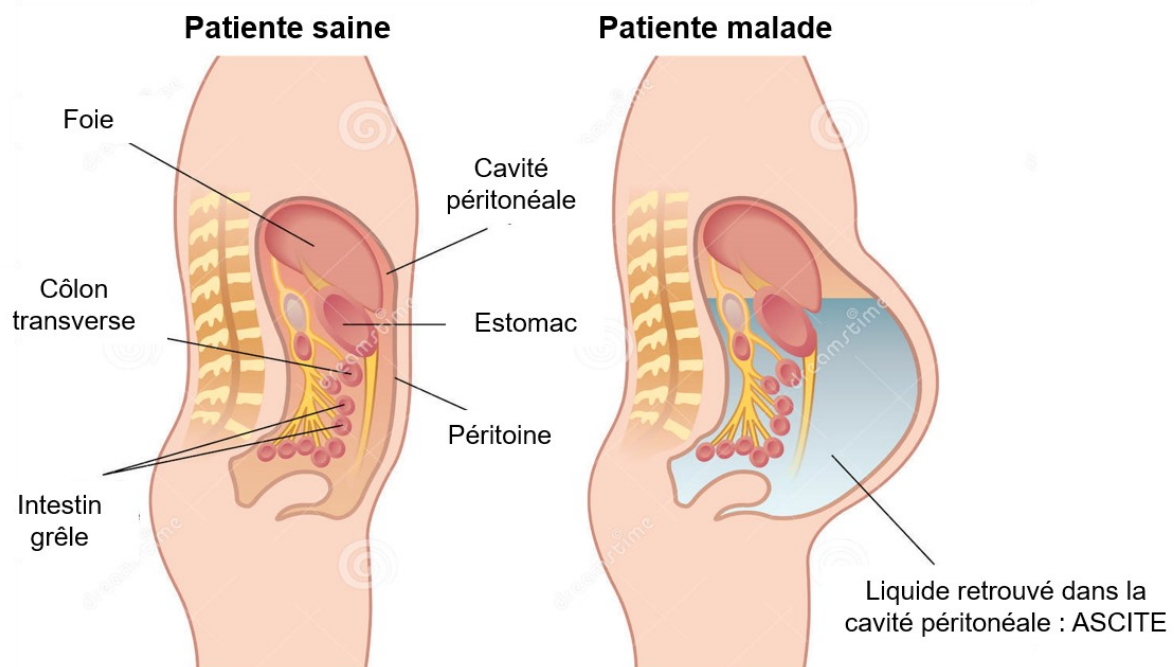


Figure 22 : Localisation de l'ascite chez les patientes malades.

Modifié d'après la plateforme « depositphotos ».

1.1. Formation de l'ascite

La séreuse péritonéale est le revêtement lisse du péritoine à l'intérieur de laquelle circule, à l'état physiologique, une faible quantité de liquide péritonéal. Celui-ci provient du liquide interstitiel produit par les capillaires lymphatiques situés sous le mésothélium.

Ce liquide a pour rôle de maintenir les surfaces séreuses de la paroi péritonéale lubrifiées ce qui favorise le glissement des organes sans frictions et permet le passage de solutés entre la

paroi péritonéale et les organes adjacents. Son volume physiologique est compris entre 20 et 50 mL [84]. La formation d'une ascite pathologique résulte d'un déséquilibre entre production et résorption de ce liquide. La résorption peut être diminuée en cas d'obstruction des canaux lymphatiques sous-péritonéaux. Cette obstruction est la plus souvent tumorale ou infectieuse [85]. La production excessive et la résorption restreinte ont pour conséquences une augmentation des volumes accumulés d'ascites pouvant varier de quelques millilitres à plusieurs litres ainsi que l'apport d'une richesse importante en protéines dans ce liquide.

Dans le cas du cancer de l'ovaire, on retrouve une accumulation de l'ascite dans la cavité péritonéale. Effectivement, la présence de cellules cancéreuses vient diminuer la réabsorption des fluides par les vaisseaux lymphatiques [79,86]. L'accumulation de l'ascite est aussi influencée par une surexpression du VEGF par les cellules cancéreuses, ce qui cause une hyperperméabilité des micro-vaisseaux de la cavité péritonéale [87,88].

1.2. Composition de l'ascite et impact sur le comportement cellulaire

Dans le cas du cancer de l'ovaire, l'ascite immerge la cavité péritonéale dans laquelle résident les cellules cancéreuses mais aussi beaucoup d'autres protagonistes. A ce titre, l'ascite représente un microenvironnement tumoral complexe qui contient une grande variété de composants solubles ainsi qu'une population hétérogène de cellules. De plus, c'est un microenvironnement particulier en raison de son caractère fluide.

1.2.1. Composante cellulaire de l'ascite

La fraction cellulaire de l'ascite se compose de cellules cancéreuses, de cellules mésothéliales, de cellules endothéliales, d'adipocytes, de fibroblastes, d'hématies, de cellules immunitaires, de cellules souches mésenchymateuse et de cellules souches cancéreuses [89–91] (Figure 23). C'est donc un mélange très hétérogène de cellules qui est retrouvé dans l'ascite. Cet ensemble de cellules peut être distingué en 2 parties : les cellules appelées « résidentes » et les cellules appelées « non-résidentes ». Les cellules cancéreuses ovariennes exfoliées à partir de la surface des ovaires et les cellules mésothéliales desquamées des organes de la cavité péritonéale, appartiennent au groupe des cellules résidentes. Dans le groupe des cellules « non-résidentes » des ascites sont retrouvés les macrophages, les monocytes, les hématies ou les cellules souches mésenchymateuses [92].

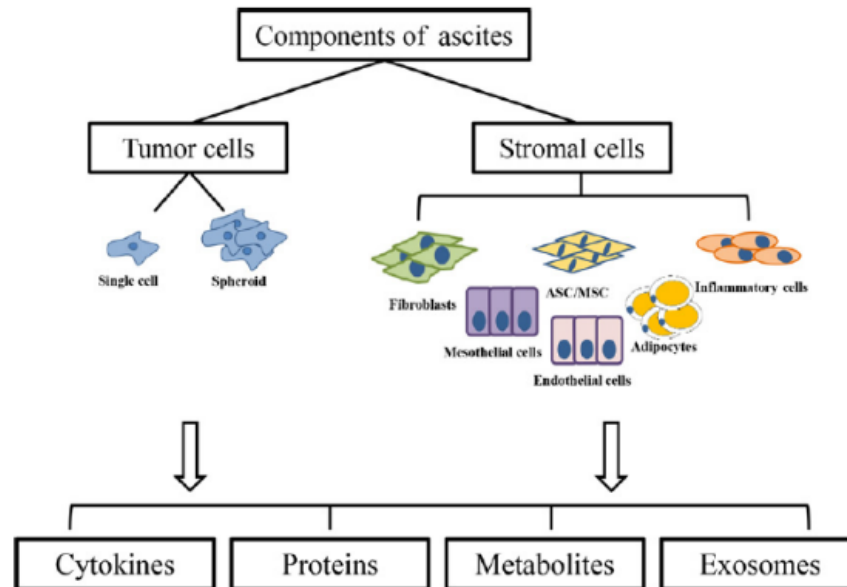


Figure 23 : Composition cellulaire et acellulaire de l'ascite.

D'après Kim et al. [91]

Une des caractéristiques particulières des cellules retrouvées dans l'ascite sont les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses ovariennes exfoliées du foyer tumoral primaire se retrouvent en suspension dans l'ascite sous forme individuelle et/ou sous forme d'agrégats multicellulaires appelés sphéroïdes. Ces sphéroïdes ont pu être isolés à partir de l'ascite [93]. Tous les différents types de cellules retrouvées dans l'ascite coopèrent au sein du microenvironnement tumoral *via* plusieurs « cross-talk » et contribuent au développement de la pathologie [94]. Par exemple, les cellules souches mésenchymateuses associées au carcinome retrouvées dans l'ascite, peuvent promouvoir l'angiogenèse et ainsi favoriser la progression tumorale [89]. La compréhension des interactions entre les cellules cancéreuses et les autres types cellulaires dans l'ascite permettrait de mieux comprendre les mécanismes de dissémination et de chimiorésistance des cellules cancéreuses.

1.2.2. Composante acellulaire de l'ascite

L'ascite contient des molécules provenant d'exsudats plasmatiques ainsi que des molécules bio-actives sécrétées à la fois par les cellules cancéreuses de l'ovaire et par le microenvironnement péritonéal. Dans cette partie acellulaire de l'ascite, sont retrouvées de nombreuses protéines de la MEC, des facteurs de la coagulation, des matrikines, des protéases, des cytokines et des chimiokines. Tous ces éléments ont la capacité de moduler le

comportement cellulaire et peuvent influencer la prolifération, l'angiogenèse et le potentiel de dissémination des cellules cancéreuses [90,91,95] (Figure 24).

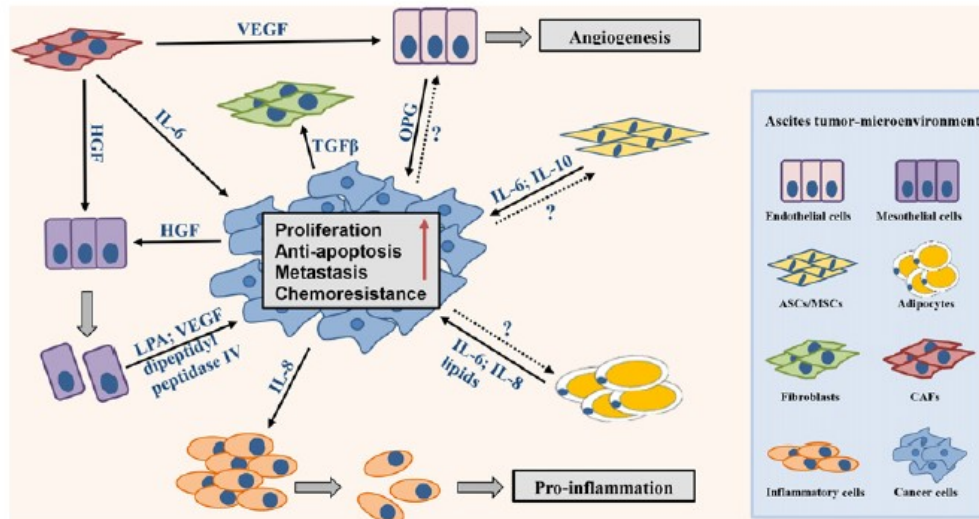


Figure 24 : Organisation des différentes voies de communication des divers composants cellulaires de l'ascite.

D'après Kim et al. [91]

La vitronectine est l'une des protéines de la MEC retrouvée dans l'ascite [96]. Selon les études, la concentration de la vitronectine dans l'ascite est en moyenne de 300 µg/ml, ce qui correspond à ses concentrations dans le plasma humain [40,97]. Des recherches montrent que la vitronectine est l'un des principaux facteurs chimioattractant présent dans les fluides ascitiques qui potentialise la migration des cellules cancéreuses. Cependant son activité peut être inhibée après liaison au fibrinogène [97,98].

D'après d'autres études du laboratoire, des isoformes de la vitronectine et la fibronectine ont été caractérisées dans les ascites et ces protéines ont pu être purifiées. Ces protéines, issues d'ascite après purification, ont favorisé l'adhérence, l'étalement et la migration de cellules cancéreuses ovariennes de manière intégrines dépendante. De plus, les cellules cancéreuses sont capables de remodeler la fibronectine ascitique [40].

Des études montrent des niveaux élevés de laminine dans les ascites des patientes atteintes de cancer de l'ovaire par rapport au liquide péritonéal sain [36].

L'ascite contient également des chimiokines, telle CCL18 dont l'expression a été associée à un mauvais pronostic dans certains cancers. Les niveaux de CCL18 sont nettement augmentés dans les ascites séreuses des cancers de l'ovaire par rapport aux épanchements

péritonéaux bénignes. L'ascite et CCL18 ont augmenté de manière dose-dépendante la migration de lignées cellulaires cancéreuses ovariennes [99].

Les cytokines sont produites à la fois par des cellules cancéreuses et des cellules mésothéliales péritonéales, et se concentrent dans l'ascite. Des études ont montré que des cytokines étaient présentes dans l'ascite à de fortes concentrations telles que l'IL-6 et IL-10. IL-6 contribue à la progression du cancer ovarien par inhibition de l'apoptose, la stimulation de l'angiogenèse, l'augmentation de la migration et l'invasion ainsi que la stimulation de la prolifération cellulaire.

Ainsi, en plus d'être associée à un mauvais pronostic vital, l'ascite par sa composition cellulaire et moléculaire, est à elle-même un microenvironnement complexe qui est un acteur clé du développement tumoral.

Ce véritable « réservoir » de protéines bioactives favorise la survie des cellules cancéreuses et leur mobilité. Ainsi, elle peut contribuer au développement d'une chimiorésistance et à la dissémination, deux processus sous-jacents à la récurrence des cancers ovariens.

2. Organisation des cellules cancéreuses en sphéroïdes

Une des particularités du cancer de l'ovaire est la capacité des cellules cancéreuses à se détacher du foyer primaire sous forme isolées et/ou organisées en agrégats multicellulaires appelés sphéroïdes. Ces sphéroïdes peuvent être retrouvés flottants dans l'ascite avant de se déposer sur les parois du mésothélium. Organisées en sphéroïdes, les cellules cancéreuses survivent dans l'ascite bien qu'elles ne soient pas adhérentes [92].

2.1. Formation des sphéroïdes

Avant que les cellules cancéreuses ovariennes ne disséminent dans la cavité péritonéale, elles subissent des réarrangements de leurs interactions cellules-cellules et cellules-MEC ce qui facilite leur détachement du foyer primaire.

Les sphéroïdes retrouvés dans les ascites peuvent bourgeonner à partir de cellules du foyer tumoral primaire ou se former suite au réarrangement en agrégats multicellulaire de cellules cancéreuses ovariennes isolées [100].

In vitro, l'ascite régule la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses mais aussi la formation des sphéroïdes [96,101,102]. Cette accentuation de la formation des sphéroïdes en ascite peut être liée à l'effet de l'ascite sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) [101]. Lors de la formation de ces sphéroïdes, les cellules cancéreuses ovariennes peuvent

subir une TEM, c'est-à-dire la perte d'un phénotype épithélial pour l'acquisition d'un phénotype plus mésenchymateux. Ceci se traduit par la perte d'expression de marqueurs épithéliaux tels que les E-Cadhérines ce qui aboutit à une diminution des interactions intercellulaires, favorisant le détachement des cellules cancéreuses du foyer primaire. De plus, il y a aussi surexpression des N- et P-Cadhérines, ce qui confère aux cellules cancéreuses des capacités migratoires et invasives accrues [103]. Pour que les cellules cancéreuses puissent développer un foyer tumoral secondaire, il faut un « switch » inverse des cadhérines et donc une transition mésenchymo-épithéliale (TME) qui permettra une meilleure prolifération des cellules. Cependant, ces transitions peuvent être que partielles, et certaines cellules ont un phénotype intermédiaire [104].

2.2. Capacité de survie des cellules en sphéroïdes

Les cellules cancéreuses ovariennes ont une capacité de survie très forte et mettent en place de nombreux mécanismes de résistance durant la cancérogenèse. Cependant la survie de ces cellules cancéreuses est accentuée lorsque les cellules sont organisées en sphéroïdes, notamment leur capacité à résister à l'anoïkis et à acquérir une chimiorésistance.

2.2.1. Résistance à la mort cellulaire par anoïkis

Les sphéroïdes, lors de la dissémination, sont capables de résister à l'anoïkis, c'est-à-dire à la mort cellulaire à la suite d'une perte d'encrage. Les intégrines permettent aux cellules de résister à l'anoïkis. L'étude de Carduner et al a montré que les signaux en aval des intégrines αv conduisent à l'activation de PKC et ERK1/2, des voies de signalisation de survie [105]. TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) est une cytokine capable d'induire l'apoptose en se liant à des récepteurs transmembranaires exprimés à la surface de la cellule cible. Par un jeu d'interactions protéiques, la fixation de TRAIL sur ces récepteurs agonistes (TRAIL-R1 et TRAIL-R2) conduit à l'activation de l'apoptose. L'ascite semble aussi favoriser la résistance à l'anoïkis *via* l'activation de FAK et Akt dans une voie dépendante de l'intégrine $\alpha v\beta 5$, ce qui confère une protection contre la mort cellulaire induite par TRAIL et par l'activation des caspases [106]. L'ostéoprotégérine (OPG) est présente à des niveaux élevés dans l'ascite chez les patients atteints de cancer de l'ovaire. Il a été montré une corrélation positive entre les niveaux d'OPG dans l'ascite et la capacité de l'ascite à atténuer la mort cellulaire induite par TRAIL [107]. La teneur élevée en VEGF dans les ascites favoriserait la survie des cellules cancéreuses ovariennes. Une étude montre que le VEGF-A et son récepteur, le VEGFR-2, protègent de l'anoïkis les cellules cancéreuses ovariennes en suspension dans l'ascite. Résultats impliquant que des agents bloquant le VEGF pourraient potentiellement induire l'apoptose des cellules cancéreuses [108]. L'ascite augmente la

transcription de Mcl-1 selon un processus Erk-1/-2 et Elk1-dépendant, ce qui induirait la protection des cellules cancéreuses de la mort par apoptose [109]. De plus, les E-Cadhérines sont surexprimées dans les cellules cancéreuses organisées en sphéroïdes et elles induisent une signalisation PI3K/AKT supprimant l'anoïkis [110].

Enfin, l'organisation tridimensionnelle des sphéroïdes permettraient aux cellules du centre des sphéroïdes d'être dans un état de quiescence, ce qui permettrait de surmonter la perte d'ancrage en attendant de pouvoir à nouveau adhérer dans un microenvironnement plus propice [111].

2.2.2. Acquisition de chimiorésistance

Les traitements par chirurgie et chimiothérapie sont efficaces pour réduire la masse tumorale, cependant la plupart des patientes rechutent rapidement après ces traitements. La présence résiduelle de cellules cancéreuses en suspension dans la cavité péritonéale est suffisante pour conduire à la formation de nouveaux foyers tumoraux. Effectivement, les sphéroïdes ont la capacité d'acquérir une chimiorésistance. La première raison est, tout comme pour la résistance à l'anoïkis, l'organisation tridimensionnelle des sphéroïdes qui entraîne une mauvaise délivrance des agents chimiothérapeutiques au cœur des sphéroïdes [112]. Le faible taux de prolifération des cellules cancéreuses dans les sphéroïdes serait une des raisons de la perte de sensibilité aux agents thérapeutiques ciblant le cycle cellulaire [113].

Les ascites des cancers ovariens séreux de haut grade auraient un rôle protecteur contre l'effet cytotoxique des agents chimiothérapeutiques en protégeant les cellules de l'apoptose induite par TRAIL [114]. L'IL-10, retrouvée dans l'ascite, contribue partiellement à l'inhibition de TRAIL par interaction avec d'autres facteurs solubles. Sa neutralisation inhibe l'effet protecteur des ascites [115].

De nombreuses découvertes ont démontré le rôle émergent des cellules immunitaires et des cellules hôtes dans cette résistance aux traitements *via* de nombreuses voies de signalisation [116].

Dans le cancer de l'ovaire, les voies AKT, NFκB et STAT3 jouent un rôle déterminant dans la médiation de la chimiorésistance en bloquant les mécanismes apoptotiques (Figure 25). PI3K /AKT de la voie de survie mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) est dérèglée dans environ 70% des cancers de l'ovaire par causes de mutations génétiques, notamment par amplification ou activation d'AKT1, PIK3CA (codant pour PI3K) ou mTOR mais aussi par inactivation de PTEN, TSC ou LKB1 [117,118].

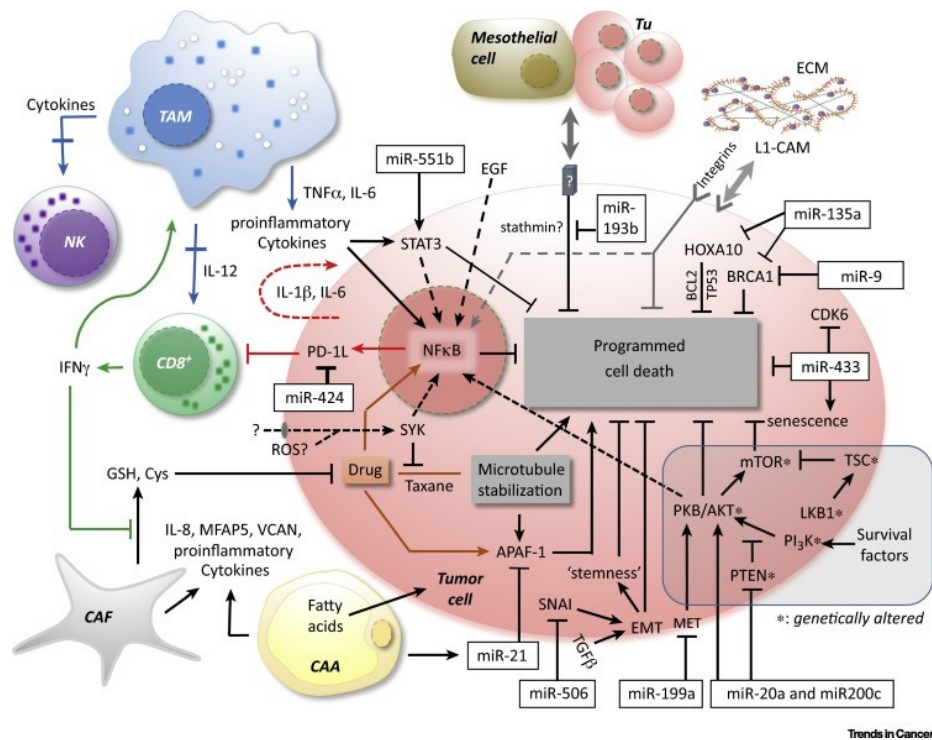


Figure 25 : Représentation schématique des voies de signalisation dans le microenvironnement du cancer de l'ovaire, impactant la réponse des cellules cancéreuses aux médicaments chimiothérapeutiques.

D'après Pogge et al. [116]

La formation des sphéroïdes ainsi que leur croissance et les capacités des cellules cancéreuses à résister à l'anoïkis et à développer une chimiorésistance est dû en grande partie à l'ascite et à ses divers constituants cellulaires et moléculaires qui le composent.

3. Intégrines, MEC et sphéroïdes

La cohésion des sphéroïdes ne suffit pas par l'interaction seule des cellules entres-elles, il est nécessaire que les cellules interagissent avec les éléments de la MEC qu'elles produisent ou la MEC environnante, pour former des sphéroïdes capables de survivre et de disséminer. Les cellules ovariennes saines et cancéreuses synthétisent certains ligands matriciels des intégrines. De plus, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et les intégrines des familles $\beta 1$ et $\beta 3$ sont les principales intégrines exprimées par les cellules ovariennes saines et cancéreuses, et sont susceptibles de jouer un rôle dans la biologie de ce cancer [119].

L'une des protéines clé dans la formation des sphéroïdes est la fibronectine. L'étude de R. Casey et ses collaborateurs a montré que l'apport exogène de fibronectine favorise la formation des sphéroïdes par les cellules cancéreuses ovariennes. A l'inverse, l'utilisation

d'anticorps bloquants anti- $\alpha 5$ ou anti- $\beta 1$ inhibe ce processus. Ces résultats mettent en avant que les interactions entre la fibronectine et $\alpha 5\beta 1$ sont impliquées dans la formation des sphéroïdes [120]. De plus, la formation des sphéroïdes qui est renforcée par la fibronectine a aussi été associée à une expression accrue des intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$ en plus des intégrines $\alpha 5\beta 1$ dans les sphéroïdes [121].

Des études montrent que la laminine peut favoriser la formation de sphéroïdes alors qu'à l'inverse le collagène de type IV inhiberait cette formation [120]. Des études antérieures de l'équipe démontrent aussi l'importance de la vitronectine, qui est l'une des principales protéines de la MEC retrouvée dans l'ascite, et de leur récepteurs les intégrines αv dans les premières étapes de la formation des sphéroïdes [96]. De plus, ces interactions cellules-MEC entraînent des signaux qui pourraient favoriser certains comportements cellulaires, tel que la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses lorsqu'elles sont sous la forme de sphéroïdes.

Chapitre 3 : Implantation des métastases et microenvironnement mésothélial

Environ 75% des patientes atteinte de carcinomes ovariens présentes des métastases péritonéales dans les stades avancés de la maladie (III-IV, selon la classification FIGO) [122].

L'ancrage des cellules cancéreuses au péritoine représente une étape clé de la dissémination métastatique des cancers de l'ovaire. Dans le cas du cancer de l'ovaire, après avoir quittées le foyer primaire et avoir été transportées dans l'ascite, les cellules cancéreuses viennent s'implanter sur le mésothélium péritonéal au niveau de la cavité abdominale de manière isolée ou en sphéroïdes. Une fois les cellules implantées au niveau du péritoine, elles sont capables de proliférer et de migrer au travers du mésothélium pour venir envahir les tissus conjonctifs sous-jacent et former des foyers secondaires. Le péritoine est constitué en surface d'un mésothélium et d'un tissu conjonctif sous-jacent. Ce tissu lâche est constitué de fibroblastes, de macrophages, de lymphocytes et d'adipocytes et d'une MEC abondante. De plus, le péritoine présente une vascularisation sanguine et lymphatique riche qui est propice à l'établissement d'un foyer tumoral secondaire. Le mésothélium péritonéal et son microenvironnement participent au tropisme des cellules cancéreuses constituants de vraies niches métastatiques (Figure 26).

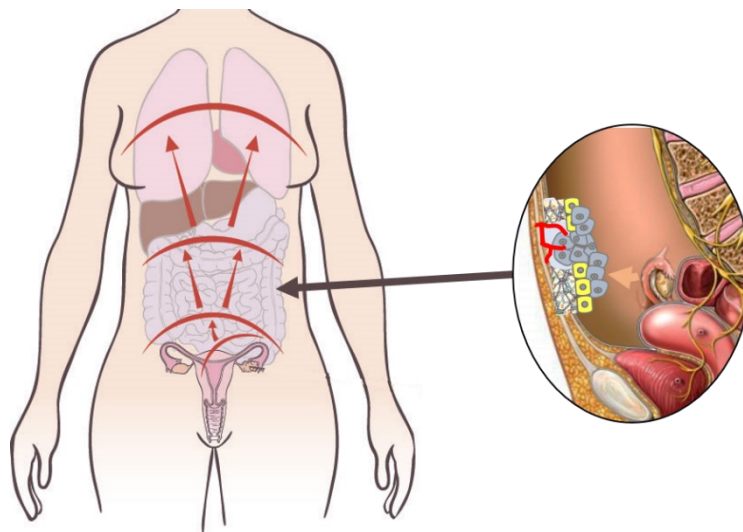


Figure 26 : Emplacement du « microenvironnement mésothélial ».

Modifié d'après « Vivre avec un cancer de l'ovaire ».

1. Mésothélium, cellules mésothéliales et matrice extracellulaire

Les sites des métastases de cancer de l'ovaire sont les organes sous-jacents au mésothélium, tissu constitué d'une seule couche de cellules mésothéliales couvrant un stroma sous-jacent composé de divers constituants de la MEC. Les cellules mésothéliales synthétisent des cytokines, des facteurs de croissance et du liquide lubrifiant pour protéger le tissu [123]. Les cellules mésothéliales produisent aussi différents types de protéines matricielles qui vont réguler le comportement des cellules cancéreuses ovariennes et particulièrement leur implantation (Figure 27).

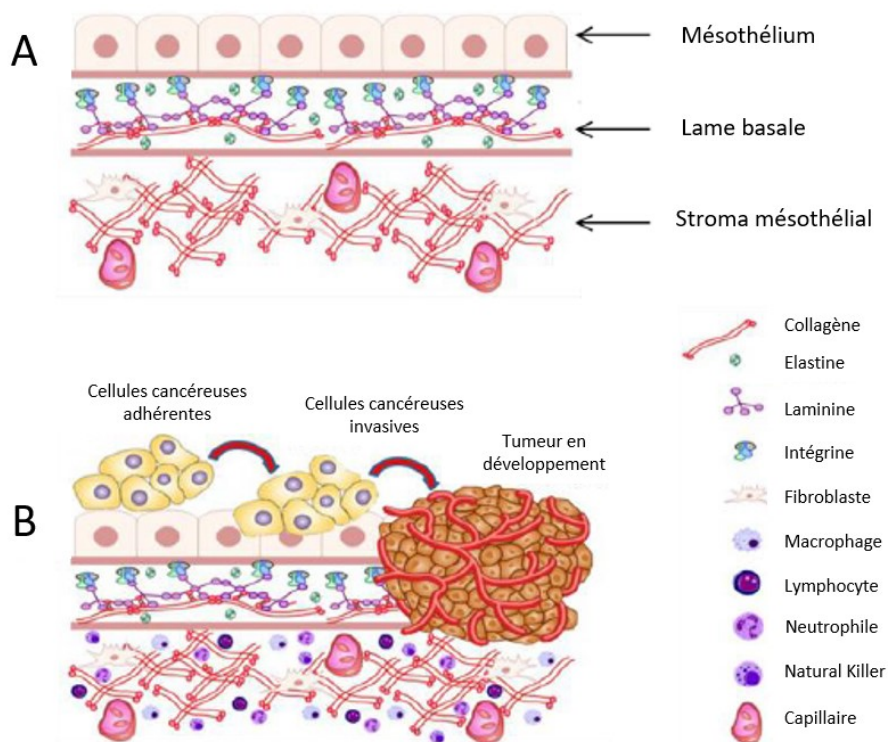


Figure 27 : Implantation péritonéale des cellules cancéreuses ovariennes.

Modifié d'après Fuller & Howell. [124]

1.1. Le mésothélium, une barrière efficace

Le mésothélium est un épithélium spécialisé qui tapisse les principales cavités du corps telles que le péritoine, le péricarde, le mésentère, le bassin et la plèvre. C'est un tissu d'origine mésodermique. Le mésothélium est composé d'une seule couche de cellules épithéliales pavimenteuses jointives reposant sur une lame basale. La fonction principale du mésothélium est la protection des structures internes et l'aide au mouvement et à la respiration. Le mésothélium fournit une surface glissante, non adhésive et protectrice aux structures et

organes internes. Les cellules mésothéliales ont également un rôle dans la présentation de l'antigène, l'inflammation et la réparation des tissus, la coagulation et la fibrinolyse et l'adhésion des cellules cancéreuses...

En cas de lésion, les cellules mésothéliales sont capables de synthétiser et exprimer des chimiokines ainsi que des récepteurs membranaires (I-CAM-1, VCAM-1) reconnus par les leucocytes. Elles expriment aussi des marqueurs épithéliaux (cytokératine 6, 8, 18 et 19) et mésenchymateux (vimentine, desmine) témoignant de leur capacité à réaliser une TEM lors du processus de cicatrisation en cas de lésion à la surface du péritoine [112].

Les jonctions cellules-MEC et cellules-cellules assurent l'intégrité du mésothélium et lui permettent d'assurer son rôle de barrière protectrice et dynamique. Les cadhérines sont les principales protéines de l'adhérence intercellulaire. Dans le mésothélium c'est particulièrement la N-Cadhérine qui est exprimée (N pour Nerveuse) puisque le mésothélium est d'origine mésodermique. Les cadhérines sont associées au cytosquelette par les caténines. Le système cadhérine-caténine joue un rôle central dans l'organisation structurale et fonctionnelle des contacts cellule-cellule dans les épithéliums [119]. L'occludine est une protéine transmembranaire présente notamment dans les jonctions serrées. Elle permet des jonctions étanches qui ont pour fonction d'assurer la cohésion entre les cellules des épithéliums. Ces deux protéines permettent de maintenir l'intégrité et l'homéostasie du mésothélium intègre [119].

1.2. Cellules mésothéliales et matrice extracellulaire

Le mésothélium est un feuillet de cellules mésothéliales adhérentes à une membrane basale. Cette membrane basale est composée majoritairement des collagènes de type IV, de la fibronectine et de la laminine. Le collagène de type I est lui aussi retrouvé mais il est majoritairement présent de manière diffuse dans le stroma péritonéal [125].

Les cellules mésothéliales synthétisent des protéines matricielles telles que la fibronectine et la vitronectine [123,126]. Protéines matricielles retrouvées également en grande quantité dans l'ascite [40].

Les cellules mésothéliales sécrètent à leur pôle apical des glycosaminoglycanes qui sont principalement des hyaluronanes, des surfactants et des protéoglycanes. C'est l'ensemble de ces molécules qui forme une surface antiadhésive qui permet le glissement des organes entre eux et évite leur friction [127]. Les cellules péritonéales sont particulièrement riches en acide hyaluronique [128,129].

La synthèse de ces protéines par les cellules mésothéliales va favoriser l'implantation des sphéroïdes et l'adhésion des cellules cancéreuses ainsi que leur migration.

Les cellules mésothéliales ne synthétisent pas de fibrinogène. Cependant, des expériences *in vivo* chez la souris ont mis en évidence la présence de dépôt de fibrine à la surface de la cavité péritonéale après implantation de cellules cancéreuses ovariennes [130,131].

2. Implantation péritonéale

Les cellules cancéreuses ovariennes isolées et les sphéroïdes flottants dans l'ascite s'implantent au niveau du mésothélium. L'implantation péritonéale nécessite une succession d'évènements cellulaires tels que l'adhérence, la migration, la prolifération et l'invasion. Ces mécanismes sont médiés et favorisés par différents protagonistes. Les interactions cellules-cellules et cellules-MEC jouent un rôle clé dans le processus de dissémination atypique des cancers ovariens.

Les sphéroïdes provenant de liquide d'ascites sont capables d'adhérer et de migrer sur une monocouche de cellules mésothéliales, cultivées *ex-situ*, et de l'envahir [132]. Les cellules cancéreuses ovariennes adhèrent sur la majorité des protéines matricielles grâce à la diversité de leur répertoire d'intégrines [119]. Les cellules mésothéliales ont la capacité de synthétiser de nombreuses protéines matricielles, ce qui favorise l'implantation des sphéroïdes. Effectivement, K. Burlison et ses collaborateurs ont démontré que les sphéroïdes tumoraux ovariens adhèrent spécifiquement sur la fibronectine, la laminine et le collagène IV de la MEC du mésothélium [93].

La fibronectine semble être un acteur clé dans l'implantation des cellules cancéreuses métastatiques. Effectivement, l'augmentation de l'expression de la fibronectine (codée par le gène *FN1*) a été détectée dans les métastases cancéreuses ovariennes par rapport à la tumeur ovarienne primaire. Les cellules mésothéliales humaines primaires sécrètent de la fibronectine à leur surface. L'inhibition de la production de fibronectine dans les cellules mésothéliales primaires *in vitro* ou dans des modèles murins, soit génétiquement (système cre-lox) soit *via* siRNA, entraîne la diminution de l'adhérence, de l'invasion, de la prolifération et des métastases des cellules cancéreuses ovariennes [133]. De plus, *via* un modèle de co-culture, il a été déterminé que les cellules ovariennes cancéreuses sécrètent le TGF- β 1, qui à son tour active une voie de signalisation du récepteur TGF- β / RAC1 / SMAD dans les cellules mésothéliales, ce qui favorise un phénotype mésenchymateux et une régulation positive de la transcription de la fibronectine. Enfin, inhiber l'interaction des intégrines α 5 et des intégrines β 1 avec la fibronectine bloque les étapes initiales et tardives des métastases. La fibronectine

exprimée et retrouvée sur les cellules mésothéliales favorise l'adhérence, la migration et la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes (Figure 28) [133].

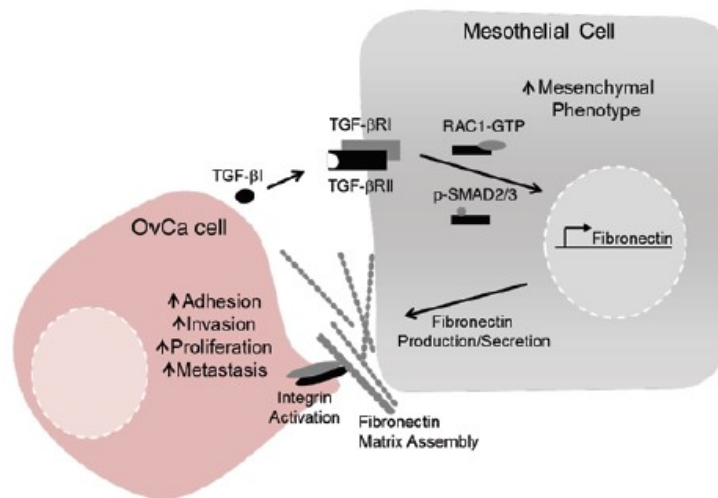


Figure 28 : Communication entre les cellules cancéreuses ovariennes et les cellules mésothéliales au cours des étapes initiales des métastases.

D'après Keny et al. [133]

Le détachement des cellules cancéreuses ovariennes de leur site primaire est précédé d'une transition épithélio-mésenchymateuse. Ce processus est initié notamment par une diminution de l'expression des E-cadhérines. Il a été démontré que l'inhibition de l'expression des E-cadhérines induit la surexpression du récepteur spécifique de la fibronectine, $\alpha 5\beta 1$, favorisant l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes sur les sites métastatiques secondaires comme le péritoine [134].

La vitronectine semble aussi jouer un rôle dans cette implantation péritonéale. La présence de vitronectine à la surface des cellules cancéreuses et au niveau péricellulaire a été démontrée *in vitro* et *in situ*. Cette présence induit le recrutement des récepteurs intégrines αv au niveau des contacts focaux entre la monocouche mésothéliales et les cellules cancéreuses ovariennes. L'ajout d'anticorps bloquants anti-Vn, anti-intégrines αv , anti-uPAR ou de peptide cRGDFV entraîne une inhibition significative de l'adhérence des cellules cancéreuses sur les cellules mésothéliales. Ceci permet de mettre en évidence le rôle de la vitronectine et de ses récepteurs dans l'implantation des cellules cancéreuses et de leur dissémination au niveau du mésothélium [126].

Comme cité plus haut, l'ascite se compose de nombreux constituants différents telles que les métalloprotéinases. La MMP2, retrouvée dans l'ascite, clive la fibronectine et la vitronectine

en de petits fragments, appelés matrikines, qui renforcent l'adhérence des cellules cancéreuses au péritoine *via* les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha V\beta 3$ [135].

En résumé de ces différentes études, le blocage des sous-unités αv , $\alpha 5$ et $\beta 1$ ainsi que l'utilisation d'un peptide RGD inhibent l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes sur une monocouche de cellules mésothéliales [126,133,136].

La présence de cellules mésothéliale sénescents dans le péritoine lors des métastases de cancer ovarien a suscité des interrogations. En comparaison avec des cellules mésothéliales à un passage précoce, les cellules sénescents ont montré une augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm de la fibronectine ainsi que de l'expression de la protéine. Ceci renforcerait l'interaction des cellules cancéreuses ovariennes sur les cellules mésothéliales *via* l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. L'effet du stress oxydatif sur la synthèse de fibronectine s'est révélé être médié par le TGF β -1, dont la voie de signalisation était contrôlée par p38 MAPK. L'activité de p38 MAPK a nettement augmenté dans les cellules mésothéliales sénescents. Le traitement de ces dernières avec des antioxydants a considérablement atténué l'augmentation de l'activité p38 MAPK, la production de TGF β -1 et de la fibronectine ce qui a donc réduit l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes [137]. De plus, l'augmentation de la sénescence des cellules mésothéliales lors de leur exposition à l'ascite maligne a récemment été décrite. Effectivement, l'analyse des lésions excisées du péritoine des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire a montré l'abondance de cellules mésothéliales sénescents à proximité du tissu cancéreux. De plus, la croissance des tumeurs dans la cavité péritonéale de souris a été intensifiée lorsque les cellules cancéreuses ont été co-injectées avec des cellules mésothéliales sénescents. Ces résultats semblent indiquer que les cellules mésothéliales sénescents qui s'accumulent dans le péritoine *in vivo* pourraient créer une niche métastatique favorisant l'implantation des cellules cancéreuses ovariennes. [138]

D'autres protagonistes de la MEC tel que l'acide hyaluronique exprimé à la surface des cellules mésothéliales permet aux sphéroïdes d'y adhérer. Cette adhérence cellulaire peut être dirigée par le CD44 qui est exprimé à la surface de sphéroïdes provenant de patientes [139,140]. Par ailleurs, des expériences *in vivo* chez la souris ont mis en évidence la présence de dépôt de fibrine à la surface de la cavité péritonéale après implantation de cellules cancéreuses ovariennes [130,131]. Néanmoins, l'impact direct du fibrinogène / fibrine sur l'implantation péritonéale est encore peu étudié.

Le rôle de la P-Cadhérine a été identifié dans la formation des sphéroïdes ainsi que dans la migration des cellules cancéreuses ovariennes. L'inhibition de la P-Cadhérine par des shRNA et des peptides bloquants diminue l'adhérence des cellules cancéreuses sur les cellules mésothéliales. Dans des modèles de xénogreffes intra-péritonéales de souris, l'inhibition de la

P-cadhérine a diminué l'agrégation des cellules entre elles et la survie des cellules cancéreuses flottantes dans les ascites ainsi que l'implantation tumorale sur le péritoine. Ces résultats indiquent que la P-cadhérine favorise la dissémination intra-péritonéale des cellules cancéreuses ovariennes en facilitant l'agrégation multicellulaire des cellules cancéreuses et les interactions tumeur-péritoine, en plus de favoriser la migration des cellules cancéreuses [141].

Toutes ces données permettent de mettre en avant les nombreux protagonistes impliqués dans l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes, isolées ou en sphéroïdes, sur le mésothélium péritonéal pour venir coloniser les tissus qui lui sont sous-jacents. Un véritable jeu d'interactions entre les récepteurs de type intégrines et la MEC du microenvironnement mésothélial s'établit pour permettre l'adhérence des cellules cancéreuses au mésothélium.

3. Clairance et transmigration mésothéliale

L'implantation des cellules cancéreuses ovariennes est une étape clé de la formation d'un foyer secondaire, cependant il existe un autre mécanisme qui prend le relais de l'implantation : la clairance. La clairance est la capacité des cellules cancéreuses et des sphéroïdes, après l'implantation, à « pousser » les cellules du mésothélium pour venir coloniser le tissu sous-jacent en migrant au travers de la monocouche mésothéliale [142]. Les cellules cancéreuses ovariennes perturbent les jonctions intercellulaires, conduisant à la rétraction des cellules mésothéliales et à l'exposition de la MEC sous-jacente. De plus, les cellules cancéreuses peuvent induire l'apoptose des cellules mésothéliales [143].

Des chercheurs ont pu mesurer la clairance *via* l'utilisation des cellules cancéreuses ovariennes GFP (Green Fluorescent Protein) et des cellules mésothéliales RFP (Red Fluorescent Protein), dans différentes conditions. Ils ont pu démontrer que la régulation négative, *via* siRNA, de la sous-unité d'intégrine $\alpha 5$, de la taline ou de la myosine II dans les sphéroïdes diminuait la clairance mésothéliale [144].

Iwanicki et son équipe ont mis en évidence que le blocage de l'expression de la taline I dans les sphéroïdes cancéreux inhibe la clairance des cellules mésothéliales. De plus, le recrutement de taline I semble nécessaire pour la clairance des cellules mésothéliales engendrée par la myosine. Le blocage de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans les cellules cancéreuses de l'ovaire diminue la clairance des cellules mésothéliales, tandis qu'une surexpression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ augmente la clairance des cellules mésothéliales. L'ensemble de ces données révèlent que les sphéroïdes cancéreux ovariens éliminent les cellules mésothéliales de manière dépendante des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et de la taline [126] (Figure 29).

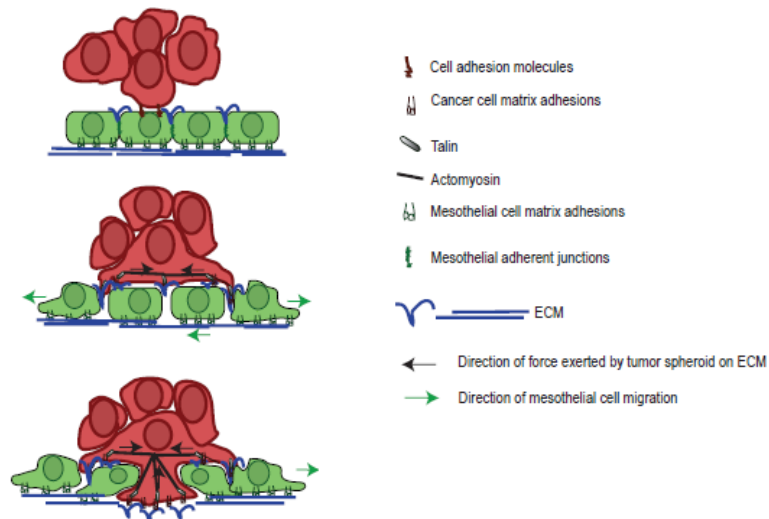


Figure 29 : Schéma des forces contractiles générées par les sphéroïdes favorisant la clairance mésothéliale.

D'après Iwanicki et al. [142]

Le fait que la clairance soit facilitée par les cellules cancéreuses ovariennes engendre une augmentation de la transmigration. La TEM semble là aussi être impliquée dans le mécanisme de transmigration de cellules cancéreuses ovariennes comme le décrit Pakula et al. Comparé à un milieu de culture ou à de l'ascite bénin, les cellules de deux lignées de cellules cancéreuses ovariennes exposées à des fluides malins ont une expression de E-Cadhérine diminuée et celle de la vimentine augmentée. Ces deux protéines sont des marqueurs de la TEM. Les auteurs ont ensuite étudié la migration de cellules cancéreuses ovariennes à travers une monocouche de cellules mésothéliales. La transmigration des cellules A2780 et SKOV3 était plus élevée lorsque les cellules étaient pré-incubées avec de l'ascite malin par rapport aux fluides ascitiques bénins. Les auteurs ont réalisé les mêmes expériences en neutralisant les médiateurs de la TEM : le caractère invasif des cellules A2780 a été significativement réduit lors de la neutralisation de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) et du TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1). L'invasion des cellules SKOV3 était quant à elle diminuée par l'inhibition de l'EGF (Epidermal Growth Factor), de l'IGF (Insulin-like Growth Factor), de l'HGF et du TGF- β 1. En ce qui concerne les voies de signalisation pouvant jouer un rôle sur la transmigration des cellules cancéreuses, les auteurs ont pu observer une diminution de l'invasion des cellules A2780 lors du blocage de Smad 2/3 et d'ILK (Integrin-Linked Kinase), mais pas de AP-1 (Activator Protein 1). Dans le cas des cellules SKOV3, leur invasion a été réduite lors de l'inhibition de Smad 2/3 et du facteur de transcription SP-1 (Specificity Protein 1), mais pas de ILK. Ces résultats suggèrent l'importance de la TEM et des voies de signalisation associées lors du mécanisme de transmigration [145].

4. Mise en place des foyers secondaires : la carcinose péritonéale et son microenvironnement endothélial

Une fois les cellules cancéreuses implantées et la clairance du mésothélium établie, les cellules cancéreuses envahissent le tissu conjonctif sous-jacent afin de développer des métastases formant ainsi des foyers secondaires. Puis, suite à des processus d'angiogenèse et de lymphangiogenèse, les cellules cancéreuses ovariennes peuvent également se propager à travers les vaisseaux lymphatiques vers les ganglions ou emprunter la circulation sanguine pour coloniser des organes éloignés.

Tout comme au niveau du foyer primaire, la croissance du carcinome dépend de sa vascularisation. Les cellules cancéreuses vont devoir réorganiser le microenvironnement endothélial et interagir avec l'endothélium.

La fibronectine semble à nouveau favoriser l'implantation des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales. La participation active des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$ et la réorganisation de la fibronectine endothéliale lors de l'adhésion des cellules cancéreuses ovariennes de la lignée IGROV1 à une monocouche de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) a été établie [34]. Il a aussi été démontré que ces cellules cancéreuses ovariennes IGROV1 adhéraient rapidement à cette monocouche de cellules HUVEC. Cette adhérence est inhibée par les anticorps bloquants anti-intégrine αv et anti-Vn, mais pas par les anticorps anti-intégrine $\beta 1$. De plus, après ancrage des cellules cancéreuses, la formation « de trous » dans la monocouche et la disparition du réseau inter-endothélial de la VE-Cadhérine se sont faites, traduisant une rupture de l'intégrité endothéliale [146]. Enfin, la transmigration de cellules d'adénocarcinome ovarien humain à travers la MEC endothéliale implique la participation de MMP-2 favorisant la migration des cellules cancéreuses [147].

Bien que l'adhérence directe des cellules cancéreuses à la couche de cellules mésothéliales soit considérée comme une étape clé pour l'invasion péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens, Matsuoka et ses collaborateurs ont identifié un autre mécanisme pour l'invasion péritonéale. Dans 6 des 20 cas de carcinomes ovariens étudiés, une croissance extra-péritonéale des sphéroïdes a été observée avec la néovascularisation des vaisseaux d'alimentation, qui relie le stroma hôte intrapéritonéal et les lésions extra-péritonéales cancéreuses à travers la monocouche mésothéliale qui reste intègre. Ce mécanisme semble se dérouler en plusieurs étapes, les sphéroïdes s'ancrent dans des réseaux de fibrine extra-péritonéaux, puis induisent la migration de cellules endothéliales CD34⁺ et l'expression du VEGF-A, construisant des réseaux vasculaires extra-péritonéaux autour des sphéroïdes (Figure 30 A). Au cours de la croissance extra-péritonéale des sphéroïdes, des fibroblastes associés au cancer rejoignent le complexe (Figure 30 B). Dans les lésions plus avancées la

monocouche mésothéliale est déstabilisée (Figure 30 C). Les cellules mésothéliales disparaissent autour des zones d'insertion des vaisseaux d'alimentation de la tumeur, puis le stroma extra-péritonéal et intrapéritonéal sont intégrés, permettant aux sphéroïdes et aux cellules cancéreuses ovariennes d'envahir le stroma hôte, en restant associés aux FACs (Figure 30 D). Cette nouvelle stratégie étudiée met en avant la croissance pré-invasive des cellules cancéreuses ovariennes ancrées à la fibrine ainsi que la néovascularisation sur la face externe de la surface péritonéale qui elle reste intacte [148].

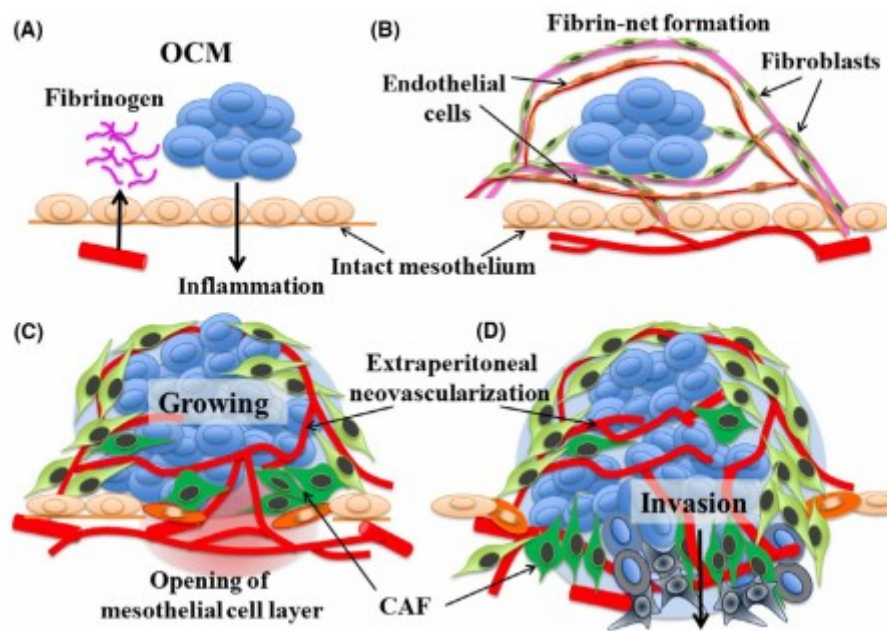


Figure 30 : Nouvelle stratégie d'implantation péritonéale par les cellules cancéreuses de l'ovaire.

D'après Matsuoka et al. [148]

L'implantation péritonéale des cellules cancéreuses reste la voie de dissémination privilégiée des cancers ovariens, avec un développement des métastases provoquant des carcinoses péritonéales. Les cellules cancéreuses ovariennes mettent en place secondairement une néovascularisation permettant l'établissement d'un foyer secondaire irrigué et la migration des cellules cancéreuses vers les organes plus lointains.

Objectifs

Le projet de recherche fondamental a pour premier objectif de contribuer à décrypter les mécanismes sous-jacents à l'implantation métastatique des cancers ovariens sur le mésothélium tapissant la cavité péritonéale et d'appréhender le rôle régulateur du microenvironnement tumoral qu'est l'ascite au cours de ce processus. Le « décryptage » de la mécanistique de cette implantation est au cœur du travail. Pour répondre à cela, nous proposons de développer un modèle in vitro de co-culture tridimensionnel entre des cellules mésothéliales saines et des sphéroïdes tumoraux d'adénocarcinomes ovariens, en présence d'ascites, mimant ainsi les étapes précoces de la dissémination. La mise au point de ce modèle est le second objectif de ce projet de recherche.

1) *Caractérisation de la composante matricielle et de son devenir lors de l'implantation péritonéale*

L'objectif de cette approche est de déterminer l'influence de l'ascite sur les différents protagonistes retrouvés lors de l'implantation des cellules cancéreuses sur le mésothélium ainsi que sur le microenvironnement matriciel, afin d'estimer qualitativement et quantitativement les microenvironnements propices à l'établissement de niches métastatiques.

2) *Modèle de co-culture tridimensionnel de cellules mésothéliales et de sphéroïdes tumoraux en condition ascitique*

De manière plus précise, les objectifs de cette approche sont d'estimer l'impact d'une matrice tridimensionnelle de fibrine sur les cellules cancéreuses et les cellules mésothéliales, mais avant tout d'estimer l'impact de l'ascite sur la co-culture de cellules cancéreuses / cellules mésothéliales en absence de matrice tridimensionnelle pour permettre la « Calibration » des conditions optimales de co-culture en présence d'ascite, afin de déployer ensuite le modèle 3D de co-culture en matrice tridimensionnelle. Le développement d'un modèle de co-culture 3D de sphéroïdes cancéreux/cellules mésothéliales en condition ascitique sera ensuite réalisé afin de permettre, à terme, des études mimant la réalité de la pathologie concernant les interrelations entre les cellules cancéreuses et les cellules mésothéliales saines dans un microenvironnement complexe et dans des mécanismes tels que la clairance ou la transmigration.

Matériel et méthodes

1. Collecte des échantillons d'ascites

Les échantillons d'ascites sont collectés après avoir obtenu le consentement éclairé des patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien. Les prélèvements ont eu lieu au *Centre de lutte contre le cancer François Baclesse* (Caen) et sont conservés aux *Centre de Ressources Biologiques OvaRessources*. Ces deux organismes ont mis en place une collection d'échantillons annotée en termes de paramètres clinico-pathologiques. Les échantillons recueillis depuis l'an 2000 et la collecte d'un nombre important de données clinico-biologiques associées constituent désormais une collection de haute valeur pour les cliniciens et les chercheurs travaillant dans le domaine de l'onco-gynécologie. Les ascites utilisées dans cette étude ont toutes été certifiées cytologiquement positives pour les cellules malignes.

Les ascites sont prélevées dans des flacons ne contenant ni EDTA, ni héparine. Immédiatement après la collecte, les échantillons ont été centrifugés à 400 g pendant 5 min puis les surnageants ont été stockés à -20°C . Les échantillons ont été stérilisés par filtration ($0,2\ \mu\text{m}$, faible liaison) et supplémentés avec de la pénicilline (200 UI / ml) / streptomycine (200 μg / ml) avant la culture cellulaire.

Les ascites ont été testées sur les cellules sur 5 jours afin de vérifier « leur compatibilité en culture cellulaire » et la non contamination des ascites.

Les aspects macroscopiques (couleur, présence de sang, présence d'agrégat, consistance...) des ascites ont été déterminés. Dans cette étude, 8 ascites de 8 patientes différentes étiquetées ASC #1, ASC #2, ASC #3, ASC #4, ASC #5, ASC #6, ASC #7 et ASC #8 ont été utilisées.

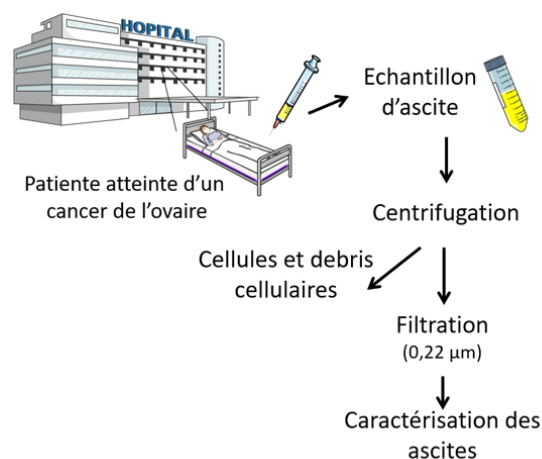


Figure 31 : Processus de la collecte et du stockage des ascites.

2. Culture cellulaire

2.1. Lignées cellulaires cancéreuses et saines

2.1.1. Lignées cellulaires cancéreuses

La lignée d'adénocarcinome ovarien IGROV1 est issue de l'ovaire d'une patiente atteinte d'un cancer de l'ovaire de stade III (FIGO), et nous a été généreusement fournie par le Dr. J Bénard [149]. Les cellules IGROV1 ont un aspect polygonal et ont un temps de doublement d'environ 20 h. Elles ont la particularité de former des populations hétérogènes de cellules adhérentes en monocouche et de cellules en suspension regroupées en amas multicellulaires irréguliers. La lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien humain SKOV3 (ATCC® HTB-77™, Manassas, USA), a été généreusement fournie par le Dr L. Poulain de l'équipe BioTICLA INSERM U1086 (Biologie et Thérapie Innovantes des Cancers Localement Agressifs, Caen, France). Cette lignée a été isolée à partir d'ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Les cellules SKOV3 ont une morphologie de type fibroblastique et forment uniquement des monocouches en condition adhérente et leur temps de doublement est d'environ 30 h.

Ces deux lignées sont des modèles d'étude des tumeurs ovariennes largement éprouvées dans la littérature, que cela soit avec des approches expérimentales *in vitro* et *in vivo*.

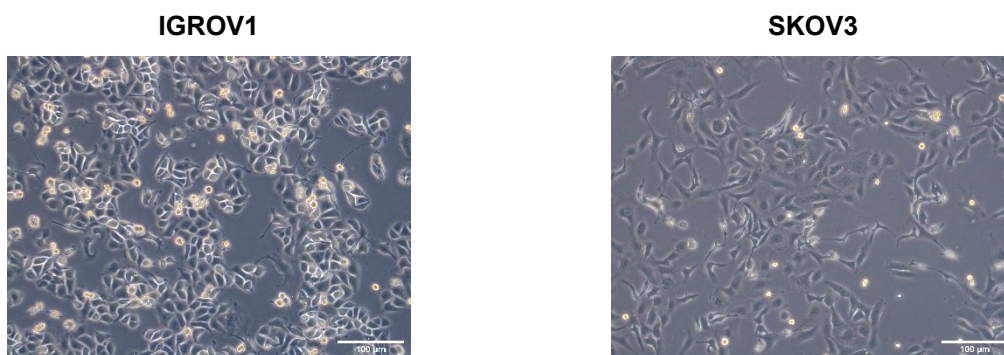


Figure 32 : Lignées cellulaires d'adénocarcinome ovarien cultivées en conditions adhérentes.

2.1.2. Lignées cellulaires saines

La lignée de cellules mésothéliales MeT-5A provient de mésothélium humain sain. Elle a été achetée auprès d'ATCC® (CRL-9444). Les cellules MeT-5A ont une forme pavimenteuse et possèdent un temps de doublement d'environ 30 h.

La lignée cellulaire fibroblastique BJ (ATCC® CRL-2522) est issue de peau humaine. Elles ont une forme fusiforme et un temps de doublement d'environ 30 h.

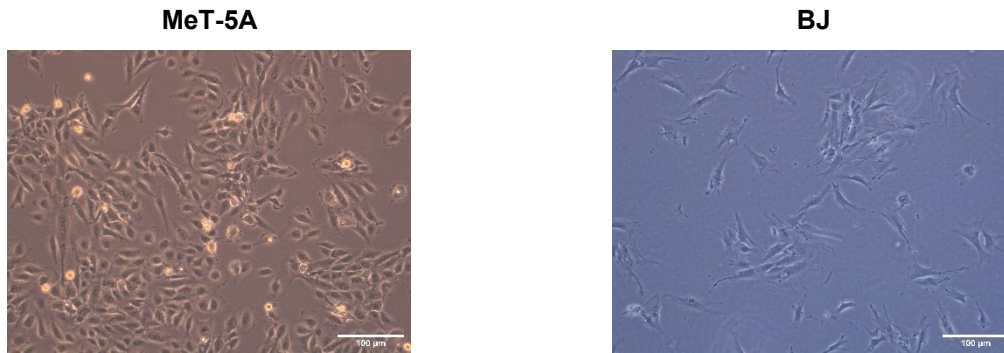


Figure 33: Lignées cellulaires saines cultivées en conditions adhérentes.

2.2. Conditions et analyse des cultures

2.2.1. Culture des cellules en condition adhérente

Le milieu de culture des cellules IGROV1 et SKOV3 est du RPMI-1640 glutaMAX contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de pénicilline / streptomycine et 7,5 % de bicarbonate de sodium, c'est un milieu dit « complet ».

Le milieu de culture des cellules MeT-5A est du M199 L-Glutamine contenant 10% de SVF, 7,5 % de bicarbonate de sodium, 1 % de pénicilline / streptomycine, 0,0001 % d'EGF, 0,0002 % d'insuline et 0,8 % d'hydrocortisone. Il est appelé, dans cette étude, « milieu de culture classique ».

Le milieu de culture complet des cellules BJ est du milieu DMEM contenant 10 % de SVF, 1 % de pénicilline / streptomycine et 7,5 % de bicarbonate de sodium. L'ensemble des réactifs de culture cellulaire est fourni par Invitrogen.

Les cellules IGROV1, SKOV3 et MeT-5A ont aussi été cultivées en présence d'ascite dans certaines expériences.

Les cellules saines et cancéreuses ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture a été changé tous les 2 à 3 jours, et les cellules ont été repiquées deux fois par semaine. Les différents travaux ont été effectués à partir de cellules sub-confluentes cultivées dans des boîtes de 25 à 175 cm².

Les cellules sub-confluentes ont été décrochées avec 0,25% de trypsine-EDTA (Life technologies, France). Dans certaines expériences, les cellules ont été cultivées sur un revêtement de 10 ug / ml de fibronectine, de vitronectine ou de fibrinogène. Dans les expériences de migration, les chambres de Boyden ont été recouvertes d'un coating de 50

$\mu\text{g/ml}$ de fibronectine ou fibrinogène. La fibronectine et la vitronectine ont été purifiées à partir du plasma sanguin humain (fourni par l'établissement français du sang) comme décrit par Poulain et al [150]. Le fibrinogène a été acheté auprès de Hyphen BioMed (PP001C).

2.2.2. Préparation du milieu conditionné des fibroblastes

A partir de flasques confluentes à 90% de fibroblastes (BJ), le milieu de culture a été remplacé par du milieu DMEM dépourvu de SVF (DMEM 0 %). Ce milieu a été récupéré après 24h d'incubation avec les cellules BJ puis congelé à -20°C . Ce milieu est appelé « Milieu conditionné de fibroblastes », annoté « MCF ».

2.3. Formation et analyse des sphéroïdes

Afin de produire des sphéroïdes, les cellules cancéreuses ovarienne ont été cultivées selon deux méthodes, une technique de culture non-adhérente et la technique de la goutte suspendue « Hanging drop ».

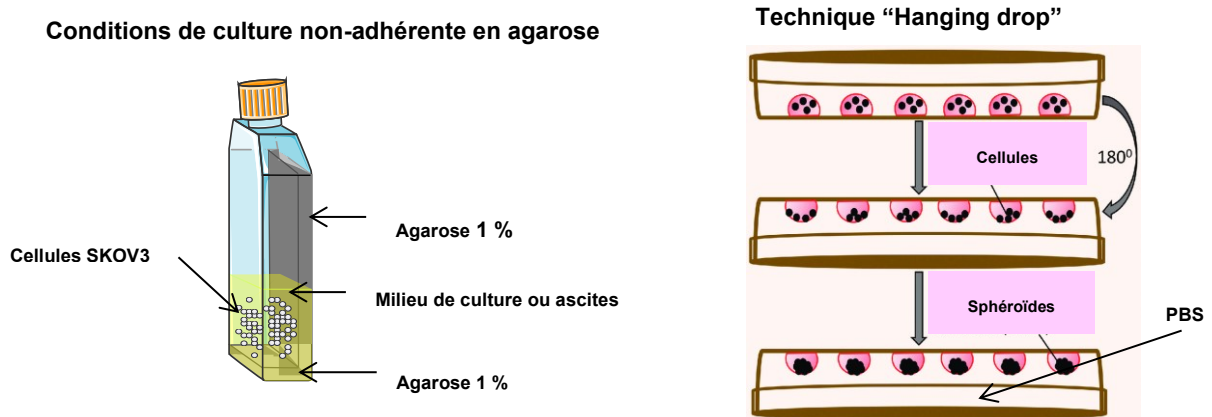


Figure 34 : Deux techniques différentes de culture en condition non adhérentes

2.3.1. Technique de culture non-adhérente sur substrat non adhésif

La première technique consiste à recouvrir des boîtes de culture de 25 cm^2 par 6 mL d'agarose 1 % (dissous dans l'eau distillé), 3 mL sur la face arrière et 3 mL sur la face basse de la boîte de culture. Après solidification de l'agarose, les cellules sontensemencées dans du milieu complet ou dans de l'ascite à une densité de 1 500 000 cellules pour 5 mL. En absence

d'adhérence, les cellules s'agrègent entre elles, ce qui induit la formation non spontanée de sphéroïdes. La formation des sphéroïdes a été suivie chaque jour par microscopie à contraste de phase.

2.3.2. Technique « Hanging drop »

La deuxième méthode est la technique « Hanging drop » : une suspension de 500 cellules SKOV3 a été ensemencée dans un volume total de 20 μ L d'ascite. Les gouttes contenant l'ascite et les cellules ont été déposées sur le fond du couvercle d'une boîte de Petri. La partie inférieure de la boîte de Pétri a été remplie de PBS stérile pour créer une chambre humide empêchant ainsi l'évaporation. Il est possible de placer au moins 25 gouttes par couvercle. Le couvercle de la boîte de Pétri a été retourné et placé sur le fond de la boîte (Figure 34). L'ensemble a été transféré dans un incubateur humidifié à 37° C pendant 5 jours pour contribuer à la sédimentation et à l'agrégation des cellules afin de favoriser la formation des sphéroïdes. La formation des sphéroïdes a été suivie chaque jour par microscopie à contraste de phase.

2.3.3. Caractérisation des sphéroïdes

Afin de caractériser les sphéroïdes par une « approche quantitative » plus précise que par une analyse « visuelle », une analyse de leur taille et de leur morphologie a été réalisée. Les sphéroïdes ont été générés en milieu de culture ou avec les ascites #1, #2, #4, #6 ou #7 pendant 5 jours. A la fin de ce temps d'incubation, le périmètre moyen des sphéroïdes a été mesuré *via* le logiciel d'imagerie open-source : FIJI.

Une macro personnalisée dans FIJI, combinée à l'approche PHANTAST, a été utilisée pour identifier précisément le contour des sphéroïdes. Ces contours ont ensuite été analysés en utilisant la rondeur comme indicateur du niveau de compactage des sphéroïdes. Plus les sphéroïdes sont compacts, plus ils doivent être proches d'un cercle parfait (Roundness = 1, Figure 35). Les résultats ont été tracés à l'aide de la routine MATLAB personnalisée.

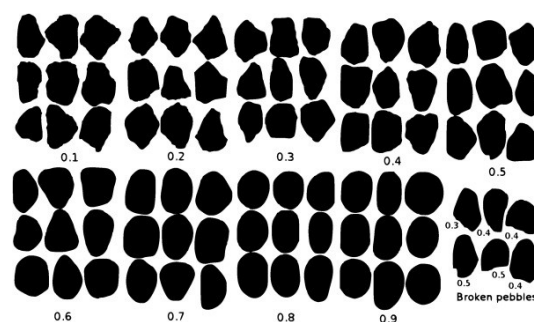


Figure 35 : Exemples de différents types de « Roundness »

3. Etude du comportement cellulaire

3.1. Test de viabilité cellulaire

Pour le test de prolifération, les cellules Met-5A ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à 16 000 / cm² et incubées dans du milieu M199 complet (milieu de culture) pendant 5 jours jusqu'à confluence. A la confluence, le milieu a été retiré et les cellules ont été incubées dans un nouveau milieu M199 complet ou avec de l'ascite (#1, #2 ou #6). Le nombre de cellules vivantes (et mortes) a été mesuré par le test d'exclusion au bleu trypan à 0 h, 24 h, 72 h ou 96 h après le renouvellement du milieu de culture ou l'ajout de l'ascite. Les résultats sont représentatifs au minimum de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata, et sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne.

3.2. Analyse de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire

Les cellules Met-5A ont étéensemencées dans une boîte de culture (75 cm²) et incubées dans du milieu de culture pendant 5 jours jusqu'à confluence. A la confluence, les cellules ont été incubées dans un nouveau milieu de culture ou avec de l'ascite (#1, #2 ou #6) pendant 24 h ou 96 h. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS), récoltées avec de la trypsine-EDTA et remises en suspension dans un milieu complet. Après centrifugation, les cellules ont été fixées dans de l'éthanol à 70% et stockées à -20 ° C pendant la nuit. Après centrifugation, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS avec calcium et magnésium et avec de la RNase (40 ug / ml) (AM2694, INVITROGEN). Les cellules ont été marquées, dans la glace, pendant 30 minutes avec de l'iodure de propidium (20 ug / ml) (P4864, Sigma-Aldrich). Par condition, 50 000 cellules ont été analysées dans un cytomètre en flux (BD Accuri C6plus). Le pourcentage de distribution du cycle cellulaire dans les phases pré-G1, G0/G1, S et G2/M a été déterminé avec le logiciel BD Accuri C6 Plus. Les résultats sont représentatifs au minimum de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata, et sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne.

3.3. Test de Migration et d'invasion cellulaire en chambre de Boyden

La migration des cellules a été estimée en chambre de Boyden. Les filtres des chambres de Boyden contiennent des pores de 8 µm. Selon les conditions, les filtres ont été laissés vides ou recouverts d'un coating de fibronectine (50 µg/ml) ou de fibrinogène (50 µg/ml). Les cellules ont étéensemencées, en présence d'ascite, dans la partie supérieure à une densité cellulaire de 10 000 cellules isolées. La partie inférieure contenant la solution chimioattractante a été remplie avec de l'ascite (ASC), du milieu conditionné de fibroblastes (MCF) ou du milieu de

culture (MC). La migration des cellules a été suivie pendant 24 h à 72 h. L'estimation du nombre de cellules ayant migrées a été faite par coloration au bleu de Coomassie (B0149, Sigma-Aldrich). 5 champs ont été pris en photo pour permettre le comptage (un exemple d'un champs représentatif, Figure 36). Les résultats sont représentatifs au minimum de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata, et sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne.

Pour estimer l'invasion, les filtres ont été recouverts de matrigel (354483, CORNING) ou d'un gel de fibrine (3 mg / ml, voir préparation du gel ci-après). Les conditions d'ensemencement de la partie inférieure et supérieure sont identiques à celles du test de migration cellulaire. L'invasion a été suivie pendant 24 h à 48 h. L'estimation de l'invasion a été faite par coloration au bleu de Coomassie. 5 champs ont été pris en photo pour permettre le comptage. Les résultats sont représentatifs au minimum de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata, et sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne.

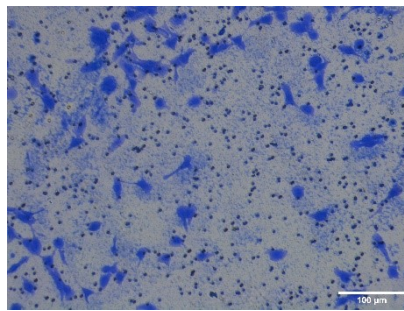


Figure 36 : Acquisitions au microscope optique à contraste de phase après coloration des chambres de Boyden au bleu de Coomassie

3.4. Etude de la désagrégation des sphéroïdes sur la Fibronectine et le Fibrinogène

Pour observer la désagrégation des sphéroïdes sur de la MEC, des lamelles de verres ont été recouvertes d'un revêtement « coating » de fibronectine (Fn) ou de fibrinogène (Fg) à 10 µg/ml. Les sphéroïdes, préalablement formés selon la technique de « Hanging drop », ont été déposés sur les revêtements protéiques puis incubés 24 h en milieu de culture ou en ascite. La surface de dispersion (μm^2) des sphéroïdes a ensuite été mesurée *via* le logiciel FIJI. Les résultats sont représentatifs au minimum de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata, et sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne.

4. Caractérisation et localisation des protéines étudiées

4.1. Dosage ELISA

Les concentrations de fibrinogène humain et de thrombine ont été mesurées par des kits de dosage immunologique (ab208036 et ab108909 abcam, respectivement) selon les instructions du fabricant. Les anticorps spécifiques de la protéine sont préalablement fixés sur des plaques 96 puits, ils sont appelés anticorps de capture. Les échantillons standards pour la gamme d'étalonnage et les échantillons d'ascites ont été ajoutés aux puits selon différentes dilutions, puis des anticorps de détection biotinylés spécifiques de la protéine ont été ajoutés, suivi de plusieurs rinçages avec le tampon de lavage. Le conjugué streptavidine-peroxydase a été ajouté et les conjugués non liés aux anticorps de détection ont été éliminés avec du tampon de lavage. Le TMB (3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine) a ensuite été utilisé pour visualiser la réaction enzymatique de la streptavidine-peroxydase. La streptavidine-peroxydase catalyse le TMB pour produire un produit de couleur bleue qui vire au jaune après l'ajout de la solution d'arrêt acide. La densité de la coloration jaune est directement proportionnelle à la quantité de protéine capturée dans la plaque. L'absorbance a été mesurée à 450 nm par le spectrofluoromètre (Xenius XM, SAFAS). Les concentrations de fibrinogène et de thrombine ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage des standards correspondants. Les seuils de sensibilité du dosage du fibrinogène et de la thrombine, avec les kits, sont respectivement de ~ 0,20 ng/ml et 0,10 pg/ml. Les résultats sont représentatifs au minimum de 2 expériences indépendantes réalisées en duplicata, et sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne.

4.2. Western blot

La quantité des protéines ascitiques totales a préalablement été déterminée en utilisant le test d'acide bicinchoninique (BCA1-1KT, Sigma-Aldrich). Une quantité égale de protéines provenant des différentes ascites et du milieu de culture M199 (10 μ g) ont été traitées avec du tampon Laemmli (Tris 125 mM pH 6,8, 20% de glycérol, 4% de SDS, 0,005% de bleu de bromophénol, 5% de β -mercaptoéthanol). Ces échantillons ont été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE bis-acrylamide à 10% dans des conditions réductrices sous un courant électrique (30 mA/gel) puis transférés sur membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) pendant 1h à 100V à température ambiante (RT). La membrane a été bloquée 1 h à TA avec TTBS (132 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCL, pH 7,6, 0,05% de Tween) et 5% de BSA. La membrane a ensuite été sondée pendant 2 h à température ambiante avec un anticorps anti-fibrinogène (1: 1 000, A0080, DAKO). Après trois lavages avec du TTBS, la membrane a été incubée pendant 1h à TA dans du TTBS-BSA 0,5% et avec un anticorps anti-lapin conjugué

avec la peroxydase de raifort (1/5 000, A6154, Sigma-Aldrich). Après trois lavages avec du TTBS, l'immunoréactivité a été détectée par chimioluminescence (ECL, Millipore). La chimioluminescence des protéines a été révélée à l'aide de l'appareil ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, France).

Les cellules Met-5A ont été cultivées dans des flacons de culture dans du milieu de culture jusqu'à confluence. Ensuite, un nouveau milieu de culture ou de l'ascite a été ajouté pendant 24 h, 48 h, 72 h ou 96 h. Les cellules ont été lavées une fois avec du PBS glacé et lysées avec du tampon RIPA (# 9806, Cell Signaling TECHNOLOGY) complété avec un inhibiteur de la protéase PMSF (P7626, Sigma-Aldrich). Le lysat cellulaire a été clarifié par centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4 ° C et les concentrations de protéines ont été déterminées en utilisant le test BCA. Une quantité égale de protéine (10 µg) a été traitée avec du tampon Laemmli et soumise à une électrophorèse SDS-PAGE bis-acrylamide à 10% dans des conditions réductrices, puis transférée sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) pendant 1 h à 100 V à RT. La membrane a été bloquée avec le tampon de blocage TBS (927-50000, Odyssey) pendant 1 h. Les membranes ont été sondées avec des anticorps anti-N-cadhérine (ab45139, abcam), anti-ZO-1 (610966, BD biosciences), anti-β-actine (A5441, Sigma-Aldrich) et anti-α-tubuline (T9026, Sigma- Aldrich) (respectivement à ces dilutions : 1: 1 000; 1: 500; 1: 2 500 et 1: 1 000). L'anticorps lié a été détecté en utilisant un anticorps secondaire fluorescent (IRDye 800CW anti-lapin et IRDye 680RD anti-mousse) (1/80 000). La fluorescence des membranes a été lue par le système d'imagerie infrarouge ODDYSEY (LI-COR Biosciences).

4.3. Tests d'activités protéiques : RhoA, cdc42 et Rac1

Trois membres de la famille des Rho-GTPases ont été étudiés : RhoA, Rac1 et Cdc42 par immunoprécipitation (RhoA / Rac1 / Cdc42 Activation Assay Combo Biochem Kit, #BK030, Cytoskeleton, Inc). En utilisant des cultures sub-confluentes qui avaient été privées de sérum (0,1 % de SVF) pendant 18 h, les cultures ont ensuite été incubées avec de l'ascite ou du milieu de culture pendant 30 min ou 24 h. A la fin de chaque temps d'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid, grattées dans 500 µl de tampon de lyse avec des inhibiteurs de protéases. Après centrifugation à 10 000 g pendant 1 min, les surnageants ont été congelés dans de l'azote liquide. Les concentrations ont ensuite été déterminées par dosage BCA. 500 µg de protéines cellulaires totales des différentes conditions ont été utilisés pour un test d'immunoprécipitation (IP) ainsi que pour les contrôles positifs et négatifs. Les protéines ont été incubées avec 50 µg de billes rhotekin-RBD (rhotekin - Rho Binding Domain) pour le test de pull down RhoA et 10 µg de billes PAK-PBD (p21 Activated Kinase I - p21Binding Domain) pour Cdc42 et Rac1 pendant 1 h à 4 ° C avec une rotation douce. Après

des centrifugations et des rinçages décrits dans le protocole du fabricant, 20 µL de tampon Laemmli ont été ajoutés aux échantillons et ils ont été analysés par SDS-PAGE (12%). 30 µg de protéine totale ont été analysés pour la quantification des petites GTPases spécifiquement étudiées (RhoA, Rac1 ou Cdc42) ainsi que 20 ng de protéine correspondante marquée à l'histidine, servant de contrôle pour les anticorps. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane en PVDF pendant 45 minutes à 75 V. Les membranes ont été bloquées avec du lait écrémé à 5% dans du TTBS pendant 30 minutes à RT sous agitation. Les membranes ont été sondées avec un anticorps anti-RhoA (1: 500), anti-Rac1 (1: 500) ou anti-Cdc42 (1: 250) dilué dans du TTBS pendant une nuit à 4 ° C sous agitation. Après lavage, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris conjugué HRP (GENA931, Sigma-Aldrich) diluée dans du TTBS (1: 5 000) pendant 1 h à RT sous agitation. Après lavage, les anticorps liés aux protéines ont été détectés par révélation ECL (Millipore). La chimioluminescence des protéines a été révélée à l'aide de l'appareil ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, France). L'intensité des bandes pour permettre la comparaison des différentes conditions a été déterminée sur FIJI.

4.4. Localisation moléculaire / Immunofluorescence

4.4.1. Immunomarquage

Les différentes expériences de culture des cellules MeT-5A (en monocouche ou en cellules isolées), de sphéroïdes sur un coating de Fg ou Fn ou de co-cultures entre les sphéroïdes et la monocouche mésothéliale ont été réalisées sur lamelles comme décrits précédemment. Après la culture, les lamelles sont rincées au PBS, fixées avec du paraformaldéhyde 3 % dilué dans du PBS (10 min) puis rincées avec du PBS contenant 0,5 % de BSA (PBS-BSA). Elles ont ensuite été perméabilisées avec du Triton X100 0,1 % dans du PBS (4 min) à 4°C pendant 30 minutes à température ambiante, puis rincées 3 fois au PBS-BSA. Puis, les lamelles ont été incubées avec un anticorps primaire pendant 2 h à température ambiante ou une nuit à 4°C selon le marquage (Tableau 3). Après plusieurs lavages dans du PBS-BSA, les cellules ont été incubées pendant 1 h avec l'anticorps secondaire approprié couplé à un fluorochrome (Alexa 568 ou Alexa 488, Tableau 4). Les anticorps ont été dilués dans le PBS-BSA 0,5 %. L'ADN des noyaux cellulaires a été marqué avec le DAPI (4,6-diamino-2-phenyliindol dihydrochloride, D9542, Sigma Aldrich) ou du Hoechst (33342, abcam). Pour certaines expériences, le cytosquelette d'actine a été marqué par de la phalloïdine couplée au FITC (P5282, Sigma Aldrich) ou au TRITC (P1951, Sigma Aldrich). Les lamelles ont été montées dans le réactif antifade Prolong-Gold (P36930, Invitrogen) et analysées par microscopie confocale à balayage laser (LSM710, Zeiss).

Pour les sphéroïdes, le marquage a été réalisé selon le même protocole mais dans des microtubes pour permettre des centrifugations à chaque étape de rinçage. De plus, les sphéroïdes ont été incubés pendant une nuit à 4 ° C avec l'anticorps primaire (Tableau 3) et ont été incubés pendant 2 h à température ambiante avec les anticorps secondaires appropriés couplés à un fluorochrome (Alexa 568 ou Alexa 488, Tableau 4).

Pour les deux types de marquages, des témoins de spécificité ont été réalisés en incubant les cellules avec l'anticorps secondaire seul. Ces contrôles étaient négatifs. Les observations des marquages immunofluorescents ont été réalisées avec un microscope confocal (LSM710, Zeiss) équipé d'une diode de 405 nm, de lasers 458, 488, 514, 561 et 633 nm et d'objectifs x20 Apo Plan, ouverture numérique 0.8 et x63 avec Apo Plan immersion, ouverture numérique 1.4.

Cible de l'anticorps (Anti-)	Référence	Espèce, Nature, couplage	Fournisseur	Dilution Ac IR	Temps d'incubation Ac IR			
					Cellules en monocouche	Cellules en sphéroïdes ou en co-culture		
Collagène IV (IF)	C1926	Ac M., IgM de Souris	Sigma-Aldrich	1/50 ^{ème}	2 h à Température ambiante			
Vitronectine Vn (IF)	V7881	Ac M., IgM de Souris						
Fibronectine Fn (IF)	F3648	Ac P., IgM de Lapin						
Laminine LM (IF)	L9393	Ac P., IgG de lapin						
Vinculine (IF)	V9131	Ac M., IgG de Souris						
Tubuline (IF)	T9026	Ac M., IgG de Souris						
Vimentine (IF)	CBL202	Ac M., IgG2a de souris						
Fibrinogène Fg (IF/IHC)	A0080	Ac P., Ig de lapin	DAKO					Une nuit à 4°C
N-Cadhérine (IF)	ab45139	Ac P., IgG de lapin	abcam					
Z0-1 (IF)	610966	Ac M., IgG de Souris	BD biosciences					
Rac 1 (IF)	610651	Ac M., IgG2b de souris						
Intégrine α v (IF)	sc-9969	Ac M., IgG de Souris	Santa-Cruz			Une nuit à 4°C		
Intégrine β 1 (IF)	Mab1965	Ac M., IgG1 de souris	Sigma-Aldrich					
Intégrine α 5 β 1 (IF)	Mab1969	Ac M., IgG de Souris						

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

(Ac P. : Anticorps polyclonaux, Ac M. : Anticorps monoclonaux)

Cible de l'anticorps (Anti-)	Référence	Fournisseur	Couplage	Dilution Ac IIR	Temps d'incubation Ac IR	
					Cellules en monocouche	Cellules en sphéroïdes
Mouse	Life technologies	A11004	Alexa fluoro 568	1/400 ^{ème}	1 h à Température ambiante	2 h à Température ambiante
Rabbit	Life technologies	A11011	Alexa fluoro 568	1/400 ^{ème}		
Mouse	Life technologies	A11029	Alexa fluoro 488	1/400 ^{ème}		
Rabbit	Life technologies	A11008	Alexa fluoro 488	1/400 ^{ème}		

Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence

4.4.2. Immunohistochimie : Analyse ex vivo

Des sphéroïdes, isolés à partir d'ascite de patientes atteintes d'un carcinome ovarien humain, ont été collectés lors de ponctions chirurgicales dans le centre de cancérologie complet F. Baclesse (Caen, France), après diagnostic pathologique certifié. Les sphéroïdes ont été inclus en paraffine, puis des sections de 5 µM ont été déparaffinées et réhydratées. Elles ont ensuite été chauffées pendant 30 min à 97 ° C dans un tampon citrate 10 mM, pH 6 pour la récupération de l'antigène, puis lavées avec 0,1 M Tris – 0,15 M NaCl et incubées avec 10% de peroxyde d'hydrogène pour bloquer l'activité peroxydase endogène. Les sites de fixation non spécifiques ont été saturés avec une solution neutralisante du kit Ultratech HRP. Les coupes ont été incubées pendant 1 h à TA avec un anticorps anti-fibrinogène (1: 400) (A0080, DAKO). Après lavage au PBS, les coupes ont été incubées avec le système de détection universel Ultratech HRP Streptavidine-Biotine selon les instructions du fabricant (Beckman Coulter, Villepinte, France). La coloration a été visualisée à l'aide d'un système chromogène DAB (Zymed, Clinisciences, Montrouge, France) et les noyaux ont été contre-colorés à l'hématoxyline. Après lavage à l'eau, les coupes ont été déshydratées à l'aide d'alcool et de toluène avant d'être montées avec Entellan (Merck, Darmstadt, Allemagne). L'anticorps primaire a été omis des contrôles négatifs. Suite à une xénogreffe de cellules cancéreuses de l'ovaire (lignée cellulaire IGROV1) injectées dans le péritoine de la souris, des tranches péritonéales, au niveau de l'interface péritoine / cellules cancéreuses, ont également été soumises à un marquage IHC anti-fibrinogène, comme décrit précédemment, après sacrifice à 28 jours et dissection de la souris.

5. Analyse aux microscopes électronique à balayage et à force atomique

5.1. Préparation des échantillons pour l'analyse au MEB

Les échantillons analysés au microscope électronique à balayage (MEB) ont été soumis aux étapes suivantes : pour chaque échantillon, le milieu de culture a été éliminé par deux rinçages au PBS (37 ° C) et fixé par une suspension de 0,2 M de cacodylate et de glutaraldéhyde à 2% pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, les échantillons ont été rincés trois fois avec du cacodylate 0,2 M et placés successivement dans différents bains d'éthanol à 30%, 50%, 80% et 100% pendant 10 min. Les échantillons ont été séchés par séchage au point critique pendant 16 échanges (EM CPD300, Leica). Enfin, ils ont été métallisés par pulvérisation d'une fine couche de platine de 4 nm, avant d'être observés au MEB (GeminiSEM 300, ZEISS).

5.2. Microscopie corrélative

Les cellules Met-5A ont étéensemencées sur une lamelle de verre gravée avec un motif en grille permettant d'avoir des repères de position (P35G-1,5-14-CGRD, MatTek). La culture s'est faite jusqu'à la confluence puis l'ascite a été ajoutée. A 24 h d'incubation, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-fibrinogène (A0080, DAKO) ou de la phalloïdine couplée au TRITC (P1951, Sigma Aldrich) selon le protocole de marquage immunfluorescent décrit précédemment. Les observations du marquage immunfluorescent ont été réalisées au microscope confocal (LSM710, Zeiss). Ensuite, les cellules ont été lavées, déshydratées et séchées comme décrit précédemment. Enfin, les cellules ont été métallisées par pulvérisation d'une couche de 4 nm de platine, avant d'être observées à l'aide du MEB (GeminiSEM 300, ZEISS). Les acquisitions des images de microscopie confocale et du MEB ont été superposées avec ICY, un logiciel de traitement d'images open source, avec le plugin ecCLEM [151].

5.3. Microscopie à force atomique

Les cellules Met-5A ou SKOV3 ont étéensemencées de façon isolée, après 24 h d'adhérence en milieu de culture, elles ont été incubées avec un nouveau milieu de culture ou en ascites. Des monocouches de cellules Met-5A ont été formées, après confluence elles ont été incubées avec du milieu de culture ou de l'ascite. Après 24 h d'incubation, la mesure de l'élasticité ou la topographie des cellules / monocouches ont été faites à l'aide d'une pointe colloïdale ($R=3.5\mu\text{m}$, $k=0.17\text{N/m}$) sur le microscope à force atomique (BioScope Resolve AFM with Advanced correlation stage). *(Les résultats obtenus sont des résultats préliminaires)*

- Monocouche Met-5A en milieu de culture : 61 mesures
- Monocouche Met-5A en ascite : 68 mesures
- Cellules SKOV3 isolées en milieu de culture : 19 mesures
- Cellules SKOV3 isolées en ascite : 34 mesures

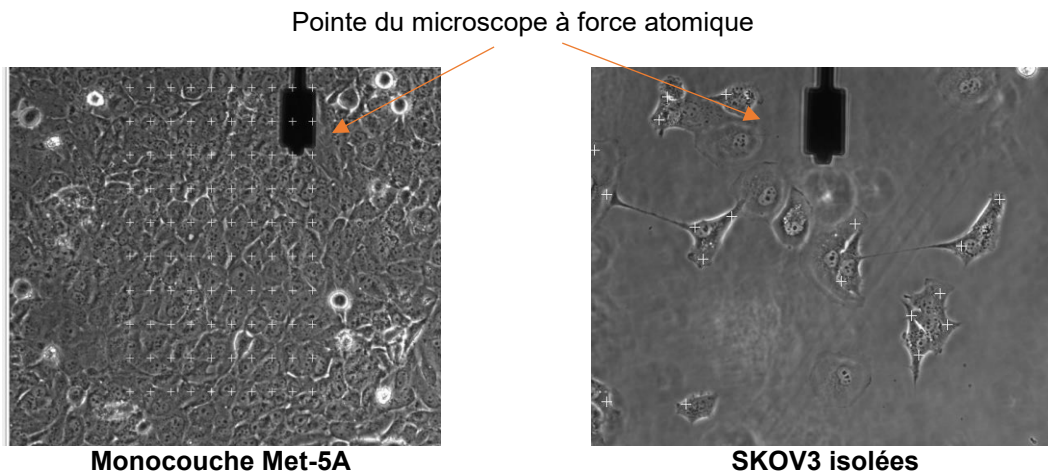


Figure 37 : Observation des cellules avec la caméra du microscope à force atomique

6. Mise au point du modèle de co-culture

6.1. Réalisation de la co-culture

Pour illustrer au mieux *in vitro* la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes et leur implantation sur le mésothélium, un modèle de co-culture de sphéroïdes tumoraux ovariens et de cellules mésothéliales a été réalisé et utilisé. Les cellules Met-5A ont d'abord été cultivées sur des lamelles de verre dans des plaques de 24 puits à 16 000 / cm² pendant 5 jours, jusqu'à confluence, dans du milieu de culture. Les sphéroïdes générés par la technique « Hanging drop » ont été déposés sur la monocouche mésothéliale confluyente en milieu de culture ou en ascite. Ce modèle de co-culture a été observé et suivi au cours du temps par microscopie optique à contraste de phase puis utilisé dans différentes expériences décrites ci-dessous.

6.2. Utilisation de Nanoparticules pour quantifier la clairance et observer les sphéroïdes mixtes

Des nanoparticules ont été utilisées pour différencier les lignées cellulaires lors de la clairance. Les nanoparticules (NPs) sont construites à partir de polymère biodégradable d'acide poly (lactique-co-glycolique) chargées avec des colorants de cyanine. Celles-ci nous ont été fournies par Andreas Reich de l'équipe biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires du laboratoire de bioimagerie et pathologies (UMR CNRS 7213, Strasbourg) [152]. Ces nanoparticules ont la capacité d'être endocytées de manière homogène par les cellules, sans influencer sur la viabilité ou autres comportements cellulaires. L'incorporation des nanoparticules se fait à partir de cellules adhérentes et confluentes à 50 %. Les cellules Met-5A ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à 21 000 / cm². Après 18 heures d'adhésion, le milieu de culture a été éliminé, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS

et une fois avec de l'opti-MEM (Gibco). Les cellules ont été incubées avec une solution fraîchement préparée des NPs. La solution de NPs a été préparée à partir de la solution mère dans un tampon phosphate $20 \cdot 10^{-3}$ M à un pH de 7,4 avec une concentration de particules de $3 \cdot 10^{-9}$ M ($0,04 \text{ g}^{-1}$ L de polymère). Ensuite, cette solution a été diluée au 1/10 avec l'opti-MEM. La suspension de NPs a été déposée sur les cellules pendant 3 h à 37°C , puis la suspension de NPs a été éliminée, les cellules ont été rincées avec de l'opti-MEM puis du PBS. Après ce temps, les cellules marquées au Cy3 ou Cy5 ont pu être décrochées et utilisées pour différentes expériences comme la clairance et l'analyse de sphéroïdes mixtes.

L'incorporation des nanoparticules a été vérifiée à l'aide d'un marqueur membranaire pour délimiter le contour cellulaire et vérifier l'incorporation homogène des nanoparticules par les cellules.

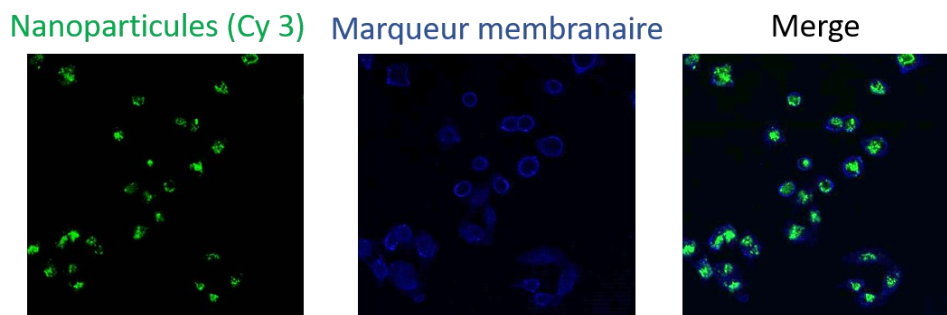


Figure 38 : Vérification de l'incorporation des nanoparticules par les cellules Met-5a

6.2.1. Etude de la clairance

Pour observer et quantifier la clairance, les cellules MeT-5a ont été marquées avec les nanoparticules puis ont été incubées avec le milieu de culture pour former une monocouche confluente. Lorsque celle-ci a été formée, les sphéroïdes non marqués ont été déposés dessus et la co-culture a pu être incubée pendant 24 h, avec du milieu de culture ou de l'ascites. L'ensemble des cellules de la co-culture a ensuite été fixé au Paraformaldehyde (PFA) 4% et l'ADN des noyaux cellulaires est marqué au DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol dihydrochloride, D9542, Sigma Aldrich).

Pour observer ce phénomène de clairance, des acquisitions d'images au microscope confocale ont été réalisées pour visualiser uniquement la fluorescence de la monocouche mésothéliale. La perte de fluorescence de la monocouche à l'emplacement des sphéroïdes témoigne de la clairance de la monocouche mésothéliale par les sphéroïdes. Les surfaces des zones de clairance ont ensuite été mesurées sur FIJI dans les différentes conditions d'incubation. Les résultats sont représentatifs au minimum de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata, et sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne.

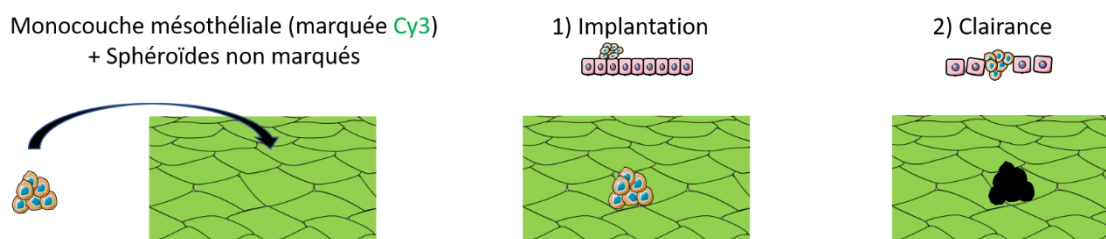


Figure 39 : Protocole d'observation de la clairance avec les nanoparticules

6.2.2. Essai de formation de sphéroïdes mixtes (IGROV1-SKOV3)

Les nanoparticules ont aussi été utilisées pour former des sphéroïdes « mixtes » avec les deux lignées cellulaires cancéreuses, les cellules SKOV3 marquées à la Cy3 et les cellules IGROV1 marquées à la Cy5. Une fois le marquage établi, les sphéroïdes ont été formés selon le protocole de « Hanging drop » détaillé ci-dessus avec 500 cellules de chaque lignée. Les sphéroïdes ont ensuite été déposés sur une monocouche mésothéliale confluyente non marquée, la co-culture a été suivie jusqu'à 72 h. L'observation au microscope optique à contraste de phase de la co-culture et son analyse au microscope confocal pour étudier la dispersion des sphéroïdes ont pu être réalisés. Les acquisitions des images au microscope confocal ont pu permettre l'analyse de la répartition des cellules des deux lignées cellulaires au sein des sphéroïdes mixtes. Les résultats ont été tracés à l'aide de la routine MATLAB personnalisée.

6.2.3. Etude de l'implication des intégrines dans la désagrégation des sphéroïdes et dans la clairance des cellules mésothéliales

Pour les expériences d'inhibition d'implantation de sphéroïdes sur des revêtements protéiques (fibronectine, fibrinogène), d'invasion de sphéroïdes dans des gels de fibrine ou d'étude de la clairance, des peptides bloquants Cyclo (-RDGfc) (637851-1, Anaspec) et cilengitide (SML1594, Sigma Aldrich) ont été utilisés à une concentration de 100 µg / ml et 50 µg / ml, respectivement. Le C (-RGDfc) est un peptide bloquant spécifique des intégrines αV et le Cilengitide spécifique des intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$ [153]. Les sphéroïdes ont été pré-incubés pendant 2 h 30 à 4 ° C avec l'un des peptides avant d'être déposés sur les revêtements protéiques ou sur les monocouches mésothéliales préalablement marquées avec les NPs comme décrit ci-dessus. En présence des peptides bloquant les intégrines ou en leur absence

(Ctrl), les zones de dispersion des sphéroïdes sur les revêtements protéiques ainsi que la zone de clairance des cellules mésothéliales ont été mesurées par le logiciel Image J. Les résultats sont représentatifs au minimum de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata, et sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne.

6.3. Gel de fibrine avec sphéroïdes : modèle de culture 3D

Préparation des gels de fibrine (avec sphéroïdes) : Pour observer la dispersion et l'invasion des sphéroïdes du cancer de l'ovaire dans un gel de fibrine, une suspension de fibrinogène à 3 mg / ml dans du PBS a été réalisée. 1 U / ml de thrombine humaine (T6884, Sigma) a été ajoutée et la suspension de fibrinogène (Fg) a été rapidement transférée dans des plaques 48 puits (150 μ l / puits). Cette suspension de fg a été incubée pendant 30 minutes à 37 ° C afin de polymériser en gel de fibrine. Puis une suspension avec 150 μ L de la suspension de Fg à 3 mg / ml, 50 μ L d'ascite contenant des sphéroïdes (préalablement formés puis pré-incubés avec des peptides bloquants Cyclo (-RDGfc) et cilengitide, comme décrit ci-dessus) et de la thrombine (1U / ml) a été ajoutée sur le 1er gel initialement formé. L'ensemble a été incubé à 37 ° C pendant 30 min pour permettre la polymérisation de la seconde suspension en gel de fibrine. Ensuite, le milieu de culture ou l'ascite a été ajouté aux puits. La dispersion, la désagrégation et l'invasion des cellules des sphéroïdes dans les gels de fibrine ont été suivies à différents temps au microscope optique à contraste de phase.

7. Analyses statistiques

Toutes les données chiffrées ont été obtenues à partir d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les données ont été exprimées en moyenne \pm l'erreur standard de la moyenne. Toutes les expériences ont été réalisées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (* P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001).

Présentation des résultats

1. L'ascite, un « réservoir » de molécules bioactives : Caractérisation du fibrinogène et de la fibrine dans les ascites

Le fibrinogène (Fg) et la fibrine ont été identifiés sur les tissus de la muqueuse péritonéale chez des souris porteuses de tumeurs ascitiques [130]. Cette donnée bibliographique nous a incité à évaluer la présence de ces facteurs au sein d'un panel de liquides ascitiques prélevés chez des patientes atteintes de carcinomes ovariens.

Ainsi, la concentration en Fg a été déterminée par le test ELISA sur un panel de 8 échantillons d'ascite, et a été comparée à celle du milieu de culture utilisé classiquement en culture cellulaire pour les lignées cancéreuses ou mésothéliales.

Les résultats obtenus montrent une hétérogénéité des concentrations en Fg selon les différentes ascites allant de 266 à 1725 $\mu\text{g/ml}$, la concentration la plus élevée se rapprochant de la concentration retrouvée dans le plasma humain (1800 à 4000 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 40 A). Ces concentrations fluctuantes reflètent l'hétérogénéité de la composition de l'ascite en fonction de la source de l'échantillon. Le milieu de culture qui a été complété avec 10% de SVF ne contient pas de fibrinogène.

Cependant, la présence de Fg dans les ascites n'est pas suffisante pour justifier la présence de sa forme polymérisée et donc la présence de fibrine. Dans ce cadre, la thrombine, le principal effecteur de la polymérisation du Fg, a également été dosée par test ELISA.

Les résultats révèlent la présence de thrombine dans la majorité des ascites testées (#1, #2, #3, #4 et #5), à des concentrations significativement plus hautes que celle du milieu de culture cellulaire classique (Figure 40 B).

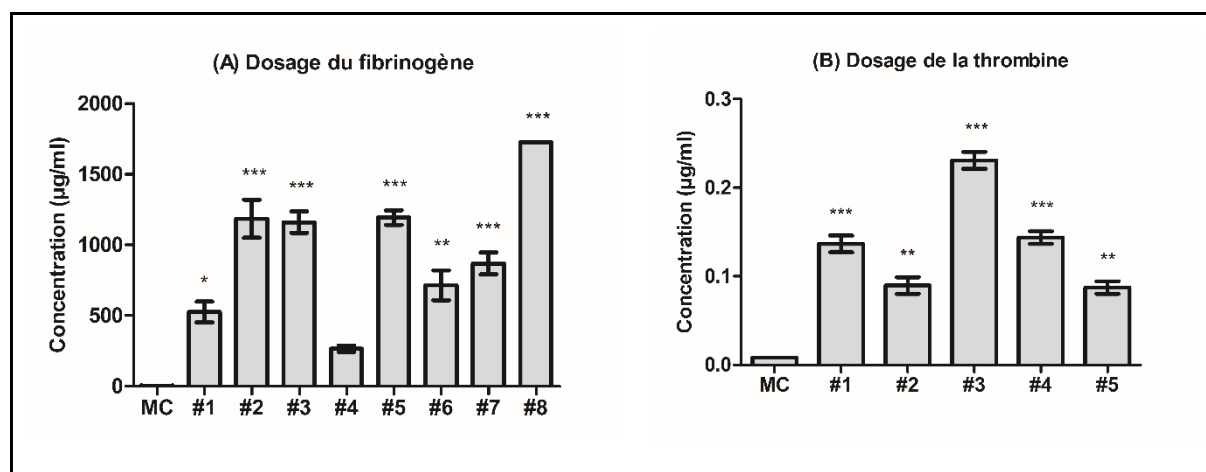


Figure 40 : Caractérisation du fibrinogène et de la thrombine dans les ascites.

Les concentrations de fibrinogène (A) et de thrombine (B) ont été quantifiées par test ELISA dans les ascites et dans le milieu de culture (MC). Les valeurs p ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) avec le milieu de culture (MC) vs Ascites #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7 ou #8.

La présence de Fg a également été recherchée par Western blot dans le panel de 8 échantillons ascitiques et dans le milieu de culture cellulaire.

Comme observé dans la Figure 41, le fibrinogène est détecté dans tous les échantillons testés, avec des intensités de bandes différentes selon les ascites. De plus, aucune bande n'a été détectée en milieu de culture cellulaire classique, ce qui valide l'absence de fibrinogène dans ce milieu. Dans les échantillons d'ascites, le Fg a été détecté par la présence de 3 bandes entre 48 et 75 kDa, représentatives des 3 paires de chaînes polypeptidiques α , β et γ qui constituent la molécule de fibrinogène. De plus, des bandes de $\sim 85/97$ kDa, caractéristiques des structures dimères γ - γ de la fibrine réticulée, sont observées.

La protéolyse de la fibrine réticulée par la plasmine conduit au fragment DD (D-Dimer constitué des domaines D de 2 molécules de fibrine réticulées *via* les chaînes γ et au fragment E (domaine E central). Les bandes de fragment E $\sim 40/44$ kDa et le fibrinogène/fibrine dégradés sont également détectés, ce qui suggère fortement la présence de protagonistes du processus de fibrinolyse dans les ascites (Figure 41).

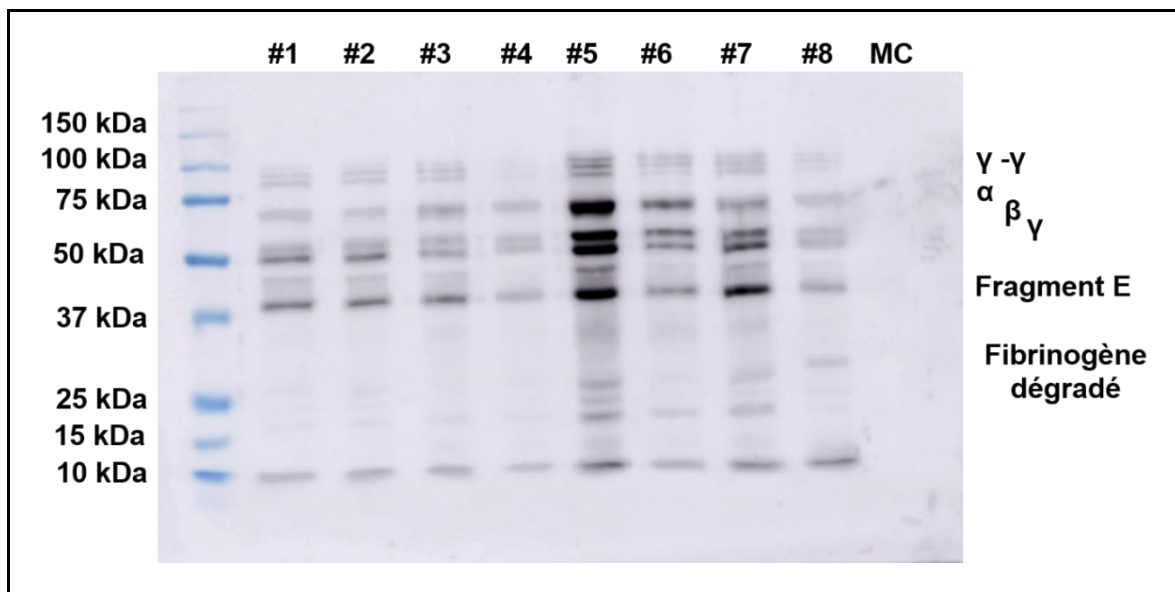


Figure 41 : Caractérisation de la fibrine dans l'ascite.

Western blot représentatif de la détection du fibrinogène/fibrine dans le MC ou dans les ascites. Des quantités égales (10 μ g) de protéines totales du milieu de culture ou des ascites ont été séparées sur SDS-PAGE dans des conditions réductrices. Puis le Fg et la fibrine sont recherchées par un anticorps spécifique et révélées par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

Conclusion : Partie 1 « L'ascite, un « réservoir » de molécules bioactives :

Caractérisation du fibrinogène et de la fibrine dans les ascites »

Ces résultats montrent la présence de fibrinogène, de thrombine ainsi que de fibrine dans l'ascite issue de tumeurs ovariennes humaines. De plus ces résultats démontrent que des mécanismes de polymérisation du Fg en fibrine et de fibrinolyse se produisent dans les ascites présentes dans la cavité abdominale de patientes atteintes de cancer de l'ovaire.

2. L'ascite, un acteur clé de la formation des sphéroïdes tumoraux : Impact de l'ascite sur les sphéroïdes tumoraux ovariens

2.1. Deux techniques expérimentales pour l'obtention de sphéroïdes tumoraux

La dissémination du carcinome ovarien est en partie due à des agrégats multicellulaires ovariens appelés sphéroïdes, présents dans la cavité péritonéale puis implantés sur le mésothélium péritonéal.

Deux techniques expérimentales de formation des sphéroïdes ont été comparées pour pouvoir déterminer la technique permettant la meilleure reproductibilité, pour les expériences nécessitant des quantifications avec les sphéroïdes.

Les sphéroïdes tumoraux ovariens ont été générés *in vitro* avec la lignée cellulaire SKOV3, avec une technique de culture en conditions non-adhérentes (lorsque les boîtes de culture sont recouvertes d'agarose) ou avec la technique de la goutte suspendue « Hanging Drop ».

Dans la condition non-adhérente en agarose, les cellules sont capables de former de petits agrégats en milieu de culture. Cependant, ces sphéroïdes semblent peu compacts et possèdent surtout des tailles très hétérogènes. En ascites, on peut observer la présence de très gros agrégats. Avec la technique « Hanging drop », la calibration de la taille des sphéroïdes ainsi que de leur nombre sont assurés. Effectivement, il y a un sphéroïde par goutte. De plus, en conditions ascitiques les sphéroïdes se forment plus rapidement et sont plus compacts qu'en milieu de culture. (Figure 42).

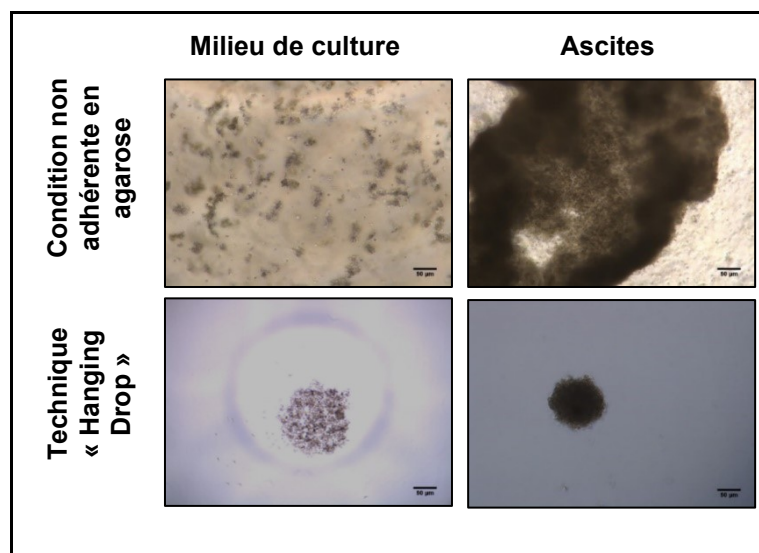


Figure 42 : Comparaison de deux techniques expérimentales de formation de sphéroïdes tumoraux.

Les sphéroïdes sont formés selon une condition de culture non-adhérente avec les boîtes de culture recouvertes d'agarose ou selon la technique de goutte suspendue « Hanging drop » où les cellules sédimentent dans une goutte. Les sphéroïdes ont été formés avec ces deux techniques en milieu de culture ou en ascites pendant 5 jours. Barre d'échelle : 50 μ m.

La comparaison des sphéroïdes, formés au bout de 5 jours avec différentes ascites, révèle que la forme des sphéroïdes semble moins circulaire dans le milieu de culture, ce qui indique une compaction plus faible des sphéroïdes par rapport à ceux formés dans les ascites. Dans le milieu de culture, les cellules cancéreuses de l'ovaire ont formé des sphéroïdes peu compacts, dispersés et non reproductibles d'une goutte à l'autre (Figure 43).

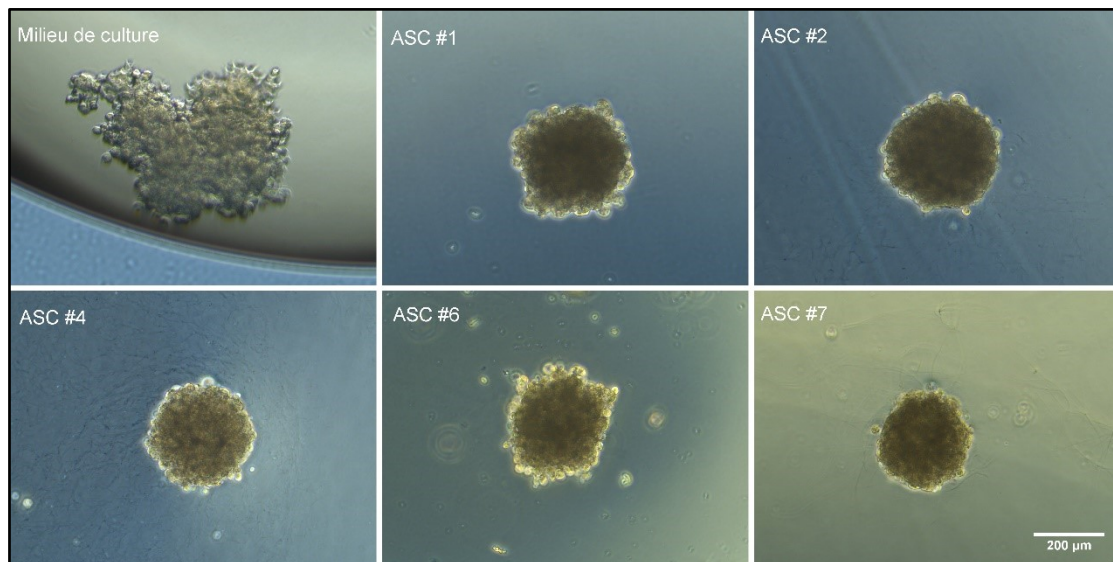


Figure 43 : Effet de l'ascite sur la formation des sphéroïdes.

Les sphéroïdes ont été générés en utilisant la méthode « Hanging drop » : 500 cellules SKOV3 ont été ensemencées dans un volume total de 20 µL de milieu de culture ou d'ascite. Des photographies représentatives au microscope optique à contraste de phase ont été prises après 5 jours de formation des sphéroïdes. Barre d'échelle : 200 µm.

Dans des conditions ascitiques, les cellules cancéreuses de l'ovaire forment des sphéroïdes compacts, uniques et de taille similaire dans chaque goutte (Figure 44 A).

Afin de « quantifier » l'impact de l'ascite sur la formation des sphéroïdes, les périmètres de ces derniers, dans les différentes conditions, ont été mesurés (µm). La moyenne des périmètres est significativement plus faible pour les sphéroïdes formés dans les ascites (1050 µm +/- 115,2) par rapport à ceux formés dans le milieu de culture (1600 µm +/- 648,5) (Figure 44 A).

De plus, la sphéricité des sphéroïdes a été mesurée dans chaque condition. L'indicateur de sphéricité a été utilisé pour décrire le compactage des sphéroïdes. Un cercle parfait a une rondeur égale à 1. Lorsque l'indicateur est proche de 1, le sphéroïde est considéré comme compact. La sphéricité moyenne est significativement plus élevée pour les sphéroïdes formés dans les ascites (0,882 UA +/- 0,014) comparés à ceux formés dans le milieu de culture (0,737

UA +/- 0,034) (Figure 44 B). De plus, on observe une hétérogénéité des tailles ainsi que de la sphéricité pour les sphéroïdes formés en milieu de culture, ceci renforce l'effet de l'ascite sur sa capacité à former des sphéroïdes compacts.

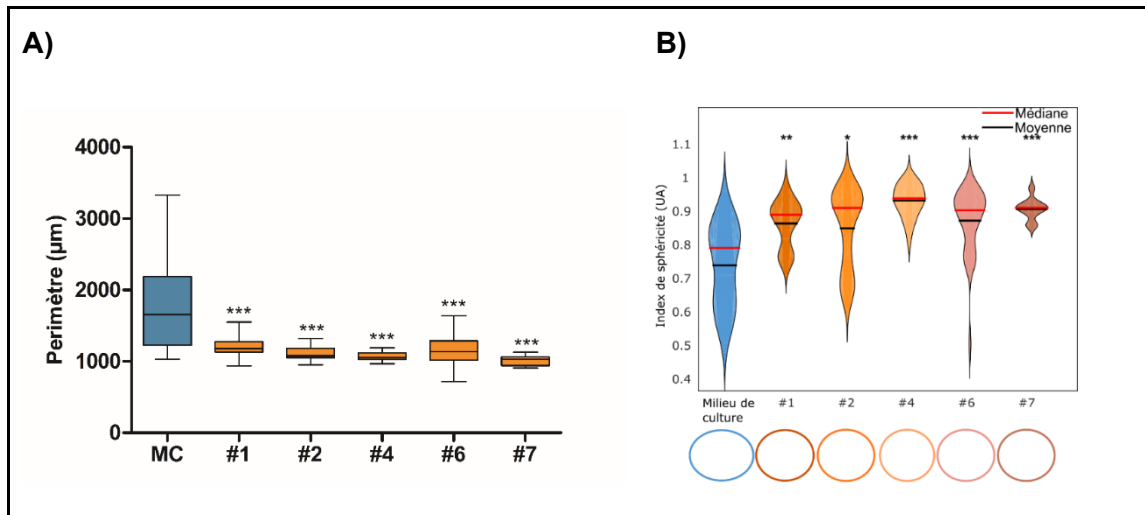


Figure 44 : Effet de l'ascite sur la taille et la compaction des sphéroïdes.

Les sphéroïdes ont été générés en utilisant la méthode « Hanging drop ». 500 cellules SKOV3 ont étéensemencées dans un volume total de 20 µL de milieu de culture ou d'ascite. Les périmètres moyens (A) et la sphéricité (B) des sphéroïdes SKOV3 ont été mesurés après 5 jours de formation avec le logiciel ImageJ. Un cercle parfait a un indicateur de rondeur = 1 (UA). Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne ± SEM. Les valeurs de P ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001) avec des différences significatives estimées par comparaison MC vs Ascites #1, #2, #4, #6 ou #7.

Ces résultats, dans un premier temps, montrent la capacité des cellules cancéreuses de l'ovaire à former des sphéroïdes lorsqu'elles sont maintenues dans un état de culture indépendant de l'ancrage. Cette formation est renforcée par l'ascite quelle que soit la technique *in vitro* utilisée. De plus, ces résultats ont permis de valider l'utilisation de la technique « Hanging drop » pour assurer l'utilisation de sphéroïdes calibrés, en termes de taille et de nombre, dans les expériences suivantes. Enfin, ces résultats mettent en exergue l'impact de l'ascite sur la formation des sphéroïdes ainsi que sur leur compaction en comparaison avec le milieu de culture.

2.2. Le microenvironnement matriciel des sphéroïdes : Caractérisation de la matrice extracellulaire présente au sein des sphéroïdes

Lors de la dissémination tumorale, les sphéroïdes sont amenés à interagir activement avec le microenvironnement péritonéal et ceci, entre autres, *via* les interactions entre les protéines de la MEC et leurs récepteurs. L'expression matricielle *in vitro* et *in situ* des sphéroïdes tumoraux ovariens a donc été observée.

Pour étudier et visualiser l'expression et l'organisation des protéines de la MEC dans les sphéroïdes, une immunofluorescence sur les sphéroïdes ovariens, générés dans l'ascite, a été réalisée.

La localisation et l'organisation de la vitronectine (Vn) et de la fibronectine (Fn) est visualisée à la surface des sphéroïdes. Le fibrinogène (Fg) est également présent et notamment organisé en réseau fibrillaire avec la présence de fibrilles à la surface des sphéroïdes. Les cellules SKOV3 n'exprimant pas le fibrinogène dans un milieu de culture classique, le Fg visualisé au sein des sphéroïdes semble provenir du contenu ascitique ; il est donc « fournie » aux sphéroïdes par l'ascite. (Figure 45 A).

La marquage immunofluorescent montre la présence spécifique de fibrinogène et l'analyse au MEB montre une organisation en réseau, évocatrice d'une organisation en dépôt de fibrine à la surface des sphéroïdes, probablement amenée par l'ascites (Figure 45 B).

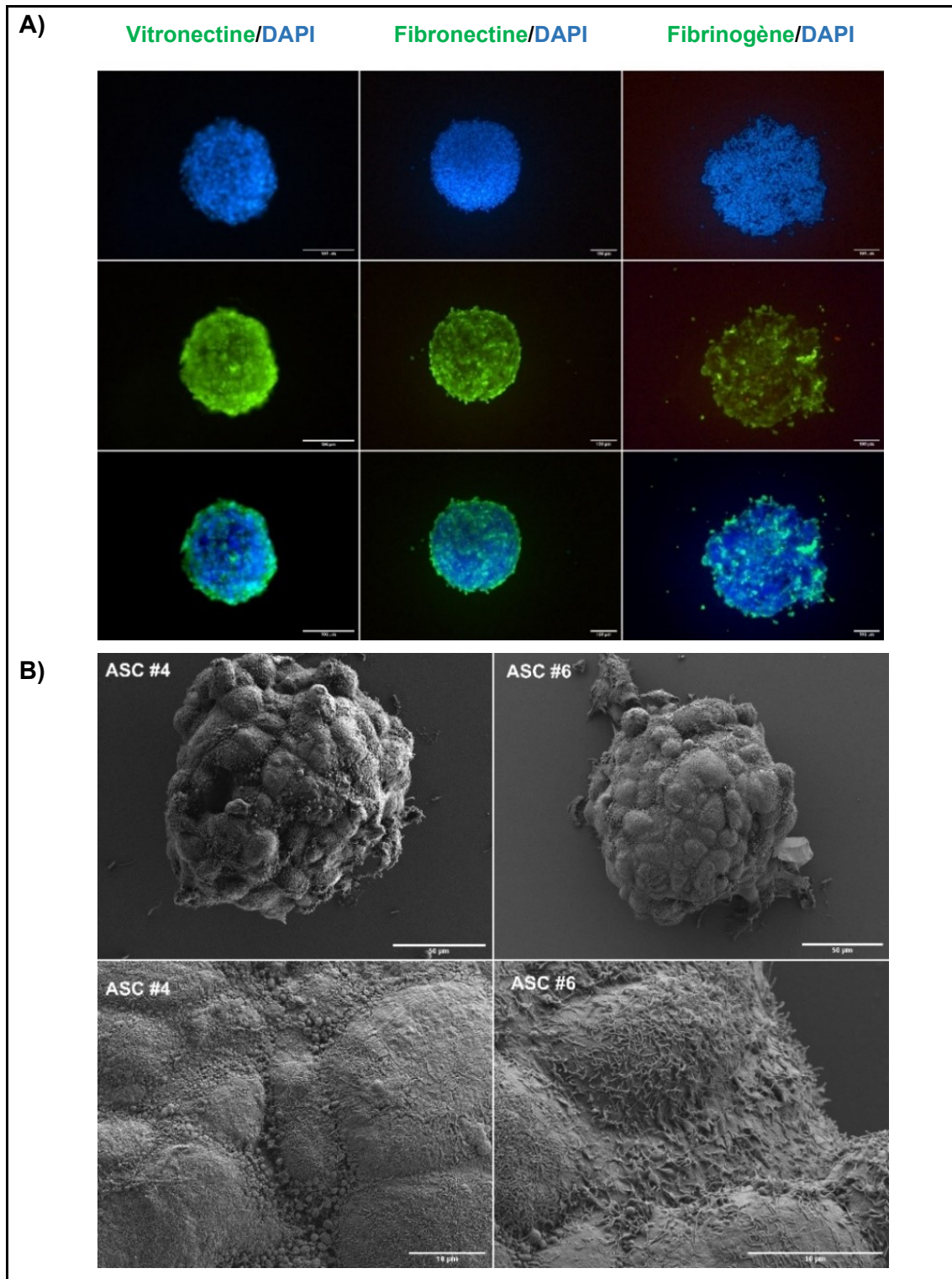


Figure 45 : Localisation et organisation des protéines matricielles des sphéroïdes générées *in vitro*.

(A) Immunofluorescence de la vitronectine, de la fibronectine et du fibrinogène au niveau des sphéroïdes SKOV3 formés *in vitro* en conditions ascitiques (vert). L'ADN des noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (bleu). Les marquages immunofluorescents ont été visualisés par microscopie confocale à balayage laser. Barre d'échelle : 100 µm. (B) Les sphéroïdes SKOV3 ont été formés *in vitro* en ascites (#4 ou #6) et analysés par microscopie électronique à balayage (MEB). Les flèches indiquent des dépôts de macromolécules organisées en réseaux. Barres d'échelle : 50 µm (au-dessus) et 10 µm (en dessous).

Comme le montre la Figure 40 et la Figure 41, les différentes ascites sont une source de fibrinogène et de fibrine qui peuvent être réorganisés par les cellules cancéreuses ovariennes *in vitro*. Une approche *ex-vivo* a également été utilisée pour conforter nos études *in vitro*. Des immunohistochimies, sur des coupes en paraffine de sphéroïdes isolés à partir d'ascite de patientes ont donc également été analysées pour l'expression de Fg / fibrine.

La présence de Fg à la périphérie et à l'intérieur des sphéroïdes *ex-vivo* est clairement visible et conforte donc la présence organisée de Fg et fibrine au sein du microenvironnement péricellulaire des sphéroïdes (Figure 46).

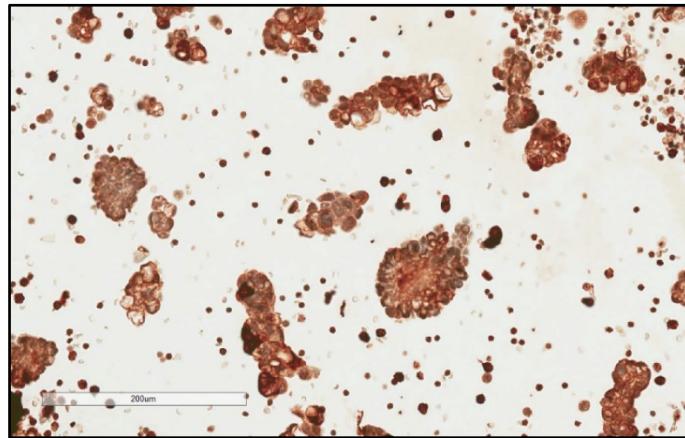


Figure 46 : Présence de fibrinogène/fibrine associés aux sphéroïdes *ex vivo*.

Immunohistochimique du fibrinogène/fibrine au niveau des sphéroïdes tumoraux isolés à partir d'ascite de patientes. Barre d'échelle : 200 μ m.

Ces résultats nous indiquent qu'en présence d'ascites les sphéroïdes présentent un environnement riche en diverses protéines matricielles. De plus, la présence de fibrinogène et de fibrine apportés par l'ascite est retrouvée autour et au sein des sphéroïdes *in vitro* et *ex vivo*.

Conclusion : Partie 2 « L'ascite, un acteur clé de la formation des sphéroïdes tumoraux : Impact de l'ascite sur les sphéroïdes tumoraux ovariens »

Ces résultats démontrent la capacité de l'ascite à renforcer la formation ainsi que la compaction des sphéroïdes. Ces caractéristiques, accentuées par l'ascite, pourraient favoriser la résistance des sphéroïdes aux traitements thérapeutiques en comparaison avec les cellules isolées.

De plus, en ascite, les sphéroïdes expriment ou réorganisent différentes protéines matricielles. Ces molécules matricielles, pourraient activement participer à l'implantation des sphéroïdes tumoraux sur le mésothélium péritonéal, ce qui favoriserait l'apparition et l'extension des métastases. La présence abondante de fibrinogène et de fibrine au sein des ascites et aux abords des sphéroïdes démontrée *in vitro* et *ex vivo* suggère leur importance dans le processus de dissémination tumorale ovarienne.

3. Impact de l'ascite sur le mésothélium

3.1. Le microenvironnement mésothélial : Caractérisation de la matrice extracellulaire des cellules mésothéliales

Le mésothélium péritonéal bordant la cavité abdominale représente un site privilégié et propice à l'implantation des tumeurs de l'ovaire. En effet, les cellules cancéreuses isolées ou plus souvent en amas multicellulaire (sphéroïdes) migrent principalement vers le mésothélium du péritoine, le traversent et envahissent le tissu conjonctif sous-jacent ce qui crée des métastases. Les cellules cancéreuses de l'ovaire, *via* leurs récepteurs membranaires, adhèrent aux protéines de la MEC mésothéliale et s'ancrent aux cellules mésothéliales constituant le mésothélium.

Afin d'étudier ce mésothélium et illustrer au mieux son microenvironnement matriciel ainsi que sa capacité à constituer une barrière protectrice potentiellement déstabilisée au cours de l'implantation tumorale, le modèle cellulaire utilisé est les cellules Met-5A. Les cellules Met-5A ont étéensemencées dans un milieu de culture pendant 5 jours afin d'obtenir une monocouche confluente « solide » et stable. A la confluence, le milieu a été retiré et les cellules ont été incubées dans un nouveau milieu de culture ou en ascite. L'expression des protéines matricielles des cellules de cette monocouche a été visualisée après 24 h d'incubation en milieu de culture ou en ascites. Nous avons focalisé notre attention sur les constituants de la lame basale mais aussi sur la fibronectine dont nous avons, précédemment dans l'équipe, mis en évidence son importance au sein du microenvironnement tumoral ovarien [40]. Nous avons également, suite à nos résultats cités plus haut, investigué plus particulièrement le Fg/fibrine.

Les cellules mésothéliales de la monocouche expriment le collagène IV, la laminine et la fibronectine en condition classique de culture. Cependant, en présence d'ascite, cette expression augmente, apparaît plus intense et dense, et est associée à une organisation en réseau de protéines (Figure 47).

Concernant le fibrinogène, l'immunofluorescence révèle l'absence de marquage de Fg lorsque les cellules mésothéliales sont en condition classique de culture. En revanche, en ascites, la présence de Fg, et plus spécifiquement l'organisation de réseaux de fibrine, sont observées. Cet apport et ce dépôt de fibrinogène et de fibrine ascitique est visualisé Figure 47.

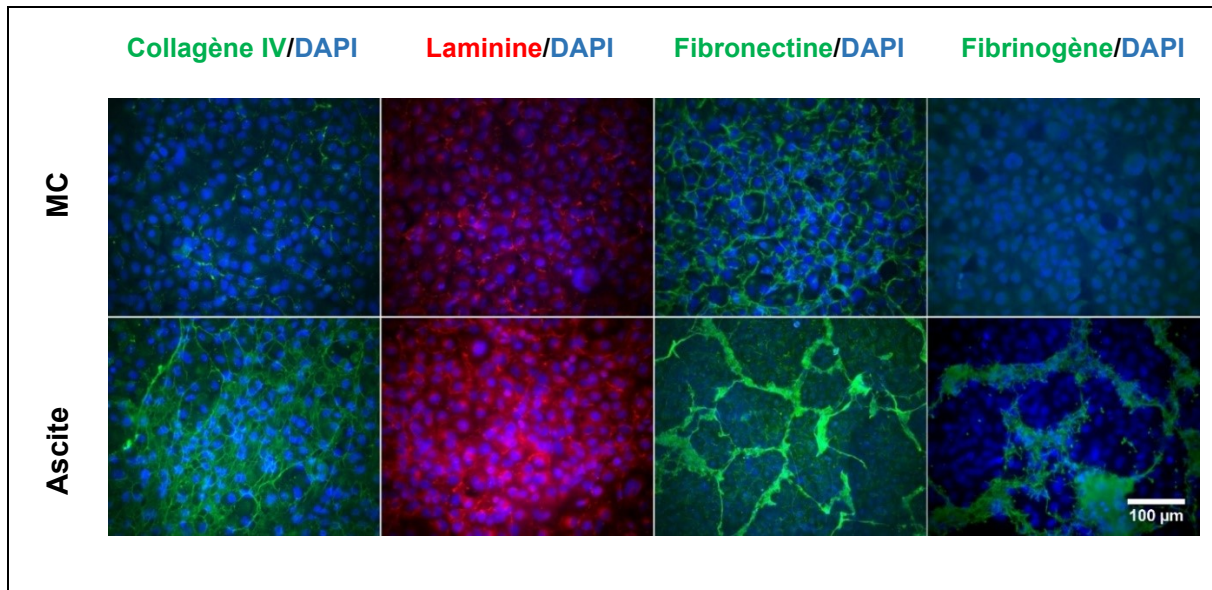


Figure 47 : Effet de l'ascite sur la localisation et l'organisation des protéines matricielles de la monocouche mésothéliale.

Immunofluorescence du collagène IV, de la laminine, de la fibronectine et du fibrinogène au niveau de la monocouche de cellules Met-5A après 24 heures d'incubation avec un milieu de culture ou en ascite. L'ADN des noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle : 100 µm.

Ces réseaux de fibrine flottants et parfois sous forme de paillette peuvent, selon l'ascite, être observés au microscope optique à contraste de phase dès l'ajout de l'ascite sur les monocouches (Figure 48 A).

Ces réseaux de fibrine ont été analysés par MEB lorsque les monocouches mésothéliales ont été incubées avec le milieu de culture ou différentes ascites (#2, #5 ou #6) pendant 24 h.

Les observations confirment l'absence de réseaux de fibrine lorsque les cellules mésothéliales ont été incubées avec du milieu de culture. A l'inverse, des réseaux hétérogènes de fibres, à la fois en termes de quantité et d'organisation, selon les différentes ascites utilisées, sont visualisés (Figure 48 B). Les acquisitions MEB ont révélé que les réseaux sont bien organisés en fibres [154,155] (Figure 48 B, grossissement).

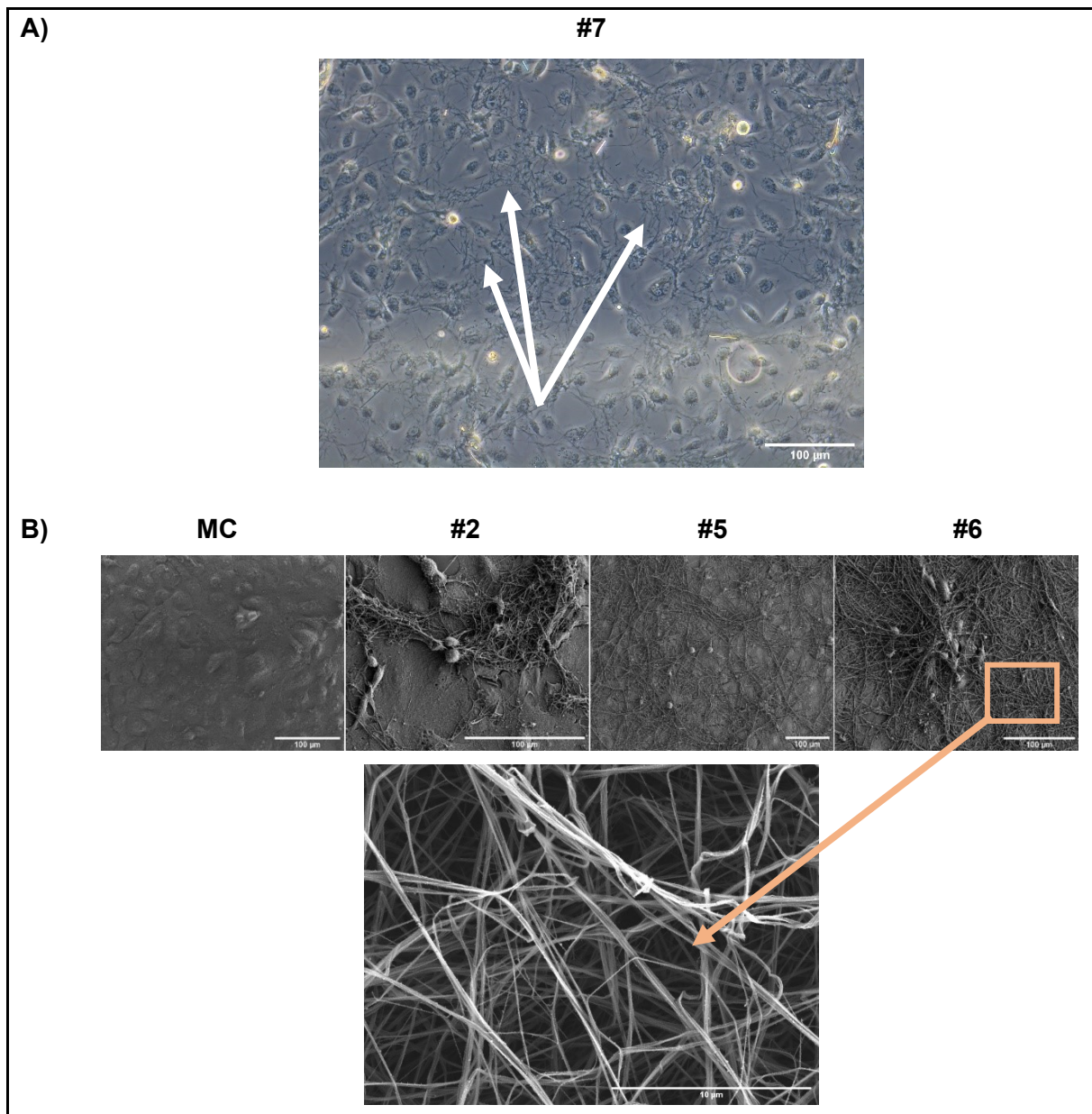


Figure 48 : Présence du fibrinogène et de la fibrine sur les monocouches mésothéliales.

(A) Des cellules mésothéliales ont été incubées avec l'ascite #7 et la présence de paillettes de fibrinogène a été photographiée (flèches). Barre d'échelle : 100 µm. (B) La monocouche de cellules Met-5A a été incubée 24 heures avec un milieu de culture ou différentes ascites (#2, #5 ou #6) et analysée par MEB. Barre d'échelle : 100 µm. Barre d'échelle du grossissement : 10 µm (flèche orange).

Les analyses en microscopie électronique à lumière corrélative (CELM) permettent de superposer des images de fluorescence à celle du MEB. Ceci permet d'estimer et de confirmer une colocalisation de molécules. Ainsi, nos études révèlent, par le marquage en immunofluorescence du Fg, que les réseaux observés sont bien corrélés aux réseaux de fibrines retrouvés en MEB. Ceci permet d'affirmer que les fibres visualisées sur le mésothélium sont bien composées de fibrine.

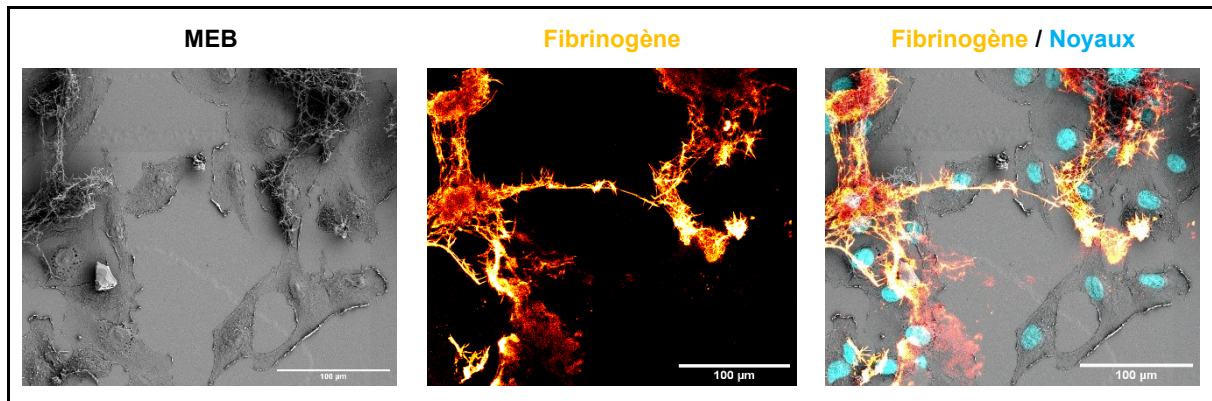


Figure 49 : Co-localisation de fibrinogène et de fibrine sur le mésothélium.

La monocouche de cellules Met-5A a été incubée 24 heures avec de l'ascite et a été analysée par microscopie électronique-lumière corrélative (CELM). Immunofluorescence du fibrinogène (orange). L'ADN des noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (bleu). Les marquages immunofluorescents ont été visualisés par microscopie confocale à balayage laser, puis le même échantillon a été séché par séchage au point critique et analysé par MEB. Barre d'échelle : 100 µm.

Ces résultats démontrent que l'ascite permet la densification et la réorganisation des protéines de la MEC (Collagène IV, Laminine, Fibronectine) par les cellules mésothéliales. De plus, l'ascite est une source de Fg et de fibrine qui se déposent et s'organisent en réseaux sur le mésothélium. Cette présence renforcée et accentuée de matrice extracellulaire à la surface de la monocouche mésothéliale en conditions ascitiques pourrait favoriser l'implantation des sphéroïdes puis leur dispersion sur le mésothélium.

3.2. Impact de l'ascite sur le fonctionnement cellulaire : Etude de la cytotoxicité, viabilité et du cycle cellulaire des cellules mésothéliales

Le mésothélium péritonéal est le site privilégié d'implantation des métastases d'adénocarcinome ovarien. Les dépôts de protéines matricielles favorisent l'implantation des cellules cancéreuses ovariennes isolées et/ou en sphéroïdes mais ne justifient pas leur capacité à traverser le mésothélium pour coloniser les tissus sous-jacents. En effet, la membrane mésothéliale est une barrière stable et protectrice dans des conditions physiologiques, qui empêche, normalement, le passage des cellules cancéreuses. Nous avons donc voulu étudier l'impact de l'ascite sur cette barrière protectrice potentiellement déstabilisée au cours de l'implantation tumorale.

Après 5 jours de culture, les cellules mésothéliales ont formé une monocouche confluente « mimant » le mésothélium. A la confluence de cette monocouche, le milieu de culture a été

retiré et les cellules ont été incubées dans un nouveau milieu de culture ou avec différentes ascites.

Après 24 h d'incubation en ascite (ASC #1, ASC #2, ASC #6), les cellules mésothéliales semblent être en légère souffrance cellulaire avec une déstabilisation apparente de la monocouche et l'accumulation de vésicules intracellulaires qui augmente avec le temps (96 h). En revanche, en conditions classique de culture, les cellules de la monocouche semblent avoir une morphologie classique (Figure 50).

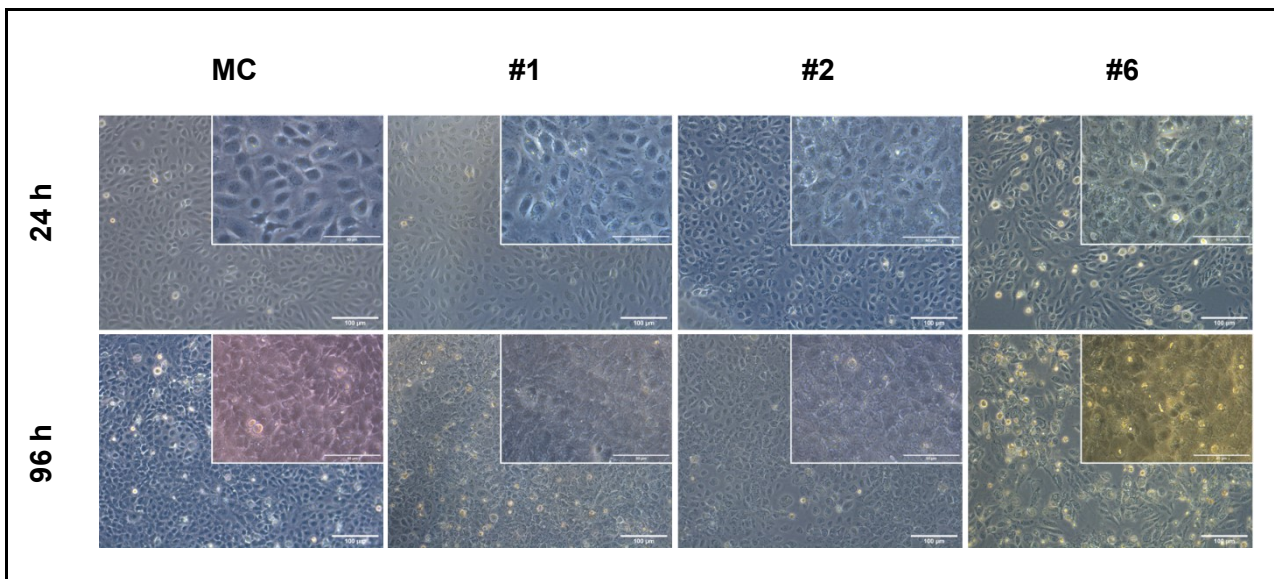


Figure 50 : Effet de l'ascite sur l'état morphologique de la monocouche mésothéliale.

Les cellules Met-5A ont étéensemencées dans du milieu de culture pendant 5 jours jusqu'à confluence. Ensuite, des monocouches mésothéliales ont été incubées avec du milieu de culture (MC) ou des ascites (#1, #2 ou #6) pendant 24 h ou 96 h. Des photographies représentatives ont été prises à 24 h et 96 h au microscope optique à contraste de phase. Barre d'échelle : 100 μm et 50 μm pour les grossissements.

Pour évaluer une possible cytotoxicité due aux molécules présentes dans les ascites, un test LDH (Lactate déshydrogénase) a été réalisé en comparant la cytotoxicité des différentes ascites du panel au milieu de culture.

Les résultats montrent une cytotoxicité des ascites sur les cellules mésothéliales à 24 h mais celle-ci se stabilise au cours du temps comparé au milieu de culture (Figure 51).

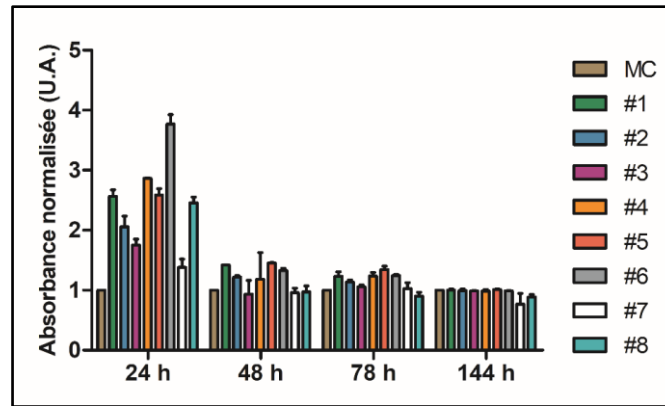


Figure 51 : Effet de l'ascite sur la cytotoxicité cellulaire des cellules mésothéliales.

Les cellules Met-5A ont été ensemencées dans du milieu de culture pendant 5 jours jusqu'à confluence. Ensuite, des monocouches mésothéliales ont été incubées avec du MC ou des ascites (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7 ou #8) pendant 24 h, 48 h, 78 h ou 144 h. Un test à la Lactate Deshydrogénase (LDH) a été réalisé à chaque temps pour mesurer la cytotoxicité des ascites sur les cellules mésothéliales.

Par ailleurs, la viabilité des cellules de la monocouche mésothéliale a été estimée par le test d'exclusion au bleu trypan après 0, 24, 72 ou 96 heures de culture cellulaire en condition classique ou ascitique (ascites #1, #2 ou #6).

Après 24 h de culture, aucun effet de l'ascite n'est observé sur la viabilité des cellules Met-5A par rapport au milieu de culture. Cependant, à 72 h, les ascites #1 et #6 inhibent de manière significative la viabilité des cellules Met-5A par rapport au milieu de culture. Au même temps, l'ascite #2 semble avoir un effet intermédiaire, entre les ascites #1/ #6 et le milieu de culture, sur la viabilité des cellules de la monocouche Met-5A. A 96 h, les ascites #1 et #6 inhibent de manière significative la viabilité des cellules Met-5A par rapport à l'ascites #2. Ces différences entre les ascites illustrent l'hétérogénéité des ascites déjà évoquée précédemment mais le profil général des ascites tend à suggérer que les ascites ont un effet inhibiteur sur la viabilité des cellules du mésothélium (Figure 52).

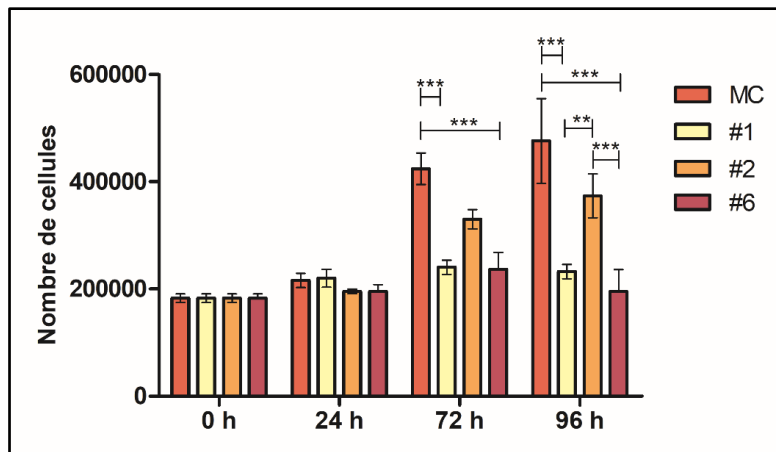


Figure 52 : Effet de l'ascite sur la viabilité cellulaire des cellules mésothéliales.

Les cellules Met-5A ont été ensemencées dans du milieu de culture pendant 5 jours jusqu'à confluence. Les monocouches mésothéliales ont ensuite été incubées avec du MC ou des ascites (#1, #2 ou #6) pendant 24 h, 72 h ou 96 h. Le nombre de cellules viables a été mesuré par le test d'exclusion au bleu trypan à chacun des temps. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs p ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) avec des différences significatives estimées par comparaison entre le MC et les ascites.

Pour approfondir cet impact des ascites sur le fonctionnement cellulaire, l'analyse du cycle cellulaire des cellules Met-5A, en monocouche, a été réalisée après l'ajout des ascites #1, #2 et #6 pendant 24 h et 96 h.

Contrairement au milieu de culture, l'ascite #6 augmente considérablement le pourcentage de débris cellulaires et de mort cellulaire (Pic pré-G1) au fil du temps (Figure 53). Ce résultat conforte l'impact des ascites sur la viabilité des cellules mésothéliales. En outre, à 24 h comme à 96 h, l'ASC #6 diminue considérablement la proportion de cellules Met-5A dans la phase G0 / G1 et augmente la phase G2 / M du cycle cellulaire. A partir de 24 h d'incubation avec les ascites #1 ou #2, le pourcentage de cellules en phase S diminue significativement et le pourcentage de cellules en phase G0 / G1 augmente significativement par rapport au milieu de culture. A 96 h, le nombre de cellules en phase G0 / G1 diminue de manière significative et le nombre de cellules en phase G2 / M augmente significativement par rapport au milieu de culture. Ces trois ascites semblent bloquer les cellules dans la phase G2 / M du cycle cellulaire (Figure 53). De plus ces données confirment la diminution de la densité cellulaire globale observée sur la Figure 52. Cependant, ces résultats montrent encore des différences entre les ascites. Alors que les ascites #1 et #2 ne sont associées qu'à une diminution de la densité cellulaire en bloquant le cycle cellulaire en G2 / M, l'ascite #6 en plus de ce blocage, semble plus agressive avec un effet cytotoxique sur la monocouche mésothéliale.

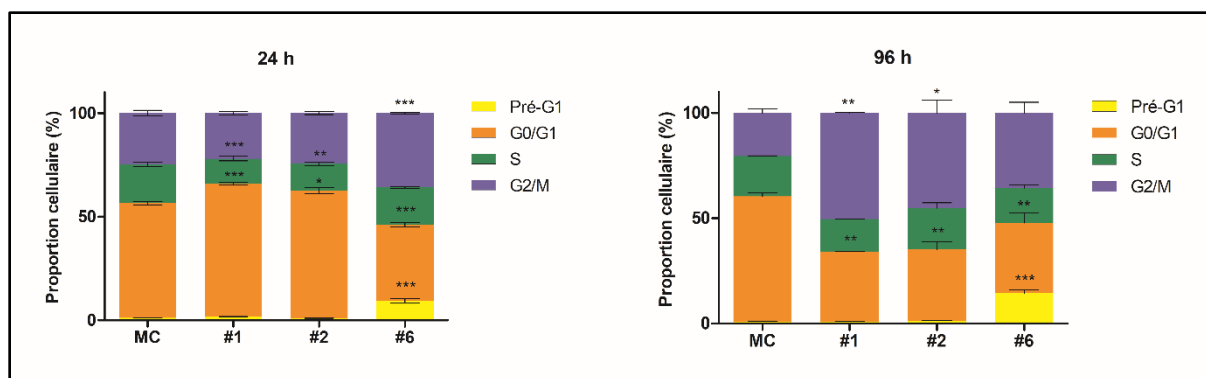


Figure 53 : Effet de l'ascite sur le cycle cellulaire des cellules mésothéliales.

Les cellules Met-5A ont été ensemencées dans du milieu de culture pendant 5 jours jusqu'à confluence. Les monocouches mésothéliales ont ensuite été incubées avec du MC ou des ascites (#1, #2 ou #6) pendant 24 h ou 96 h. L'analyse du cycle cellulaire des cellules Met-5A après incubation avec du MC ou des ascites pendant 24 ou 96 h a été réalisée. Les cellules ont été marquées avec de l'iodure de propidium et analysées dans un cytomètre en flux. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne \pm SEM. Le pourcentage de distribution du cycle cellulaire dans les phases Pré-G1, Go / G1, S et G2 / M a été déterminé avec le logiciel BD Accuri C6 Plus. Les valeurs p ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) avec des différences significatives estimées par comparaison MC vs Ascites #1, #2 ou #6.

L'ascite induit une légère cytotoxicité des cellules mésothéliales lorsqu'elles sont en monocouche à 24 h. Cependant, au cours du temps, l'ascite affaiblit le mésothélium en affectant la viabilité des cellules mésothéliales ainsi qu'en déstabilisant leur distribution dans le cycle cellulaire. Globalement, il est démontré que les molécules ascitiques impactent le fonctionnement des cellules mésothéliales.

3.3. Ascites et déstabilisation de la barrière mésothéliale : Caractérisation des jonctions cellulaires des cellules mésothéliales

Comme mentionné dans l'introduction bibliographique du manuscrit, le mésothélium agit comme une barrière physiologique. Sa déstabilisation facilite la migration des cellules cancéreuses au travers de cette barrière. La déstabilisation apparente de la monocouche n'est probablement pas induite uniquement par une cytotoxicité des ascites ou par une apoptose accrue.

Les monocouches mésothéliales ont été incubées pendant 24 heures avec du milieu de culture ou de l'ascite puis des marquages immunofluorescents des glycoprotéines N-Cadhérine et des jonctions serrées ZO-1 ont été réalisés. Ces deux molécules sont au cœur des interactions intercellulaires épithéliales et sont capitales pour le maintien de la cohésion du mésothélium.

En milieu de culture classique, le marquage immunfluorescent de la N-Cadhérine révèle une localisation jonctionnelle régulière entre les cellules de la monocouche mésothéliale. En ascites, le marquage diffus de la N-Cadhérine suggère fortement une dislocation de la protéine intercellulaire le long des cellules de la monocouche. Le marquage immunfluorescent de ZO-1 révèle aussi une expression irrégulière de la protéine en conditions ascitiques comparée au milieu de culture (Figure 54).

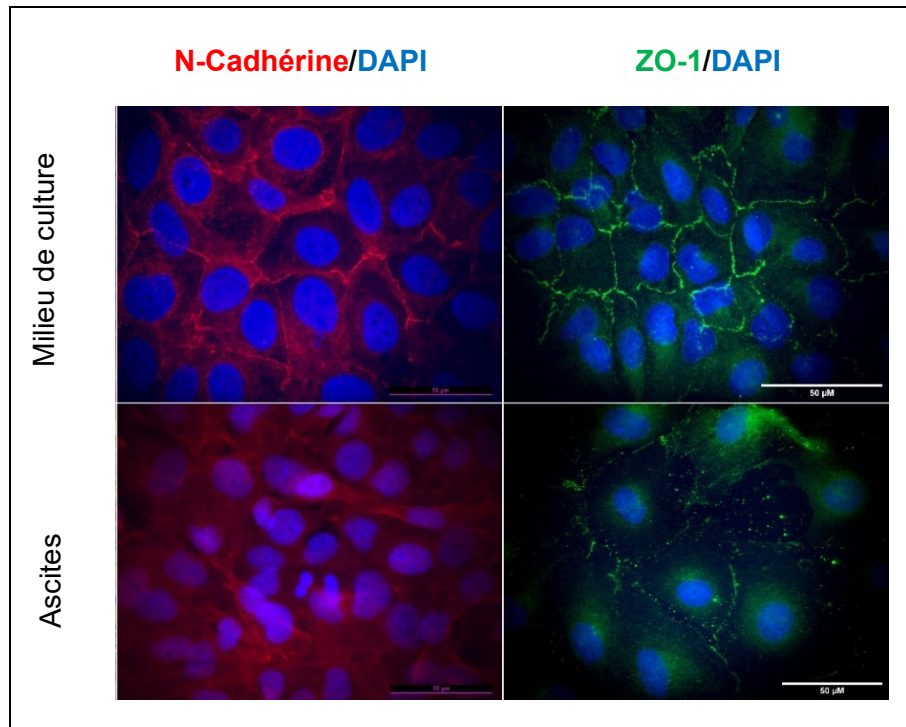


Figure 54 : Effet de l'ascite sur l'intégrité du mésothélium.

Immunofluorescence de la N-Cadhérine (rouge) ou ZO-1 (vert) au niveau de la monocouche de cellules Met-5A après 24 h d'incubation avec du milieu de culture ou de l'ascite. L'ADN des noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle : 50 μ m.

Cependant, les quantités de protéines N-cadhérine et ZO-1, suivies par Western blot, ne sont pas affectées par les différentes ascites en comparaison avec le milieu de culture (Figure 55). L'ascite ne semble donc pas avoir d'influence sur la synthèse ou la dégradation de ces protéines. Les bandes de N-cadhérine et de ZO-1 ont été observées respectivement à 150 et 220 kDa.

Suite à ces résultats, notre hypothèse est que les molécules contenues dans les ascites favorisent la dislocation de la monocouche mésothéliale et perturbent l'organisation des jonctions intercellulaires mésothéliales telle que la N-Cadhérine et la ZO-1, sans forcément affecter la synthèse ou la dégradation des protéines étudiées.

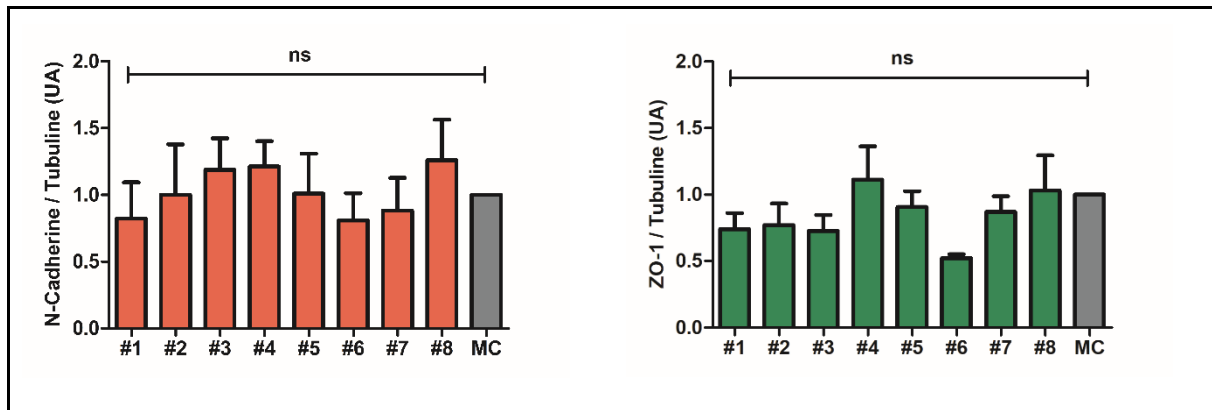


Figure 55 : Effet de l'ascite sur la N-Cadhérine et ZO-1

Des monocouches de Met-5A ont été incubées avec du milieu de culture ou des ascites (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7 ou #8) pendant 24 h. Un Western blot représentatif pour l'expression de la N-cadhérine et ZO-1 dans les cellules Met-5A a été analysé. Des quantités égales (10 ug) de protéines totales des cellules Met-5a ont été séparées sur SDS-PAGE dans des conditions réductrices. La tubuline a été utilisée comme témoin de charge. Les résultats sont donnés sous forme de graphique du facteur relatif de la N-cadhérine ou de la ZO-1 par rapport à celui de la tubuline. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM et représentatives de trois expériences indépendantes. ns : non significatif.

3.4. Ascite et perturbation du « squelette » et de l'élasticité cellulaire : Etude de l'organisation du cytosquelette des cellules mésothéliales.

Le maintien de l'intégrité du mésothélium est dû à la stabilité des jonctions cellule-cellule mais aussi à la propriété mécanique des cellules qui leur est conférée par leur cytosquelette ainsi que par leur capacité d'ancrage.

Après 24 h d'incubation des cellules mésothéliales avec le milieu de culture ou de l'ascite, le marquage de la tubuline (microtubules) et de la vimentine (filaments intermédiaires) ne révèlent aucun impact de l'ascite sur leur organisation par rapport au milieu de culture (Figure 56).

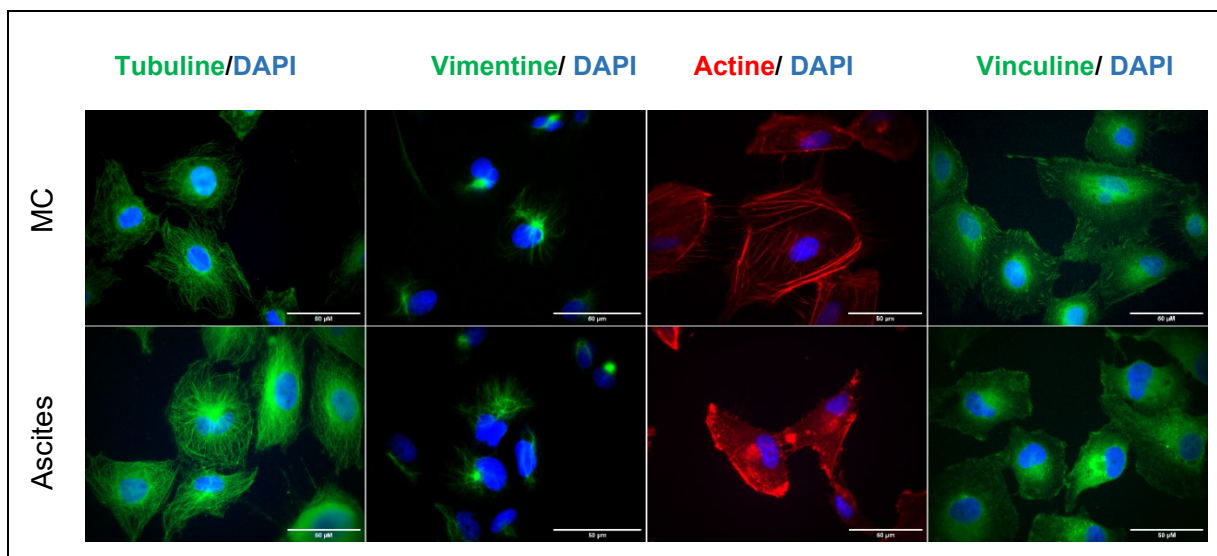


Figure 56 : Effets de l'ascite sur le cytosquelette et l'ancrage des cellules mésothéliales.

Immunofluorescence de la tubuline, de la vimentine, de l'actine et de la vinculine au niveau des cellules Met-5A après 24 h d'incubation avec un milieu de culture ou en ascite (vert). L'actine a été marquée à la Phalloïdine (rouge). L'ADN des noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle : de 50 µm.

Néanmoins, l'ascite conduit à une réorganisation du cytosquelette de l'actine. L'organisation initiale de l'actine des cellules mésothéliales se caractérise par la présence de fibres de tensions et d'actine corticale. En ascites, le marquage de l'actine est plus diffus et se situe à la périphérie de la membrane, ce type de structure de l'actine est appelée « membrane ruffles » et correspond à un « ébouriffage » de la membrane (Figure 57).

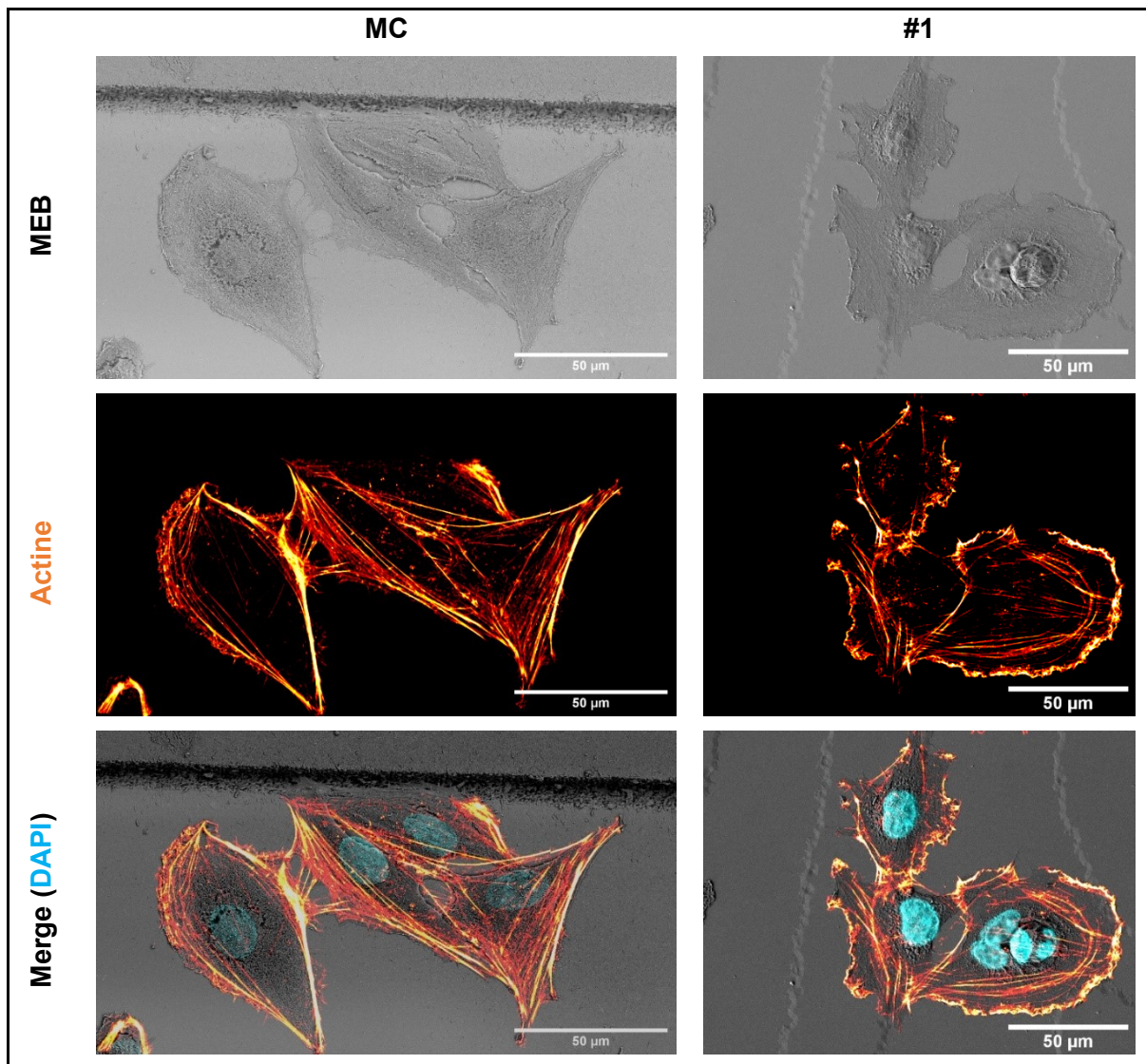


Figure 57 : Effet de l'ascite sur le cytosquelette d'actine et organisation en « membrane ruffle ».

Images obtenues suite à la microscopie CLEM : acquisitions MEB + acquisitions d'immunofluorescence de l'actine (orange) sur des cellules Met-5A après 24 h d'incubation avec un milieu de culture ou de l'ascite. L'ADN des noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (bleu). Barre d'échelle : 50 µm.

Les cellules émettent ce type d'extension cytoplasmique et membranaire lorsqu'elles se rétractent ou se déplacent. De plus, l'analyse par Western blot révèle que les intensités des bandes d'actine restent inchangées ce qui implique que seule l'organisation de l'actine est impactée et non pas sa synthèse, quelle que soit l'ascite utilisée (Figure 58).

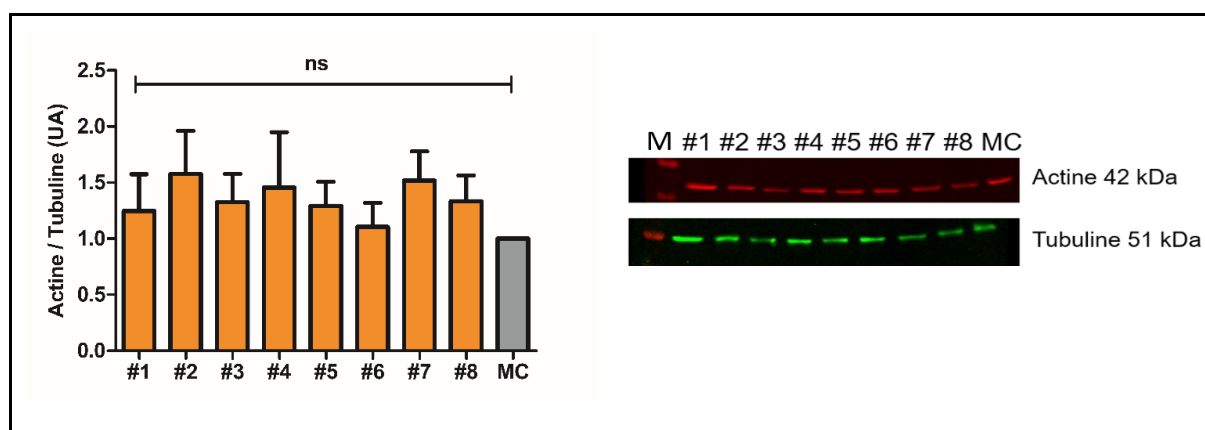


Figure 58 : Effet de l'ascite sur l'actine.

Les monocouches mésothéliales ont été incubées avec du milieu de culture ou les ascites (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7 ou #8) pendant 24 h. Un Western blot représentatif pour l'expression de l'actine dans les cellules Met-5A a été analysé. Des quantités égales (10 µg) de protéines totales des cellules Met-5A ont été séparées sur SDS-PAGE dans des conditions réductrices. La tubuline a été utilisée comme témoin de charge. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes exprimées en moyenne \pm SEM et représentatives de trois expériences indépendantes. ns : non significatif. M : Marqueur de poids moléculaire.

En ce qui concerne l'impact de l'ascite sur l'ancrage cellulaire, le marquage de la vinculine permet de visualiser les plaques d'adhésions focales au niveau des membranes cellulaires (Figure 56). Ces plaques d'adhésions appelées aussi contacts focaux sont de véritables structures d'adhérence et de signalisation cellulaire. Ces points d'ancrage sont très présents et organisés lorsque les cellules sont incubées en milieu de culture classique. En ascite, le marquage est diffus et moins prononcé ce qui évoque une désorganisation des structures d'ancrage associées à la vinculine (Figure 56).

Ces résultats illustrent l'impact de l'ascite sur la déstabilisation du mésothélium, il induit une désorganisation de l'ancrage des cellules à leur MEC perturbant notamment l'organisation des contacts focaux ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette de l'actine avec l'apparition de « membrane ruffle ». Ces modifications ont pour conséquence une rétraction des cellules mésothéliales.

Afin de vérifier cette hypothèse sur la rétraction cellulaire, la topographie ainsi que l'élasticité des cellules Met-5a ont été étudiées par une analyse au microscope atomique.

Après 24 h d'incubation des cellules Met-5A avec le milieu de culture ou l'ascite, l'observation topographique des cellules mésothéliales au microscope à force atomique semble indiquer une rétraction des cellules et une perte des points d'ancrage en condition ascitique. De plus, on peut observer à nouveau les « membrane ruffles » (Figure 59). (*Résultats préliminaires*)

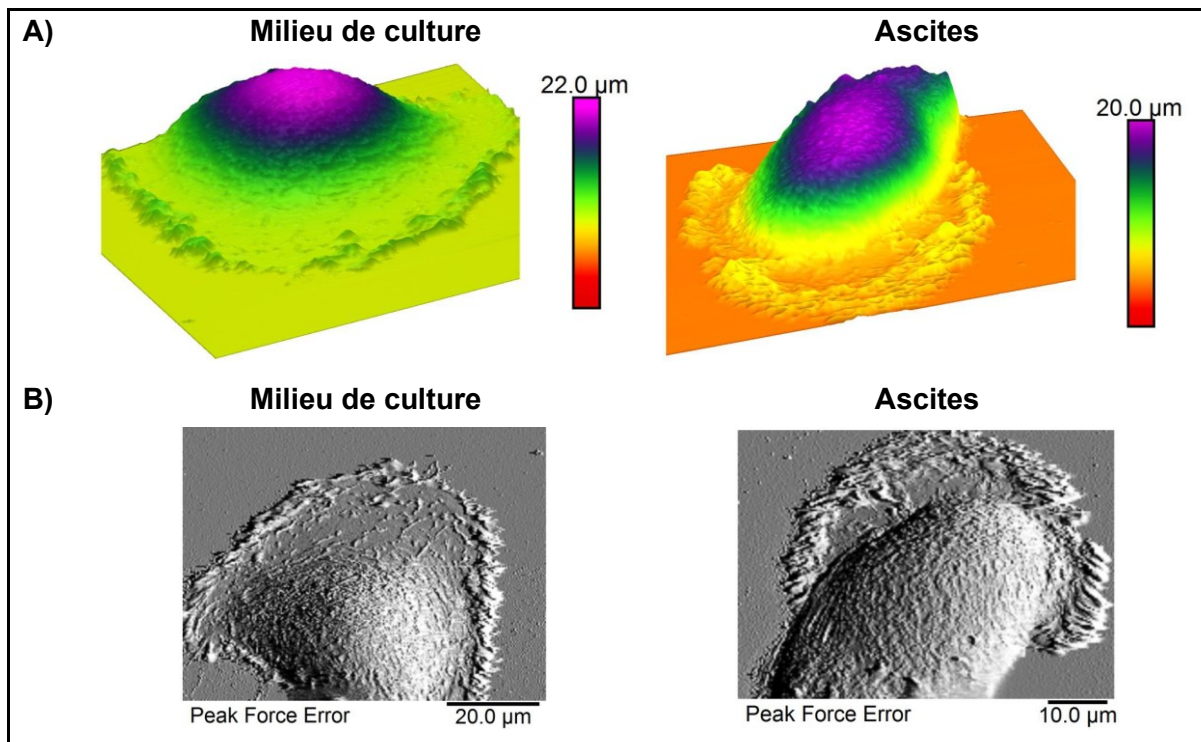


Figure 59 : Effet de l'ascite sur la rétraction des cellules mésothéliales.

Les cellules Met-5a isolées ont été incubées 24 h avec le milieu de culture ou de l'ascite et ont ensuite été analysées avec un microscope électronique à force atomique. A : Projection 3D de la topographique. B : Représentation topographique de surface.

Le module élastique, aussi appelé module de Young, est la constante qui relie la contrainte de traction et le début de la déformation d'un matériau élastique. Cette mesure d'élasticité est en Pascal (Pa). En biologie cellulaire, ces mesures permettent d'évaluer l'élasticité d'une cellule et donc sa motilité [156,157]. Lorsque les cellules sont cultivées dans l'ascites, il y a une diminution de l'élasticité moyenne comparée aux cellules cultivées en milieu de culture classique (~10 vs 15 kPa). Cette dernière traduit un gain de motilité des cellules mésothéliale en présence d'ascites (Figure 60). (*Résultats préliminaires*)

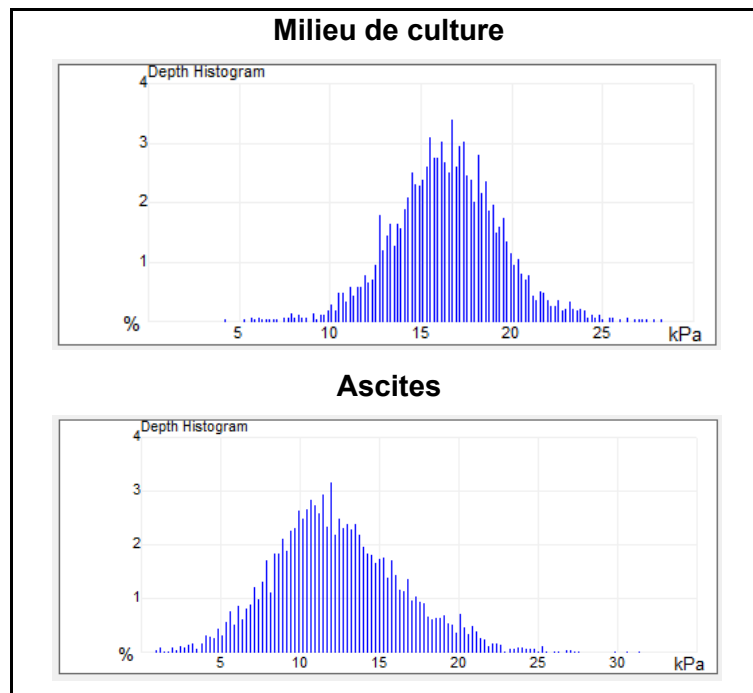


Figure 60 : Effet de l'ascite sur l'élasticité des cellules mésothéliales.

Distribution des mesures d'élasticité (module de Young). Des monocouches mésothéliales ont été incubées 24 h avec le milieu de culture ou de l'ascite et ont ensuite été analysées avec un microscope électronique à force atomique.

Ces données démontrent l'impact de l'ascite sur sa capacité à influencer l'élasticité des cellules mésothéliale, caractéristique qui pourrait permettre aux cellules de se rétracter et perdre l'intégrité de la barrière mésothéliale.

3.5. Ascite et signalisation : Etude de la voie de signalisation RhoA/Rac1/Cdc42 dans les cellules mésothéliales

La déstabilisation du mésothélium et la perturbation de l'organisation cellulaire mésothéliale nous ont incité à évaluer l'impact des ascites sur la signalisation cellulaire. Notamment celle accompagnant la réorganisation du cytosquelette. Une immunoprécipitation (IP) a été réalisée à l'aide de billes Rhotekin-RBD et PAK-PBD pour détecter l'activation des GTPase : RhoA, de Cdc42 et de Rac1. Ces mesures d'activation ont été réalisées sur les monocouches mésothéliales après 30 minutes ou 24 heures d'incubation avec du milieu de culture ou les ascites #1, #2 ou #6.

Le taux d'activation des protéines RhoA et Cdc42 ne montrent pas de différences significatives entre le milieu de culture et l'ascite (Figure 61).

Les résultats des immunoprécipitations montrent que l'activation basale de Rac1 est faible dans les cellules mésothéliales, mais lorsque les cellules ont été incubées avec les ascites, une augmentation de l'activation de Rac1 est observable dès 30 minutes (Figure 61). Cette augmentation de l'activation de Rac1 dans les cellules est accentuée à 24 heures avec les ascites #1 et #2. L'activation de Rac1 dans les cellules avec l'ascite #6 semble constante au cours du temps.

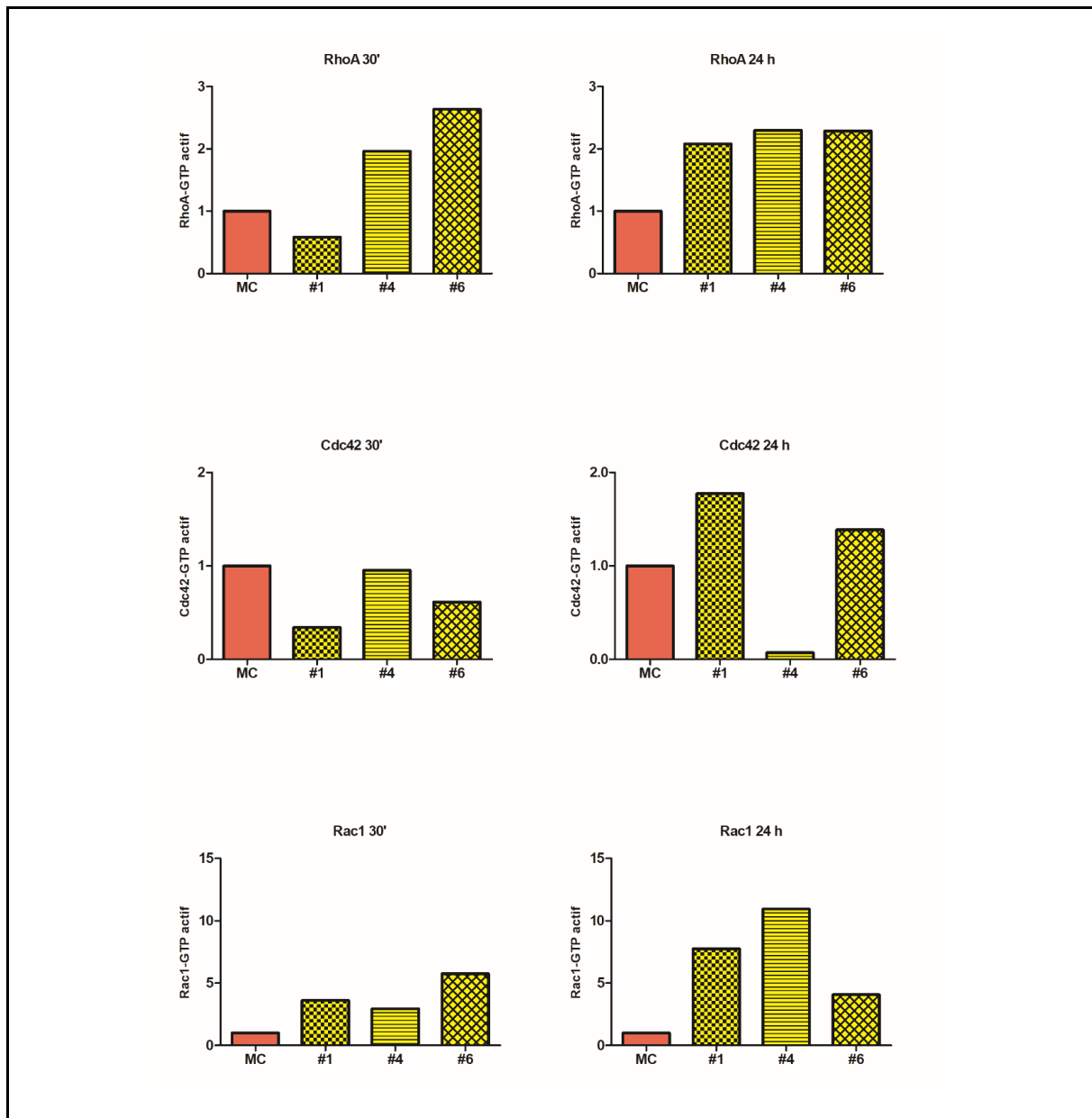


Figure 61 : Effet de l'ascite sur les effecteurs de la dynamique du cytosquelette : RhoA, Cdc42 et Rac1.

Les cellules Met-5A ont été incubées pendant 30 minutes ou 24 heures avec du milieu de culture ou des ascites (#1, #4 ou #6). Une immunoprécipitation de RhoA activé, Cdc42 activé ou Rac1 activé a été réalisée suivit d'un Western blot. Le ratio entre la forme activée de la protéine et la quantité totale de protéine a été calculé.

Par ailleurs, l'analyse par immunofluorescence de l'actine a révélé une augmentation du nombre de cellules riches en « membrane ruffles » lorsque les cellules sont en présence d'ascite par rapport au milieu de culture. La localisation par immunofluorescence de Rac-1 au sein de ces extensions cytoplasmiques (membrane ruffles) conforte le fait que cette GTPase est activée en présence d'ascite (Figure 62).

Ces résultats d'activation de Rac1 dans les cellules mésothéliales en présence d'ascite sont en accord avec les observations d'immunofluorescence, en effet les ascites #1 et #2 génèrent plus de « volants » membranaires tandis que l'ascite #6 induit une morphologie mésenchymateuse des cellules.

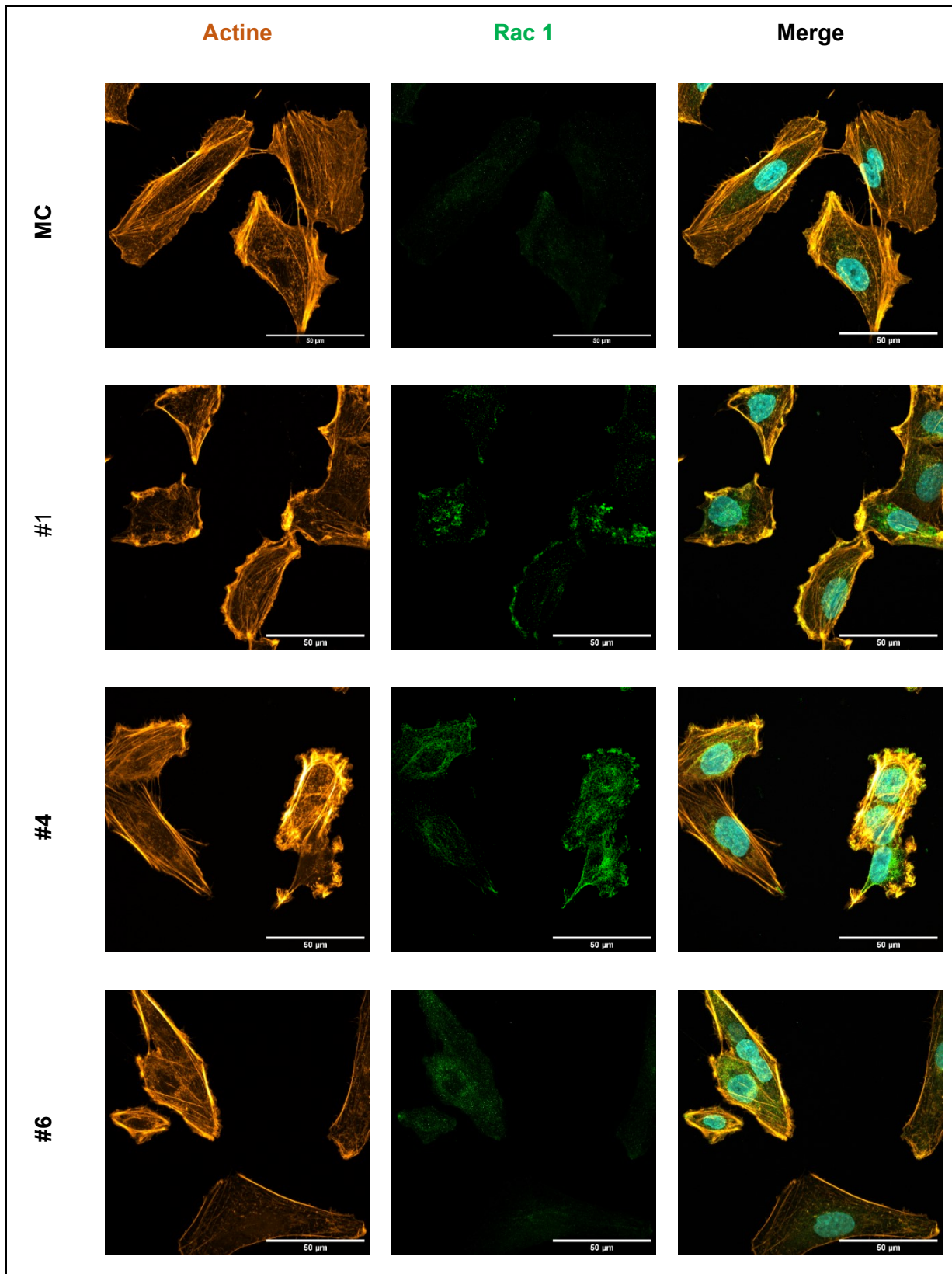


Figure 62 : Effet de l'ascite sur la localisation de Rac1.

Les cellules Met-5A ont été incubées pendant 24 heures avec du milieu de culture ou des ascites (#1, #4 ou #6). Marquage par immunofluorescence de l'actine (Orange) et de Rac1 (Vert) exprimées dans les cellules Met-5A. L'ADN des noyaux cellulaires ont été marqués avec du Hoechst (bleu). Les cellules ont été examinées par microscopie confocale à balayage laser. Barre d'échelle : 50 μ m.

Conclusion : Partie 3 « Impact de l'ascite sur le mésothélium »

L'ascite favorise la densification et la formation de réseaux de protéines matricielles à la surface du mésothélium.

L'ascite a un impact sur la diminution de la viabilité des cellules mésothéliales en monocouche ainsi que sur la perturbation de leur répartition dans le cycle cellulaire favorisant la fragilisation du mésothélium.

La perte d'intégrité de la monocouche mésothéliale due à une diminution des jonctions cellulaires, une réorganisation du cytosquelette d'actine avec l'apparition de « membrane ruffle », une perte des contacts focaux et un gain d'élasticité des cellules mésothéliales s'accompagnent d'une rétraction des cellules lorsqu'elles sont au contact de l'ascite.

Ces données illustrées dans cette partie de résultats suggèrent que les effets des ascites décrits, pourraient faciliter l'implantation des sphéroïdes tumoraux ovariens sur le mésothélium puis la migration transmésothéliale des cellules cancéreuses.

4. Impact de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur un revêtement matriciel

4.1. Impact de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur la fibronectine et sur le fibrinogène

Pour accéder au tissu conjonctif sous-jacent du mésothélium et y établir des métastases, les cellules cancéreuses ovariennes isolées ou en sphéroïdes s'implantent dans un premier temps au niveau du mésothélium péritonéal. Comme le montre la Figure 47, les cellules mésothéliales expriment et organisent de la Fn en présence d'ascite. De plus, l'ascite est une source de Fg comme décrit précédemment. Ces deux protéines se déposent et se localisent au niveau du mésothélium et s'organisent en réseau sous l'influence de l'ascite et de la présence des cellules mésothéliales. Il nous a paru pertinent d'évaluer la capacité des sphéroïdes à se fixer et se désagréger sur ces protéines dans des conditions ascitiques.

Les sphéroïdes ont été déposés sur des lamelles en verre (contrôle), ou sur des lamelles en verre recouvertes d'un revêtement (coating) de Fn ou de Fg. Les sphéroïdes ont été incubés pendant 24 h, dans le milieu de culture ou dans l'ascite. Dans le milieu de culture, les sphéroïdes adhèrent aux surfaces dans les 3 conditions mais les sphéroïdes se sont plus rapidement désagrégés sur le revêtement de Fn que sur le revêtement de Fg (Figure 63). Ces résultats sont en accord avec les tests d'adhérence de cellules isolées, effectivement les cellules cancéreuses adhèrent davantage sur la fibronectine que sur le fibrinogène (résultats non montrés). En ascites, la désagrégation des sphéroïdes est plus marquée ainsi que de la dispersion et la migration des cellules isolées sur les 3 types de surfaces, par rapport au milieu de culture.

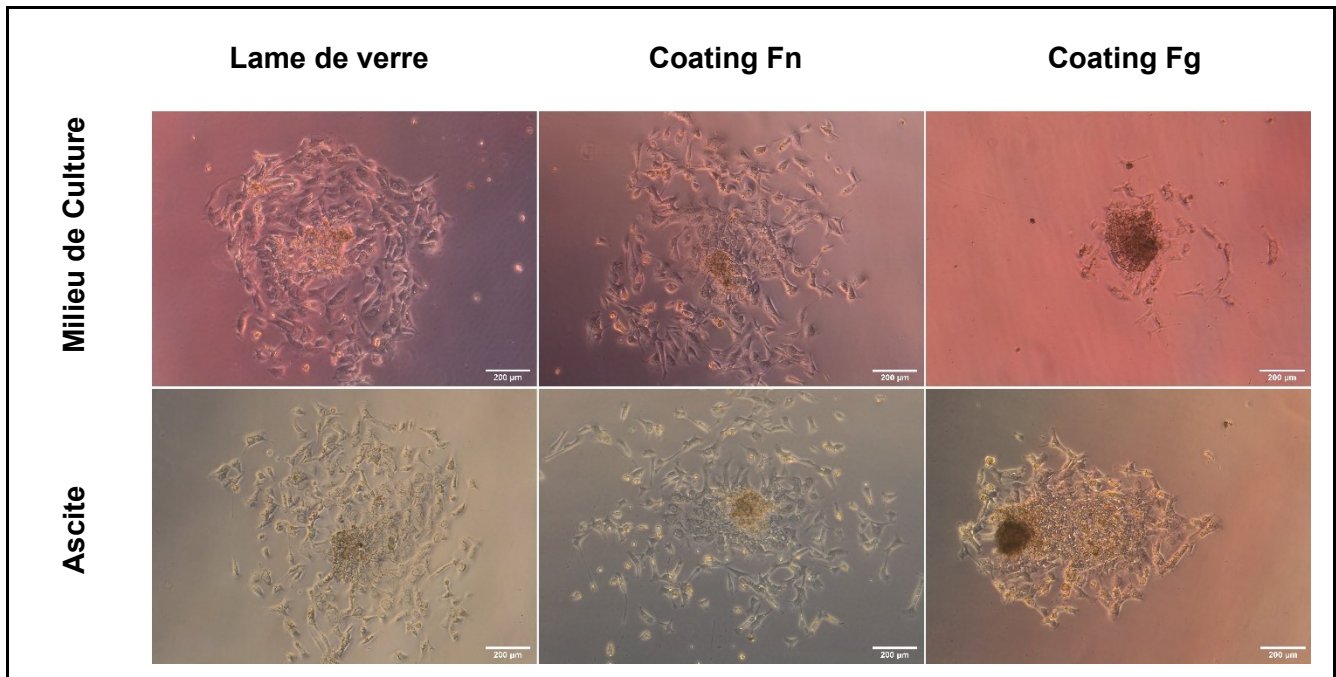


Figure 63 : Effet de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur différents supports.

Des sphéroïdes préalablement formés ont été déposés sur des lames de verres, recouvertes ou non de Fn ou de Fg dans du milieu de culture ou en ascites. Des photos au microscope à contraste de phase des sphéroïdes et de leur dispersion ont été prises après 24 h d'incubation. Barre d'échelle : 200 µm.

Les sphéroïdes adhèrent et se dispersent sur différentes protéines particulièrement exprimées et organisées au sein du microenvironnement mésothélial. De plus cette désagrégation des sphéroïdes est stimulée dans les ascites.

4.2. Localisation et implication des intégrines dans les sphéroïdes tumoraux ovariens

Les intégrines jouent un rôle clé dans le comportement des cellules cancéreuses et en particulier dans l'adhérence et la migration des cellules.

Les intégrines $\alpha 5 \beta 1$, dont le ligand principal est la Fn mais qui a aussi pour ligand le Fg, ont été marquées par immunofluorescence pour pouvoir observer leur présence et leur localisation sur les sphéroïdes, ainsi que dans les cellules qui s'étaient étalées sur le revêtement de Fg après 24 h d'incubation en ascite.

La localisation des intégrines au point de contacts cellule-substrat et de contacts cellule-cellule est observée. Cette localisation se fait en particulier au niveau des contacts focaux aux abords des cellules étalées, soulignant la présence de structures de type lamellipodes et

pseudopodes. La présence des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ sur les cellules migrant hors du sphéroïde et s'étalant sur le revêtement de Fg suggère que ces interactions impliquent des intégrines (Figure 64). Des résultats similaires sont obtenus avec le revêtement de Fn.

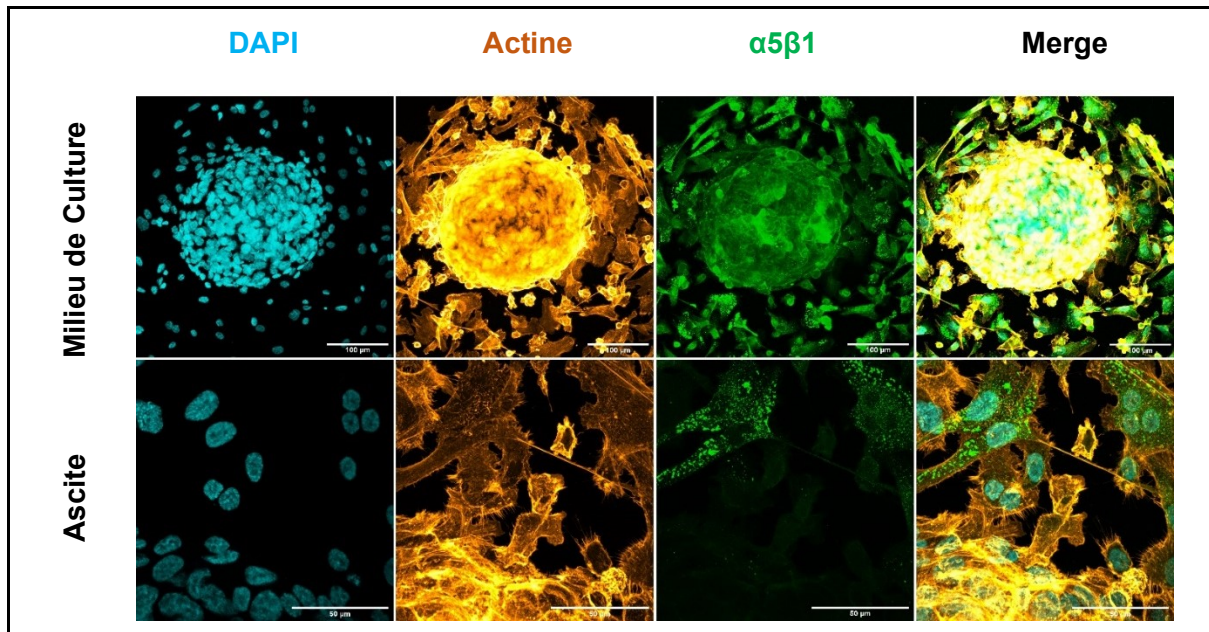


Figure 64 : Visualisation des intégrines dans la dispersion des sphéroïdes sur les revêtements protéiques.

Des sphéroïdes préalablement formés ont été déposés sur des lames de verres recouvertes de Fg en MC ou en ascites. Les différents marquages (actine, intégrines $\alpha 5 \beta 1$, noyaux) ont été réalisés après 24 h d'incubation. Les sphéroïdes ont été examinés par microscopie confocale à balayage laser. Barre d'échelle : 50 μm .

La présence d'intégrines sur les cellules migrantes hors du sphéroïde, lorsque celui-ci est sur un revêtement de Fg, pourrait mettre en exergue une cible moléculaire impliquée lors des processus d'ancrage et de désagrégation des sphéroïdes sur le péritoine lui-même recouvert de Fg ascitique.

4.3. Implication des intégrines dans la dispersion des sphéroïdes tumoraux ovariens sur la fibronectine et le fibrinogène

Comme mentionné dans l'introduction bibliographique, et notamment par nos études antérieures, les intégrines αV et $\alpha 5$, sont particulièrement sollicitées dans le comportement des cellules cancéreuses ovariennes. Pour évaluer leur implication dans la dispersion des sphéroïdes sur le Fg, les sphéroïdes ont été pré-incubés pendant une nuit avec deux antagonistes d'intégrine. Le premier, couramment utilisé, C (-RGDfc) est un peptide bloquant

spécifique des intégrines αV et le second, le Cilengitide spécifique des intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$ [153]. Après incubation avec ces antagonistes d'intégrine, les sphéroïdes ont été déposés sur un revêtement Fn ou Fg en présence de milieu de culture ou des ascites.

Après 24 h d'incubation, le pourcentage de sphéroïdes adhérents ou non sur les revêtements de Fn ou de Fg a été calculés et les surfaces de dispersion (μm^2) des sphéroïdes adhérents aux coatings ont été mesurées.

L'analyse de l'adhérence des sphéroïdes sur les coatings, indique que le peptide cilengitide inhibe totalement l'adhérence de certains sphéroïdes et ceci particulièrement sur le fibrinogène (Tableau 5).

Conditions		Sphéroïdes adhérents	Sphéroïdes non-adhérents	
Fibronectine	MC	Ctrl	100%	0%
		Cilengitide	100%	0%
	#2	Ctrl	100%	0%
		Cilengitide	33%	66%
	#4	Ctrl	100%	0%
		Cilengitide	25%	75%
Fibrinogène	MC	Ctrl	100%	0%
		Cilengitide	60,00%	40,00%
	#2	Ctrl	100%	0%
		Cilengitide	45,50%	55,50%
	#4	Ctrl	100%	0%
		Cilengitide	0%	100%

Tableau 5 : Inhibition de l'adhérence des sphéroïdes par blocage des intégrines.

Les sphéroïdes ont préalablement été pré-incubés avec le peptide Cilengitide (50 μg / ml) bloquant les intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$. Puis, ils ont été déposés sur des lamelles recouvertes de Fn ou de Fg et incubés en milieu de culture ou en ascite (#2 ou #4). Les pourcentages de sphéroïdes adhérents ou non-adhérents ont ensuite été calculés.

Concernant la dispersion des sphéroïdes adhérents, comme décrit ci-dessus, les surfaces de désagrégation des sphéroïdes sans peptides (ctrl) confirment que la désagrégation des sphéroïdes est favorisée par l'ascites par rapport au milieu de culture (respectivement 202 128 μm^2 vs 129 096 μm^2 sur le coating de Fn et 104 537 μm^2 vs 60 969 μm^2 sur le coating de Fg).

De plus, les résultats contrôles permettent aussi de confirmer que les sphéroïdes se désagrègent mieux sur le revêtement de Fn que de Fg. (Figure 65)

En milieu de culture, l'ajout du peptide C (-RGDfc) (RGD) diminue la désagrégation des sphéroïdes sur les revêtements de Fn et de Fg avec respectivement 15,7% et 36,6% d'inhibition. Toujours en milieu de culture, le cilengitide provoque une réduction significative de la désagrégation des sphéroïdes sur les revêtements de Fn et de Fg avec respectivement 78,7% et 76,2% d'inhibition (Figure 65 B).

En conditions ascitiques, la présence du peptide RGD diminue significativement la capacité des sphéroïdes à se désagréger sur la Fn ou le Fg avec respectivement 67,5% et 41,4% d'inhibition. Toujours en ascites, le cilengitide inhibe drastiquement la désagrégation des sphéroïdes sur le coating de Fn ou de Fg avec respectivement 77,4 et 95,3% (Figure 65 B).

Ces résultats démontrent l'implication des intégrines αV et des intégrines $\alpha 5\beta 1$ dans l'ancrage et la désagrégation des sphéroïdes tumoraux ovarien sur les protéines matricielles que sont le Fn et le Fg.

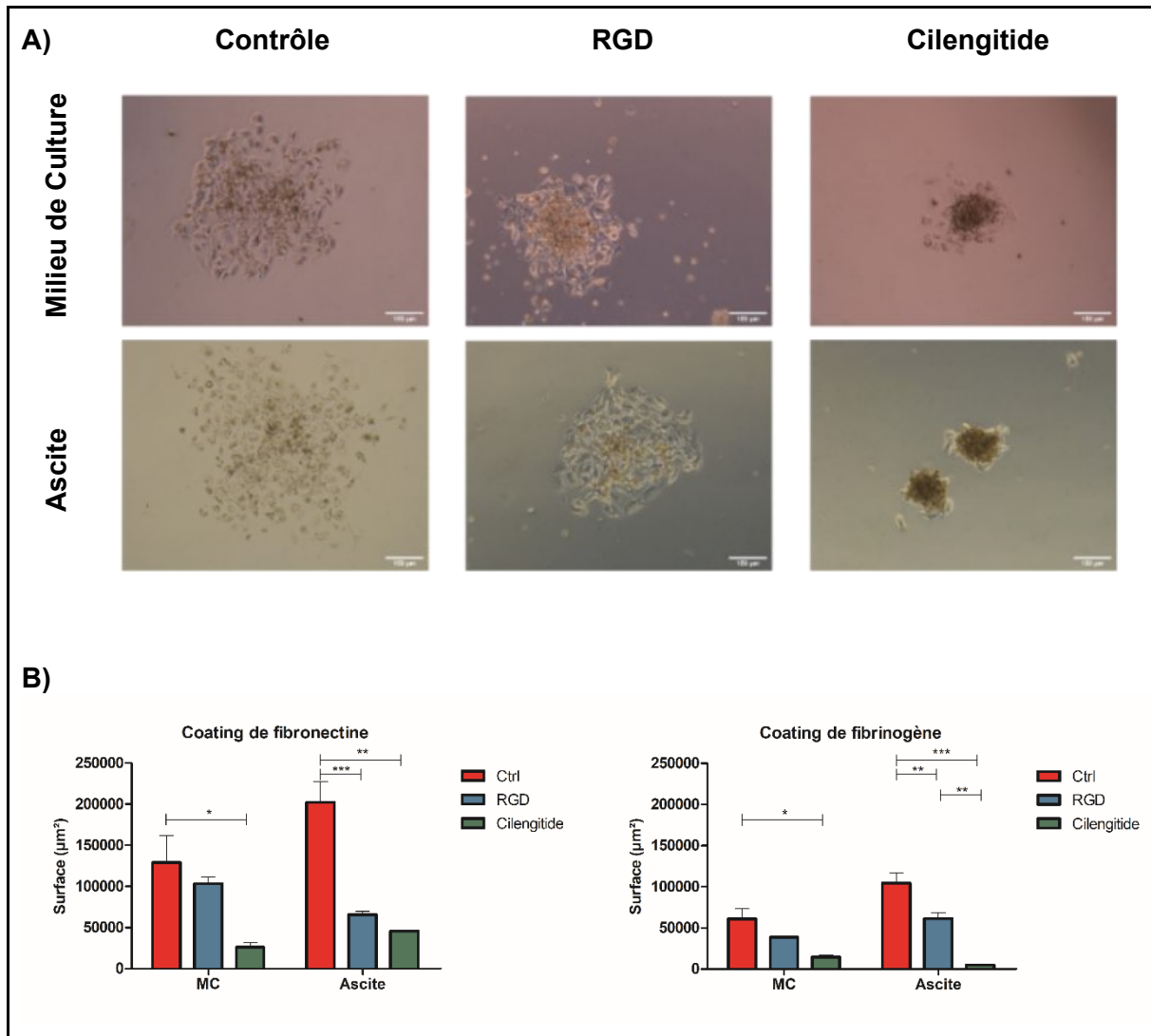


Figure 65 : Effet de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur les revêtements matriciels : implication des intégrines.

C (-RGDfc) est un peptide bloquant spécifique des intégrines αV et Cilengitide spécifique des intégrines $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ et $\alpha\text{5}\beta\text{1}$. Les sphéroïdes ont été pré-incubés pendant 2 h 30 à 4 ° C avec le peptide bloquant RGD (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) ou Cilengitide (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$), avant d'être déposés sur des lamelles de verre ou différents supports protéiques (Fn ou Fg à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et incubés dans du milieu de culture ou en ascites. Les « témoins » sont des sphéroïdes qui ont été pré-incubés sans les peptides bloquants. (A) Des photographies représentatives prises au microscope à contraste de phase ont été prises après 24 heures d'adhésion des sphéroïdes. Barre d'échelle : 200 μm . (B) Après 24 h d'incubation, les surfaces (μm^2) de dispersion des sphéroïdes ont été calculées avec le logiciel ImageJ. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs p ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (* P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001) avec des différences significatives estimées par comparaison du contrôle par rapport au RGD ou au cilengitide.

Conclusion, Partie 4 : « Impact de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes sur un revêtement matriciel »

Les sphéroïdes ont la capacité d'adhérer et de se désagréger sur des protéines matricielles que l'on peut retrouver dans le microenvironnement tumoral péritonéal tels que la Fn et le Fg.

L'ascite favorise la dispersion des sphéroïdes sur ces protéines.

La présence des intégrines $\alpha 5\beta 1$ dans les sphéroïdes et dans les cellules migrant hors de ces derniers a été confirmée.

Les résultats, lorsque les intégrines ont été bloquées, ont montré une inhibition dans l'adhérence et la désagrégation des sphéroïdes sur la Fn ou le Fg ce qui révèle un rôle clé des intégrines dans ces mécanismes cellulaires.

Ces résultats, pris dans leur ensemble, soulignent l'implication des intégrines dans les processus d'implantation sur des protéines matricielles retrouvées aux abords du mésothélium péritonéal, site privilégié des métastases du cancer ovarien.

5. Ascite et co-culture : Impact de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes tumoraux ovariens sur le mésothélium

Afin de se rapprocher au mieux de l'*in vivo* et des conditions physiopathologiques de l'implantation péritonéale, un modèle approprié de co-culture a été développé afin d'évaluer l'interaction des sphéroïdes avec la monocouche mésothéliale.

5.1. Cinétique de dispersion des sphéroïdes tumoraux ovariens sur le mésothélium

Pour observer les différences de désagrégation des sphéroïdes sur la monocouche mésothéliale au cours du temps, une cinétique de co-culture a été réalisée en présence de milieu de culture ou en ascite. Premièrement, quelle que soit la condition de culture, les sphéroïdes ont adhéré sur la monocouche mésothéliale. Deuxièmement, la vitesse de dispersion des sphéroïdes sur la monocouche mésothéliale est stimulée en présence d'ascite (Figure 66). Effectivement, dès 18 h les différences de dispersions sont visibles entre les deux conditions : en ascite, le sphéroïde est plus étalé et les cellules se dispersent sur la monocouche mésothéliale.

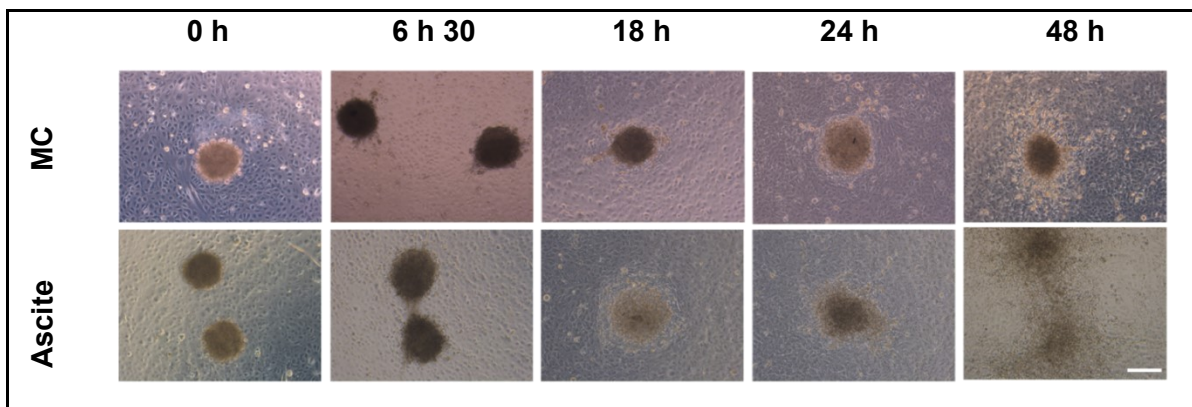


Figure 66 : Effet des ascites sur la cinétique de dispersion des sphéroïdes sur la monocouche mésothéliale.

Les sphéroïdes préalablement formés ont été déposés sur une monocouche mésothéliale confluyente en milieu de culture ou en ascite. La co-culture a été observée et photographiée au microscope à contraste de phase à différents temps. Barre d'échelle : 200 μm .

L'ascites favorise et stimule donc la désagrégation des sphéroïdes tumoraux sur la monocouche mésothéliale au cours du temps.

5.2. Localisation du fibrinogène/fibrine en co-culture *in vitro* et *ex vivo*

Les sphéroïdes ont été incubés pendant 6 h ou 24 h sur la monocouche mésothéliale en culture classique ou dans l'ascite. Comme vu ci-dessus, quelle que soit la condition de culture, les sphéroïdes ont adhéré à la monocouche mésothéliale.

En ascite, après 6 h d'incubation, le marquage immunofluorescent du Fg montre que les sphéroïdes sont enchevêtrés dans un réseau de Fg contrairement aux sphéroïdes en milieu de culture classique. Les acquisitions réalisées au MEB confirment la présence d'un réseau de fibrine dense autour des sphéroïdes cultivés en ascite (Figure 67 A). La fibrine agit comme une matrice adhésive qui permet aux sphéroïdes d'adhérer au mésothélium. Des cellules cancéreuses « ont pu quitter » les sphéroïdes et adhérer au mésothélium (Figure 67 B, flèche blanche). Au cours du temps, notamment à partir de 24 h de co-culture en ascite, les sphéroïdes s'étalent, se désagrègent sur la monocouche mésothéliale. En milieu de culture, la faible présence de fibrinogène et de fibrine, observée autour des sphéroïdes, est dû à la formation des sphéroïdes qui est réalisée avec la technique « Hanging drop » où les cellules sont dans une goutte d'ascite, source de Fg (cf mat et met).

Des expérimentations *ex vivo* ont également été réalisées, les cellules cancéreuses ont été injectées à des souris au niveau de la cavité abdominale de la souris. Après 28 jours, la souris a été sacrifiée et les tumeurs ancrées sur le péritoine ont été récupérées, inclus en paraffine et analysées en immunohistochimie après marquage du Fg/Fibrine.

L'analyse des tumeurs ainsi « xénogreffées » révèle et confirme la présence de Fg et sa localisation à proximité de la barrière mésothéliales ainsi qu'autour des sphéroïdes, semblant être enchâssées dans un réseau protéique comprenant du Fg et/ou de la fibrine. (Figure 68).

Le fibrinogène et la fibrine sont des constituants du microenvironnement péritonéal lors de l'implantation des tumeurs et sont localisés plus particulièrement au niveau des sites d'interactions entre les sphéroïdes et le mésothélium.

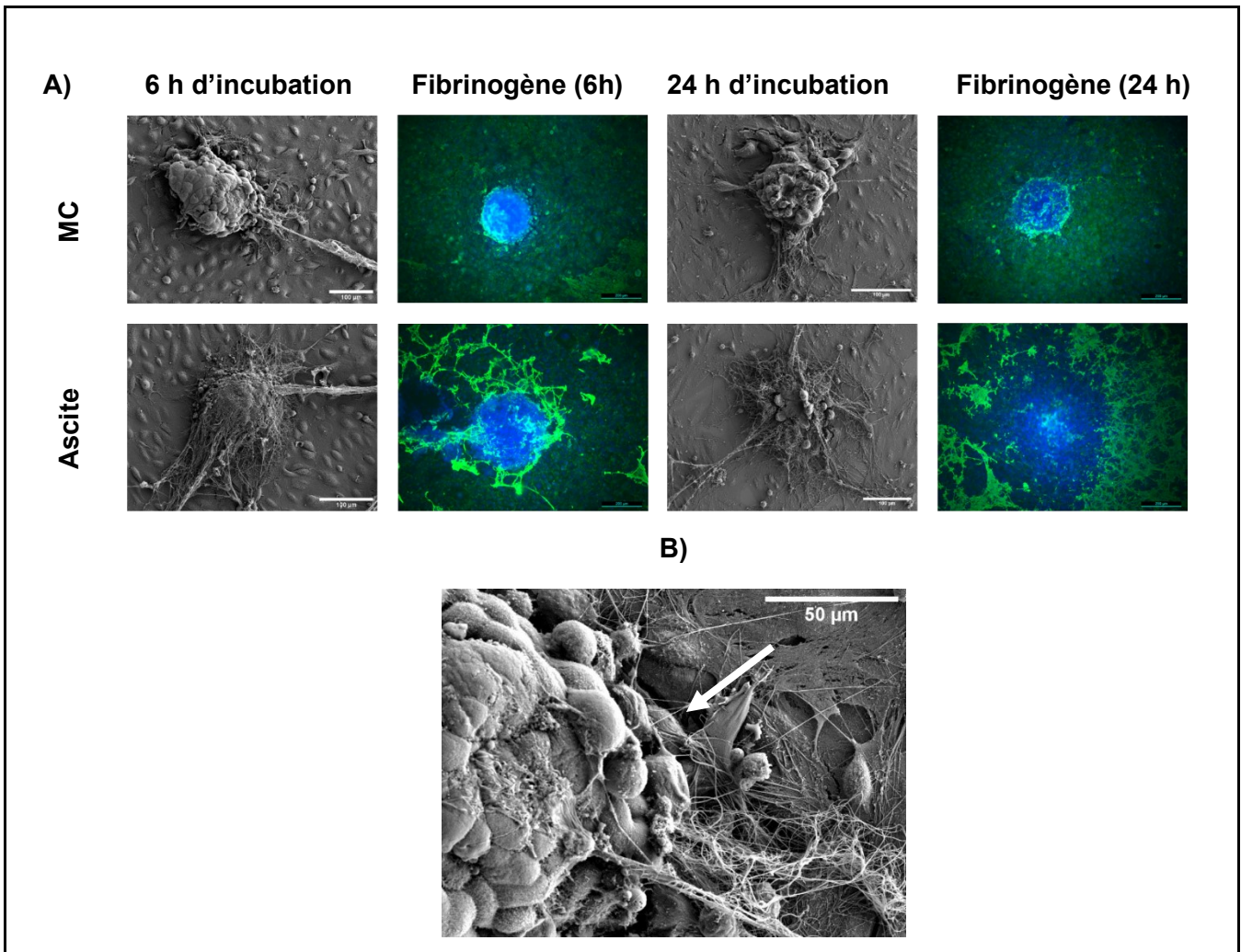


Figure 67 : Fibrinogène/fibrine et co-culture *in vitro* au cours du temps.

La co-culture entre les sphéroïdes et la monocouche mésothéliale a été incubée en milieu de culture ou en ascite pendant 6 h ou 24 h. La co-culture a ensuite été analysée par MEB. Immunofluorescence du fibrinogène (vert). L'ADN des noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (bleu). La co-culture a été examinée par microscopie confocale à balayage laser. Barre d'échelle : de 200 µm. La figure du bas en MEB est un agrandissement. La flèche indique des cellules sortant du réseau de fibrine.

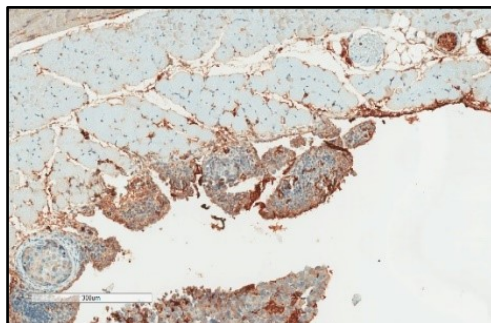


Figure 68 : Expression du fibrinogène *ex vivo* aux abords du mésothélium de souris après l'implantation de cellules cancéreuses ovariennes.

Une coupe de péritoine à partir de xénogreffe de cellules cancéreuses de l'ovaire injectée dans le péritoine de la souris a été soumise à une immunohistochimie du fibrinogène. Barre d'échelle : 300 µm.

Conclusion, Partie 5 : « Ascite et co-culture : Impact de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes tumoraux ovariens sur le mésothélium »

Les sphéroïdes tumoraux ovariens ont la capacité d'adhérer au mésothélium, ce qui est l'étape initiale de la formation et de l'extension métastatique.

Une fois l'ancrage établie, l'ascite favorise et stimule la dispersion des sphéroïdes sur le mésothélium.

Dans le contexte pathologique étudié, ces résultats démontrent le fort impact de l'ascite dans les étapes initiales de l'adhérence des sphéroïdes tumoraux ovariens sur le mésothélium ainsi que de leur dispersion. De plus, la présence de fibrine aux abords du mésothélium semble révéler son pouvoir de « colle naturelle » qui facilite l'implantation des sphéroïdes avant leur dispersion.

6. Ascite et clairance : Impact de l'ascite sur la clairance du mésothélium

6.1. Visualisation et définition de la clairance

Notre étude révèle que sous l'effet de l'ascite la monocouche mésothéliale est déstabilisée et que les sphéroïdes se dispersent dessus. *In vivo*, après l'implantation, les sphéroïdes ont la capacité de « pousser » les cellules mésothéliales pour pouvoir passer au travers le mésothélium (processus appelée migration transmésothéliale) et accéder aux tissus sous-jacents. Cette clairance peut se visualiser. Dans notre modèle de co-culture, les sphéroïdes tumoraux ont été incubés pendant 6 h avec la monocouche mésothéliale dans l'ascite.

L'analyse au MEB montre une déstabilisation de la monocouche mésothéliale avec les cellules mésothéliales qui semblent être « poussées » par le sphéroïde (Figure 69, flèches blanches).

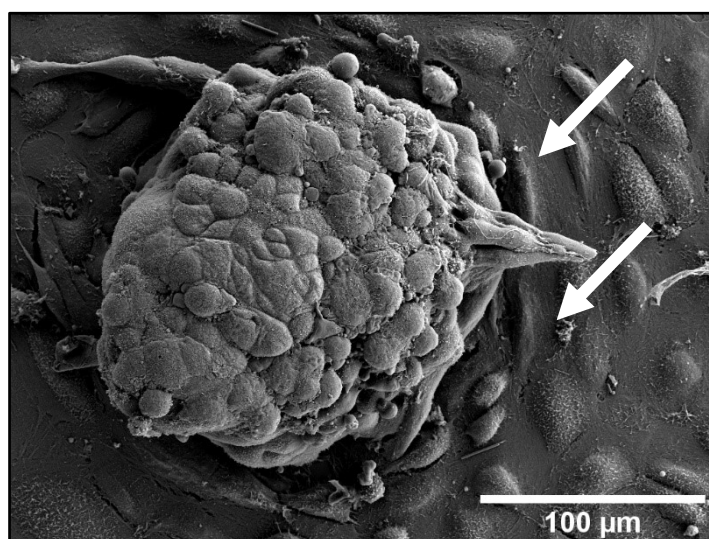


Figure 69 : Observation de la clairance du mésothélium par les sphéroïdes.

Une co-culture entre un sphéroïde et une monocouche mésothéliale a été analysée au MEB après 6 h d'incubation en ascite. Barre d'échelle : 100 μm .

Les sphéroïdes tumoraux ovariens ont la capacité de provoquer la clairance du mésothélium pour pouvoir accéder aux tissus sous-jacents.

6.2. Quantification de la clairance

Afin d'observer le phénomène de clairance, les cellules de la monocouche mésothéliale sont marquées *via* l'incorporation de nanoparticules (cf mat et met) puis les sphéroïdes non marqués sont déposés dessus. La perte de la fluorescence de la monocouche témoigne de la clairance mésothéliale par les sphéroïdes. La co-culture a été incubée avec du milieu de culture ou de l'ascite pendant 24 heures.

L'absence de la fluorescence de la monocouche mésothéliale, marquée avec les NPs, confirme à nouveau que l'ascite favorise la désagrégation des sphéroïdes sur la monocouche mésothéliale (Figure 70).

Le marquage des cellules mésothéliales avec les nanoparticules permet de visualiser l'absence de fluorescence et donc de cellules mésothéliales à l'emplacement du sphéroïde. Cela suggère qu'il y a un mécanisme de clairance en plus du processus d'implantation.

De plus, l'ascite favorise la clairance de monocouche mésothéliale par les sphéroïdes par rapport au milieu de culture.

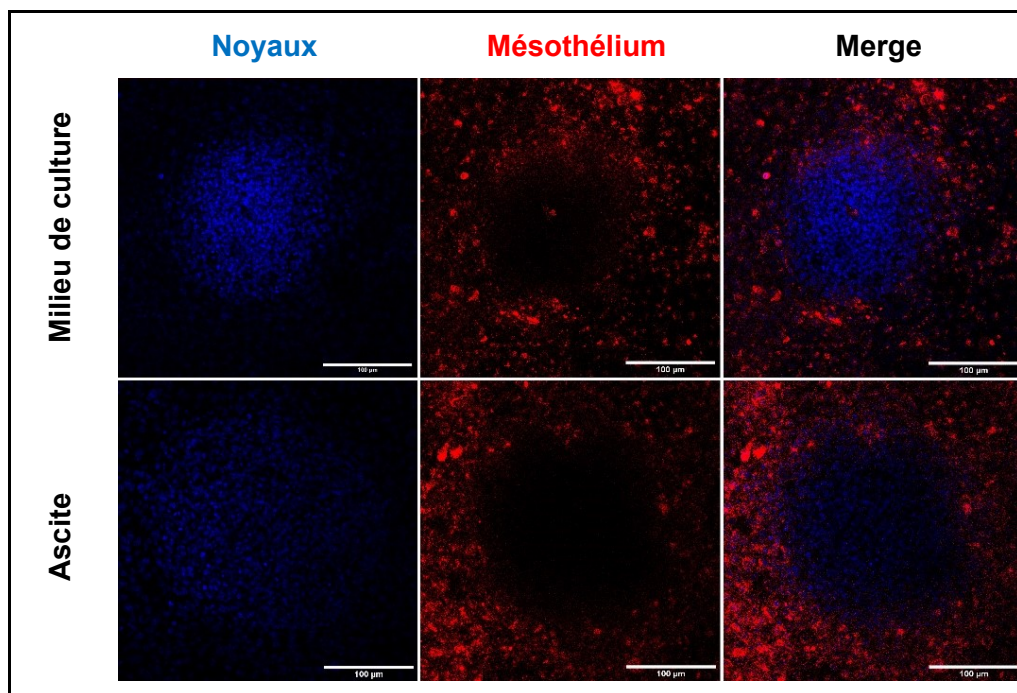


Figure 70 : Effet de l'ascite sur la clairance du mésothélium par les sphéroïdes.

Les sphéroïdes ont été déposés sur une monocouche de cellules mésothéliales préalablement marquée avec des nanoparticules (rouge). La co-culture a été incubée dans du milieu de culture ou en ascites pendant 24 h. L'ADN des noyaux cellulaires ont été colorés avec du DAPI (bleu) et la co-culture a été examinée par microscopie confocale à balayage laser. La clairance correspond à la zone où il n'y a pas de fluorescence des nanoparticules et par conséquent l'absence des cellules mésothéliales. Barre d'échelle : 100 µm.

La clairance est un phénomène qui peut être visualisé en microscopie. En plus de favoriser la désagrégation des sphéroïdes, l'ascite facilite la clairance du mésothélium par les sphéroïdes.

6.3. Rôle des intégrines dans la clairance

Nos résultats démontrent que les intégrines sont impliquées dans l'adhérence des sphéroïdes sur la fibronectine et sur le fibrinogène, ainsi que dans leur désagrégation.

Des tests d'ancrage des sphéroïdes sur le mésothélium ont été réalisés suite au blocage des intégrines, pour évaluer l'implication de ces récepteurs dans le mécanisme de clairance. Les sphéroïdes ont été pré-incubés avec les peptides bloquants C (-RGDfc) ou Cilengitide ou sans peptides (ctrl). Ils ont ensuite été déposés sur la monocouche mésothéliale préalablement marquée avec les nanoparticules. Cette co-culture a été incubée avec le milieu de culture ou de l'ascite. Après 24 heures d'incubation, les zones sans fluorescence ont été mesurées (μm^2).

En l'absence de peptides bloquants, les mesures confirment que l'ascite favorise la clairance comparée au milieu de culture (respectivement $147\,842\ \mu\text{m}^2$ vs $127\,807\ \mu\text{m}^2$).

En condition de culture classique, par rapport au témoin, l'ajout du RGD ou du Cilengitide permet une inhibition significative de la clairance de respectivement 71,3% et 72,6%. En ascite, le peptide RGD déclenche une réduction significative de la clairance de 64,2% tandis que le cilengitide inhibe plus drastiquement la clairance avec 97,1% d'inhibition (Figure 71).

Le cilengitide semble avoir un effet inhibiteur plus marqué en ascites sur la clairance du mésothélium par les sphéroïdes par rapport au milieu de culture.

Ces résultats démontrent l'implication des intégrines de la famille αV ainsi que des intégrines $\alpha5\beta1$ dans la clairance du mésothélium par les sphéroïdes tumoraux.

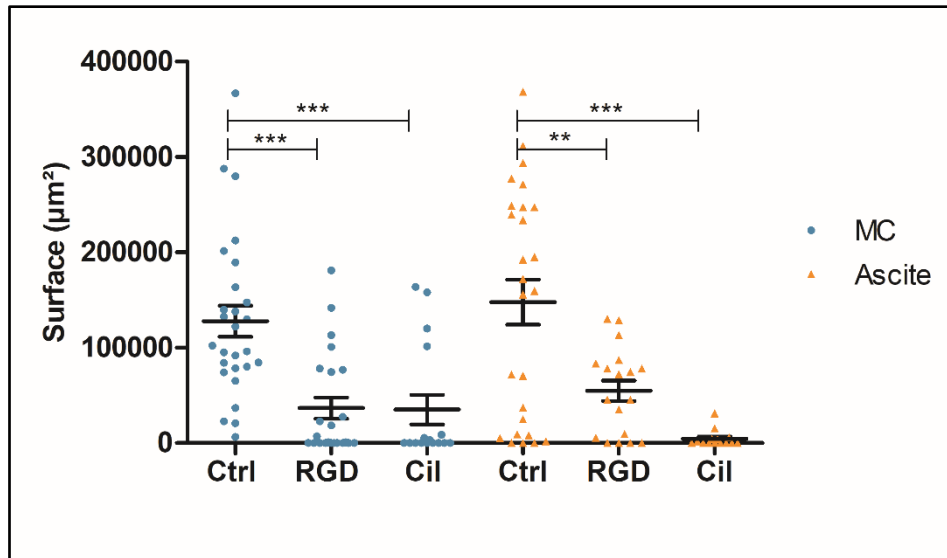


Figure 71 : Implication des intégrines dans la clairance du mésothélium par les sphéroïdes tumoraux ovariens.

C (-RGDfc) est un peptide bloquant spécifiquement les intégrines αV et le Cilengitide (*Cil*) bloque spécifiquement les intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$. Les sphéroïdes ont été pré-incubés pendant 2 h 30 à 4 ° C avec les peptides RGD (100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) ou Cilengitide (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$), avant d'être déposés sur monocouche de cellules mésothéliales préalablement marquées avec des nanoparticules. Les contrôles (*Ctrl*) sont des sphéroïdes qui ont été pré-incubés sans les peptides bloquants. Les co-cultures ont été incubées dans du milieu de culture ou en ascites. Après 24 h d'incubation, les zones (μm^2) d'absence de coloration par des nanoparticules ont été mesurées avec le logiciel ImageJ, pour quantifier la clairance de la monocouche mésothéliale par les sphéroïdes. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs p ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) avec des différences significatives estimées par comparaison *Ctrl* vs RGD ou Cilengitide.

Conclusion, Partie 6 : « Ascite et clairance : Impact de l'ascite sur la clairance du mésothélium »

L'ascite est un composant du microenvironnement péritonéal qui peut agir à la fois sur les cellules saines et les cellules cancéreuses. Affaiblissant et déstabilisant le mésothélium d'une part, et en stimulant l'ancrage et l'invasion des cellules cancéreuses au travers le mésothélium (transmigration) d'autre part, l'ascite renforce ainsi la clairance mésothéliale et probablement l'invasion du tissu conjonctif sous-jacent.

Ce mécanisme est intégrines-dépendant, les intégrines αv et $\alpha 5$ en étant deux acteurs clés. Leurs interactions avec leurs ligand, Fn, Fg, Fibrine et Vn (selon nos études antérieures dans le laboratoire) semblent donc être fortement sollicitées.

Ces résultats mettent en exergue des protéines qui pourraient être considérées comme des cibles thérapeutiques. Leur inhibition pouvant conduire à limiter la formation de métastases péritonéales.

7. Ascite et transmigration mésothéliale

Le processus de métastase implique l'adhérence des sphéroïdes, leur dispersion ainsi que la clairance du mésothélium pour permettre la migration des cellules cancéreuses au travers du mésothélium, pour pouvoir accéder aux tissus sous-jacents et les coloniser. Pour observer un tel mécanisme, il est nécessaire d'avoir un modèle tridimensionnel regroupant ces protagonistes retrouvés *in vivo*. La mise en place d'un modèle 3D pour pouvoir quantifier cette transmigration en conditions ascitiques est nécessaire.

7.1. Migration des cellules cancéreuses ovariennes isolées

Une quantification de la migration a été réalisée en utilisant des chambres de Boyden recouvertes ou non de fibronectine ou de fibrinogène. Les cellules cancéreuses ovariennes ont été déposées dans la partie supérieure de la chambre de Boyden pour pouvoir quantifier leur migration au travers du filtre vers la chambre inférieure.

Plusieurs études ont montré que l'ascite avait un rôle de chimioattractant, en augmentant la migration des cellules cancéreuses vers la chambre inférieure, lorsque celle-ci était en ascites comparée au milieu de culture.

Cependant, *in vivo*, les cellules baignent dans l'ascite avant de migrer au travers du mésothélium, c'est pourquoi dans cette étude nous avons pris le parti d'incuber directement les cellules cancéreuses en ascite dans la partie supérieure de la chambre de Boyden (cf mat et met).

Lorsque la chambre inférieure contient du milieu de culture, on observe une migration quelle que soit la condition de recouvrement du filtre (~ 50 cellules / champs). Lorsque la chambre inférieure contient des ascites, il y a une augmentation du nombre de cellules cancéreuses qui migrent quel que soit la condition de recouvrement du filtre (~ 80 cellules / champs). Dans ce cas, c'est une migration de type chimiocinèse qui se définit comme un mouvement cellulaire aléatoire en l'absence de gradients de chimioattractants (Figure 72).

In vivo, les cellules cancéreuses ovariennes qui migrent au travers du mésothélium se retrouvent au niveau du tissu conjonctif et sont donc au contact d'un nouveau type de microenvironnement. Les cellules cancéreuses ont donc été mises au contact de l'ascite comme dans la cavité péritonéale et le chimioattractant de la chambre inférieure était du milieu conditionné (pendant 24 h) de fibroblastes afin de mimer le tissu conjonctif sous-jacent au mésothélium.

Le milieu conditionné de fibroblastes favorise la migration des cellules au travers du filtre (~ 160 cellules / champs) ainsi qu'au travers du filtre recouvert de Fn (~ 114 cellules / champs). Ce type de migration est de la chimiotaxie qui est définie comme le mouvement des cellules vers des gradients de concentration d'attractifs solubilisés (Figure 72).

Lorsque le filtre est recouvert de fibrinogène, le milieu conditionné ne favorise pas la migration des cellules cancéreuses par rapport à l'ascite. Ceci peut s'expliquer par le fait que le fibrinogène joue un rôle de « colle naturelle » ce qui piège les cellules et ne leur permet pas de migrer dans un premier temps aussi vite qu'au travers de la Fn.

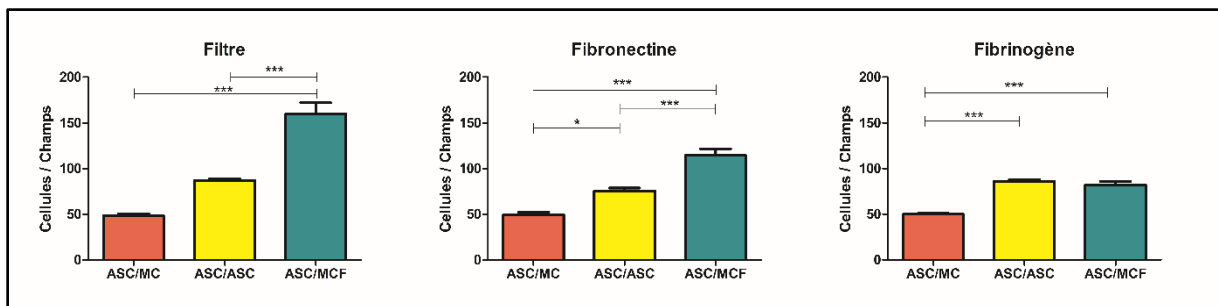


Figure 72 : Effets de l'ascite et du milieu conditionné de fibroblastes sur la migration des cellules SKOV3.

La migration a été estimée en chambre de Boyden. Les filtres des chambres de Boyden ont été recouverts ou non de Fn ou de Fg. Les cellules SKOV3 ont été déposées dans la chambre supérieure en ascite. Dans la chambre inférieure, différents chimioattractants ont été déposés : milieu de culture (MC), ascite (ASC) ou milieu de conditionné de fibroblastes (MCF). Le nombre de cellules ayant migrées a été compté sur 5 champs après 24 h de migration. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs p ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$)

Le milieu conditionné de fibroblaste et donc les molécules actives sécrétées par les cellules du tissu conjonctif ont un pouvoir chimioattractant plus élevé que celui de l'ascite, ce qui pourrait jouer un rôle important dans la transmigration des cellules cancéreuses au travers du mésothélium. De plus, la présence de fibrinogène ne semble pas empêcher la migration des cellules mais légèrement la réduire par rapport à la Fn.

L'ascite a donc un effet stimulant sur la migration des cellules SKOV3. Une analyse au microscope à force atomique a été réalisée sur ces cellules en milieu de culture ou en ascites. L'ascite confère une meilleure élasticité aux cellules cancéreuses ce qui confirme l'augmentation de la capacité migratoire des cellules cancéreuses ovariennes par l'ascite. (Figure 73). (Résultats préliminaires)

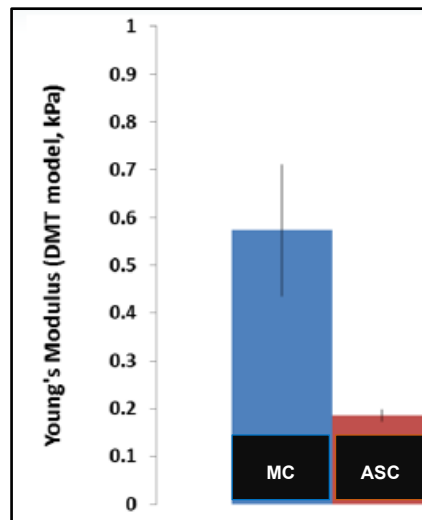


Figure 73 : Effet de l'ascite sur l'élasticité des cellules SKOV3.

Les cellules SKOV3 ont été analysées au microscope à force atomique après 24 h d'incubation en milieu de culture (MC) ou en ascite (ASC). Le module élastique des cellules SKOV3 a été déterminé avec plusieurs mesures sur différentes cellules, 19 mesures en MC et 34 mesures en ASC.

7.2. Invasion de gels de fibrine par les cellules cancéreuses isolées ou en sphéroïdes et implication des intégrines

L'invasion des cellules isolées SKOV3 à travers du matrigel ou d'un gel de fibrine au cours du temps a été étudié. Ce test a été réalisé avec de l'ascite dans la chambre supérieure pour les mêmes raisons que vues précédemment. Puis la chambre inférieure a été composée de milieu de culture ou d'ascite pour estimer si l'ascite était un chimioattractant dans le processus d'invasion.

Les cellules cancéreuses SKOV3 commencent à envahir le matrigel à partir de 48 h dans les conditions classiques et ascitiques, même si elles sont peu nombreuses (respectivement ~ 4 et ~ 7 cellules / champs) (Figure 74).

En comparaison, les cellules cancéreuses migrent beaucoup plus dans le gel composé uniquement de fibrine. De plus, cette invasion commence dès 24 h lorsque le chimioattractant est l'ascite (~ 39 cellules / champs). Après 48 h d'incubation, l'ascite favorise toujours l'invasion de cellules cancéreuses ovariennes par rapport au milieu de culture avec respectivement ~ 80 contre ~ 26 cellules / champs (Figure 74).

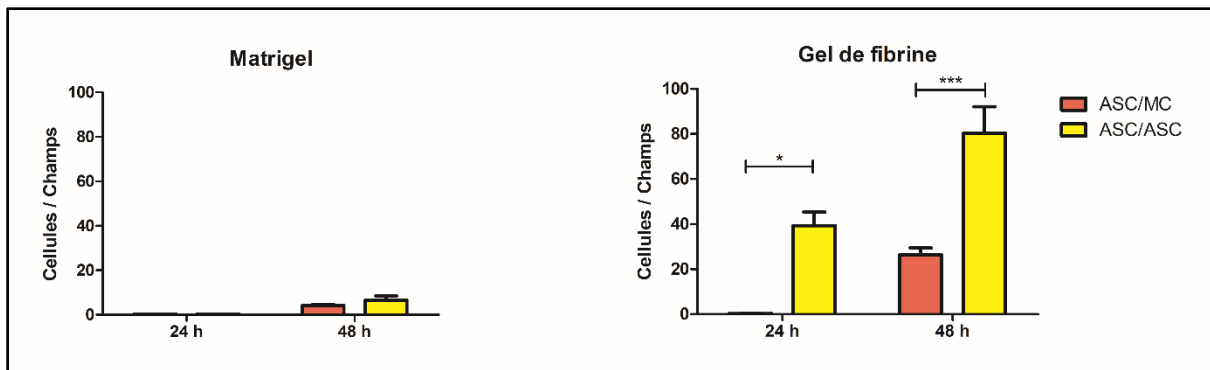


Figure 74 : Effet de l'ascite sur l'invasion des cellules SKOV3 isolées.

L'invasion des cellules SKOV3 a été quantifiée en chambre de Boyden. La chambre supérieure a été remplie de matrigel ou de gel de fibrine. Après polymérisation des gels, de l'ascite ainsi que les cellules SKOV3 ont été rajoutées. Dans la chambre inférieure, différents chimioattractants ont été déposés : du milieu de culture (MC) ou de l'ascite (ASC). Le nombre de cellules ayant migrées a été compté sur 5 champs après 24 h ou 48 h d'invasion. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs p ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$)

Ces résultats montrent dans un premier temps que les cellules cancéreuses SKOV3 peuvent migrer au travers du gel de fibrine et en second temps que cette invasion est stimulée par l'ascite.

Ainsi, pour compléter et incrémenter notre modèle de co-culture, un modèle tridimensionnel en gel de fibrine a été développé pour observer et comprendre la mécanistique de l'implantation tumorale sur le péritoine, la désagrégation des sphéroïdes et l'invasion du mésothélium par les cellules cancéreuses ovariennes.

Les sphéroïdes ont été pré-incubés avec les peptides bloquants, le peptide C (-RGDfc) ou le cilengitide, ou sans peptides comme contrôle et ont été « encapsulés » au sein de gels de fibrine. Les sphéroïdes piégés dans des gels de fibrine ont été incubés avec du milieu de culture ou de l'ascite. A 24h, les surfaces (μm^2) de désagrégation des sphéroïdes ont été mesurées.

Premièrement, en l'absence de peptides bloquants, les sphéroïdes sont capables de se disperser dans le gel de fibrine quelle que soit la condition de la culture utilisée. Cependant, les peptides bloquants réduisent la désagrégation des sphéroïdes dans les gels de fibrine (Figure 75 A). En condition de culture classique, par rapport au témoin, l'ajout du RGD ou du Cilengitide a inhibé significativement la désagrégation et l'invasion de respectivement 59,7 et 73,1%. En ascite, le peptide RGD et le cilengitide ont déclenché une réduction similaire et significative de l'invasion d'environ 55% par rapport au témoin (Figure 75 B).

Ces résultats montrent « l'affinité » des sphéroïdes tumoraux pour le fibrinogène / fibrine. La désagrégation des sphéroïdes et l'invasion des cellules cancéreuses de l'ovaire dépendent des interactions, entre autres, intégrines αV et $\alpha 5$ / Fibrinogène.

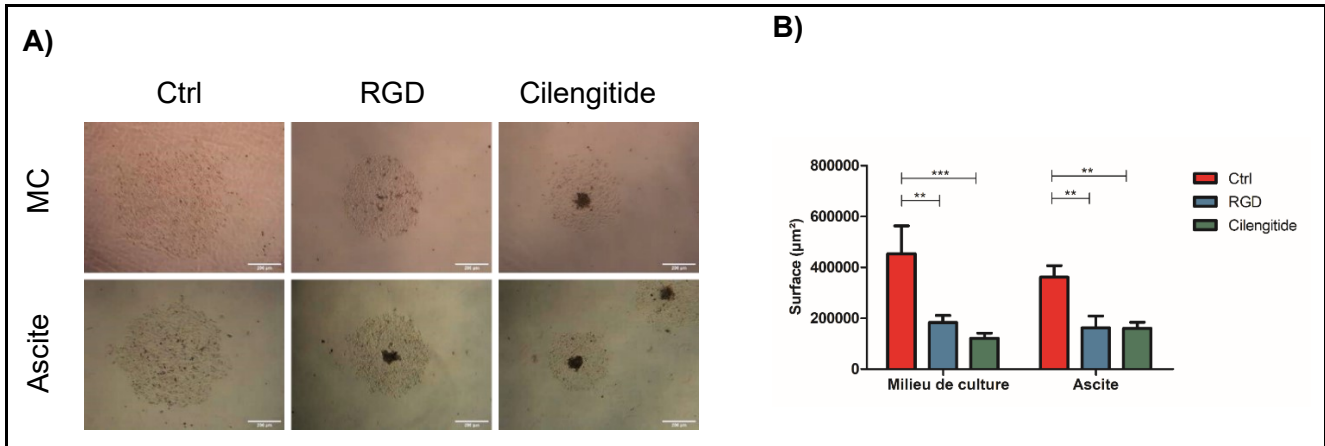


Figure 75 : Effet de l'ascite sur la dispersion des sphéroïdes dans des gels de fibrine.

C (-RGDfc) est un peptide bloquant spécifiquement les intégrines αV et le Cilengitide (Cil) bloque spécifiquement les intégrines $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$. Les sphéroïdes ont été pré-incubés pendant 2 h 30 à 4 ° C avec les peptides RGD (100 μg / ml) ou Cilengitide (50 μg / ml), avant d'être inclus dans un gel de fibrine et incubés dans du milieu de culture ou en ascites. Les contrôles (Ctrl) sont des sphéroïdes qui ont été pré-incubés sans les peptides bloquants. (A) Des photographies représentatives prises au microscope à contraste de phase ont été prises après 24 heures d'incubation. Barre d'échelle : 200 μm . (B) Au même temps, les surfaces (μm^2) de dispersion des sphéroïdes ont été calculées avec le logiciel ImageJ. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes et sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs p ont été calculées par un test ANOVA unidirectionnel apparié (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) avec des différences significatives estimées par comparaison Ctrl vs RGD ou Cilengitide.

Conclusion, Partie 7 : « Ascite et transmigration mésothéliale »

Ces résultats montrent l'importance de l'ascite sur sa capacité à augmenter la migration et l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes.

De plus, un nouveau microenvironnement, retrouvé au niveau du tissu conjonctif sous-jacent, joue aussi un rôle favorisant la migration des cellules cancéreuses ovariennes. Enfin, la dispersion et l'invasion des sphéroïdes dans les gels de fibrine sont intégrines dépendantes.

Ces données tendent à dire que les différents microenvironnements (l'ascite et les molécules/protéines délivrées par les fibroblastes) rencontrés par les cellules cancéreuses ovariennes favorisent leur migration et leur invasion, permettant la colonisation et la création d'une niche métastatique mésothéliale propice.

8. Impact de l'ascite sur les sphéroïdes tumoraux mixtes

Comme démontré ci-dessus l'ascite a une influence sur la dispersion des sphéroïdes tumoraux ovariens ainsi que sur la migration et l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes. Les expériences jusqu'ici ont été réalisées avec la lignée cancéreuse ovarienne SKOV3 qui a un phénotype et des propriétés migratoires accrues. *In vivo*, il y a une hétérogénéité des phénotypes des cellules cancéreuses ovariennes [101,158]. C'est pourquoi nous avons tenté de générer des sphéroïdes « mixtes », qui se composent des cellules SKOV3 mais aussi de cellules IGROV1, une autre lignée cancéreuse ovarienne.

Dans un premier temps, ces sphéroïdes « mixtes » ont été déposés sur une monocouche mésothéliale en ascite et la dispersion de ces derniers a été observée.

Les sphéroïdes commencent à adhérer dès 24 h et à se disperser sur la monocouche mésothéliale dès 48 h (Figure 76). Des cellules migrent hors du sphéroïdes (flèches bleues) mais le cœur du sphéroïde (flèche rouge) ne se désagrège pas totalement même au bout de 72 h.

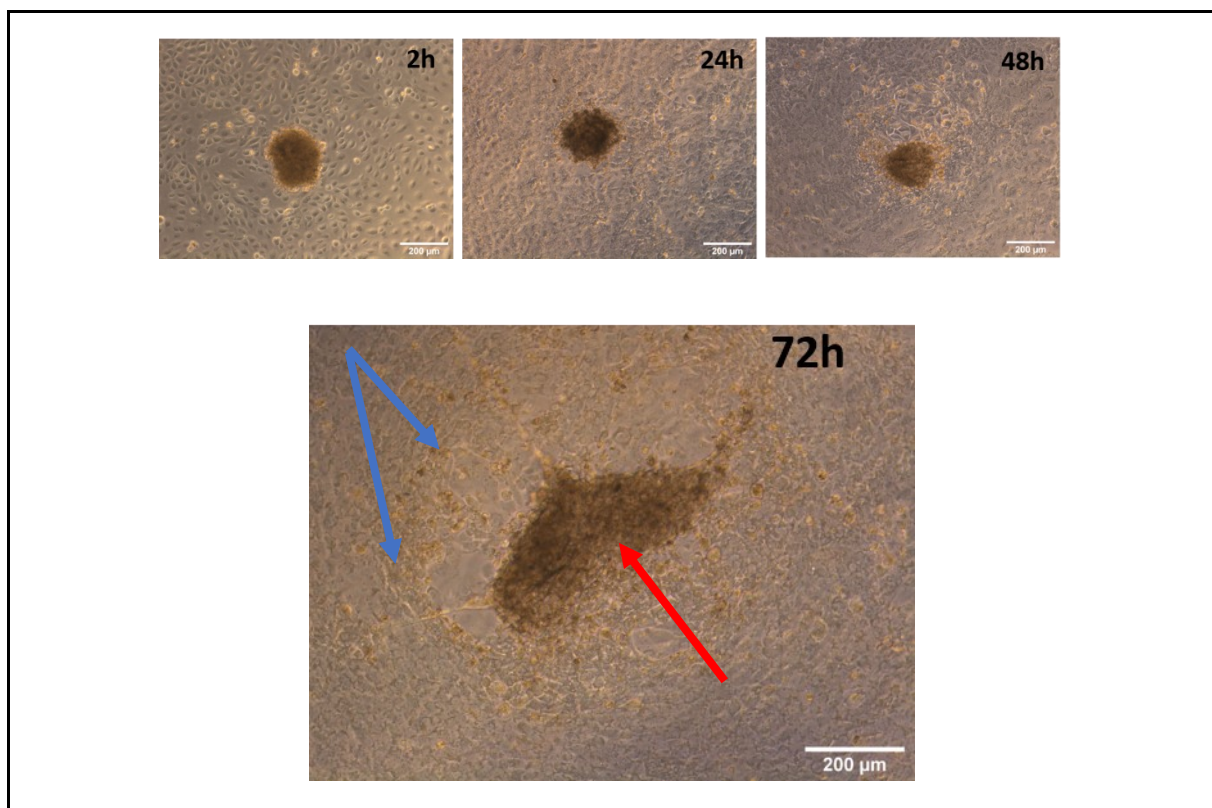


Figure 76 : Dispersion de sphéroïdes mixtes SKOV3/IGROV1 sur le mésothélium.

Des sphéroïdes mixtes ont été générés selon la technique « Hanging drop » et déposés sur une monocouche mésothéliale en ascite. La co-culture a été photographiée au microscope optique à contraste de phase à différents temps. Les flèches bleues indiquent les cellules qui migrent sur la monocouche. La flèche rouge indique le cœur du sphéroïde.

Dans un second temps, pour mieux discriminer les deux lignées cellulaires, chacune des deux lignées a été marquée *via* l'incorporation des nanoparticules précédemment utilisées (SKOV3 avec les NPs Cy3 et IGROV1 avec les NPs Cy5, cf mat et met). Les sphéroïdes ont été formés avec un ratio de 1 : 1 pour chacune des lignées puis disposés sur une monocouche mésothéliale non marquée puis incubés en milieu de culture ou en ascite pendant 24 h.

En milieu de culture classique, l'intensité maximale de la fluorescence Cy5 est au centre du sphéroïdes et la fluorescence de Cy3 est répartie sur l'ensemble du sphéroïde. Ceci montre qu'il y a un cœur de cellules IGROV1 au centre du sphéroïde et que les cellules SKOV3 sont réparties de manière homogène dans le sphéroïde (Figure 77 A).

En ascite, l'intensité maximale de la fluorescence de la Cy5 est au centre du sphéroïde mais plus étendue qu'en condition classique. L'intensité maximale de la fluorescence de la Cy3 reste homogène dans le sphéroïde mais réduite au centre de ce dernier. L'ascite favorise la dispersion et la migration des cellules IGROV1 dans le sphéroïde et augmente la dispersion des cellules SKOV3 hors du sphéroïde, vers et sur le mésothélium (Figure 77 B).

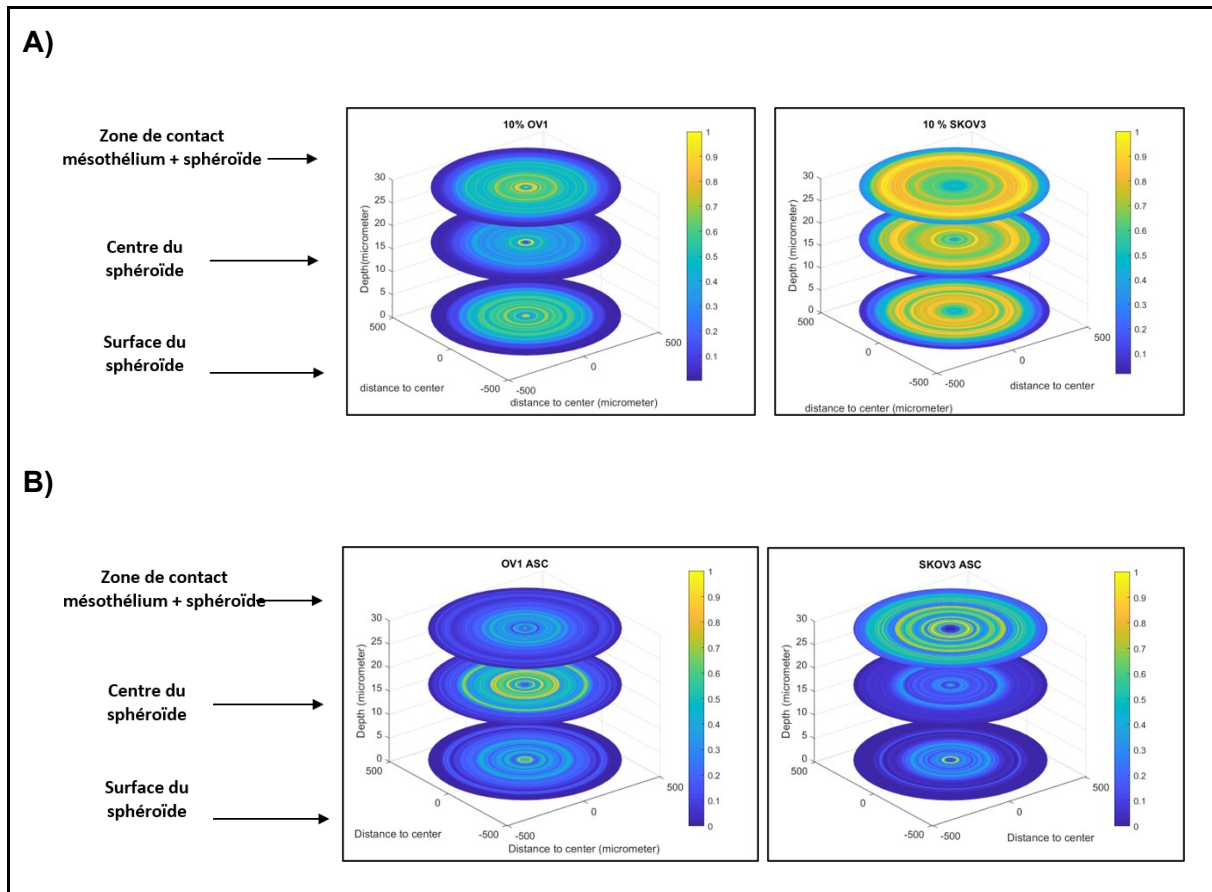


Figure 77 : Effet de l'ascite sur la répartition des cellules SKOV3 et IGROV1 dans la co-culture entre les sphéroïdes mixtes et la monocouche mésothéliale.

Les lignées cellulaires cancéreuses ovariennes ont été marquées via l'incorporation des nanoparticules précédemment utilisées (SKOV3 avec les NPs Cy3 et IGROV1 avec les NPs Cy5). Les sphéroïdes mixtes ont été formés avec un ratio de 1 : 1 pour chacune des lignées puis déposés sur une monocouche mésothéliale non marquée en milieu de culture ou en ascite pendant 24 h. Les résultats d'intensité de fluorescence ont été tracés à l'aide de la routine MATLAB personnalisée en milieu de culture (A) ou en ascite (B).

Conclusion, Partie 8 : « Impact de l'ascite sur les sphéroïdes tumoraux mixtes »

Dans le contexte pathologique du cancer, il y a une hétérogénéité des microenvironnements et des protagonistes rencontrés. Cette hétérogénéité se retrouve aussi au niveau des différents comportements cellulaires des cellules cancéreuses.

Les résultats des sphéroïdes mixtes montrent les différences de répartition des cellules cancéreuses dans le sphéroïde ainsi que dans leur dispersion sur la monocouche mésothéliale.

Cependant, l'ascite favorise la capacité migratoire et invasive des deux lignées cellulaires même si celles-ci restent tout de même différentes.

9. Conception du modèle tridimensionnel : étape par étape

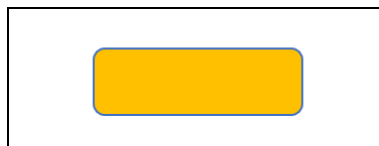
Tout au long de ces travaux de doctorat nous avons élaboré puis incrémenté notre modèle d'étude de co-culture en 3 dimensions (3D). Cette partie rédactionnelle résume notre stratégie et nos mises au point.

A – Ascites et composante cellulaire clé

Comme mentionné dans l'introduction bibliographique, dans le cas du cancer de l'ovaire, les cellules cancéreuses issues de l'épithélium de surface de l'ovaire sont capables d'envahir l'ovaire mais aussi de se « détacher » de la tumeur primaire de façon individuelle ou plus fréquemment en formant des amas multicellulaires appelés « sphéroïdes » de « baigner » et survivre dans des fluides inflammatoires péritonéaux, appelés ascites. Ce processus de dissémination atypique, permet aux cellules cancéreuses de se propager dans la cavité péritonéale, de s'implanter et de coloniser des niches pré-métastatiques du péritoine.

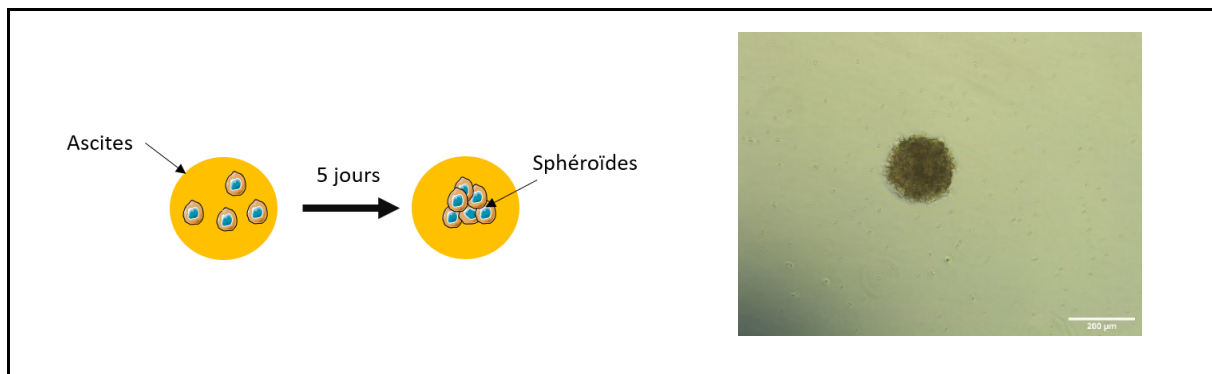
L'accumulation d'ascite dans la cavité péritonéale est un premier élément que nous avons pris en compte dans la conception du modèle de culture 3D. Dans notre étude, et donc sur notre modèle, plutôt que du milieu de culture classique, différentes ascites ont été utilisées. Cette utilisation nous a permis par ailleurs d'évaluer les effets ascites-dépendants des réponses cellulaires étudiées.

Ascites



Les sphéroïdes tumoraux ovariens sont retrouvés dans l'ascite, c'est pourquoi nous avons décidé d'inclure, dans le modèle, des cellules cancéreuses ovariennes, cultivées en conditions indépendante de l'ancrage, auto-assemblées en agrégats multicellulaires de forme sphérique avec une organisation en 3D. Pour cela, comme décrit dans le matériel et méthodes, la technique de la goutte suspendue en ascites a été utilisée afin de calibrer la taille, la morphologie et le nombre de cellules par sphéroïde.

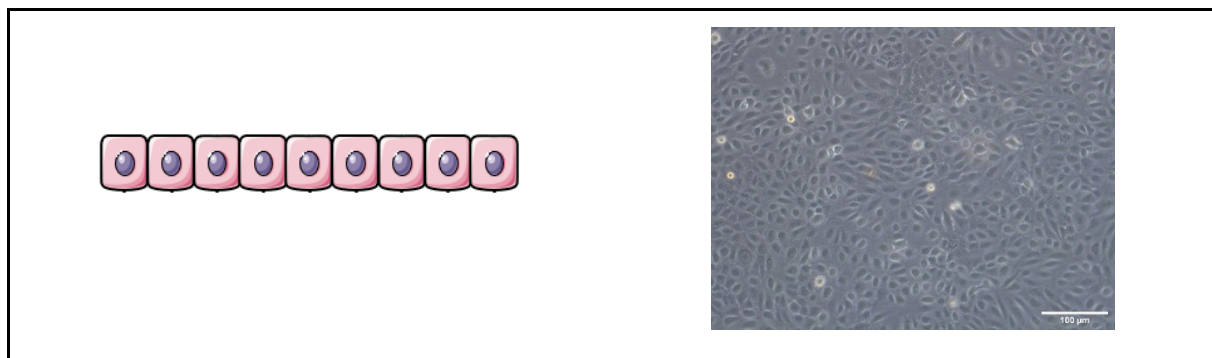
Sphéroïdes tumoraux ovariens



Les sphéroïdes tumoraux baignant dans cette ascite ont la capacité de s'ancrer et donc de s'implanter sur le mésothélium, une couche de cellules épithéliales qui borde la cavité péritonéale au niveau de la cavité abdominale. Suite à cette implantation les cellules cancéreuses migrent, prolifèrent et envahissent ce tissu secondaire afin de former des métastases.

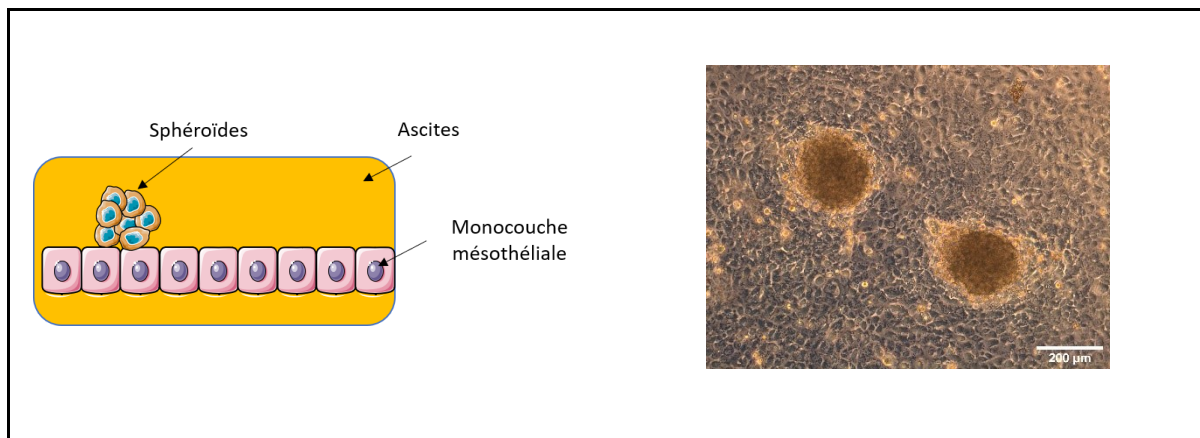
Notre objectif a donc été de mimer ce mésothélium par une monocouche de cellules mésothéliales, bien calibrée et parfaitement jointive.

Monocouche mésothéliale



Le modèle se compose initialement d'une co-culture entre la monocouche mésothéliale et les sphéroïdes, en ascites.

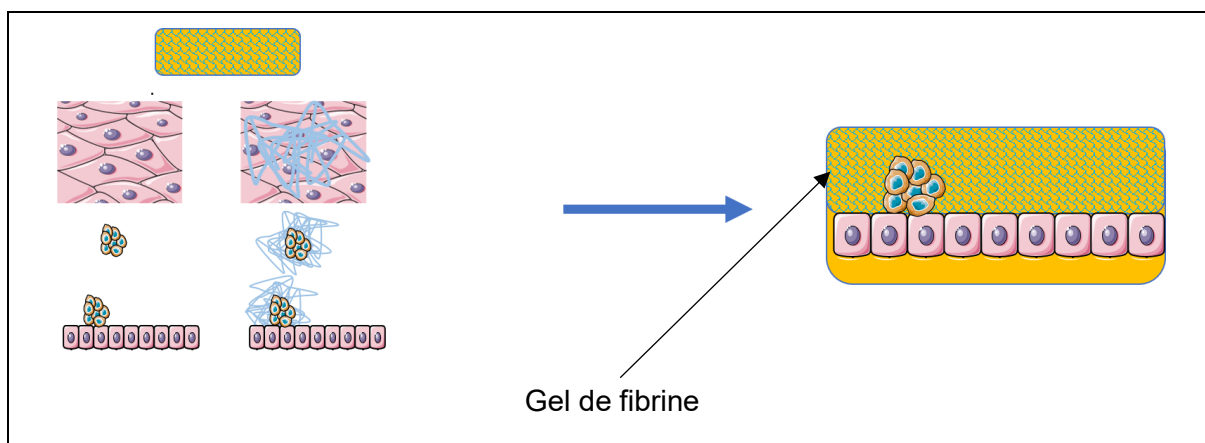
Co-culture en ascite



B – Le fibrinogène et la fibrine : Protagonistes clé de la matrice 3D biomimétique

Nos résultats ont révélé la présence de fibrinogène / fibrine *in vitro et ex vivo*, dans les ascites, sur le mésothélium et autour, voir au sein, des sphéroïdes. Nous avons donc décidé d'inclure les sphéroïdes dans un gel de fibrine et de les déposer sur la monocouche mésothéliale. Rappelons que la concentration du gel de fibrine est de 3 mg/ ml se rapprochant ainsi des concentrations de Fg retrouvées dans les ascites (et dans le plasma).

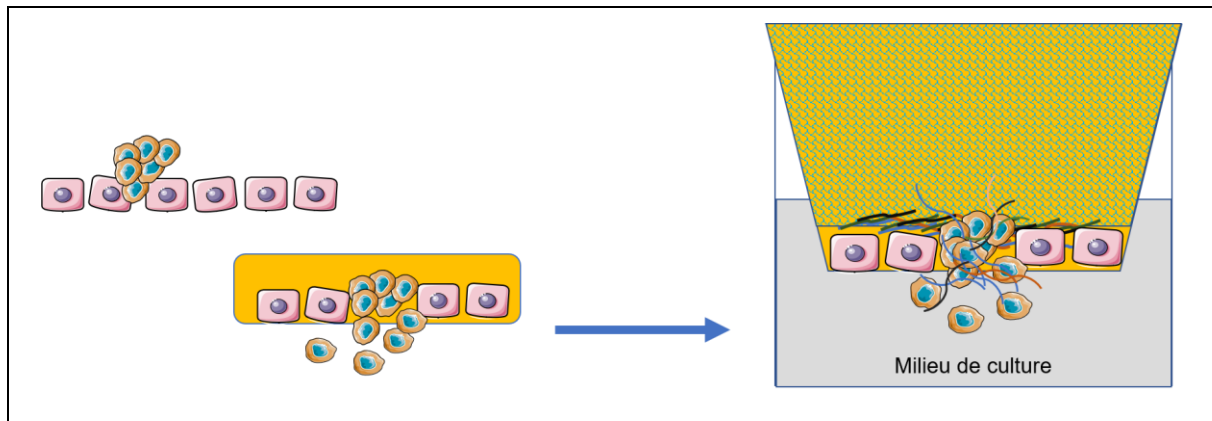
Co-culture en gel de fibrine et en ascite



C – Clairance et transmigration

La clairance des cellules mésothéliales par les sphéroïdes est stimulée *in vitro* en ascite. Suite à cette clairance, les cellules cancéreuses ont la capacité de migrer au travers du mésothélium pour rejoindre le tissu conjonctif sous-jacent. C'est pourquoi l'idée est d'utiliser notre modèle de co-culture en gel de fibrine dans la partie supérieure d'une chambre de Boyden afin de pouvoir quantifier cette transmigration.

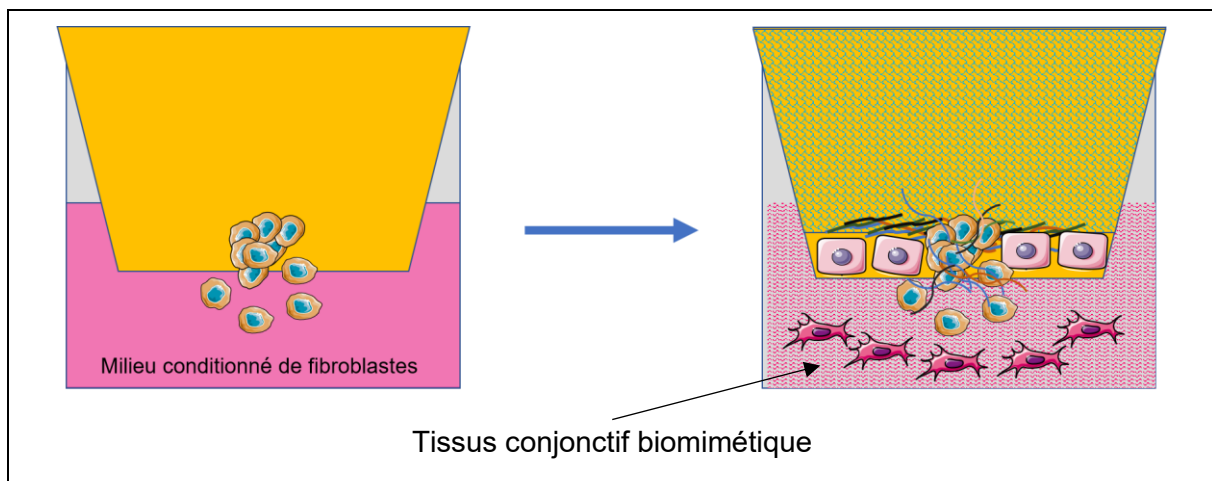
Modèle de transmigration



D – Impact du stroma sous-mésothélial :

La diversité du stroma et du microenvironnement du cancer de l'ovaire nécessite de pouvoir complexifier les modèles. Nos résultats de migration ont permis de démontrer que le milieu conditionné de fibroblastes favorise la migration des cellules cancéreuses. Ces résultats justifient d'associer des sécrétions fibroblastiques et même l'ajout des fibroblastes, dans des gels de matrice, au modèle tridimensionnel afin de mimer une partie du tissu conjonctif sous-jacent.

Modèle de transmigration complexifié



Discussion

La progression du cancer de l'ovaire est fréquemment associée au développement d'ascite maligne dans la cavité péritonéale. Nous avons démontré dans cette étude doctorale, l'influence de ce liquide inflammatoire sur le comportement des cellules du foyer tumoral ovarien et du mésothélium, site métastatique privilégié des cancers de l'ovaire. De nombreuses interrogations peuvent être soulevées :

- Sur la nature des composants ascitiques particuliers pouvant favoriser la niche pré-métastatique ou impacter l'organisation cellulaires des sphéroïdes,
- Sur l'importance du microenvironnement matriciel et des interactions intégrines dépendantes qui en découlent, dans la création d'une niche propice à l'extension tumorale,
- Sur la nature des déstabilisations tissulaires engendrées par l'ascite et sur la capacité des cellules cancéreuses à se frayer un chemin au travers de la barrière mésothéliale (clairance),
- Sur les signalisations mises en jeu,
- Sur la pertinence de réaliser des modèles de co-culture tridimensionnels mimant la dissémination tumorale.

Le fibrinogène ascitique, un élément clé de la formation de niches pré-métastatiques ovariennes ?

Nous avons démontré la présence de fibrinogène au sein d'un panel de liquides ascitiques prélevés chez des patientes atteintes d'adénocarcinome ovarien avec des concentrations de fibrinogène ascitiques semblables à celles du fibrinogène plasmatique. Les niveaux élevés de fibrinogène circulant et la perméabilité des vaisseaux sanguins conduisent à une extravasation de fibrinogène retrouvé dans les ascites malignes de la cavité péritonéale. Par ailleurs, les taux plasmatiques de fibrinogène augmentent dans des contextes inflammatoires, notamment dans les conditions inflammatoires illustrant les cancers de l'ovaire [51]. Les taux élevés de fibrinogène peuvent être expliqués et être la conséquence de la suractivation de la voie de coagulation, induite en réponse à l'activation du système immunitaire pour « contrer » la tumeur, donnant un phénotype tumoral pro-coagulant [159]. De plus, nous avons également démontré la présence de fibrine, forme polymérisée du fibrinogène, dans les ascites. Cette présence de fibrine peut s'expliquer par le fait que lorsque la tumeur est en hypoxie, c'est-à-dire qu'elle subit un manque d'apport en oxygène, les tissus répondent en surexprimant les protéines impliquées dans la coagulation, et ainsi, favorise la polymérisation du fibrinogène en fibrine [160].

Tout comme le fibrinogène, la vitronectine, actrice du processus de coagulation, est une protéine de la MEC pouvant être circulante dans le plasma sanguin, associée ou non avec le fibrinogène. Schneider et al. montrent que la vitronectine présente dans le plasma est un puissant facteur favorisant la migration des cellules cancéreuses et que cette protéine est chaperonnée par le fibrinogène [98,161]. Tout comme pour le fibrinogène, la présence de vitronectine au sein d'ascites issues de tumeurs de l'ovaire a également été démontrée [40], ce qui suggère, comme cela se passe dans le plasma, une interaction entre les deux protéines lorsque qu'elles sont dans l'ascite.

Des approches expérimentales utilisant des modèles d'études murins révèlent, *in vivo*, la présence de dépôts de fibrine à la surface mésothéliale de la cavité péritonéale [130,131]. Après injection de cellules cancéreuses dans le péritoine de souris, il s'est d'abord produit une hyperperméabilité microvasculaire aux macromolécules circulantes, suivie d'une extravasation de fibrinogène plasmatique et de sa coagulation en fibrine réticulée. Notre étude, notamment par des approches *in situ* à partir de biopsie humaine, démontre que des cellules cancéreuses ovariennes organisées, ou non, sous forme d'amas multicellulaires appelés sphéroïdes, peuvent être piégés au sein de ces dépôts de fibrine au niveau du mésothélium péritonéal. Nos résultats d'imagerie corrélative confirment cette présence de Fg et de fibrine qui se déposent et s'organisent en réseaux sur le mésothélium. Ce dépôt de fibrine au niveau de la barrière mésothéliale est considéré comme nocif en cas de dissémination péritonéale car il piège les cellules cancéreuses et favorise potentiellement leur dissémination et leurs capacités à former des métastases et de nouveaux sites secondaires de dissémination [154].

Nous avons démontré la présence de fibrine autour des sphéroïdes tumoraux ovariens isolés à partir d'ascite de patientes et lors de leur formation *in vitro* en ascite. Matsuoka et ses collaborateurs ont observé la croissance extra-péritonéale des sphéroïdes enchâssés dans de la fibrine avec une néovascularisation des vaisseaux d'alimentation reliant le stroma hôte intrapéritonéal et les lésions extra-péritonéales cancéreuses, ceci au travers la monocouche mésothéliale mais sans affecter son intégrité. Les facteurs de la coagulation sont fortement détectés autour de ces sites d'implantation péritonéaux et leurs taux dans l'ascite étaient plus élevés que dans le sang. Ces résultats démontrent la présence d'une néovascularisation autour des sphéroïdes ancrés dans un réseau de fibrine sur la monocouche mésothéliale intègre, suggérant une nouvelle stratégie d'invasion péritonéale du cancer de l'ovaire et un traitement anti-cancer intrapéritonéal ciblé sur les facteurs de la coagulation [148].

Par ailleurs, en plus de la présence de fibrinogène et de fibrine au sein des ascites, nous avons aussi démontré la présence de thrombine. Dans ce cadre il est à noter que des épanchements péritonéaux et pleuraux de patients atteints de cancer du côlon ou d'autres tumeurs malignes

contiennent également des niveaux élevés de thrombine et de fibrine qui induisent une réponse pro-invasive des cellules cancéreuses colorectales humaines HCT8 / S11 [162].

Nos résultats ainsi que la bibliographie suggèrent fortement que l'ascite est une source de fibrinogène et de fibrine qui se déposent et s'organisent en réseaux sur le mésothélium péritonéal et autour des sphéroïdes. Le fibrinogène et la fibrine apparaissent comme deux acteurs moléculaires clés de la création d'un micro-environnement propice à la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes et semblent jouer un rôle important dans l'élaboration d'une niche pré-métastatique.

L'hétérogénéité des sphéroïdes tumoraux : un élément clé de l'implantation péritonéale des tumeurs ovariennes et de la formation de métastases ?

Afin d'illustrer au mieux les conditions pathologiques de la dissémination tumorale ovarienne et plus particulièrement de la composante cellulaire, organisée en trois dimensions (3D), nous avons généré *in vitro* en condition ascitique des sphéroïdes tumoraux par la technique de la goutte suspendue. Les sphéroïdes obtenus sont ainsi comparables à ceux retrouvés dans l'ascite (Figure 43). Cette approche nous a permis de démontrer que l'ascite accentue la capacité des cellules cancéreuses de l'ovaire à former des sphéroïdes lorsqu'elles sont maintenues dans un état de culture indépendant de l'ancrage. L'utilisation d'un autre modèle de culture dans des conditions non adhérentes, précédemment établi au sein de l'équipe [96], a révélé des résultats similaires de formation et de compactage des sphéroïdes comparativement entre l'ascite et le milieu de croissance. Cependant, les sphéroïdes avaient des tailles inégales, des formes hétérogènes et des états de compactage différents, ce qui ne permettait pas de les utiliser pour des expériences reproductibles. La technique de la goutte suspendue, quant à elle, a assuré l'obtention de sphéroïdes plus homogènes en termes de nombre de cellules, de taille, de forme et de compaction permettant des résultats reproductibles notamment en termes de quantification des réponses cellulaires.

Les tumeurs ovariennes se caractérisent par la présence d'une population hétérogène de cellules avec des propriétés génétiques et phénotypiques distinctes qui peuvent favoriser de manière différentielle la progression, les métastases et la résistance aux médicaments [163]. Dans notre étude, les sphéroïdes ont été générés avec la lignée cellulaire SKOV3 (cellules initialement issues d'ascite de patientes), et la lignée cellulaire IGROV1 (cellules initialement issues d'un épithélium ovarien d'une patiente). Lors de la formation des sphéroïdes, les cellules cancéreuses de l'ovaire peuvent subir une transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM), c'est-à-dire la perte d'un phénotype épithélial pour l'acquisition d'un phénotype plus mésenchymateux. Cela se traduit par la perte d'expression de marqueurs tels que la E-

Cadhérine, la diminution des interactions intercellulaires, ce qui favorise le détachement des cellules cancéreuses des sites primaires. De plus, les N- et P-Cadhérines sont également surexprimées, ce qui confère aux cellules cancéreuses des capacités migratoires et invasives accrues [103,104,164]. Ces différences d'expression de cadhérines ont un rôle sur plusieurs comportements cellulaires. Effectivement, des études montrent des différences de comportement des sphéroïdes selon différentes lignées avec des expressions de cadhérines différentes. Les sphéroïdes constitués majoritairement de « N-Cadhérine » sont beaucoup plus compacts et stables que les sphéroïdes composés majoritairement de « E-Cadhérine ». Lorsque des gènes favorisant l'expression de la N-Cadhérine sont insérés dans les cellules des sphéroïdes majoritairement constitués de « E-Cadhérine », les sphéroïdes deviennent beaucoup plus stables et adhésifs. A l'inverse une surexpression du gène CDH1, codant pour la E-Cadhérine, dans les sphéroïdes « N-Cadhérine » réduit l'adhésion sphéroïdes-MEC et sphéroïdes-mésothélium [164]. Ces données sont en accord avec nos investigations et nos résultats. Nous avons constaté des différences de compaction entre les sphéroïdes d'IGROV1, composés de cellules de phénotype épithélial et donc avec une composition dominante de « E-Cadhérine » par rapport aux sphéroïdes SKOV3, majoritairement composés de cellules de phénotype mésenchymateux et donc avec une composition dominante de « N-Cadhérine ».

La formation de sphéroïdes compacts, générés par la méthode de la goutte suspendue, est donc favorisée lorsque les sphéroïdes sont formés avec des lignées cellulaires ovariennes qui possèdent un phénotype mésenchymateux [112]. De plus, l'exposition des lignées cellulaires cancéreuses de l'ovaire à l'ascite entraîne des modifications des morphologies cellulaires. Sous l'effet de l'ascite, les cellules IGROV1 maintiennent et accentuent leur phénotype épithélial tandis que les cellules SKOV3, caractérisées initialement par un phénotype mésenchymateux intermédiaire, voient leurs marqueurs mésenchymateux augmenter [101]. Les lignées cellulaires mésenchymateuses ont également une capacité migratoire et invasive plus élevée que celles des lignées cellulaires qui ne forment pas de sphéroïdes compacts. En effet la lignée SKOV3 est plus invasive que la lignée IGROV1 [101,112]. Ces données nous ont conduit à générer des sphéroïdes mixtes (SKOV3/IGROV1). Lorsqu'ils sont déposés sur une monocouche mésothéliale, nous avons observé des différences de désagrégation dans le temps entre les sphéroïdes classiques et les sphéroïdes mixtes. Cette différence s'explique par les comportements distincts de migration des deux lignées cellulaires utilisées. L'ascite déclenche de manière différentielle un phénotype de dissémination. Le type de dissémination est lié aux caractéristiques cellulaires intrinsèques initiales en permettant soit la formation de sphéroïdes et l'extension de colonies pour les cellules qui présentent un phénotype intermédiaire épithélial initial, soit en favorisant la migration de cellules avec un phénotype intermédiaire mésenchymateux [101].

De façon intéressante, les sphéroïdes tumoraux *in vivo* se caractérisent également par la présence au sein de ces amas multicellulaires de cellules non cancéreuses et non ovariennes. Ces cellules auraient une influence non négligeable quant à la compaction globale des sphéroïdes ainsi que sur leur comportement. Ainsi, Matte et coll. ont décrit la présence de cellules mésothéliales au centre des sphéroïdes (*in vivo* et *in vitro* lors de formation des amas multicellulaires avec la technique de la goutte suspendue), ce qui rend les sphéroïdes plus compacts. L'ascite, par sa composition moléculaire, favorise le compactage des sphéroïdes mais est également une source de cellules mésothéliales, desquamées du mésothélium, qui sont incorporées dans les sphéroïdes et qui favorisent également le compactage. Dans ces sphéroïdes « hybrides », il existe une forte expression des intégrines $\beta 1$, ce qui favoriserait leur implantation au mésothélium [165]. Il a aussi été démontré que des cellules cancéreuses ascitiques de haut grade qui ont une expression élevée d'intégrines $\alpha 5$ sont susceptibles de former des sphéroïdes hétérotypiques avec des fibroblastes associés au cancer (FACs). Ces fibroblastes à l'intérieur de ces agrégats hybrides favorisent la survie des cellules cancéreuses ascitiques et guident leur invasion péritonéale avant de devenir des composants essentiels du stroma tumoral dans les métastases nouvellement formées. Ces résultats permettent d'identifier une architecture de sphéroïdes qui renforce l'interaction tumeur-stroma et favorise la métastase [166].

Nos résultats mais également les données bibliographiques mettent en avant l'hétérogénéité cellulaires au sein des sphéroïdes ainsi que l'importance de l'ascite sur la compaction de ces derniers. Il est important que les modèles cellulaires *in vitro*, pour étudier les cancers de l'ovaire, prennent en compte les sphéroïdes. Effectivement, cette structure en trois dimensions permet d'illustrer de façon plus adéquate le contexte pathologique par rapport aux cellules isolées uniquement. Par ailleurs, il est maintenant établie que l'organisation tridimensionnelle des sphéroïdes compacts conduit à une mauvaise diffusion des agents chimiothérapeutiques au cœur des sphéroïdes et à la chimiorésistance qui en résulte [112].

Dans ce cadre, même si cela n'est pas directement le sujet de la présente étude doctorale, j'ai pu activement participer à une étude visant à estimer l'effet de molécules actives d'intérêt sur la survie des cellules cancéreuses ovariennes et notamment de sphéroïdes tumoraux. Cette étude est disponible en fin de manuscrit dans le dossier annexes [167]. Ainsi dans le cadre d'une collaboration, notre équipe a démontré les effets du SRO-91, analogue de synthèse de la ribavirine, sur la dissémination de la tumeur ovarienne et sa non-toxicité vis-à-vis des cellules saines non cancéreuses. Le SRO-91, comme la ribavirine, inhibe la prolifération, la migration, la clonogénicité et la formation de sphéroïdes des cellules cancéreuses. De plus, un modèle physiologiquement pertinent *in vitro* a montré que le SRO-91, comme la ribavirine ou le cisplatine, inhibe l'implantation des cellules cancéreuses sur le mésothélium péritonéal

sans pour autant avoir un effet cytotoxique sur les cellules mésothéliales [167]. Il serait intéressant de pouvoir juger de l'effet du SRO-91 sur l'implantation de sphéroïdes, préalablement formés puisque le SRO-91 joue un rôle inhibiteur sur la formation des sphéroïdes, sur le mésothélium.

Le microenvironnement matriciel au cœur des interactions moléculaires et cellulaires favorisant la dissémination ?

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau complexe de macromolécules, aux propriétés physiques, biochimiques et biomécaniques distinctives, qui est un acteur clé du microenvironnement tumoral. Effectivement, une dérégulation de la composition et de l'organisation de la MEC est caractéristique de nombreux cancers [168]. La MEC, au-delà de son rôle de support structural pour les cellules malignes et non-malignes, représente aussi une source de ligands protéiques bioactifs qui régulent la prolifération, le fonctionnement et la migration des cellules grâce, entre autres, aux récepteurs de la famille des intégrines [13].

Dans la présente étude, la caractérisation des sphéroïdes nous a permis de détecter et mettre en évidence la présence et l'organisation du fibrinogène, de la vitronectine et de la fibronectine au sein des sphéroïdes. Dans une étude précédente, notre équipe a également démontré le rôle de la vitronectine et de ces récepteurs, « les intégrines αv » dans la formation initiale des sphéroïdes tumoraux [96]. Par ailleurs, concernant les interactions moléculaires impliquées dans la formation des sphéroïdes, il est à noter que l'absence d'expression de CD44, récepteur de l'acide hyaluronique, peut diminuer la prolifération, l'activité de migration et d'invasion ainsi que la formation de sphéroïdes [169]. Ces résultats illustrent l'importance des interactions entre la MEC et ses récepteurs dans la formation des sphéroïdes. De plus, le fait que nous démontrons que l'ascite favorise l'expression et l'organisation de la MEC au niveau des sphéroïdes, cela suggère un renforcement des interactions MEC ascitiques-récepteurs, telles que les intégrines, ce qui favoriserait la compaction des sphéroïdes. Enfin, dans des conditions ascitiques, les sphéroïdes organisent à leur surface diverses protéines matricielles qui pourraient être impliquées dans leur implantation sur le mésothélium et donc dans la formation de métastases.

Comme nous l'avons également démontré, l'ascite permet une modification et une densification du réseau des protéines matricielles sur le mésothélium. Cette forte présence matricielle favoriserait le remodelage et la création d'un nouveau microenvironnement mésothélial propice à la formation de métastases. La caractérisation des protéines de la MEC par immunofluorescence révèle la présence de fibronectine, de vitronectine et de fibrinogène (trois molécules pouvant être plasmatiques et matricielles) ainsi que de laminine et collagène

IV (deux acteurs clés des lames basales épithéliales). Nous révélons également l'influence de l'ascite sur le remodelage de ces molécules. Par ailleurs, la désagrégation des sphéroïdes sur des revêtements de fibronectine ou de fibrinogène, protéines présentes et organisées sur le mésothélium, nous a permis de montrer que l'ascite favorise cette désagrégation. Cette désagrégation est dépendante des intégrines. En effet, le blocage des intégrines de ces ligands (intégrine αv et $\alpha 5\beta 1$) par le peptide RGD ou le cilengitide réduit la dislocation ou désagrégation des sphéroïdes sur les différentes matrices. Dans ce cadre, Kenny et al. ont montré que le blocage de la production de fibronectine par les cellules mésothéliales conduit à une diminution de l'adhésion, de l'invasion, de la prolifération et des métastases de cellules cancéreuses ovariennes isolées. De plus, les auteurs ont également montré que l'inhibition de l'interaction des intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ avec la fibronectine bloque les stades initial et tardif des métastases [133]. *In vitro*, de façon similaire à nos résultats, les sphéroïdes se sont complètement désagrégés sur des substrats de collagène de type I. De plus, un anticorps monoclonal contre la sous-unité intégrine $\beta 1$ a inhibé de manière significative la désagrégation des sphéroïdes sur toutes les protéines testées (laminine, fibronectine, collagène IV) [170]. De surcroît, des résultats équivalents ont été démontrés avec des sphéroïdes isolés à partir d'ascites de patientes qui se sont complètement désagrégés sur les composants de la MEC comme la laminine, la fibronectine, le collagène I, le collagène IV ou l'hyaluronane [132]. D'autres types d'interactions avec la MEC ont aussi leur importance dans le cancer de l'ovaire : l'adhérence des sphéroïdes à l'acide hyaluronique, exprimé par les cellules mésothéliales, peut être dirigée par le CD44 qui est exprimé à la surface de sphéroïdes dérivés de patientes [139].

Le resvératrol, qui est un polyphénol, est connu pour inhiber l'adhésion de nombreuses tumeurs malignes. Mikuła-Pietrasik et al. ont montré que le resvératrol inhibe l'adhérence de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ovariennes (A2780, OVCAR-3, SKOV-3). Ce polyphénol affecte l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes aux cellules mésothéliales en diminuant le niveau d'expression d'intégrines $\alpha 5\beta 1$ cellulaire et en augmentant la sécrétion d'acide hyaluronique dans l'environnement [171].

Ces résultats, en accord avec les nôtres, prouvent l'importance des protéines de la MEC exprimées à la surface des sphéroïdes ainsi que sur le mésothélium et leurs liaisons avec leurs récepteurs de types « intégrines » dans les étapes de formation des sphéroïdes et dans les étapes d'implantation et de formation de métastase sur le mésothélium péritonéale.

Déstabilisation et fragilisation du mésothélium : l'implantation et l'invasion tumorale est-elle conditionnée par l'ascite ?

Dans notre étude, nous avons également voulu observer l'impact de l'ascite sur le mésothélium, site privilégié de formation de métastase cancéreuses ovariennes. Nous démontrons que l'ascite déstabilise la structuration cohésive de la monocouche mésothéliale avec une modification des jonctions intercellulaires ZO-1 et N-Cadhérine. Dans ce cadre, une étude a montré que les cellules mésothéliales exposées à des ascites malignes de tumeurs de type I (cellules claires et endométrioïdes) présentent une expression inchangée de la E-cadhérine (jonctions adhérentes), de l'occludine (jonctions serrées), de la desmogléine (desmosome) et une expression légèrement diminuée de la connexine 43 (jonctions GAP). En revanche, les cellules mésothéliales soumises à une ascite maligne de type II (séreuse et indifférenciée) sont caractérisées par une réduction significative de l'expression des molécules des quatre jonctions intercellulaires testées [172].

Nos résultats montrent également que la présence d'ascite engendre une désorganisation des zones d'ancrage et de signalisation entre les cellules mésothéliales et leur lame basale, et de ce fait une déstructuration des contacts focaux et une réorganisation du cytosquelette de l'actine. Cet impact ascitique semble se traduire par une rétraction des cellules mésothéliales. L'intégrité mécanique des cellules est régulée par un réseau dynamique de molécules structurales, de réticulation et de signalisation [173]. Par conséquent, les modifications des propriétés mécaniques des cellules individuelles peuvent révéler des informations importantes sur les changements dans ces réseaux. Entre autres, des altérations de la structure et de l'organisation du cytosquelette se manifestent, dans la plupart des cas, par une déformation plus importante des cellules individuelles, comme cela a été rapporté pour divers cancers, tels que le cancer des ovaires [157]. Dans notre étude, pour le cas des cellules mésothéliales, même si celles-ci sont des cellules saines, sous l'influence de l'ascite, celles-ci semblent se « rétracter » et subir une perte des points d'ancrage. Effectivement, notre analyse d'immunofluorescence montre un marquage diffus de la vinculine, supposant une perte des contacts focaux et notre analyse préliminaire au microscope à force atomique révèle, avec l'observation topographique, que les cellules mésothéliales se rétractent en condition ascitique. De plus, l'ascite confère aux cellules mésothéliales une meilleure élasticité traduisant une perte de la stabilité et donc une cellule en mouvement/motilité. Ces changements sur la plasticité cellulaire sont généralement liés soit à une perte partielle des filaments d'actine, soit à une désorganisation des microtubules étant en fait la conséquence d'une densité plus faible de l'échafaudage cytosquelettique cellulaire [174,175].

La fragilisation du mésothélium peut aussi s'expliquer par le processus de sénescence. Bien que la sénescence soit un état cellulaire stable, ce mécanisme physiologique engendre de nombreuses modifications phénotypiques des cellules. Dans notre étude, lorsque la monocouche de cellules mésothéliales est au contact de l'ascite, nous avons pu observer une

accumulation de vésicules dans les cellules. Une des caractéristiques des cellules sénescents est l'accumulation de vésicules et de granules [176]. De plus, il est établi que les propriétés des cellules sénescents peuvent favoriser la progression du cancer. Ksiazek et coll. ont mis en évidence la présence de cellules mésothéliales péritonéales humaines sénescents à proximité des tissus cancéreux qui permettraient la création d'une niche métastatique facilitant l'expansion intrapéritonéale de tumeurs malignes [137]. Dans ce processus de sénescence, l'ascite joue aussi un rôle important. Effectivement, il y a une augmentation de la sénescence des cellules mésothéliales lorsqu'elles sont exposées à des ascites malignes [138,177].

Ainsi, une fragilisation et une perturbation des interactions cellule-cellule et cellules-MEC aboutissant à la déstabilisation de la monocouche mésothéliale, semblent la rendre plus propice à l'implantation des cellules cancéreuses. L'ascite altère « l'homéostasie du mésothélium », favorisant l'ancrage et la métastase des cellules cancéreuses ovariennes.

La clairance : les intégrines au cœur du mécanisme d'invasion du mésothélium par les sphéroïdes tumoraux ovariens ?

Les biopsies de blocs de tumeurs attachés aux organes péritonéaux montrent que les cellules mésothéliales ne sont pas présentes sous des masses tumorales [142]. Effectivement, *in vivo*, après implantation, les sphéroïdes ont la capacité de « pousser » les cellules mésothéliales pour pouvoir traverser le mésothélium (migration transmésothéliale) et accéder aux tissus sous-jacents pour former des métastases [144]. *In vitro*, nous démontrons que l'ascite favorise la dispersion des sphéroïdes sur la monocouche mésothéliale et que celle-ci est intégrines dépendantes (αv et $\alpha 5\beta 1$). Iwanicki et al. démontrent que les sphéroïdes du cancer de l'ovaire utilisent l'activation de la myosine et la force de traction de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ et de la taline 1 pour favoriser le déplacement des cellules mésothéliales sous les sphéroïdes tumoraux ovariens [142]. La tête de la taline se lie au domaine cytoplasmique de l'intégrine et la tige de la taline contient un site supplémentaire de liaison à l'intégrine mais aussi deux sites de liaison à l'actine et plusieurs sites de liaison à la vinculine. Comme nous l'avons démontré l'ascite implique une perte des points d'ancrage avec une déstabilisation de l'organisation de la vinculine aux points d'ancrages ainsi qu'une modification de l'organisation du cytosquelette d'actine. Nos résultats, en accord avec la bibliographie, illustrent l'importance de l'impact de l'ascite sur le complexe Intégrines / Taline / Vinculine / Actine dans le phénomène de clairance du mésothélium par les cellules cancéreuses ovariennes.

Davidowitz et al. ont démontré que les lignées cellulaires cancéreuses qui présentaient une forte activité de clairance des cellules mésothéliales avaient une expression plus élevée des

gènes associés à un profil mésenchymateux, alors que les lignées cellulaires cancéreuses qui présentaient une activité de clairance faible ou indétectable étaient associées à une forte expression des « gènes des marqueurs épithéliaux ». De plus, la surexpression des facteurs de transcription SNAI1, TWIST1 et ZEB1, qui régulent la Transition Epithélio-Mésenchymateuse, ont favorisé la clairance mésothéliale dans les lignées cellulaires cancéreuses initialement à faible activité de clairance. A l'inverse, l'inactivation des facteurs de transcription TWIST1 et ZEB1 atténuait la clairance mésothéliale dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire à forte activité de clairance [178]. Ces résultats concordent avec les différences de comportement des deux lignées cellulaires cancéreuses utilisées dans les sphéroïdes mixtes lors de leur co-culture avec les cellules mésothéliales.

Ces données, prises dans leur ensemble, illustrent la complexité de ce mécanisme de clairance encore peu étudié. Cependant, l'importance des intégrines révélée dans notre étude permet de songer à ces récepteurs en termes de cible thérapeutique afin de limiter la clairance. Bloquer les intégrines, et donc inhiber la clairance, diminuerait l'implantation tumorale au mésothélium et la formation de métastases dans les tissus sous-jacent et réduirait le risque d'un nouveau foyer tumoral.

Transmigration : quand différents microenvironnements s'en mêlent

Après avoir « poussé » les cellules mésothéliales et donc réalisé cette clairance, les cellules cancéreuses sont capables de migrer au travers de cette barrière mésothéliale et de coloniser les tissus, notamment conjonctifs, sous-jacents. Ce mécanisme est la transmigration. Nous avons mis en évidence que l'ascite favorise la clairance du mésothélium et favorise la migration des cellules cancéreuses, ce qui induirait la transmigration.

Les cellules cancéreuses de l'ovaire sont généralement plus « molles » et affichent une variabilité intrinsèque plus faible en termes de « rigidité » cellulaire que les cellules épithéliales ovariennes non malignes [179,180]. Au travers de nos résultats préliminaires et après analyse au microscope à force atomique (AFM), nous constatons que les cellules cancéreuses SKOV3 voient leur élasticité augmenter sous l'effet de l'ascite ce qui favorise leur capacité migratoire. Des études portant sur divers cancers, utilisant l'AFM comme technique expérimentale, ont montré que des anomalies des propriétés élastiques des cellules sont associées à la pathogenèse et à la progression de la maladie [156,181]. Une étude sur les cellules cancéreuses de l'ovaire hautement invasives (HEY A8) par rapport à leurs cellules parentales moins invasives (HEY), démontre que la déformabilité est un biomarqueur précis du potentiel métastatique. Les analyses comparatives de l'expression génétique indiquent que la rigidité réduite des cellules HEY A8, hautement métastatiques est associée, au remodelage

du cytosquelette d'actine favorisant ainsi la migration. L'ascite semble donc favoriser la perte de rigidité et donc le gain en élasticité et en motilité des cellules cancéreuses, permettant ainsi leur migration.

L'augmentation de la migration cellulaire peut aussi se voir influencer par d'autres mécanismes. Pakula et al. décrivent que l'ascite maligne stimule la TEM dans deux lignées cellulaires représentatives du cancer de l'ovaire (A2780, SKOV-3) et démontrent que la TEM induite dans les cellules cancéreuses en réponse à l'ascite maligne contribue à l'augmentation de l'invasion transmésothéliale [145].

En plus de l'ascite, les cellules du stroma, présentes au sein du foyer tumoral ou à proximité peuvent aussi influencer la migration et transmigration des cellules cancéreuses. Il a été documenté que les cellules mésothéliales péritonéales humaines sénescents stimulent la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de l'ovaire *in vitro*. Cet effet est lié à la fois à l'activité des agents solubles libérés dans l'environnement par les cellules mésothéliales sénescents mais aussi par le contact direct cellule mésothéliale – cellule cancéreuse [138].

Les cellules cancéreuses au cours de leur dissémination métastatique « rencontrent » différents microenvironnements. Dans ce cadre, nous montrons également qu'un autre type de microenvironnement que l'ascite peut avoir un impact sur la migration des cellules cancéreuses. Le milieu conditionné de fibroblastes et donc les molécules bioactives sécrétées par les cellules du tissu conjonctif ont un pouvoir chimioattractant, ce qui pourrait jouer un rôle important dans la transmigration des cellules cancéreuses au travers du mésothélium. Dans notre étude, ce ne sont pas directement les « fibroblastes associés au cancer » (FAC) du stroma de la tumeur qui influencent la migration mais bien des fibroblastes sains. Cependant, ces cellules fibroblastiques et leurs sécrétions moléculaires peuvent influencer le comportement cellulaire des cellules cancéreuses.

Les FACs représentent une population de cellules non cancéreuses du microenvironnement tumoral et jouent un rôle dans le remodelage matriciel et dans l'invasion tumorale. Il est maintenant bien établi qu'après leur activation par les cellules cancéreuses, les FACs sont capables d'émettre en retour des « signaux oncogéniques » aux cellules cancéreuses ce qui stimule la progression tumorale [182]. Ces signaux peuvent être des sécrétions de cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance ou de protéines matricielles. Dans ce cadre nous pouvons noter que des cellules épithéliales cancéreuses mises en présence de FACs accroissent leurs propriétés invasives *in vivo* [61,183] et développent une résistance exacerbée aux chimiothérapies [62]. De plus, Wersterlund et al. ont démontré que le milieu conditionné de fibroblastes favorise la production de métalloprotéases matricielles comme la

MMP-2 par les cellules cancéreuses ovariennes [183]. Globalement, les MMPs participent à la dégradation de la MEC, favorisant ainsi l'invasion tumorale. La MMP-2, qui est à la fois présente dans l'ascite et qui peut être produite par les cellules cancéreuses sous l'influence du microenvironnement fibroblastique, clive la fibronectine et la vitronectine en de petits fragments qui renforcent l'adhérence des cellules cancéreuses au péritoine [135]. Ces fragments ne sont à l'heure actuelle pas étudiés mais il serait pertinent de savoir si ce sont potentiellement des matrikines.

Les cellules mésothéliales et les fibroblastes ont donc une influence sur le comportement des cellules cancéreuses. Une étude révèle également que le temps d'incubation d'une co-culture de cellules cancéreuses avec des cellules mésothéliales et des fibroblastes en même temps, est une notion importante. Effectivement, plus la co-culture est longue (de 24 h à 96 h), plus les cellules ont le temps de sécréter différentes protéines, y compris les protéines matricielles, qui peuvent affecter le comportement des cellules cancéreuses ovariennes lorsqu'elles s'implantent sur le mésothélium et transmigrent au travers [184].

Ces résultats sur l'impact de l'ascite sur la migration des cellules cancéreuses suggèrent fortement que l'ascite favorise la transmigration mésothéliale. De plus le microenvironnement sous-jacent au mésothélium (tissus conjonctif) semble également contribuer à la l'adhérence, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses.

Rac1 : un relais cytoplasmique important dans la dissémination du cancer de l'ovaire ?

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à une voie de signalisation potentiellement impliquée dans la rétraction des cellules mésothéliales et dans la déstabilisation du mésothélium sous l'effet de l'ascite.

La famille Rho GTPases est une famille de protéines de liaison GTP exprimée de manière ubiquitaire et conservée dans l'évolution qui transduisent des signaux intracellulaires connus pour réguler une variété de processus cellulaires. Les trois membres de la famille Rho les mieux caractérisés sont Cdc42, RhoA et Rac1. Ils jouent chacun un rôle central dans l'expression des gènes et dans diverses fonctions cellulaires telles que la polarité cellulaire, la morphogenèse, la migration, l'apoptose, le trafic des vésicules et la transformation cellulaire. A noter que la réorganisation de l'actine est régulée par les petites GTPases [185–187].

Kenny et al. ont démontré l'influence des cellules cancéreuses sur la production de Fn par les cellules mésothéliales, favorisant ainsi l'adhérence et donc les métastases. Cette induction de l'expression de la fibronectine dans les cellules mésothéliales est médiée par une voie de signalisation dépendante de TGF- β RI / Rac1 / SMAD3 [133]. Effectivement, l'augmentation

de Rac1-GTP (forme activée de Rac1) a été observée spécifiquement dans les cellules mésothéliales après co-culture avec les cellules SKOV3. De plus, l'induction de l'expression de la fibronectine en réponse au TGF- β 1 dans les cellules mésothéliales peut être abrogée en bloquant la signalisation de Rac1. L'activation de Rac1 joue donc un rôle dans l'expression protéique des cellules mésothéliales et est dépendant du microenvironnement ou des cellules rencontrés par ces dernières.

Dans notre étude, nous avons pu mettre en exergue que l'ascite favorisait la rétraction des cellules mésothéliales et qu'il y avait une augmentation des volants membranaires « membrane ruffles » dans ces cellules. Nous avons également détecté une augmentation de l'activation de Rac1 dans les cellules mésothéliales lorsque celles-ci sont exposées à de l'ascite. Les protéines Dedicator-of-cytokinesis (DOCK) sont une famille de facteurs d'échange guanine-nucléotides pour les Rho GTPases. Une expression induite de ces protéines dans des cellules favorise une augmentation des volants membranaires [188]. De plus, cette augmentation est en cohérence avec une augmentation des niveaux d'activation de Rac1. Ces résultats montrent le lien entre l'activation de Rac1 et la formation de volants membranaires, tout comme notre étude, et mettent en avant des protéines ayant une capacité à induire ces structures membranaires particulières par l'activation de Rac1 [188].

Compte tenu de la bibliographie, la mécanistique de l'action de Rac1 pourrait être la suivante. mDia (mammalian homolog of Diaphanous) et ROCK (Rho-associated coiled-coil containing kinases) sont des effecteurs en aval de l'action de Rho sur le cytosquelette d'actine : mDia produit des filaments d'actine par nucléation et polymérisation et ROCK active la myosine pour les relier pour l'induction de faisceaux d'actomyosine et la contractilité. Le mDia est potentiellement lié à l'activation de Rac1 et à la formation de volants membranaires par phosphorylation induite par c-Src des protéines d'adhérence focales, et ROCK contre-carre cette action de mDia. Ainsi, la morphogénèse, l'adhérence et la motilité des cellules peuvent être déterminées par l'équilibre entre les activités mDia et ROCK [189]. Il serait ainsi judicieux en termes de perspectives d'observer l'équilibre de ces effecteurs et de leur impact sur les volants membranaires dans les cellules mésothéliales suite à leur incubation avec l'ascite.

Nos résultats, au-delà de l'activation de Rac1 et de l'augmentation des volants membranaires dans les cellules mésothéliales en présence d'ascite, ont montré la présence de Rac1 par immunofluorescence au niveau membranaire et en particulier dans les volants membranaires. Kurokawa et al. rapportent la régulation spatio-temporelle de Rac1 et Cdc42 au niveau des lamellipodes et des volants membranaires. Dans les cellules Cos1 et A431 stimulées par le facteur de croissance épidermique (EGF), Rac1 et Cdc42 ont été activés de manière diffuse au niveau de la membrane plasmique, suivis par une protrusion lamellipodiale et un la présence de volant membranaire. Bien que l'activité Rac1 ait diminué rapidement, l'activité

Cdc42 s'est maintenue au niveau des lamellipodes. Par conséquent, Rac1 et Cdc42 semblent induire en synergie des lamellipodes et des volants de la membrane dans les cellules Cos1 et A431 stimulées par l'EGF [190].

L'endothélium et le mésothélium sont deux types de tissus qui tapissent certaines surfaces internes. L'endothélium tapisse le système circulatoire tandis que le mésothélium tapisse les principales cavités corporelles. C'est donc la principale différence entre l'endothélium et le mésothélium. Beaucoup d'études s'intéressent à l'intégrité de l'endothélium dans son rôle de barrière. Les médiateurs inflammatoires augmentent la perméabilité vasculaire principalement par la formation d'espaces inter-cellulaires entre les cellules endothéliales. Dans ces conditions, les contacts cellules-cellules endothéliales tels que les jonctions adhérentes et serrées s'ouvrent pour permettre le passage du fluide paracellulaire. Rac1 et Cdc42 sont normalement les principaux GTPases requis pour l'entretien et la stabilisation des barrières, tandis que RhoA régule négativement les propriétés des barrières dans les conditions de repos et inflammatoires. Pour Rac1 et RhoA, des fonctions contraires dans certaines conditions ont également été décrites. [191].

La formation de métastases est un événement clé de la progression tumorale maligne. La capacité à métastaser dépend de la capacité de la cellule cancéreuse à passer d'un compartiment à un autre, à migrer dans le tissu conjonctif, à adhérer et éventuellement à transmigration au travers du mésothélium (ou endothélium). Une étude a permis de savoir si les cellules cancéreuses invasives peuvent diminuer la fonction de barrière endothéliale par des altérations des propriétés biomécaniques endothéliales. A l'aide de pinces magnétiques, qui sont des instruments scientifiques pour la manipulation et la caractérisation de biomolécules ou de polymères, les auteurs ont découvert que les cellules de cancer du sein (MDA-MB-231), altéraient les propriétés mécaniques des cellules endothéliales en réduisant leur rigidité. Ils mettent aussi en évidence la dynamique de remodelage du cytosquelette d'actine qui a été augmentée dans les cellules endothéliales lors de leur co-culture avec les cellules cancéreuses du sein comparées aux cellules endothéliales mono-cultivées. De plus, le knock-out de la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules cancéreuses du sein, de la vessie et des reins, qui ont une grande capacité de transmigration, a aboli l'effet d'invasion endothéliale. De plus, l'inhibition de Rac1, de Rho kinase, de la MEK kinase et du PI3K a réduit l'effet de renforcement de l'invasion endothéliale. Ceci indique que la signalisation, par l'intermédiaire de petites GTPases, peut jouer un rôle dans l'augmentation de l'envahissement endothélial des cellules cancéreuses.

En conclusion, la diminution de la rigidité et l'augmentation de la dynamique de remodelage du cytosquelette des cellules endothéliales peuvent expliquer la perte de la fonction barrière endothéliale, suggérant que les altérations biomécaniques sont suffisantes pour faciliter la

transmigration et l'invasion des cellules cancéreuses [192]. Ces données sur l'endothélium pourraient faire écho aux résultats que l'on retrouve au niveau du mésothélium et des cellules mésothéliales, ou en tous cas alimentent les perspectives éventuelles à notre étude.

Comme le montre nos résultats, la fibrine est un élément du microenvironnement péritonéal que « rencontrent » et probablement qu'utilisent les cellules métastatiques ovariennes. Étant donné que la GTPase Rac1 a été suggérée pour agir comme un relais de signalisation dans divers types de cellules, Diebold et al. ont voulu savoir si Rac1 pouvait être le lien entre la signalisation de la thrombine, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1), qui inhibe la fibrinolyse et favorise les dépôts de fibrine et la prolifération des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire. Les auteurs ont montré que l'exposition des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire à la thrombine, renforce les niveaux d'activation de la protéine Rac1 et augmente la quantité d'ARNm de PAI-1 ainsi que l'expression de PAR-1, récepteur de la thrombine [193].

Une étude démontre que le fibrinogène stabilise le syndécan-1 (protéoglycane membranaire impliqué dans l'ancrage cellulaire et la formation de contacts focaux) sur la surface des cellules endothéliales et contribue à la protection de la barrière endothéliale. La PAK1, une kinase activée par P21 et Rac1 est une protéine kinase impliquée dans la signalisation intracellulaire conduisant au réarrangement du cytosquelette d'actine et joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la liaison du fibrinogène au syndécan-1 activait la voie PAK1. Le traitement au fibrinogène a entraîné une augmentation du syndécan-1, de l'activation de PAK1 (phosphorylation), de l'activation de la cofiline (déphosphorylation), ainsi qu'une diminution des fibres de stress et de la perméabilité par rapport au traitement témoin. La cofiline est une protéine de liaison à l'actine qui dépolymérise la F-actine pour diminuer la formation de fibres de stress. De plus, le fibrinogène n'a pas influencé l'activation de la chaîne légère de la myosine qui est un médiateur de la tension des cellules endothéliales. La désactivation de PAK1 empêche la déphosphorylation induite par le fibrinogène de la cofiline et renforce l'intégrité de la barrière. Le fibrinogène activerait donc la signalisation PAK1 pour stimuler / déphosphoryler la cofiline, conduisant au désassemblage des fibres de stress et à la réduction de la perméabilité endothéliale [194].

Un modèle de culture tridimensionnel : un outil pertinent

In vitro, de nombreuses (voir la plupart) études sont réalisées *via* des modèles de culture en deux dimensions.

L'utilisation d'un modèle 3D semble pertinent pour étudier la complexité de la « mécanistique » du cancer de l'ovaire et de sa dissémination atypique. L'utilisation d'un modèle 3D est judicieuse pour comprendre les processus cellulaires de formation de métastases cancéreuses *in vitro*. Par ailleurs, un niveau élevé de chimiorésistance étant décrit particulièrement pour ce type de cancer, l'étude de celle-ci révèle une différence de sensibilité aux traitements entre les cellules de modèles 2D et 3D. Il est donc nécessaire de pouvoir éprouver des médicaments, des principes actifs ou autres molécules potentiellement thérapeutiques, sur des cellules cancéreuses lorsqu'elles sont dans un modèle 3D illustrant au mieux le contexte pathologique *in vivo* [195,196].

Dans ce cadre, après de nombreuses mises au point expérimentales, le modèle de co-culture établi (mais en cours d'optimisation) dans la présente étude, entre des monocouches mésothéliales saines et calibrées et des sphéroïdes tumoraux ovariens également calibrés nous a permis d'observer l'impact de l'ascite sur la désagrégation des sphéroïdes sur le mésothélium et la clairance de la monocouche mésothéliale.

L'étude du processus métastatique doit être réalisée avec du recul et dans son ensemble. Le microenvironnement, notamment tumoral et les « protagonistes rencontrés » par les cellules cancéreuses *in vivo*, ainsi que l'organisation de cet ensemble doit pouvoir être pris en compte. La modélisation du comportement des cellules cancéreuses dans le contexte du microenvironnement de la tumeur nécessite la génération de cultures organotypiques qui miment l'architecture et la composition cellulaire protéique de la MEC, dans un arrangement 3D qui est physiologiquement pertinent. Le principe des modèles tridimensionnels est de créer au mieux un équivalent structurel et fonctionnel du tissu étudié.

La composition des modèles 3D peut être différente selon les recherches et les protagonistes étudiés. Par exemple, la conformation des cellules cancéreuses ovariennes organisées en sphéroïdes est essentielle *in vitro* pour mieux comprendre la pathologie. Lawrenson et al. ont développé un modèle de culture *in vitro* à base de sphéroïdes de cellules saines épithéliales sécrétoires des trompes de Fallope humains primaires [197]. Ces cellules ont été isolées des trompes de Fallope après la chirurgie et la formation des sphéroïdes s'est faite par ensemencement des cellules sur des plaques de culture non-adhésives. L'analyse de l'expression génétique a révélé des changements dans l'expression de plus de 1000 gènes lorsque ces cellules étaient cultivées en 3D par rapport au 2D. Ceux-ci incluaient des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Les profils d'expression des gènes et le comportement des cellules épithéliales sécrétoires des trompes de Fallope cultivées en 3D étaient plus cohérents avec ceux des cellules retrouvées *in vivo* que les profils des cellules cultivées en 2D [197].

Pour l'étude du cancer de l'ovaire, les premières culture 3D ont commencées par le mélange de lignées cellulaires ou de cellules primaires cancéreuses ovariennes avec différentes formes de MEC telles que des protéines purifiées, comme le collagène, soit des mélanges plus complexes, tel que du Matrigel une « membrane basale like ». Les premières études qui suivent l'interaction entre les cellules cancéreuses et les protéines de la matrice sous-mésothéliale sont modélisées en cultivant des cellules cancéreuses au-dessus de gels de collagène I et III, ce qui permet d'évaluer les modifications de l'expression des gènes des cellules cancéreuses qui accompagnent l'ancrage métastatique, la survie et la prolifération [198]. Des études ont permis de montrer que la culture de cellules cancéreuses ovariennes sur des gels de collagène I entraîne une expression rapide du facteur de transcription EGR1. *Via* ce modèle, les chercheurs ont pu montrer que l'adhérence des cellules cancéreuses ovariennes au collagène I et le regroupement des intégrines $\beta 1$ activent la signalisation de SRC, ce qui a pour but d'induire l'expression protéique de EGR1, entraînant l'activation transcriptionnelle du promoteur MT1-MMP. Cet enchainement d'événements favorise l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes qui dégradent le collagène I *via* la MT1-MMP. Ce modèle met en évidence le rôle des interactions entre les cellules du carcinome ovarien et le collagène I retrouvé dans le microenvironnement de la tumeur ovarienne, en induisant des changements d'expression génétique qui favorisent la progression métastatique intrapéritonéale [199]. Ces modèles permettent donc d'étudier la dégradation ainsi que le remodelage de la MEC favorisant les métastases.

Loessner et al. ont développé une plate-forme 3D pour modéliser les interactions entre les cellules cancéreuses ovariennes et la MEC. Ils incorporent des cellules cancéreuses ovariennes dans des hydrogels synthétiques à base de polyéthylène-glycol dans lesquels les propriétés biochimiques et biophysiques des matrices peuvent être modulées (la rigidité, les sites de liaison aux intégrines et l'activité protéase). À l'aide de cette plate-forme, ils ont analysé la capacité des cellules cancéreuses ovariennes à proliférer et à former des sphéroïdes multicellulaires dans la matrice ainsi que la capacité des cellules à moduler leur comportement en réponse à des changements de propriétés de la matrice. Leurs résultats ont indiqué des différences dans la forme des sphéroïdes. Effectivement, des sphéroïdes irréguliers et dispersés se sont formés dans des hydrogels plus mous alors que des sphéroïdes plus compacts et plus petits se sont formés dans des hydrogels plus rigides. Les auteurs ont également indiqué que la prolifération des cellules dans l'environnement 3D dépendait des interactions des intégrines $\alpha 3 / \alpha 5 / \beta 1$ et du remodelage protéolytique de la MEC. De plus, ils ont évalué la réponse des sphéroïdes aux agents chimiothérapeutiques par rapport au comportement des cellules cancéreuses cultivées en monocouches 2D. Cette analyse a révélé un taux de survie cellulaire plus élevé après le traitement avec le paclitaxel lorsque les cellules

étaient cultivées en 3D par rapport à la culture 2D. Ceci suggère que le comportement des cellules cultivées dans un environnement 3D est plus indicatif pour évaluer la réponse des cellules cancéreuses *in vivo* aux agents chimiothérapeutiques [200].

Ces modèles 3D permettent aussi de justifier et de refléter l'hétérogénéité cellulaire au sein des sphéroïdes et des différences de comportement cellulaire qui en découlent dans des matrices 3D. Comme décrit plus haut, la formation des sphéroïdes semble être dépendante de la composition en molécules impliquées dans les jonctions cellules-cellules comme les cadhérines. *Via* l'étude de sphéroïdes dans des gels de collagène I, Klymeko et al. montrent que les sphéroïdes constitués majoritairement de « N-Cadhérine » présentent une dispersion latérale rapide avant la pénétration des matrices 3D de collagène. La neutralisation du domaine extracellulaire de la N-Cadhérine, avec un anticorps, inhibe la dispersion latérale et la pénétration cellulaire des gels de collagène. De plus, la co-culture de sphéroïdes « Ncad + » avec des cellules « Ecad + » ne favorise pas un mode d'invasion collective de type « leader-suiveur », démontrant que le remodelage de la matrice et la création de « chemins » par les cellules « Ncad+ » ne sont pas suffisants pour la pénétration cellulaire de matrices de collagène par les cellules « Ecad+ ». Ces données, grâce à cette matrice 3D, mettent l'accent sur le rôle de la N-Cadhérine dans l'invasion intra-péritonéal [201].

Les résultats de notre étude, tels que la présence de fibrinogène et de fibrine dans les ascites, à proximité du mésothélium et autour des sphéroïdes soulignent l'importance du microenvironnement matriciel. De plus, les cellules cancéreuses sont capables d'envahir les gels de fibrine et l'ascite stimule cette invasion. Par ailleurs, la fibrine dans les processus de réparation tissulaire sert de matrice provisoire, riche en molécules bio-actives, qui stimule la néovascularisation et la prolifération des fibroblastes [202]. Ces données notamment nous ont conduit à inclure ce protagoniste dans la modélisation 3D de la co-culture afin de reproduire un microenvironnement proche de l'*in vivo* permettant de mimer au mieux ces étapes de dissémination tumorale.

L'importance d'un modèle 3D approchant le contexte *in vivo* est de pouvoir utiliser les protagonistes acellulaires mais aussi cellulaires que l'on retrouve dans le microenvironnement. Un modèle 3D regroupant plusieurs protagonistes permet de prendre en compte et d'étudier les interrelations entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales ainsi que leurs interactions avec la MEC. Ces modèles *in vitro* peuvent ensuite permettre le criblage de différents médicaments et de principes actifs afin de mesurer leurs effets sur les cellules cancéreuses et les cellules saines.

Comme nous avons pu le montrer dans cette étude et notamment dans le cadre de l'effet du milieu conditionné de fibroblastes qui favorise la migration des cellules cancéreuses

ovariennes, il est important de prendre en considération l'impact des cellules du stroma sur le comportement des cellules cancéreuses. En effet, de nombreux types de facteurs sécrétés sont impliqués dans les interactions entre les cellules cancéreuses métastatiques et leurs microenvironnements tels que la production de TGF- β , de PDGF, d'EGFs et de PAI-1 par les cellules mésothéliales, de MMP9 et de chimiokines par les fibroblastes ou encore de IL-8 ou IL-6 par les adipocytes [94].

La mise en place de modèle qui imite de près le microenvironnement péritonéal humain *in vivo*, avec les cellules mésothéliales, est essentiel pour permettre de comprendre le rôle de certaines protéines. Grâce à la culture organotypique 3D, les rôles de : c-Met, MMP-2, HOXA9, E-cadhérine, intégrines β 3 et α 5 ont pu être défini dans les premières étapes des métastases du cancer de l'ovaire [198].

De plus, le modèle peut être complexifié avec l'ajout de cellules conjonctives telles que des fibroblastes, ou des cellules adipocytaires. En effet, plusieurs études montrent l'importance de ces cellules conjonctives non cancéreuses dans les métastases du cancer de l'ovaire [71,72,166,203]. L'implication des fibroblastes dans la formation et la dissémination des métastases du cancer de l'ovaire est indéniable. Effectivement, les fibroblastes renforcent la capacité des cellules cancéreuses à envahir le mésothélium et sont donc des éléments souvent retrouvés dans les modèles 3D mimant le microenvironnement du péritoine [133]. Comme décrits ci-dessus, les fibroblastes jouent un rôle essentiel dans le cancer de l'ovaire, tant dans l'initiation tumorale que dans les métastases, il est donc essentiel d'inclure ce protagoniste dans des modèles 3D *in vitro* ayant pour but de mieux comprendre les mécanismes de la pathologie.

Les adipocytes sont des composants clés du microenvironnement cancéreux ovarien. Il a été démontré qu'ils sont impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes et dans les métastases [71]. Leur impact sur la chimiorésistance des cellules cancéreuses a aussi été démontré. Effectivement, il a été constaté que les adipocytes, d'origine sous-cutanée et viscérale, sécrètent des facteurs qui renforcent la résistance des cellules cancéreuses ovariennes aux médicaments chimiothérapeutiques en activant la voie de survie cellulaire Akt [204].

L'intérêt de ces modèles est aussi l'utilisation de cellules primaires. L'utilisation d'un modèle 3D comprenant des fibroblastes humains primaires extraits d'un omentum humain normal, mélangés à du collagène I et recouverts d'une couche de cellules mésothéliales humaines primaires a permis de montrer que les cellules cancéreuses ovariennes ont préférentiellement adhéré au collagène I et l'envahissaient, puis se liaient au collagène IV, à la fibronectine, à la vitronectine, à la laminine 10 et 1 [205]. Dans notre étude, nous avons montré que l'ascite

favorisait la densification et l'organisation en réseau de ces protéines sur la monocouche mésothéliale.

La pertinence de ces modèles nous semble établie, ils permettront à terme d'apporter de nombreuses réponses sur les processus métastatiques ovariens. Mais ces modèles restent limités par l'absence de vascularisation, de cellules immunitaires et endothéliales. Cependant le développement et l'utilisation de modèles 3D calibrés peut combler le fossé avec les études *in vitro* en 2D, les modèles murins et la maladie humaine *in vivo*.

Conclusion et perspectives

Conclusion :

Ces travaux de thèse décrivent l'ascite comme un microenvironnement favorisant la formation des sphéroïdes tumoraux ovariens mais aussi leur capacité à produire et à réorganiser la matrice extracellulaire, nécessaire à différents comportements cellulaires (Figure 78). L'ascite joue également un rôle sur les cellules saines du mésothélium notamment en déstabilisant les jonctions cellulaires et les contacts focaux perturbant ainsi l'intégrité de la monocouche mésothéliale. De plus, l'ascite favorise la formation de membrane « ruffle » par l'activation de Rac1, ce qui impacte l'organisation du cytosquelette d'actine et permet la rétraction des cellules mésothéliales. L'ascite facilite également l'implantation et la dispersion des sphéroïdes sur cette monocouche mésothéliale *via* les intégrines $\alpha 5$ et αV . Cette déstabilisation mésothéliale et implantation des cellules cancéreuses, favorisées par l'ascite, aboutissent à la clairance médiée par ces mêmes intégrines qui permet aux cellules cancéreuses ovariennes de migrer au travers le mésothélium et de venir coloniser les tissus conjonctifs sous-jacent. Enfin, la présence de fibrinogène et de sa forme polymérisée dans ces ascites, l'organisation en réseaux de fibrine autour des sphéroïdes et leurs dépôts aux abords du mésothélium, suscite un intérêt certain permettant de s'interroger quant à la formation d'un foyer métastatique propice à la dissémination des cellules cancéreuses ovariennes.

Ces résultats sur les différents protagonistes impliqués permettent d'appréhender ce nouveau microenvironnement péritonéal dans un contexte de dissémination tumorale et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents (Figure 78). De plus, l'implication des intégrines et la suractivation de Rac1 dans les étapes de métastases, sont des pistes thérapeutiques envisageables.

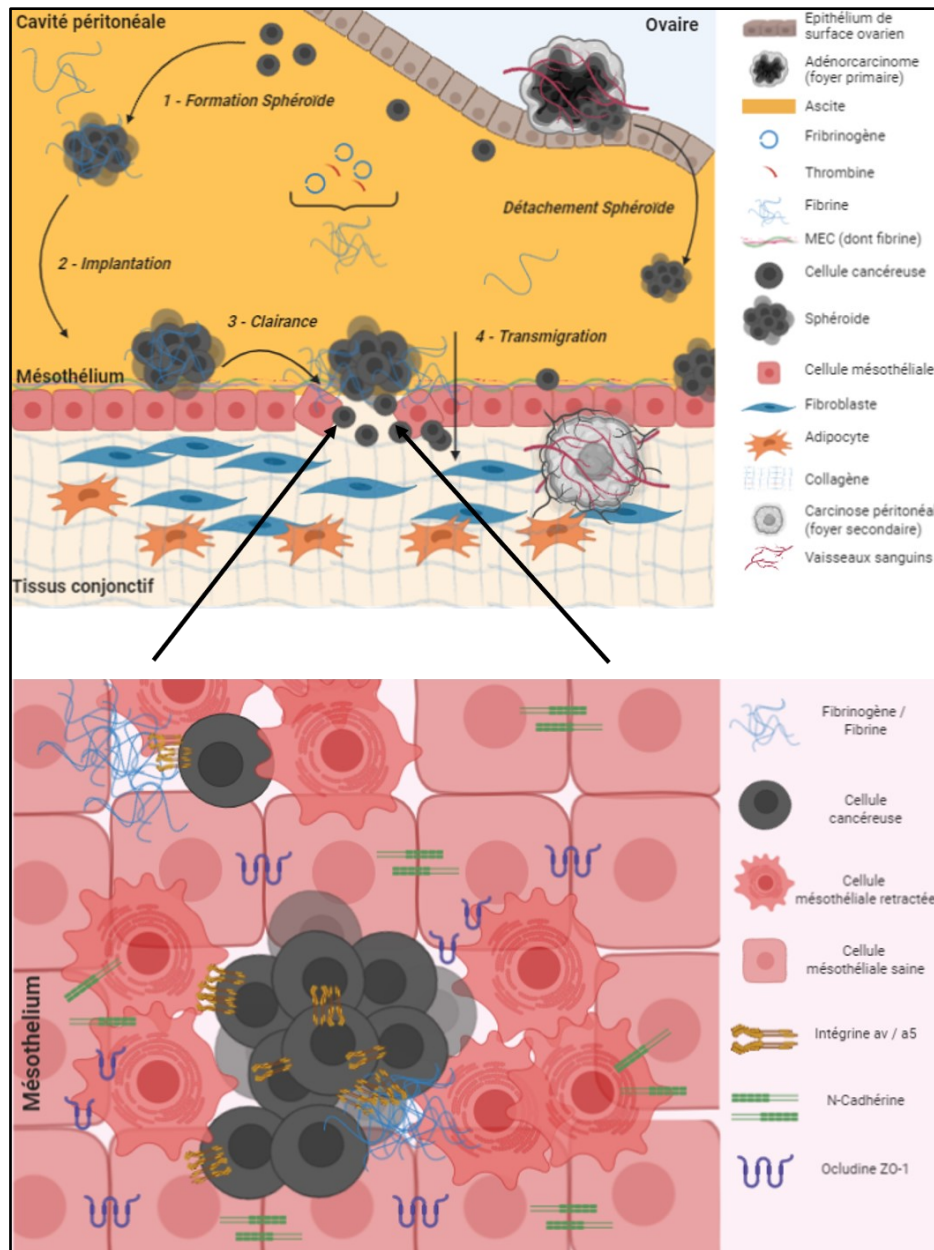


Figure 78 : L'ascite déstabilise le mésothélium et facilite l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes

Schéma globale récapitulant les résultats des travaux de thèse. L'initiation, le développement et la dissémination tumorale sont régulés par différents microenvironnements (ovarien, endothélial, ascitique, mésothélial). L'ascite est un microenvironnement tumoral unique, il est riche en composant cellulaire et acellulaire dont le fibrinogène et sa forme polymérisée sous l'effet de la thrombine, la fibrine. L'ascite favorise la formation de sphéroïdes tumoraux ovariens (1) et leur implantation sur le mésothélium (2), mais promeut également la clairance du mésothélium par les sphéroïdes (3) facilitant ainsi à la transmigration des cellules cancéreuses ovariennes (4). L'ascite a un impact sur l'intégrité du mésothélium en déstabilisant les jonctions cellulaires (N-Cadhérine et Occludine ZO-1) et en permettant la rétraction des cellules mésothéliales par l'activation de Rac-1, la rendant ainsi plus fragile. Les processus d'implantation des sphéroïdes tumoraux ovariens sur la MEC, impliquant la fibrine, et le processus de clairance du mésothélium par ces derniers sont, entre autres, conditionnés par les interactions avec les intégrines αv et $\alpha 5$. Ces résultats montrent l'importance de l'ascite et de plusieurs protagonistes qu'elle contient sur leurs capacités à réguler la dissémination métastatique aboutissant à la formation d'un foyer secondaire qui engendre une carcinose péritonéale.

Perspectives :

Profils ascitiques ?

Nous avons montré le rôle essentiel de l'ascite dans les différentes étapes du processus de dissémination tumorale. Mais nous avons également mis évidence des différences entre les ascites, que ce soit par leur composition en fibrinogène ou par leur impact sur la prolifération ou le cycle cellulaire des cellules mésothéliales. Ces différences entre les ascites sont patientes dépendantes. En effet, nos ascites proviennent d'une ascitothèque du centre de ressource biologique (ovaressource) et du centre de lutte contre le cancer François Baclesse à Caen. La création de cette ascitothèque par nos collaborateurs s'est accompagnée de l'enregistrement d'un nombre important de données cliniques concernant les patientes dont sont issues les ascites. Notre idée est de pouvoir, à plus long terme, tracer un profil de chacune des ascites, tant par leur composition que par leur effet sur le comportement des cellules cancéreuse ou saines, et de pouvoir corréliser ces résultats aux données des bilans cliniques des patientes.

Ces profils pourraient permettre de créer des groupes d'ascites, classés selon différents critères comme par exemple leur « degrés d'agressivité » sur le mésothélium. Effectivement, les recherches sur le cancer tendent à évoluer vers des thérapies / traitements individualisés suite aux informations des caractéristiques du matériel tumoral du patient. Cependant, ceci pourrait aussi s'accompagner de caractéristiques moléculaires des ascites permettant ainsi de préciser le diagnostic et de prédire le pronostic.

Dans notre étude, l'établissement du profil des ascites pourrait commencer par un détail de leur composition moléculaire, cela pourrait se faire avec une approche globale protéomique. Cette étude nous a déjà permis de mettre en avant la présence de fibrinogène et de thrombine dans les ascites. Selon les ascites, des concentrations assez hétérogènes de fibrinogène ont été retrouvées. Ces différences entre les ascites est un premier élément qui pourrait servir à la classification des ascites. La présence de fibrine à la fois autour des sphéroïdes, aux abords du mésothélium ou en agrégats dans l'ascite a suscité notre intérêt.

Pour aller plus loin, notre idée serait de dépriver les ascites de fibrinogène et voir les conséquences sur la formation de sphéroïdes ainsi que sur leur adhérence et leur dispersion sur le mésothélium. Pour cela des techniques favorisant la polymérisation et la précipitation de la fibrine seraient judicieuses telles que l'augmentation des concentrations de calcium ou l'ajout thrombine et du facteur de coagulation FXIIIa. Des centrifugations permettraient ensuite de récupérer l'ascite (surnageant) dépourvu de fibrine. De plus, des techniques de purification par colonne d'affinité, comme déjà réalisée pour la purification combinée de la Fn et de la Vn à partir d'ascite au laboratoire [40], seraient imaginables. Effectivement, le fibrinogène et la

fibrine reconnaissent différentes protéines, ces affinités pourraient permettre d'isoler le fibrinogène ou la fibrine de l'ascite. Cependant, les interactions telles que fibrine-fibronectine ou fibrinogène-vitronectine ne sont pas spécifiques. De plus des interactions avec des anticoagulants comme fibrinogène-héparine ne sont pas non plus exclusives, le protocole de purification devrait être complexifié pour ne dépriver l'ascite uniquement du fibrinogène et de la fibrine et pas ses autres composants matriciels.

Intégrité du mésothélium ?

Pour mieux comprendre la mécanistique de la perte d'intégrité de la monocouche mésothéliale en réponse à l'ascite, une étude transcriptomique, par microarray (puce à ADN) des cellules mésothéliales confluentes en milieu de culture classique ou en contact avec différentes ascites est en cours. Cette approche globale permettra d'identifier des cibles susceptibles d'être impliquées dans les mécanismes de clairance et de pouvoir envisager notamment de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans le cancer de l'ovaire plusieurs études génomiques ont été réalisées sur les cellules cancéreuses après leur contact avec l'ascite. Dans le contexte de notre étude, cela serait un enrichissement scientifique de faire une étude génomique sur les cellules mésothéliales après leur contact avec l'ascite. De plus, cela viendrait compléter notre analyse transcriptomique. Concernant le rôle de protéines, notre étude a démontré l'augmentation des « membranes ruffles » ainsi que l'activation de Rac1 dans les cellules mésothéliales suite à l'ajout d'ascite. Cependant nous ne savons pas si seule l'activation de Rac1 est responsable de la déstabilisation du mésothélium. Effectivement, l'augmentation de l'activation de Rac1 implique un changement du cytosquelette d'actine qui pourrait entraîner une réorganisation des contacts focaux (actine / vinculine / taline / intégrines) et des jonctions cellulaires (actine / caténine / N-Cadhérine et actine / ZO-1/ occludine) résultant de la perte d'intégrité du mésothélium. Bloquer l'activation de Rac1 permettrait de voir si l'activation de cette protéine est la cause principale de la déstabilisation du mésothélium. Plus globalement des perspectives de décryptage de la signalisation sous-jacente à la déstabilisation du mésothélium serait pertinentes.

Optimisation du modèle 3D ?

L'une des originalités de ce programme de thèse est la mise au point et la conception d'un modèle tridimensionnel de co-culture en ascite. Au-delà du côté technique, ce modèle a pour

but de permettre la réponse à différentes questions scientifiques sur la dissémination métastatique des cellules cancéreuses ovariennes.

Un des objectifs et même « challenge » du modèle 3D est de pouvoir quantifier la transmigration des cellules des sphéroïdes cancéreux ovariens au travers du mésothélium. Pour cela l'utilisation de cellules marquées (fluorescentes) sera nécessaire.

Comme nos résultats et d'autres études l'ont montré, l'hétérogénéité cellulaire des sphéroïdes peut jouer un rôle sur le comportement des sphéroïdes, comme leur formation et compaction, leur adhérence et désagrégation sur le mésothélium ou encore sur la clairance des cellules mésothéliales. Il serait intéressant d'utiliser différents types de sphéroïdes dans le modèle pour pouvoir observer leur comportement dans le gel de fibrine et sur le mésothélium mais aussi leur capacité de transmigration.

Il serait aussi important de poursuivre et de complexifier le modèle *via* l'ajout de cellules endothéliales pour l'angiogenèse par exemple, mais aussi en rajoutant de la matrice extracellulaire comme, par exemple, un gel de collagène I avec des fibroblastes pour mimer le tissu conjonctif sous-mésothélial. Faire varier les éléments du modèle tout en les maîtrisant permettra de mettre évidence le rôle de chacun mais aussi les interrelations entre les cellules cancéreuses et les cellules saines ainsi que leur comportement cellulaire selon le type de microenvironnement rencontré.

Enfin, un des autres buts de l'optimisation de ce modèle est le criblage de molécules ou de peptides anti-cancéreux. Notre équipe a précédemment démontré l'importance des intégrines αv dans la formation des sphéroïdes et nos résultats ont mis en exergue le rôle des intégrines $\alpha 5$ et αv dans l'implantation et la désagrégation de sphéroïdes tumoraux ovariens sur le fibrinogène et dans la clairance des cellules du mésothélium. Cibler ces récepteurs qui sont impliqués dans plusieurs étapes des métastases est une piste thérapeutique qui semble intéressante.

De nombreuses molécules chimiques ou naturelles existent et sont utilisées comme traitements des cancers de l'ovaire cependant un certain nombre restent associés à des effets secondaires. Il serait donc judicieux de tester de nouvelles molécules thérapeutiques sur ce modèle pour pouvoir étudier de manière globale leur cytotoxicité sur les cellules saines et leur efficacité contre les cellules cancéreuses, tout en tenant compte du microenvironnement. Nous avons d'ailleurs déjà commencé à le faire par l'utilisation d'un analogue de la ribavirine [167].

Nous pensons que l'ensemble de nos résultats ainsi que nos perspectives que nous espérons pouvoir développer, peuvent contribuer à une meilleure compréhension de cette pathologie grave et insidieuse et ainsi permettre de poursuivre la mise en place de stratégies thérapeutiques complémentaires à celles existantes. C'est en tout cas notre souhait.

Références bibliographiques

1. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2010;46: 765–781. doi:10.1016/j.ejca.2009.12.014
2. Maringe C, Walters S, Butler J, Coleman MP, Hacker N, Hanna L, et al. Stage at diagnosis and ovarian cancer survival: evidence from the International Cancer Benchmarking Partnership. *Gynecol Oncol*. 2012;127: 75–82. doi:10.1016/j.ygyno.2012.06.033
3. Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*. 2015;385: 977–1010. doi:10.1016/S0140-6736(14)62038-9
4. Auersperg N. The origin of ovarian cancers--hypotheses and controversies. *Front Biosci Sch Ed*. 2013;5: 709–719.
5. Deng J, Wang L, Chen H, Hao J, Ni J, Chang L, et al. Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016;7: 55771–55788. doi:10.18632/oncotarget.9908
6. Oza AM, Castonguay V, Tsoref D, Diaz–Padilla I, Karakasis K, Mackay H, et al. Progression-free survival in advanced ovarian cancer: a Canadian review and expert panel perspective. *Curr Oncol*. 2011;18: S20–S27.
7. Banerjee S, Kaye SB. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013;19: 961–968. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2243
8. Karst AM, Drapkin R. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *J Oncol*. 2010;2010: 932371. doi:10.1155/2010/932371
9. Labidi-Galy SI. Altérations fonctionnelles et phénotypiques des cellules dendritiques plasmacytoïdes et des lymphocytes T régulateurs dans le cancer de l'ovaire. : 153.
10. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, et al. Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer*. 2014;135: 371–378.
11. Tokunaga H, Shimada M, Ishikawa M, Yaegashi N. TNM classification of gynaecological malignant tumours, eighth edition: changes between the seventh and eighth editions. *Jpn J Clin Oncol*. 2019;49: 311–320. doi:10.1093/jco/hyy206
12. Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92: 699–708. doi:10.1093/jnci/92.9.699
13. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010;10: 9–22. doi:10.1038/nrc2748
14. Kobayashi M, Sawada K, Kimura T. Potential of Integrin Inhibitors for Treating Ovarian Cancer: A Literature Review. *Cancers*. 2017;9. doi:10.3390/cancers9070083
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144: 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
16. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*. 2006;6: 909–923. doi:10.1038/nrc2012
17. Aunoble B, Sanches R, Didier E, Bignon YJ. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *Int J Oncol*. 2000;16: 567–576. doi:10.3892/ijo.16.3.567
18. Tashiro H, Miyazaki K, Okamura H, Iwai A, Fukumoto M. c-myc over-expression in human primary ovarian tumours: its relevance to tumour progression. *Int J Cancer*. 1992;50: 828–833. doi:10.1002/ijc.2910500528
19. Liu X, Gao Y, Lu Y, Zhang J, Li L, Yin F. Oncogenes associated with drug resistance in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141: 381–395. doi:10.1007/s00432-014-1765-5
20. Zhang Y, Cao L, Nguyen D, Lu H. TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. *Transl Cancer Res*. 2016;5: 650–663. doi:10.21037/tcr.2016.08.40
21. Natanzon Y, Goode EL, Cunningham JM. Epigenetics in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018;51: 160–169. doi:10.1016/j.semcancer.2017.08.003
22. Deltour S, Chopin V, Leprince D. Modifications épigénétiques et cancer. *médecine/sciences*. 2005;21: 405–411. doi:10.1051/medsci/2005214405

23. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet Lond Engl.* 1971;2: 163. doi:10.1016/s0140-6736(71)92335-x
24. Chiaffarino F, Pelucchi C, Parazzini F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, et al. Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2001;12: 337–341. doi:10.1023/a:1011128408146
25. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev.* 2001;22: 255–288. doi:10.1210/edrv.22.2.0422
26. Landen CN, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008;26: 995–1005. doi:10.1200/JCO.2006.07.9970
27. Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *JAMA.* 2001;285: 1460–1465. doi:10.1001/jama.285.11.1460
28. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP.* 2017;26: 55–62. doi:10.1097/CEJ.0000000000000217
29. Macciò A, Madeddu C. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine.* 2012;58: 133–147. doi:10.1016/j.cyto.2012.01.015
30. Cuneo MG, Szeto A, Schrepf A, Kinner EM, Schachner BI, Ahmed R, et al. Oxytocin in the tumor microenvironment is associated with lower inflammation and longer survival in advanced epithelial ovarian cancer patients. *Psychoneuroendocrinology.* 2019;106: 244–251. doi:10.1016/j.psyneuen.2019.04.007
31. Leroy-Dudal J, Kellouche S, Gauduchon P, Carreiras F. La micro-écologie des tumeurs épithéliales de l'ovaire. *Bull Cancer (Paris).* 2008;95: 829–839. doi:10.1684/bdc.2008.0674
32. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97: 4–27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001
33. Leroy-Dudal J, Kellouche S, Gauduchon P, Carreiras F. [Epithelial ovarian tumor microecology]. *Bull Cancer (Paris).* 2008;95: 829–839. doi:10.1684/bdc.2008.0674
34. Carreiras F, Thiébot B, Leroy-Dudal J, Maubant S, Breton M-F, Darbeida H. Involvement of alphavbeta 3 integrin and disruption of endothelial fibronectin network during the adhesion of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1 on the human umbilical vein cell extracellular matrix. *Int J Cancer.* 2002;99: 800–808. doi:10.1002/ijc.10433
35. Carreiras F, Denoux Y, Staedel C, Lehmann M, Sichel F, Gauduchon P. Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1996;62: 260–267. doi:10.1006/gyno.1996.0225
36. Cho A, Howell VM, Colvin EK. The Extracellular Matrix in Epithelial Ovarian Cancer – A Piece of a Puzzle. *Front Oncol.* 2015;5. doi:10.3389/fonc.2015.00245
37. Ahmed N, Riley C, Rice G, Quinn M. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22: 391–402. doi:10.1007/s10585-005-1262-y
38. Shen Y, Shen R, Ge L, Zhu Q, Li F. Fibrillar type I collagen matrices enhance metastasis/invasion of ovarian epithelial cancer via $\beta 1$ integrin and PTEN signals. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc.* 2012;22: 1316–1324. doi:10.1097/IGC.0b013e318263ef34
39. Cheon D-J, Tong Y, Sim M-S, Dering J, Berel D, Cui X, et al. A collagen-remodeling gene signature regulated by TGF- β signaling is associated with metastasis and poor survival in serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014;20: 711–723. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1256
40. Carduner L, Agniel R, Kellouche S, Picot CR, Blanc-Fournier C, Leroy-Dudal J, et al. Ovarian cancer ascites-derived vitronectin and fibronectin: combined purification, molecular features and effects on cell response. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830: 4885–4897. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.023
41. Akiyama SK. Integrins in cell adhesion and signaling. *Hum Cell.* 1996;9: 181–186.
42. Freire-de-Lima L. Sweet and sour: the impact of differential glycosylation in cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition. *Front Oncol.* 2014;4: 59. doi:10.3389/fonc.2014.00059
43. Wilhelm O, Hafter R, Coppentrath E, Pflanz MA, Schmitt M, Babic R, et al. Fibrin-fibronectin compounds in human ovarian tumor ascites and their possible relation to the tumor stroma. *Cancer Res.* 1988;48: 3507–3514.

44. Demeter A, Sziller I, Csapo Z, Olah J, Keszler G, Jeney A, et al. Molecular prognostic markers in recurrent and in non-recurrent epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2005;25: 2885–2889.
45. Franke FE, Von Georgi R, Zygmunt M, Münstedt K. Association between fibronectin expression and prognosis in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 2003;23: 4261–4267.
46. Carreiras F, Cruet S, Staedel C, Sichel F, Gauduchon P. Human ovarian adenocarcinoma cells synthesize vitronectin and use It to organize their adhesion. *Gynecol Oncol.* 1999;72: 312–322. doi:10.1006/gyno.1998.5262
47. Vitronectin and its receptors - PubMed. [cited 30 Nov 2020]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7694604/>
48. Expression and localization of alpha v integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma - PubMed. [cited 30 Nov 2020]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8751559/>
49. Ricciardelli C, Rodgers RJ. Extracellular matrix of ovarian tumors. *Semin Reprod Med.* 2006;24: 270–282. doi:10.1055/s-2006-948556
50. Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood.* 2013;121: 1712–1719. doi:10.1182/blood-2012-09-306639
51. Luo Y, Kim HS, Kim M, Lee M, Song YS. Elevated plasma fibrinogen levels and prognosis of epithelial ovarian cancer: a cohort study and meta-analysis. *J Gynecol Oncol.* 2017;28. doi:10.3802/jgo.2017.28.e36
52. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4: a004903. doi:10.1101/cshperspect.a004903
53. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions - PubMed. [cited 7 Dec 2020]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21107430/>
54. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10: 21–33. doi:10.1038/nrm2593
55. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37: 13–25. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.030
56. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res.* 2017;358: 78–85. doi:10.1016/j.yexcr.2017.04.006
57. Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ. E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826: 23–31. doi:10.1016/j.bbcan.2012.03.002
58. Bruner HC, Derksen PWB. Loss of E-Cadherin-Dependent Cell-Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10. doi:10.1101/cshperspect.a029330
59. Zahraoui A. Les jonctions serrées : Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires. *médecine/sciences.* 2004;20: 580–585. doi:10.1051/medsci/2004205580
60. Rodrigues J, Heinrich MA, Teixeira LM, Prakash J. 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor–Stroma Interactions. *Trends Cancer.* 2020;0. doi:10.1016/j.trecan.2020.10.009
61. Qian L-W, Mizumoto K, Maehara N, Ohuchida K, Inadome N, Saimura M, et al. Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production. *Cancer Lett.* 2003;190: 105–112.
62. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* 2012;487: 505–509. doi:10.1038/nature11249
63. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2009;9: 108–122. doi:10.1038/nrc2544
64. Provot S. Contrôle de la croissance et de la dissémination tumorales par le microenvironnement - Certitudes et hypothèses émergentes. *médecine/sciences.* 2014;30: 366–371. doi:10.1051/medsci/20143004008
65. Buache É, Rio M-C. Le stroma tumoral : Un terreau fertile pour la cellule cancéreuse. *MS Médecine Sci ISSN Pap 0767-0974 ISSN Numér 1958-5381 2014 Vol 30 N° 4 P 385-390.* 2014 [cited 8 Jul 2019]. doi:10.1051/medsci/20143004011
66. Albregues J, Meneguzzi G, Gaggioli C. L'invasion des cellules tumorales: Quand les fibroblastes s'en mêlent. *médecine/sciences.* 2014;30: 391–397. doi:10.1051/medsci/20143004012

67. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2010;17: 135–147. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.041
68. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*. 2014;6: 1670–1690. doi:10.3390/cancers6031670
69. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122: 787–795. doi:10.1172/JCI59643
70. Hao N-B, Lü M-H, Fan Y-H, Cao Y-L, Zhang Z-R, Yang S-M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012: 948098. doi:10.1155/2012/948098
71. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011;17: 1498–1503. doi:10.1038/nm.2492
72. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831: 1533–1541. doi:10.1016/j.bbalip.2013.02.010
73. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26: 489–502. doi:10.1007/s10555-007-9094-7
74. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121: 335–348. doi:10.1016/j.cell.2005.02.034
75. Spannuth WA, Sood AK, Coleman RL. Angiogenesis as a strategic target for ovarian cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008;5: 194–204. doi:10.1038/ncponc1051
76. Jain RK, Carmeliet P. SnapShot: Tumor angiogenesis. *Cell*. 2012;149: 1408-1408.e1. doi:10.1016/j.cell.2012.05.025
77. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. [cited 30 Nov 2020]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3572232/>
78. Harter P, Sehoul J, Lorusso D, Reuss A, Vergote I, Marth C, et al. A Randomized Trial of Lymphadenectomy in Patients with Advanced Ovarian Neoplasms. *N Engl J Med*. 2019;380: 822–832. doi:10.1056/NEJMoa1808424
79. Kipps E, Tan DSP, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer*. 2013;13: 273–282. doi:10.1038/nrc3432
80. Partridge EE, Barnes MN. Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J Clin*. 1999;49: 297–320. doi:10.3322/canjclin.49.5.297
81. Shen-Gunther J, Mannel RS. Ascites as a Predictor of Ovarian Malignancy. *Gynecol Oncol*. 2002;87: 77–83. doi:10.1006/gyno.2002.6800
82. Graves LE, Ariztia EV, Navari JR, Matzel HJ, Stack MS, Fishman DA. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res*. 2004;64: 7045–7049. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1800
83. Sangisetty SL. Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World J Gastrointest Surg*. 2012;4: 87. doi:10.4240/wjgs.v4.i4.87
84. Feki A, Berardi P, Bellingan G, Major A, Krause K-H, Petignat P, et al. Dissemination of intraperitoneal ovarian cancer: Discussion of mechanisms and demonstration of lymphatic spreading in ovarian cancer model. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009;72: 1–9. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.12.003
85. Carrier P, Jacques J, Debette-Gratien M, Legros R, Sarabi M, Vidal E, et al. L'ascite non liée à la cirrhose : physiopathologie, diagnostic et étiologies. *Rev Médecine Interne*. 2014;35: 365–371. doi:10.1016/j.revmed.2013.12.001
86. Ahmed N, Stenvers KL. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol*. 2013;3: 256. doi:10.3389/fonc.2013.00256
87. Mesiano S, Ferrara N, Jaffe RB. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer. *Am J Pathol*. 1998;153: 1249–1256. doi:10.1016/S0002-9440(10)65669-6
88. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. - PubMed - NCBI. [cited 9 Jul 2019]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24093089>

89. 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. doi:10.1016/j.canlet.2012.07.020
90. 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. doi:10.1007/s10555-013-9456-2
91. Kim S, Kim B, Song YS. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci.* 2016;107: 1173–1178. doi:10.1111/cas.12987
92. Khaider NG, Lane D, Matte I, Rancourt C, Piché A. Targeted ovarian cancer treatment: the TRAILs of resistance. : 18.
93. Bureson KM, Casey RC, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Skubitz APN. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol Oncol.* 2004;93: 170–181. doi:10.1016/j.ygyno.2003.12.034
94. Aziz MAAE, Agarwal K, Dasari S, Mitra AAK. Productive Cross-Talk with the Microenvironment: A Critical Step in Ovarian Cancer Metastasis. *Cancers.* 2019;11. doi:10.3390/cancers11101608
95. Gortzak-Uzan L, Ignatchenko A, Evangelou AI, Agochiya M, Brown KA, St Onge P, et al. A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res.* 2008;7: 339–351. doi:10.1021/pr0703223
96. Kellouche S, Fernandes J, Leroy-Dudal J, Gallet O, Dutoit S, Poulain L, et al. Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin. *Tumor Biol.* 2010;31: 129–139. doi:10.1007/s13277-010-0017-9
97. Schneider G, Suszynska M, Kakar S, Ratajczak MZ. Vitronectin in the Ascites of Human Ovarian Carcinoma Acts as a Potent Chemoattractant for Ovarian Carcinoma: Implication for Metastasis by Cancer Stem Cells. *J Cancer Stem Cell Res.* 2016;4: 1. doi:10.14343/JCSCR.2016.4e1005
98. Schneider G, Bryndza E, Poniewierska-Baran A, Serwin K, Suszynska M, Sellers ZP, et al. Evidence that vitronectin is a potent migration-enhancing factor for cancer cells chaperoned by fibrinogen: a novel view of the metastasis of cancer cells to low-fibrinogen lymphatics and body cavities. *Oncotarget.* 2016;7. doi:10.18632/oncotarget.12003
99. Lane D, Matte I, Laplante C, Garde-Granger P, Carignan A, Bessette P, et al. CCL18 from ascites promotes ovarian cancer cell migration through proline-rich tyrosine kinase 2 signaling. *Mol Cancer.* 2016;15. doi:10.1186/s12943-016-0542-2
100. Pease JC, Brewer M, Tirnauer JS. Spontaneous spheroid budding from monolayers: a potential contribution to ovarian cancer dissemination. *Biol Open.* 2012;1: 622–628. doi:10.1242/bio.2012653
101. Carduner L, Leroy-Dudal J, Picot CR, Gallet O, Carreiras F, Kellouche S. Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal spectrum in ovarian cancer cells: enhancement of their invasive behavior partly dependant on α v integrins. *Clin Exp Metastasis.* 2014;31: 675–688. doi:10.1007/s10585-014-9658-1
102. Puiffe M-L, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, Tonin PN, et al. Characterization of Ovarian Cancer Ascites on Cell Invasion, Proliferation, Spheroid Formation, Gene Expression in an In Vitro Model of Epithelial Ovarian Cancer. *Neoplasia.* 2007;9: 820-IN8. doi:10.1593/neo.07472
103. Patel IS, Madan P, Getsios S, Bertrand MA, MacCalman CD. Cadherin switching in ovarian cancer progression. *Int J Cancer.* 2003;106: 172–177. doi:10.1002/ijc.11086
104. Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol.* 2007;213: 581–588. doi:10.1002/jcp.21240
105. Carduner L, Picot CR, Leroy-Dudal J, Blay L, Kellouche S, Carreiras F. Cell cycle arrest or survival signaling through α v integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Exp Cell Res.* 2014;320: 329–342. doi:10.1016/j.yexcr.2013.11.011
106. Lane D, Goncharenko-Khaider N, Rancourt C, Piché A. Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through α v β 5 integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation. *Oncogene.* 2010;29: 3519–3531. doi:10.1038/onc.2010.107
107. Lane D, Matte I, Rancourt C, Piché A. Osteoprotegerin (OPG) protects ovarian cancer cells from TRAIL-induced apoptosis but does not contribute to malignant ascites-mediated attenuation of TRAIL-induced apoptosis. *J Ovarian Res.* 2012;5: 34. doi:10.1186/1757-2215-5-34
108. Sher I, Adham SA, Petrik J, Coomber BL. Autocrine VEGF-A/KDR loop protects epithelial ovarian carcinoma cells from anoikis. *Int J Cancer.* 2009;124: 553–561. doi:10.1002/ijc.23963

109. Goncharenko-Khaider N, Matte I, Lane D, Rancourt C, Piché A. Ovarian cancer ascites increase Mcl-1 expression in tumor cells through ERK1/2-Elk-1 signaling to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer*. 2012;11: 84. doi:10.1186/1476-4598-11-84
110. Kang H-G, Jenabi JM, Zhang J, Keshelava N, Shimada H, May WA, et al. E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer Res*. 2007;67: 3094–3105. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3259
111. Correa RJM, Peart T, Valdes YR, DiMattia GE, Shepherd TG. Modulation of AKT activity is associated with reversible dormancy in ascites-derived epithelial ovarian cancer spheroids. *Carcinogenesis*. 2012;33: 49–58. doi:10.1093/carcin/bgr241
112. Sodek KL, Murphy KJ, Brown TJ, Ringuette MJ. Cell-cell and cell-matrix dynamics in intraperitoneal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31: 397–414. doi:10.1007/s10555-012-9351-2
113. Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1997;57: 2388–2393.
114. Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Piché A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. : 15.
115. Lane D, Matte I, Rancourt C, Piché A. The prosurvival activity of ascites against TRAIL is associated with a shorter disease-free interval in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2010;3: 1. doi:10.1186/1757-2215-3-1
116. Pogge von Strandmann E, Reinartz S, Wager U, Müller R. Tumor–Host Cell Interactions in Ovarian Cancer: Pathways to Therapy Failure. *Trends Cancer*. 2017;3: 137–148. doi:10.1016/j.trecan.2016.12.005
117. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474: 609–615. doi:10.1038/nature10166
118. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges - PubMed. [cited 8 Dec 2020]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25556614/>
119. Cruet S, Carreiras F, Staedel C, Gauduchon P. Molécules d'adhérence et protéases dans les cancers épithéliaux de l'ovaire. *médecine/sciences*. 1999;15: 645. doi:10.4267/10608/1403
120. Casey RC, Bureson KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Ruff LE, et al. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am J Pathol*. 2001;159: 2071–2080. doi:10.1016/s0002-9440(10)63058-1
121. Gong L, Zheng Y, Liu S, Peng Z. Fibronectin Regulates the Dynamic Formation of Ovarian Cancer Multicellular Aggregates and the Expression of Integrin Receptors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 [cited 6 Nov 2018]. doi:10.22034/APJCP.2018.19.9.2493
122. Braicu E-I, Sehouli J, Richter R, Pietzner K, Denkert C, Fotopoulou C. Role of histological type on surgical outcome and survival following radical primary tumour debulking of epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancers. *Br J Cancer*. 2011;105: 1818–1824. doi:10.1038/bjc.2011.455
123. Yung S, Li FK, Chan TM. Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial*. 2006;26: 162–173.
124. Fuller ES, Howell VM. Culture Models to Define Key Mediators of Cancer Matrix Remodeling. *Front Oncol*. 2014;4. doi:10.3389/fonc.2014.00057
125. Witz CA, Montoya-Rodriguez IA, Cho S, Centonze VE, Bonewald LF, Schenken RS. Composition of the extracellular matrix of the peritoneum. *J Soc Gynecol Investig*. 2001;8: 299–304. doi:10.1016/s1071-5576(01)00122-8
126. Heyman L, Kellouche S, Fernandes J, Dutoit S, Poulain L, Carreiras F. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2008;29: 231–244. doi:10.1159/000152941
127. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36: 9–16. doi:10.1016/S1357-2725(03)00242-5
128. Strobel T, Swanson L, Cannistra SA. In Vivo Inhibition of CD44 Limits Intra-Abdominal Spread of a Human Ovarian Cancer Xenograft in Nude Mice: A Novel Role for CD44 in the Process of Peritoneal Implantation. *Cancer Res*. 1997;57: 1228–1232.
129. 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: 216–225. doi:10.1006/gyno.1995.1214

130. Nagy JA, Meyers MS, Masse EM, Herzberg KT, Dvorak HF. Pathogenesis of ascites tumor growth: fibrinogen influx and fibrin accumulation in tissues lining the peritoneal cavity. *Cancer Res.* 1995;55: 369–375.
131. Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT, Meyers MS, Yeo KT, Yeo TK, et al. Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res.* 1995;55: 360–368.
132. Bursleson KM, Boente MP, Pambuccian SE, Skubitz APN. Disaggregation and invasion of ovarian carcinoma ascites spheroids. *J Transl Med.* 2006;4: 6. doi:10.1186/1479-5876-4-6
133. Kenny HA, Chiang C-Y, White EA, Schryver EM, Habis M, Romero IL, et al. Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *J Clin Invest.* 2014;124: 4614–4628. doi:10.1172/JCI174778
134. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, et al. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* 2008;68: 2329–2339. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5167
135. Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest.* 2008;118: 1367–1379. doi:10.1172/JCI33775
136. Strobel T, Cannistra SA. β 1-Integrins Partly Mediate Binding of Ovarian Cancer Cells to Peritoneal Mesothelium in Vitro. *Gynecol Oncol.* 1999;73: 362–367. doi:10.1006/gyno.1999.5388
137. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Korybalska K, Dworacki G, Jörres A, Witowski J. Senescent Peritoneal Mesothelial Cells Promote Ovarian Cancer Cell Adhesion. *Am J Pathol.* 2009;174: 1230–1240. doi:10.2353/ajpath.2009.080613
138. Mikula-Pietrasik J, Uruski P, Sosińska P, Maksin K, Piotrowska-Kempisty H, Kucińska M, et al. Senescent peritoneal mesothelium creates a niche for ovarian cancer metastases. *Cell Death Dis.* 2016;7: e2565–e2565. doi:10.1038/cddis.2016.417
139. Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, DeFranzo B, Kim Y, Ottensmeier C. Binding of Ovarian Cancer Cells to Peritoneal Mesothelium in Vitro Is Partly Mediated by CD44H. *Cancer Res.* 1993;53: 3830–3838.
140. Yeo TK, Nagy JA, Yeo KT, Dvorak HF, Toole BP. Increased hyaluronan at sites of attachment to mesentery by CD44-positive mouse ovarian and breast tumor cells. *Am J Pathol.* 1996;148: 1733–1740.
141. Usui A, Ko SY, Barengo N, Naora H. P-cadherin Promotes Ovarian Cancer Dissemination Through Tumor Cell Aggregation and Tumor-peritoneum Interactions. *Mol Cancer Res MCR.* 2014;12: 504–513. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0489
142. Iwanicki MP, Davidowitz RA, Ng MR, Besser A, Muranen T, Merritt M, et al. Ovarian Cancer Spheroids Use Myosin-Generated Force to Clear the Mesothelium. *Cancer Discov.* 2011;1: 144–157. doi:10.1158/2159-8274.CD-11-0010
143. Kenny HA, Nieman KM, Mitra AK, Lengyel E. The first line of intra-abdominal metastatic attack: breaching the mesothelial cell layer. *Cancer Discov.* 2011;1: 100–102. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0117
144. Davidowitz RA, Iwanicki MP, Brugge JS. In vitro Mesothelial Clearance Assay that Models the Early Steps of Ovarian Cancer Metastasis. *J Vis Exp.* 2012 [cited 6 Nov 2018]. doi:10.3791/3888
145. Pakula M, Mikula-Pietrasik J, Witucka A, Kostka-Jeziorny K, Uruski P, Moszyński R, et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Initiated by Malignant Ascites Underlies the Transmesothelial Invasion of Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20: 137. doi:10.3390/ijms20010137
146. Leroy-Dudal J, Heyman L, Gauduchon P, Carreiras F. Adhesion of human ovarian adenocarcinoma IGROV1 cells to endothelial cells is partly mediated by the α v integrins-vitronectin adhesive system and induces an alteration of endothelial integrity. *Cell Biol Int.* 2005;29: 482–488. doi:10.1016/j.cellbi.2005.01.008
147. Leroy-Dudal J, Demeilliers C, Gallet O, Pauthe E, Dutoit S, Agniel R, et al. Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves α v integrins and the participation of MMP2. *Int J Cancer.* 2005;114: 531–543. doi:10.1002/ijc.20778
148. Matsuoka A, Mizumoto Y, Ono M, Kagami K, Obata T, Terakawa J, et al. Novel strategy of ovarian cancer implantation: Pre-invasive growth of fibrin-anchored cells with neovascularization. *Cancer Sci.* 2019. doi:10.1111/cas.14098
149. Bénard J, Da Silva J, De Blois MC, Boyer P, Duillard P, Chiric E, et al. Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res.* 1985;45: 4970–4979.
150. Poulouin L, Gallet O, Rouahi M, Imhoff JM. Plasma fibronectin: three steps to purification and stability. *Protein Expr Purif.* 1999;17: 146–152. doi:10.1006/prep.1999.1103

151. Paul-Gilloteaux P, Heiligenstein X, Belle M, Domart M-C, Larijani B, Collinson L, et al. eC-CLEM: flexible multidimensional registration software for correlative microscopies. *Nat Methods*. 2017;14: 102–103. doi:10.1038/nmeth.4170
152. Andreiuk B, Reisch A, Lindecker M, Follain G, Peyri ras N, Goetz JG, et al. Fluorescent Polymer Nanoparticles for Cell Barcoding In Vitro and In Vivo. *Small*. 2017;13. doi:10.1002/sml.201701582
153. Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010;10: 753–768. doi:10.2174/187152010794728639
154. Shahid S, Iman A, Matti U, Rachid K, Assaf A, Eveno C, et al. Fibrin Deposit on the Peritoneal Surface Serves as a Niche for Cancer Expansion in Carcinomatosis Patients. *Neoplasia* N Y N. 2019;21: 1091–1101. doi:10.1016/j.neo.2019.08.006
155. Pretorius E, Vieira WA, Oberholzer HM, Auer REJ. Comparative Scanning Electron Microscopy of Platelets and Fibrin Networks of Human and Different Animals. *Int J Morphol*. 2009;27: 69–76. doi:10.4067/S0717-95022009000100013
156. Lekka M, Laidler P. Applicability of AFM in cancer detection. *Nat Nanotechnol*. 2009;4: 72; author reply 72-73. doi:10.1038/nnano.2009.004
157. Lekka M. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *Bionanoscience*. 2016;6: 65–80. doi:10.1007/s12668-016-0191-3
158. Beaufort CM, Helmijr JCA, Piskorz AM, Hoogstraat M, Ruigrok-Ritstier K, Besselink N, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PloS One*. 2014;9: e103988. doi:10.1371/journal.pone.0103988
159. Caine GJ, Stonelake PS, Lip GYH, Kehoe ST. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia* N Y N. 2002;4: 465–473. doi:10.1038/sj.neo.7900263
160. Tumor Hypoxia, the Physiological Link between Trousseau's Syndrome (Carcinoma-induced Coagulopathy) and Metastasis | *Cancer Research*. [cited 14 Aug 2019]. Available: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/61/3/795>
161. Podor TJ, Campbell S, Chindemi P, Foulon DM, Farrell DH, Walton PD, et al. Incorporation of vitronectin into fibrin clots. Evidence for a binding interaction between vitronectin and gamma A/gamma' fibrinogen. *J Biol Chem*. 2002;277: 7520–7528. doi:10.1074/jbc.M109677200
162. Nguyen Q-D, De Wever O, Bruyneel E, Hendrix A, Xie W-Z, Lombet A, et al. Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment. *Oncogene*. 2005;24: 8240–8251. doi:10.1038/sj.onc.1208990
163. Lawson DA, Kessenbrock K, Davis RT, Pervolarakis N, Werb Z. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat Cell Biol*. 2018;20: 1349–1360. doi:10.1038/s41556-018-0236-7
164. Klymenko Y, Johnson J, Bos B, Lombard R, Campbell L, Loughran E, et al. Heterogeneous Cadherin Expression and Multicellular Aggregate Dynamics in Ovarian Cancer Dissemination. *Neoplasia*. 2017;19: 549–563. doi:10.1016/j.neo.2017.04.002
165. Matte I, Legault CM, Garde-Granger P, Laplante C, Bessette P, Rancourt C, et al. Mesothelial cells interact with tumor cells for the formation of ovarian cancer multicellular spheroids in peritoneal effusions. *Clin Exp Metastasis*. 2016;33: 839–852. doi:10.1007/s10585-016-9821-y
166. Gao Q, Yang Z, Xu S, Li X, Yang X, Jin P, et al. Heterotypic CAF-tumor spheroids promote early peritoneal metastasis of ovarian cancer. *J Exp Med*. 2019;216: 688–703. doi:10.1084/jem.20180765
167. Wambecke A, Laurent-Issartel C, Leroy-Dudal J, Giffard F, Cosson F, Lubin-Germain N, et al. Evaluation of the potential of a new ribavirin analog impairing the dissemination of ovarian cancer cells. *PLoS ONE*. 2019;14: e0225860. doi:10.1371/journal.pone.0225860
168. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012;196: 395–406. doi:10.1083/jcb.201102147
169. Gao Y, Foster R, Yang X, Feng Y, Shen JK, Mankin HJ, et al. Up-regulation of CD44 in the development of metastasis, recurrence and drug resistance of ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015;6: 9313–9326. doi:10.18632/oncotarget.3220
170. Burleson KM, Hansen LK, Skubitz APN. Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers. *Clin Exp Metastasis*. 2004;21: 685–697.
171. Mikula-Pietrasik J, Sosińska P, Książek K. Resveratrol inhibits ovarian cancer cell adhesion to peritoneal mesothelium in vitro by modulating the production of $\alpha 5\beta 1$ integrins and hyaluronic acid. *Gynecol Oncol*. 2014;134: 624–630. doi:10.1016/j.ygyno.2014.06.022

172. Mikula-Pietrasik J, Uruski P, Szubert S, Szperek D, Sajdak S, Tykarski A, et al. Malignant ascites determine the transmesothelial invasion of ovarian cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;92: 6–13. doi:10.1016/j.biocel.2017.09.002
173. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 2010;463: 485–492. doi:10.1038/nature08908
174. Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773: 642–652. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.001
175. Pachenari M, Seyedpour SM, Janmaleki M, Babazadeh Shayan S, Taranejoo S, Hosseinkhani H. Mechanical properties of cancer cytoskeleton depend on actin filaments to microtubules content: investigating different grades of colon cancer cell lines. *J Biomech.* 2014;47: 373–379. doi:10.1016/j.jbiomech.2013.11.020
176. Sikora E, Mosieniak G, Sliwinska MA. Morphological and Functional Characteristic of Senescent Cancer Cells. *Curr Drug Targets.* 2016;17: 377–387. doi:10.2174/1389450116666151019094724
177. Mikula-Pietrasik J, Uruski P, Pakula M, Maksin K, Szubert S, Woźniak A, et al. Oxidative stress contributes to hepatocyte growth factor-dependent pro-senescence activity of ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 2017;110: 270–279. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.015
178. Davidowitz RA, Selfors LM, Iwanicki MP, Elias KM, Karst A, Piao H, et al. Mesenchymal gene program-expressing ovarian cancer spheroids exhibit enhanced mesothelial clearance. *J Clin Invest.* 2014;124: 2611–2625. doi:10.1172/JCI69815
179. Cross SE, Jin Y-S, Tondre J, Wong R, Rao J, Gimzewski JK. AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. *Nanotechnology.* 2008;19: 384003. doi:10.1088/0957-4484/19/38/384003
180. Xu W, Mezencev R, Kim B, Wang L, McDonald J, Sulchek T. Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *Batra SK, editor. PLoS ONE.* 2012;7: e46609. doi:10.1371/journal.pone.0046609
181. Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater.* 2007;3: 413–438. doi:10.1016/j.actbio.2007.04.002
182. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6: 392–401. doi:10.1038/nrc1877
183. Westerlund A, Hujanen E, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T. Fibroblasts stimulate human ovarian cancer cell invasion and expression of 72-kDa gelatinase A (MMP-2). *Gynecol Oncol.* 1997;67: 76–82. doi:10.1006/gyno.1997.4808
184. Peters PN, Schryver EM, Lengyel E, Kenny H. Modeling the Early Steps of Ovarian Cancer Dissemination in an Organotypic Culture of the Human Peritoneal Cavity. *J Vis Exp JoVE.* 2015; e53541. doi:10.3791/53541
185. Rathinam R, Berrier A, Alahari SK. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression. *Front Biosci Landmark Ed.* 2011;16: 2561–2571. doi:10.2741/3872
186. Chi X, Wang S, Huang Y, Stamnes M, Chen J-L. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int J Mol Sci.* 2013;14: 7089–7108. doi:10.3390/ijms14047089
187. Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* 2005;96: 379–386. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00062.x
188. Ruiz-Lafuente N, Minguela A, Parrado A. DOCK9 induces membrane ruffles and Rac1 activity in cancer HeLa epithelial cells. *Biochem Biophys Res.* 2018;14: 178–181. doi:10.1016/j.bbrep.2018.05.004
189. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28: 65–76. doi:10.1007/s10555-008-9170-7
190. Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YOT, Matsuda M. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell.* 2004;15: 1003–1010. doi:10.1091/mbc.e03-08-0609
191. Spindler V, Schlegel N, Waschke J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc Res.* 2010;87: 243–253. doi:10.1093/cvr/cvq086
192. Mierke CT. Cancer cells regulate biomechanical properties of human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2011;286: 40025–40037. doi:10.1074/jbc.M111.256172
193. Diebold I, Djordjevic T, Hess J, Görlach A. Rac-1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell proliferation by upregulation of plasminogen activator inhibitor-1: role of NFkappaB-dependent hypoxia-inducible factor-1alpha transcription. *Thromb Haemost.* 2008;100: 1021–1028.
194. F W, A C, Jf D, Ra K. Fibrinogen Activates PAK1/Cofilin Signaling Pathway to Protect Endothelial Barrier Integrity. In: *Shock (Augusta, Ga.) [Internet]. Shock; 18 May 2020 [cited 28 Sep 2020].* doi:10.1097/SHK.0000000000001564

195. Hogg SJ, Evans JJ, Sykes PH, Chitcholtan K. A method to investigate the anti-metabolic activity of anti-cancer agents on ovarian cancer cells cultured in a 96-well high throughput format. *J Ovarian Res.* 2015;8. doi:10.1186/s13048-015-0172-0
196. Loessner D, Rockstroh A, Shokohmand A, Holzapfel BM, Wagner F, Baldwin J, et al. A 3D tumor microenvironment regulates cell proliferation, peritoneal growth and expression patterns. *Biomaterials.* 2018;190–191: 63–75. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.10.014
197. Lawrenson K, Notaridou M, Lee N, Benjamin E, Jacobs IJ, Jones C, et al. In vitro three-dimensional modeling of fallopian tube secretory epithelial cells. *BMC Cell Biol.* 2013;14: 43. doi:10.1186/1471-2121-14-43
198. Lengyel E, Burdette JE, Kenny HA, Matei D, Pilrose J, Haluska P, et al. Epithelial ovarian cancer experimental models. *Oncogene.* 2014;33: 3619–3633. doi:10.1038/onc.2013.321
199. Barbolina MV, Adley BP, Ariztia EV, Liu Y, Stack MS. Microenvironmental regulation of membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in ovarian carcinoma cells via collagen-induced EGR1 expression. *J Biol Chem.* 2007;282: 4924–4931. doi:10.1074/jbc.M608428200
200. Loessner D, Stok KS, Lutolf MP, Huttmacher DW, Clements JA, Rizzi SC. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials.* 2010;31: 8494–8506. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.064
201. Klymenko Y, Kim O, Loughran E, Yang J, Lombard R, Alber M, et al. Cadherin composition and multicellular aggregate invasion in organotypic models of epithelial ovarian cancer intraperitoneal metastasis. *Oncogene.* 2017;36: 5840–5851. doi:10.1038/onc.2017.171
202. van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936: 426–437. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03526.x
203. Ladanyi A, Mukherjee A, Kenny HA, Johnson A, Mitra AK, Sundaesan S, et al. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene.* 2018;37: 2285–2301. doi:10.1038/s41388-017-0093-z
204. Yang J, Zaman MM, Vlasakov I, Roy R, Huang L, Martin CR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer chemoresistance. *Sci Rep.* 2019;9: 13316. doi:10.1038/s41598-019-49649-1
205. Kenny HA, Krausz T, Yamada SD, Lengyel E. Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. *Int J Cancer.* 2007;121: 1463–1472. doi:10.1002/ijc.22874

Annexes

Communications par affiches :

Annexe 1 : “Ascites, the tumoral environment of ovarian cancer, impact the integrity of mesothelium during peritoneal implantation of ovarian carcinoma.”

Annexe 2 : “Peritoneal implantation of ovarian carcinoma in ascites conditions: *In vitro* 3D (three-dimensional) model of co-culture.”

Communications orales (abstracts) :

Annexe 3 : “Ascites, the tumoral environment of ovarian cancer, impacts the integrity of mesothelium during peritoneal implantation of ovarian carcinoma.”

Annexe 4 : “Etude de l'implantation péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens dans un modèle *in vitro* de co-culture tridimensionnel en ascites.”

Publications (ACL) :

Annexe 5 : “Ascites microenvironment conditions the peritoneal pre-metastatic niche to promote the implantation of ovarian tumor spheroids: involvement of fibrinogen/fibrin and αV and $\alpha 5\beta 1$ integrin family. ”

Annexe 6 : “Evaluation of the potential of a new ribavirin analog impairing the dissemination of ovarian cancer cells.”

Annexe 7 : “A biomimetic model of 3D fluid extracellular macromolecular crowding microenvironment fine-tunes ovarian cancer cells dissemination phenotype.”

Annexe 1



ANNUAL MEETING OF THE FRENCH SOCIETY FOR EXTRACELLULAR MATRIX BIOLOGY
May 15-17, 2019 REIMS



Ascites, the tumoral environment of ovarian cancer, impacts the integrity of mesothelium during peritoneal implantation of ovarian carcinoma

C. Laurent-Issartel¹, R. Agniel¹, F. Giffard¹, A. Lambert², J. Leroy-Dudal¹, E. Da Silva Cruz³, F. Carreiras³, S. Kellouche³



¹ERRMECE Equipe de Recherche sur les Réseaux Extracellulaires Cellulaires (ERREC), Groupe Matrices Extracellulaires et Physio-pathologie (MECUP), Institut des Matériaux, Maison Internationale de la Recherche, LIFE Sciences et Techniques, Université de Cergy-Pontoise, FRANCE
²Inserm U1086 « ANTICOP », Unité Biologie et Thérapie Innovantes des Cancers Localement Aggressifs (BioTICIA) Centre de ressources cancer de Fovair, Centre F. Badier, Université de Caen Normandie, FRANCE
³Laboratoire de Biométrie et Pathologies (UMR CNRS 7021), Université de Strasbourg, France
Correspondence to: Frank.laurent-issartel@ucp.fr / s.kellouche@ucp.fr

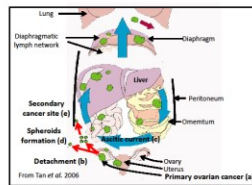


Introduction

Ovarian cancer is the most lethal gynecologic cancer : at least one-third of patients with epithelial ovarian cancer (OC) present ascites at diagnosis and almost all have ascites at recurrence¹ especially because of the propensity of the ovarian cancer cells to spread in the abdominal cavity and to develop chemoresistance.

Ovarian cancer dissemination

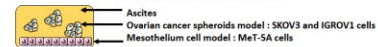
- Primary cancer arise from ovarian surface epithelium (a).
- Cancer cells can exfoliate and disseminate locally (b).
- This process leads to **ascitic fluid accumulation** (c).
- Within ascites cancer cells float as aggregated cells, so-called **spheroids** (d).
- Adhesion of floating cells and spheroids onto the **mesothelium** that lines the peritoneal cavity leads to metastasis formation (e).



The aim of this study

- To study the implantation of ovarian tumor spheroids on the mesothelium and transmesothelial migration
- To understand the effect of ascites and ECM, more particularly fibrinogen, on spheroids implantation

In vitro co-culture model



Method

Effect of ascites on the mesothelium

Ascites

Ascites were collected from patient with ovarian cancer (Centre de Lutte Contre le Cancer François Bacresse, Caen)

Mesothelial cell integrity	Mesothelial cell cytoskeleton	Mesothelial cell ECM

Ascites leads destabilization of the integrity of the mesothelial monolayer with modification of cell-cell junctions, disruption of the actin cytoskeleton and loss of cell anchorage

Spheroids

Spheroids were formed by the Hanging drop technique

Fibrinogen concentration in ascites and fibrin network

ELISA (Fibrinogen)

Cytotoxicity of ascites on mesothelial cells

L2H1 Cytotoxicity Assay

Fibrinogen in vitro & in vivo

Co-culture of mesothelial cells & spheroids

Ascites & Clearance

Fibrinogen / DAPI

Presence of fibrinogen on the surface of spheroids in ascites conditions

Spheroids from patient's ascites

Ovarian cancer xenograft mouse on peritoneum

5h Fibrinogen / DAPI

Spheroids are included in fibrin networks and ascites promotes disaggregation of spheroids on the mesothelial monolayer

DAPI Mesothelium (Cy 3) MERGE

Clearance 6h of incubation

24h of incubation

Ascites favors the clearance of the mesothelial monolayer by spheroids

Integrins & spreading of spheroids

Conclusion

Perspectives : In vitro three-dimensional model of co-culture

Spheroid on fibrinogen coating

Control	RGD	Citriglucide

Ascites favors implantation and spreading of spheroids on Fn and Fg ECM and α5 Integrins seems to be involved in these mechanisms

Ascites promotes :

- Expression and network organization of mesothelial and tumor ECM
- Spheroids implantation and spreading (integrins-dependent)
- Clearance of mesothelium

→ Importance of ascites on the dissemination of ovarian cancer and their impact on cell-cell and cell-ECM interactions.

In vivo

1 - Cancer cells	Spheroids (IGROV1/SKOV3)
2 - Tumor microenvironment	Ascites Fibrin gel
3 - Mesothelium	Mesothelial cells
4 - Connective tissue	Fibroblasts / ECM proteins

→ A better understanding of metastatic process of ovarian carcinoma

¹ Cannistra et al., N Engl J Med, 2004 / ² Heyman et al., Tumor Biol, 2008 / ³ Kellouche et al., Tumor Biol, 2010

We thank L. El Guermah for technical assistance. We thank Pr O. Gallot, Dr C. Ploc and Dr C. Vendrely for constructive discussions, Dr L. Poulain, Biocitica team (Inserm U1086) and Pr M. Lehmann (UMR CNRS 7213) for their collaboration.

This work is supported by the "Ligue Departementale de Lutte Contre le Cancer (Comité de l'Oise)"

Annexe 2



FRENCH CELL ADHESION CLUB SYMPOSIUM
May 23-25, 2018, Strasbourg

Peritoneal implantation of ovarian carcinoma in ascites conditions: *In vitro* 3D (three-dimensional) model of co-culture

C. Laurent-Issartel, E. Trzpis, C. Maspimby, C.R Picot, J. Leroy-Dudal, F. Carreiras & S. Kellouche*

ERRMECE, Institut des Matériaux, UFR Sciences et Techniques, Cergy-Pontoise, France.

*Correspondence to: franck.carreiras@u-cergy.fr / sabrina.kellouche@u-cergy.fr



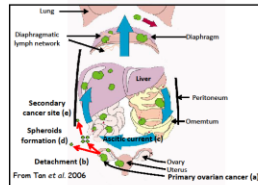
This work is supported by the "Ligue Départementale de Lutte Contre le Cancer (Comité de l'Oise)" and SFBMec for congress support

Introduction

Ovarian cancer is the most lethal gynecologic cancer : at least one-third of patients with epithelial ovarian cancer (OC) present ascites at diagnosis and almost all have ascites at recurrence¹ especially because of the propensity of the ovarian cancer cells to spread in the abdominal cavity and to develop chemoresistance.

Ovarian cancer dissemination

- Primary cancer arise from ovarian surface epithelium (a).
- Cancer cells can exfoliate and disseminate locally (b).
- This process leads to ascitic fluid accumulation (c).
- Within ascites cancer cells float as aggregated cells, so-called spheroids (d).
- Adhesion of floating cells and spheroids onto the mesothelium that lines the peritoneal cavity leads to metastasis formation (e).



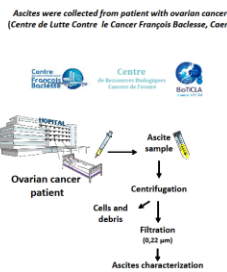
The aim of this study

- To evaluate the influence of the ascitic microenvironment and more particularly the impact and becoming of the ascitic extracellular matrix (ECM) on cancer cells dissemination.
- Especially we explore the implantation of cancer cells on peritoneal mesothelium which is the major site of ovarian cancer metastasis.

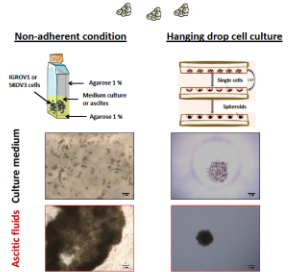
In vitro co-culture model

- Ovarian cancer spheroids model : SKOV3 and IGROV1 cells
- Mesothelium cell model : Met-5A cells

Human ascites sampling

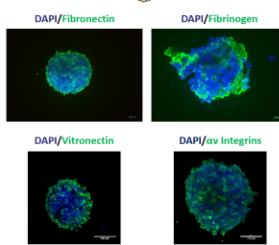


Influence of ascites on spheroids formation



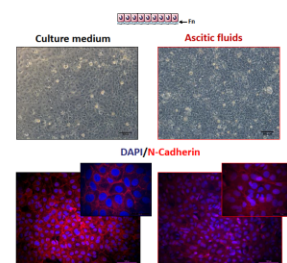
→ According to the two methods used: Ovarian cancer spheroids formation is strengthened in the presence of ascites.

Characterization of spheroids in ascites



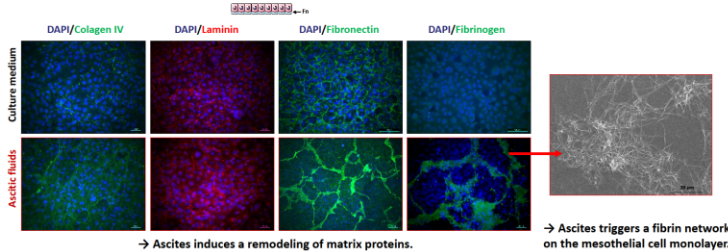
→ In ascites, spheroids express extracellular matrix proteins involved in cell-cell or cell-matrix adhesions.

Effect of ascites on the mesothelial integrity



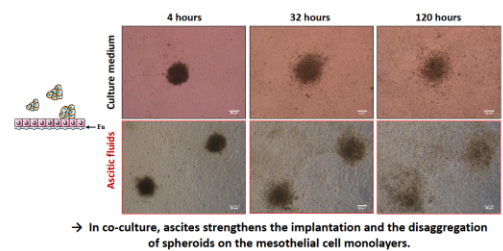
→ The impact of ascites on the integrity of mesothelial cell monolayers is demonstrated by the destabilization (or loss) of N-cadherin expression.

Effect of ascites on the organization of the mesothelial extracellular matrix



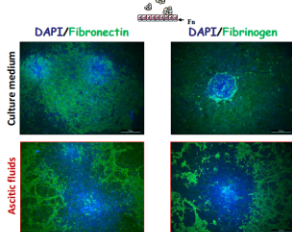
→ Ascites induces a remodeling of matrix proteins. → Ascites triggers a fibrin network on the mesothelial cell monolayer.

Impact of ascites on co-culture between spheroids & mesothelial cells



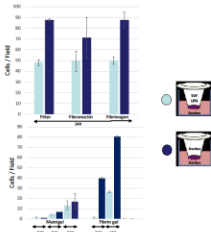
→ In co-culture, ascites strengthens the implantation and the disaggregation of spheroids on the mesothelial cell monolayers.

Incidence of ascites on fibronectin and fibrinogen organization



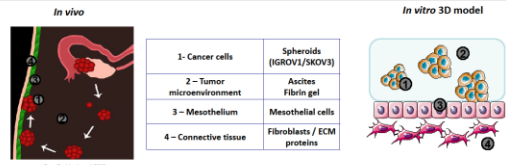
→ When tumor spheroids are implanted in the presence of ascites on mesothelial monolayer, extracellular matrix proteins such as fibronectin or fibrinogen are remodeled.

Effect of ascites on Cell migration & invasion



→ Ascites promotes migration and invasion of ovarian cancer cells

Perspectives : *In vitro* three-dimensional model of co-culture



- These results indicate the importance of ascites on the dissemination of ovarian cancer and suggest their impact on cell-cell and cell-ECM interactions.
- These elements lead us to propose (based on the models of co-cultures and spheroids that we previously established^{2,3}), a three-dimensional co-culture model in fibrin matrix. This model in the presence of ascites, will include tumor spheroids, a monolayer of healthy mesothelial cells and further basing on fibroblasts.
- This model will allow a better understanding of the mechanism of implantation of ovarian tumors on the peritoneal cavity and therefore a better understanding of the metastatic process.

¹ Cannistra et al., N Engl J Med, 2004 / Heyman et al., Tumor Biol, 2008 / Kellouche et al., Tumor Biol, 2010

We thank R. Agniet for technical assistance, Pr O. Gallot and Dr C. Vendréry for constructive discussions, Dr L. Poulain and Biotics team (Inserm U1086) for their collaboration and the Ligue Contre le Cancer (Comité de l'Oise)

Annexe 3

Ascites, the tumoral microenvironment, impact the integrity of mesothelium during peritoneal implantation of ovarian carcinoma

C. Laurent-Issartel¹, R. Agniel¹, F Giffard², J. Leroy-Dudal¹, E. Da Silva Cruz³, F. Carreiras¹, S. Kellouche¹

¹*Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules, ERRMECe, (EA1391), Groupe Matrice Extracellulaire et physiopathologie (MECuP), Université de Cergy Pontoise, France*

²*Inserm U1086 « ANTICIPE », Unité Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Agressifs (BioTICLA) Centre de ressources cancer de l'ovaire, Centre F Baclesse, Université de Caen Normandie, France.*

³*University of Strasbourg, Laboratory of Bioimaging and Pathologies - UMR CNRS 7021, Illkirch, France*

Ovarian cancer is the most lethal gynecologic cancer: at least one-third of patients with epithelial ovarian cancer (OC) present ascites at diagnosis and almost all have ascites at recurrence (*Cannistra et al., 2004*) especially because of the propensity of the ovarian cancer cells to spread in the abdominal cavity and to develop chemoresistance. Our previous studies (*Carduner et al., 2013 and 2014*), consolidated by the recent bibliography, propose that the inflammatory liquid (ascites) which accumulates in the abdominal cavity during the ovarian cancer dissemination is a unique tumoral microenvironment which regulates cancer cells behavior.


The general aim of our study is to evaluate the influence of the ascitic microenvironment on cancer cells dissemination. For that purpose, we develop an *in vitro* three-dimensional model of co-culture between tumoral ovarian cells and healthy mesothelial cells, in the presence of ascites. By this way we hope to mimic the early stages of peritoneal implantation of ovarian carcinoma.

Especially we explore the impact of ascites fluids on : *i*) the integrity of the peritoneal mesothelium which is the main site of ovarian cancer metastasis, *ii*) the ability of ovarian carcinoma cells to form spheroids, *iii*) the implantation of spheroids within mesothelial cell monolayers and the mesothelial clearance due to spheroids spreading on the mesothelium.

Our first results demonstrate the impact of ascites on the integrity of mesothelial cell monolayers by the destabilization of cell-cell interactions (N-cadherin and ZO) and of the cytoskeletal components (Actin, tubulin, vinculin). Impact of ascites on mesothelial extracellular matrix (ECM) is also shown (fibronectin, fibrin). Moreover, the formation of spheroids of ovarian cancer cells is strengthened in the presence of ascites and fibrin organization / localization is highlighted. In addition, co-culture of mesothelial cell monolayers with tumoral ovarian spheroids reveals *i*) the disaggregation of spheroids, *ii*) the loss of mesothelium integrity that results in mesothelial clearance and *iii*) the remodeling of ECM.

The optimization of the *in vitro* three-dimensional model of co-culture is actually under investigation and one of the perspectives of this study is to explore the involvement of integrins receptors in the molecular mechanism of the implantation.


Our study indicates the importance of ascites on ovarian cancer dissemination and suggests their impact on cell-cell and cell-ECM interactions. The better understanding of the mechanistic of these interactions could be of importance in the understanding of metastatic process.





Ascites, the tumoral environment of ovarian cancer, impacts the integrity of mesothelium during peritoneal implantation of ovarian carcinoma

ANNUAL MEETING OF THE FRENCH SOCIETY FOR
EXTRACELLULAR MATRIX BIOLOGY
May 15-17, 2019


Carine LAURENT-ISSARTEL
PhD Student
ERRMECe – MEC-uP





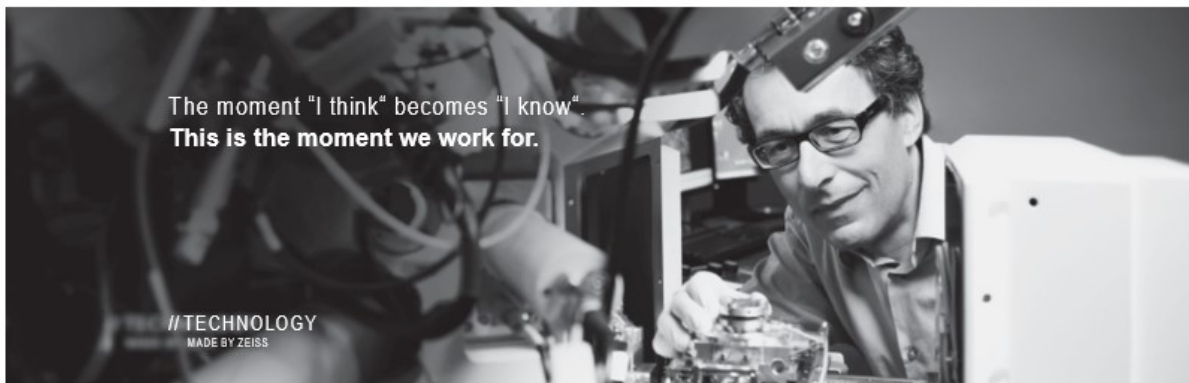


Université // Paris Seine



Annexe 4

RMZ : Rencontres des Microscopistes Zeiss



AGENDA RMZ 2019

11:40-12:10 Sessions Plénières N°4
 La microscopie pour l'étude des sphéroïdes tumoraux – Auditorium
 Carine Laurent-Issartel (Université de Cergy)

JOURNEE RMZ

19 MARS 2019



« Etude de l'implantation péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens
 dans un modèle *in vitro* de co-culture tridimensionnel en ascites »

Carine LAURENT-ISSARTEL
 2^{ème} année de Doctorat
 ERRMECe – MEC-uP







Annexe 5, 6 et 7***Annexe 5 : “Ascites microenvironment conditions the peritoneal pre-metastatic niche to promote the implantation of ovarian tumor spheroids: involvement of fibrinogen/fibrin and αV and $\alpha 5\beta 1$ integrin family”***

Cet article présente une partie des résultats du travail de Doctorat présenté dans ce manuscrit.

Annexe 6 : “A biomimetic model of 3D fluid extracellular macromolecular crowding microenvironment fine-tunes ovarian cancer cells dissemination phenotype” (Biomaterial, Déc 2020)

Comme cette étude de Doctorat, les études précédentes du laboratoire et la bibliographie le montrent, l'ascite est un microenvironnement unique et très complexe qui a un rôle clé dans le cancer de l'ovaire. Bien que les mécanismes du cancer de l'ovaire aient été largement examinés au niveau moléculaire, la plupart des études sont souvent dissociées des propriétés biophysiques du microenvironnement. Les ascites sont des fluides complexes et hétérogènes qui possèdent des propriétés chimiques et physiques spécifiques. Grâce à ces propriétés, les ascites pourraient créer un microenvironnement « encombré » en termes de macromolécules à la surface du péritoine affectant ainsi l'implantation des cellules cancéreuses ovariennes.

In vivo, les cellules sont continuellement confinées dans des microenvironnements encombrés, tandis que *in vitro*, les milieux de culture sont des solutions très diluées et beaucoup moins concentrées avec une composition moléculaire constante.

Dans ce cadre, et en parallèle de mon étude spécifique de Doctorat j'ai pu participer à une étude qui vise à étudier l'effet de l'encombrement macromoléculaire sur le comportement de cellules cancéreuses ovariennes. Pour illustrer l'encombrement macromoléculaire que l'on peut retrouver dans les fluides biologiques tels que l'ascite, deux molécules de poids moléculaires différents ont été utilisées, le Ficoll (400 kDa) et le Dextran (250 kDa). Ces protéines ont été ajoutées au milieu de culture classique à des concentrations d'environ 75 mg/ml, se rapprochant ainsi de la concentration totale de protéines retrouvés dans le plasma sanguin ou dans les ascites des cancers ovariens. Ces deux protéines, de haut poids moléculaire, présentent des différences de structures pour mimer l'état globulaire et fibrillaire de molécules biologiques, retrouvées dans les liquides biologiques, comme la fibronectine.

L'étude démontre que l'encombrement macromoléculaire modifie considérablement les propriétés biologiques, biochimiques et biophysiques en affectant la prolifération, l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses ovariennes isolées, mais aussi en empêchant la formation d'agrégats multicellulaire, les sphéroïdes. De plus, l'encombrement macromoléculaire modifie l'organisation de la matrice extracellulaire et modifie l'expression des protéines des jonctions cellulaires. Tous ces résultats montrent que l'encombrement macromoléculaire oriente les cellules cancéreuses ovariennes vers un phénotype de dissémination. Ce travail fournit des informations riches et novatrices sur la relation directe entre l'encombrement macromoléculaire et les fluides biologiques, comme l'ascite, dans le développement et le comportement du cancer de l'ovaire.

Annexe 7 : “Evaluation of the potential of a new ribavirin analog impairing the dissemination of ovarian cancer cells” (PlosOne, Déc 2019)

Les études précédentes du laboratoire ont permis de comprendre certains effets du microenvironnement sur le comportement cellulaire des cellules cancéreuses. Lorsque ces effets sont appréhendés, il est important de mettre en place des hypothèses de stratégies thérapeutiques pour contrer et/ou ralentir la pathologie. De nombreuses pistes thérapeutiques sont étudiées pour le cancer de l’ovaire, cependant, les effets secondaires sont récurrents. La ribavirine, analogue nucléosidique de la guanosine, a récemment été utilisée dans le traitement de certains cancers mais comportent de nombreux effets secondaires.

Dans ce cadre, et en parallèle de mon étude spécifique de Doctorat j’ai eu l’opportunité de participer à une étude concernant l’effet d’un analogue de la ribavirine, le SRO-91, sur les comportements typiques des cellules cancéreuses dans le cancer de l’ovaire. L’effet du SRO-91 a été comparé à l’effet de la ribavirine et du cisplatine sur plusieurs lignées cellulaires d’adénocarcinomes mais aussi sur des lignées de cellules saines. Il est essentiel d’estimer l’impact des traitements sur les cellules non cancéreuses pour limiter les effets néfastes d’un traitement. Ainsi, notre modèle *in vitro* de co-culture entre les cellules cancéreuses isolées et une monocouche de cellules mésothéliales, mimant l’implantation des cellules cancéreuses au mésothélium péritonéal, a aussi été utilisé pour appréhender les effets du SRO-91.

Cette étude démontre que le SRO-91, comme la ribavirine, inhibe la prolifération, la migration, la clonogénicité et la formation de sphéroïdes des cellules cancéreuses. De plus, contrairement à la ribavirine, le SRO-91 est préférentiellement toxique pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. Enfin, *in vitro*, le SRO-91 inhibe l’implantation des cellules cancéreuses sur le mésothélium.

Ces découvertes sont encourageantes pour la mise en place de cette molécule prometteuse pour le traitement du cancer de l’ovaire et particulièrement contre la dissémination métastatique péritonéale.

Ascites microenvironment conditions the peritoneal pre-metastatic niche to promote the implantation of ovarian tumor spheroids: involvement of fibrinogen/fibrin and αV and $\alpha 5\beta 1$ integrin family.

C. Laurent-Issartel¹, R. Agniel¹, F. Giffard², C. Blanc-Fournier², E. Da Silva Cruz³, C. Habes, J. Leroy-Dudal¹, F. Carreiras^{1,4} and S. Kellouche^{1,4}.

¹Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules, ERRMECe, (EA1391), Groupe Matrice Extracellulaire et physiopathologie (MECuP), Institut des Matériaux, I-MAT (FD4122), CY Cergy Paris Université, France

²Biological Ressources Centre "OvaRessources", certified NF S 96-900, Normandie University, UNICAEN, INSERM U1086 ANTICIPE, UNICANCER, Biopathology Department, Cancer Centre F. Baclesse, Caen, France

³University of Strasbourg, Laboratory of Bioimaging and Pathologies - UMR CNRS 7021, Illkirch, France.

⁴These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Ovarian carcinomas have a poor prognosis predominantly because of a high recurrence rate. Ovarian cancer cells spread widely throughout the abdominal cavity, leading to peritoneal metastasis. Moreover, at least one-third of patients with epithelial ovarian cancer (OC) present ascites at diagnosis and almost all have ascites at recurrence. The presence of ascites, which acts as a dynamic reservoir of active molecules and cellular components, correlates with OC peritoneal metastasis, and is associated with a poor prognosis. The influence of ascites on the development of premetastatic niches, and on the biological mechanisms leading to cancer cell colonization of the mesothelium, remain poorly understood.

This study investigates whether ascites secretions affect mesothelium integrity, and focuses on the implantation of tumor spheroids on the mesothelium.

Ascites weakens the mesothelium by affecting the viability of mesothelial cells and by destabilizing their distribution in the cell cycle. Ascites also causes destabilization of the integrity of mesothelium with a modification of the organization of cell junctions, but it does not affect the synthesis of N-cadherin and ZO-1 by Met-5A cells. Moreover, ascites induces disorganization of focal contacts and causes actin cytoskeletal reorganization dependent on the activity of Rac1. Ascites allows the densification and reorganization of extracellular matrix proteins of the mesothelium, especially fibrinogen/fibrin, and indicates that ascites is a source of fibrinogen and fibrin surrounding OC spheroids. To mimic the early stages of peritoneal implantation of OC, an *in vitro* three-dimensional model of co-culture of OC spheroids and mesothelial cells has been developed in the presence of ascites. The fibrin in the ascites leads to the adhesion of OC spheroids to the mesothelium, and the ascites promotes their disaggregation followed by the clearance of mesothelial cells. Both αV and $\alpha 5\beta 1$ integrins are involved.

Investigating the relationships between the molecular properties of ascites components and OC cell implantation may be critical for a better understanding of the recurrence of this lethal disease.

Keywords: Ovarian Cancer, ascites, spheroids, mesothelium integrity, fibrinogen, Fibrin, αV and $\alpha 5\beta 1$ integrin, clearance, 3D co-culture...

INTRODUCTION

Ovarian cancer is the gynecological malignancy with the highest case-to-mortality ratio in the western world. Because ovarian cancer is often asymptomatic, it is generally diagnosed at an advanced stage and is associated with a poor prognosis (5-year survival rate ~30 %) mainly due to acquired chemoresistance and widespread dissemination [1]. Ovarian carcinoma metastasizes by continuous infiltration of neighboring organs and disseminates within peritoneal fluid of the abdominal cavity. Ovarian metastasis is commonly due to the shedding of individual tumor cells or free-floating multicellular clusters, spheroids, from the primary tumor into the abdominal

cavity, where they survive and subsequently spread after attachment to the peritoneum. Once attached to the mesothelial layer of the peritoneum, malignant cells proliferate, invade it and metastasize to distant organs [2–5].

At least one-third of patients with epithelial ovarian cancer present ascites, an exudative fluid that accumulates intra-abdominally, at diagnosis and almost all have ascites at recurrence especially because of the propensity of the malignant cells to spread in the abdominal cavity and develop chemoresistance [6]. The presence of a large volume of ascites correlates with poor prognosis, and transcoelomic metastasis (through the mesothelium) seems to be directly associated with ascites production. Indeed, reduction in peritoneal tumor bulk as a result of surgery and chemotherapy is generally associated with a reduction of ascites production [6,7]. Ascites fluid is a dynamic reservoir of survival factors owing to its large content of many different molecules, such as cytokines, growth factors, angiogenic factors, hormones, coagulation factors, proteases and extracellular matrix (ECM) proteins that individually and/or collectively affect cancer cell adhesion, migration, invasion, survival and spheroid formation [8–10]. Since ascites represents a unique tumor microenvironment, its effects remain to be fully characterized, especially regarding the regulation of malignant spheroid cell dissemination.

Ovarian carcinoma dissemination is partly due to spheroid formation that become released within the peritoneal cavity before implantation into the mesothelium. The multicellular nature of spheroids is thought to be attributable to adhesive molecules that mediate cell-cell and cell-ECM interactions. Among secreted ECM, fibronectin promotes the formation of spheroids, and is associated with their increased expression of $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins [11,12]. Other studies show the importance of vitronectin and its αv integrins receptors in the early stages of spheroid formation [12]. In addition, these cell-ECM interactions lead to signals that could regulate spheroids cell behavior, such as the resistance to anoikis [9,13]. Spheroids can become chemoresistant. The first reason is that the three-dimensional organization of the spheroids results in poor delivery of chemotherapeutic drugs to the inner regions of spheroids [14]. The low rate of cancer cell proliferation in spheroids could be one of the reasons for the loss of sensitivity to therapeutic agents targeting the cell cycle.

Interestingly, unlike most other cancers, ovarian tumors rarely disseminate through the blood vessels. Cells spread predominantly by direct extension of the tumor into adjacent tissues, and by the shedding of cancer cells from the primary tumor into the peritoneal cavity. Thus, ovarian cancer cells are preferentially found as a solid tumor mass adhering to the peritoneal mesothelium [15]. The mesothelium, a single layer of flat cells covering the peritoneal cavity and its organs, is the first barrier met by ovarian tumor cells and is the major site of ovarian carcinoma metastasis before invading the underlying connective tissue. Mesothelial cells express and/or secrete several extracellular matrix proteins, adhesion molecules and chemotactic factors that could enhance ovarian cancer cell implantation and colonization of the mesothelium [2,16–18]. Thus, mesothelial cells and the ECM constituting the implantation site of ovarian tumors act as a propitious microenvironment for tumor growth. Both cancer cells and ascites can induce changes in the surrounding mesothelial microenvironment, creating the so-called 'reactive tumor microenvironment'.

Mesothelial cells do not synthesize fibrinogen, although accumulation of fibrinogen in tumor ascites has been previously identified. Fibrinogen is a coagulation protein found in blood plasma that increases its levels in inflammatory conditions such as ovarian cancer [19]. Fibrinogen and its polymerized form fibrin, are also regular components of solid tumor stroma. Indeed, the process of wound healing or tumor induces a decrease in oxygen level which induces the tissue or tumor to be hypoxic. To compensate this lack, the tissue responds by expressing proteins involved in coagulation and fibrinolysis [20]. In addition, the clotting pathway is also induced in response to activation of the immune system to counteract the tumor giving a pro-coagulant [21] tumor phenotype. *In vivo*

experiments in mice have shown the presence of fibrin deposition on the surface of the peritoneal cavity after implantation of ovarian cancer cells [22,23].

These data led us to explore the potential involvement of ascites derived fibrinogen/fibrin in producing a propitious microenvironment favoring the implantation and dissemination of ovarian carcinoma on the peritoneal mesothelium.

Thus, we have determined the influence of ascites on ovarian cancer spheroid implantation and dissemination on the peritoneal mesothelium. To mimic the early stages of peritoneal implantation of ovarian cancer, we develop an *in vitro* three-dimensional model of co-culture of tumor spheroids and healthy mesothelial cells in the presence of ascites. In particular, we have explored the impact of ascites and its components on: i) the integrity of the peritoneal mesothelium ii) the ability of ovarian cancer cells to form spheroids, iii) the implantation of spheroids within mesothelial cell monolayers and their clearance due to spheroid spreading.

MATERIALS AND METHODS

Ascites samples

The ascites samples were collected at the Cancer Center F. Baclesse (Caen, France) were certified cytologically as positive for malignant cells, and stored in the OvaResources Biological Resources Center (BRC) (NF-S 96900 quality management, AFNOR N°2016:72860.5). The medical officer and the scientific officer of the BRC are respectively Dr Cécile Blanc Fournier and Dr Laurent Poulain. All biological collection from BRC was declared by the project Manager of the Clinical Research Department (Alexandra Leconte) to the MESR (Ministry of Education, Health and Research, France, N°DC-2010-1243 and amendments DC-2013-1849, DC-2016-2641 and DC-2017-2923). The date of the favorable opinion on the constitution of the collection is 17 September 2011. We obtained written informed consent from the patients. The study was approved by the ethical committee "CPP North West III" (Committee for the Protection of Persons). The samples were centrifuged at 400g for 5 min immediately after collection, and the supernatants stored at -20°C. The samples were sterilized by filtration (0.2µm, low-binding) and supplemented with penicillin (200 UI/mL)/ streptomycin (200 µg/mL) before cell culturing. We used 8 ascites from 8 patients, which were labeled ASC#1 through ASC#8.

Cells and reagents

The human ovarian adenocarcinoma cell line, SKOV3, was kindly supplied by Dr L. Poulain of the BioTICLA team INSERM U1086 (Biologie et Thérapie Innovantes des Cancers Localement Agressifs, Caen, France). The cells were grown in RPMI-1640 glutaMAX (Life technologies, France) containing 0.07% (v/v) sodium bicarbonate supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biosera, France) in a humidified air atmosphere with 5% CO₂ in air at 37°C. The human mesothelial cell line, Met-5A, purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA), were grown in M199 supplemented with 3.3 nM epidermal growth factor (EGF; Sigma St-Quentin-Fallavier, France), 870 nM insulin, 400 nM hydrocortisone (Sigma), 1.25 g/l sodium bicarbonate (Invitrogen) and 10% FBS. The cultured cells were in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. Sub-confluent cells were harvested with 0.25% trypsin-EDTA (Life technologies, France). In some experiments, cells were cultured on 10 µg/ml fibronectin, vitronectin or fibrinogen coatings. Fibronectin and vitronectin were purified from human blood plasma (provided by the French Establishment of Blood), as described by Poulain et al. [10,24]. Fibrinogen was purchased from Hyphen BioMed (PP001C).

Cell proliferation and viability assay

In the proliferation assay, Met-5A cells were seeded in 24-well plates at 16,000/cm² and incubated in complete M199 medium (named growth medium, GM) for 5 days until confluent. The medium was then removed and cells were incubated in new growth medium or Ascites (ASC#1, ASC#2, ASC#6). The number of viable cells was measured by the trypan-blue exclusion test at 0, 24, 72 and 96h after the refresh of growth medium or ascites. Results are representative of 3 independent experiments done in triplicate, and are expressed as mean ± Standard Error of the Mean (SEM).

Cell cycle analysis

Met-5A cells were seeded in culture flask (75 cm²) and incubated in growth medium for 5 days until confluent. The cells were then incubated in new growth medium or Ascites (ASC#1, ASC#2, ASC#6) for 24 or 96 h. Cells were rinsed twice with phosphate buffer saline (PBS), harvested with trypsin-EDTA and resuspended in growth medium. After centrifugation, cells were fixed in 70% ethanol and stored at -20°C overnight. After centrifugation, cells were resuspended in PBS Ca⁺² Mg⁺² and with RNase (40 µg/ml) (AM2694, INVITROGEN). Cells were stained in ice for 30 min with propidium iodide (20 µg/ml) (P4864, Sigma-Aldrich). Cells (50,000) were analyzed per condition in a flow cytometer (BD Accuri C6plus). The percentage distribution in Go/G1, S and G2/M phases were determined with BD Accuri C6 Plus Software.

Spheroid formation

Ovarian cancer spheroids were generated by the hanging-drop technique adapted from Ramsy Foty [25]. Briefly, a suspension of 500 SKOV3 cells was seeded in a total volume of 20 µL ascites. The drops containing ascites and cells were deposited on the bottom of the lid Petri dish; the lower part of the dish was filled with PBS and followed each day by phase-contrast microscopy, being a humid chamber preventing evaporation of the cell-containing drops. There were at least 25 drops per dish. The lid of the petri dish was turned upside down and placed on the bottom. The whole set was transferred to a humidified incubator at 37°C for 5 days to contribute to the sedimentation and aggregation of the cells and promote the formation of 3D-ovarian cancer spheroids. Spheroid formation was followed each day by phase-contrast microscopy, and those generated were used in the experiments described below.

Co-culture model

To mimic cancer cell dissemination on to a mesothelium, a co-culture assay of ovarian cancer spheroid and mesothelial cells was used. Met-5A cells were first grown on glass coverslips in 24-well plates at 16,000/cm² for 5 days in growth medium until confluent. The spheroids formed were deposited on the mesothelial monolayer in complete M199 medium or ascites. This model of co-culture was examined several times and used at different stages as described below.

Immunofluorescent staining

Met-5A cells were seeded onto glass coverslips or co-cultured with spheroids were exposed to different ascites or growth medium for different times. At each time-point, cells were fixed in 3% paraformaldehyde (PFA) in PBS and saturated with PBS containing 0.5% BSA for 30 min. They were permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS. They

were incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies Collagen IV (C1926, Sigma-Aldrich), Fibronectin (F3648, Sigma-Aldrich), Laminin (L9393, Sigma-Aldrich), Vinculin (V9131, Sigma-Aldrich), Tubulin (T9026, Sigma-Aldrich), Vimentin (CBL202, Sigma-Aldrich), Fibrinogen (A0080, DAKO), N-Cadherin (ab45139, abcam), ZO-1 (610966, BD biosciences), Rho A (sc-418, Santa-Cruz), cdc42 (sc-8401, Santa-Cruz) or Rac1 (610651, BD Transduction Laboratories). After washing, the coverslips were incubated with the appropriate fluorescent secondary antibodies for 1 h at RT: Alexa Fluor 568-conjugated anti-mouse anti-body (A11004, Life technologies), Alexa Fluor 568-conjugated anti-Rabbit antibody (A11011, Life technologies), Alexa Fluor 488-conjugated anti-Mouse antibody (A11029, Life technologies) or Alexa Fluor 488-conjugated anti-Rabbit anti-body (A11008, Life technologies). The actin cytoskeleton was stained with FITC- phalloidin (P5282, Sigma Aldrich) or TRITC-phalloidin (P1981, Sigma Aldrich). Cell nuclei were stained with Hoechst (33342, abcam) or DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542, Sigma Aldrich). Coverslips were mounted in Prolong-Gold Antifade Reagent (P36930, Invitrogen). For the spheroids, the staining was carried out according to the same protocol, but in Ependorff tubes for centrifugation at each rinsing step. Moreover, spheroids were incubated overnight at 4°C with the primary antibody: Fibrinogen (A0080, DAKO), and after washing were incubated for 2 h at RT with the secondary antibody Alexa Fluor 488-conjugated anti-Rabbit antibody. Controls in which primary antibodies were replaced with PBS were negative. Immunofluorescent labeling as observed with a confocal microscope (LSM710, Zeiss) equipped with a 405 nm diode, 458, 488, 514, 561 and 633 nm lasers and x20 objectives Apo Plan, digital aperture 0.8 and x63 with Apo Plan immersion, and digital aperture of 1.4.

Immunohistochemistry staining

Spheroids isolated from patient ascites were collected during surgery or ascites punctures from human ovarian carcinoma patients observed in the comprehensive cancer centre F. Baclesse (Caen, France) after certified pathological diagnosis. Paraffin-embedded sections (5µM) were dewaxed and rehydrated, heated for 30 min at 97°C in 10 mM citrate buffer, pH 6 for antigen retrieval, washed with 0.1M Tris–0.15 M NaCl and incubated with 10% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity. Non-specific sites of fixation were saturated with a neutralizing solution from an Ultratech HRP kit. The sections were incubated for 1 h at RT with an anti-fibrinogen antibody (1:400) (A0080, DAKO). After PBS washing, the sections were incubated with the Ultratech HRP Streptavidin-Biotin Universal Detection System (Beckman Coulter, Villepinte, France). Staining was visualized using a DAB chromogen system (Zymed, Clinisciences, Montrouge, France) and nuclei were counterstained with hematoxylin. After washing with water, the sections were dehydrated in alcohol and toluene before being mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). The primary antibody was omitted from the negative controls. Mesothelium slices of the xenografts of ovarian cancer cells (IGROV1 cell line) injected into the peritoneum of the mouse were also treated with a fibrinogen IHC, as previously described, after being removed on day 28.

Scanning electron microscope

The samples analyzed by SEM (GeminiSEM 300, Zeiss) were treated as follows: the growth medium was removed by rinsing twice with warmed PBS (37°C) and a suspension for dehydration with 0.2 M cacodylate and 2% glutaraldehyde was added for 30 min at room temperature. The samples were rinsed 3 times with 0.2 M cacodylate and successively placed in different baths of 30, 50, 80 and 100% ethanol each for 10 min. Samples were critical point dried for 16 exchanges (EM CPD300, Leica). Finally, they were sputter-coated with a thin-layer of platinum (4 nm), before being imaged in the SEM.

Correlative Light-Electron Microscopy

Met-5A cells were seeded on glass coverslips with a grid pattern (P35G-1.5-14-CGRD, MatTek) and incubated in growth medium until confluent. The cells were then incubated in ascites. After 24 h incubation, cells were fixed in 3% paraformaldehyde (PFA) in PBS and saturated with PBS containing 0.5% BSA for 30 min. They were permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS. They were incubated for 2 h at room temperature with the primary antibody: Fibrinogen (A0080, DAKO). After washing, the coverslips were incubated with the appropriate fluorescent secondary antibodies for 1 h at RT: Alexa Fluor 488-conjugated anti-Rabbit anti-body (A11008, Life technologies). Coverslips were left in PBS and immunofluorescent labeling examined with a confocal microscope (LSM710, Zeiss). The cells were then washed, dehydrated and dried as previously described. Finally, cells were sputter-coated with 4 nm platinum before being observed in the SEM. Acquisitions of confocal microscope and SEM were superimposed with ICY, the open source image processing software, with the plugin ecCLEM [26].

Quantification of ascitic fibrinogen and thrombin

Human fibrinogen and thrombin concentrations were measured by sensitive immunoassay kits (ab208036, ab108909, abcam, respectively). Antibodies specific for the protein being examined had been fixed on 96-well plates. Standard samples for the calibration range, the culture medium and ascites samples were deposited on the wells at determined dilutions; each sample was assayed in duplicate. Protein-specific biotinylated detection antibodies were added, followed by several rinses. TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) was used to visualize the streptavidin-peroxidase enzymatic reaction. Streptavidin-peroxidase specifically catalyzes TMB to produce a blue product that turns yellow after the adding a stop solution. The absorbance was measured at 450 nm by the spectrofluorometer (Xenius XM, SAFAS). Fibrinogen and thrombin concentrations were determined from the calibration curve of the corresponding standards.

Western blotting

Previously determined using BiCinchoninic acid Assay (BCA) (BCA1-1KT, Sigma-Aldrich), equal amount of the different ascites and complete M199 culture medium (growth medium) protein (10 µg) were treated with Laemmli buffer (125 mM Tris pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.005% bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol). They were separated by 10% bis-acrylamide SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions before being transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) for 1h at 100V at room temperature (RT). The membrane was blocked 1h with TTBS (132 mM NaCl, 20 mM Tris-HCL, pH 7.6, 0.05% Tween) and 5% BSA. The membrane was probed for 2h with anti-fibrinogen (1:1,000, A0080, DAKO). After 3 washes with TTBS, the membranes were incubated for 1h at RT in TTBS-BSA 0.5% with an anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated antibody (1/5,000, A6154, Sigma-Aldrich). Following 3 washes with TTBS, immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence (ECL, Millipore). Proteins were identified using an ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, France).

Met-5A cells were grown in culture flasks in growth medium until confluent before fresh growth medium or ascites was added for 24 h. Cells were washed once with ice-cold PBS and lysed with RIPA buffer (#9806, Cell Signaling TECHNOLOGY) with PMSF protease inhibitor (P7626, Sigma-Aldrich). Cell lysates were clarified by centrifugation at 10,000g for 10 min at 4°C, and protein concentrations were determined using the BCA assay. Equal amounts of protein (10 µg) were treated with Laemmli buffer and electrophoresed under reducing conditions before being transferred on nitrocellulose membrane (Bio-Rad) for 1h at 100V at RT. Membrane was blocked with Blocking Buffer TBS (927-50000, Odyssey) for 1 h. Membranes were probed with anti-N-cadherin (ab45139, abcam), anti-ZO-1

(610966, BD biosciences), anti- β -actin (A5441, Sigma-Aldrich) and anti- α -tubulin (T9026, Sigma-Aldrich) antibodies (at these dilutions of 1:1,000 ; 1:500 ; 1:2,500 and 1:1,000, respectively). Bound antibody was detected using fluorescent secondary antibody (IRDye 800CW goat anti-Rabbit and IRDye 680RD goat anti-Mouse) (1/80,000). Membrane fluorescence was read by the ODDYSEY infrared imaging system (LI-COR Biosciences).

Activated RhoA, cdc42 and Rac1 assays

Three members of the Rho family of GTPases have been studied; RhoA, Rac1 and Cdc42. Proteins were assayed using the BK030 cytoskeleton protocol). Using sub-confluent cultures that had been serum starved (0.10% FBS) for 18 h, cultures were incubated with ascites or growth medium for 30 min or 24 h. Briefly, at each time-point, cells were washed twice with cold PBS, scraped into 500 μ l lysis buffer with protease inhibitors. After centrifugation at 10,000 g for 1 min, the supernatants were snap-frozen in liquid nitrogen. Concentrations were determined by BCA assay; 500 μ g of total cell protein under different conditions were used for pull-down assays, as well as positive and negative control. Proteins were incubated with 50 μ g rhotekin-RBD (rhotekin - Rho Binding Domain) for RhoA pull-down assay and 10 μ g of PAK-PBD (p21 Activated Kinase I - p21Binding Domain) for Cdc42 and Rac1 pull-down assay for 1 h at 4°C with gently rotation. After centrifugation and rinsing, 20 μ l Laemmli sample buffer was added and the samples were analyzed by SDS-PAGE (12%). Thirty μ g of total protein were analyzed for quantification of the total specific small G-protein and 20 ng his-tagged small G-protein controls, in Laemmli buffer. Proteins were transferred to PVDF membranes for 45 min at 75 V. The membranes were blocked with 5% nonfat-dry milk in T-TBS for 30 min at room temperature with constant agitation. The membranes were probed with anti-RhoA (1:500), anti-Rac1 (1:500) or anti-Cdc42 (1:250) antibodies diluted in T-TBS overnight at 4°C with constant agitation. After washing, membranes were incubated with anti-mouse secondary anti-body HRP conjugated (GENA931, Sigma-Aldrich) diluted in T-TBS (1:5,000) for 1 h at room temperature with constant agitation. After washing, the proteins linked antibodies were detected by ECL (Millipore).

Integrins blockage in spheroid dispersion and clearance of mesothelial cells

For inhibition experiments, implantation of spheroids on protein coatings (fibronectin, fibrinogen) or clearance study, Cyclo (-RDGfc) (637851-1, Anaspec) and Cilengitide blocking peptides (SML1594, Sigma Aldrich) were used at 100 μ g/ml and 50 μ g/ml, respectively. The ovarian cancer spheroids were preincubated for 2 h 30 at 4°C with one of the blocking peptides before being deposited on protein coatings or on mesothelial monolayers that has been labelled with nanoparticles. Briefly, Met-5A monolayer was stained by nanoparticles (NPs) (biodegradable polymers loaded with cyanine dyes) that can be homogenously endocytosed by living cells [27]. NPs were provided to us by Dr. Andreas Reisch. For labeling, Met-5A cells were seeded in 6-well plates at 21,000/cm². After 18 h adhesion, the culture medium was removed before the cells washed twice with PBS and once with opti-MEM (Gibco). Cells were incubated with a freshly prepared solution of the NPs. NPs solution was prepared from the stock solution in 20 x 10⁻³ M phosphate buffer at pH 7.4 with a particle concentration of 3 x 10⁻⁹ M (0.04 g-1 L-polymer). This solution was diluted 10X with opti-MEM. The NPs suspension was deposited on the cells for 3 h at 37°C; the NPs suspension was then removed, cells were rinsed with opti-MEM then PBS. Met-5A cells were detached with trypsin - EDTA and seeded onto glass coverslip until confluent. In the presence or absence (Ctrl) of integrins blocking peptides, the area of dispersion of the spheroids on the protein coatings, as well as the area of the clearance of the mesothelial cells illustrated by the absence of nanoparticles staining, were measured by Image J software.

Fibrin gel with spheroids: 3D culture model

To observe the dispersion and invasion of ovarian cancer spheroids in a fibrin gel with or without blocking peptides (described above), a suspension of fibrinogen at 3 mg/ml in PBS was produced. 1 U/ml of human thrombin was added and the fibrinogen (Fg) suspension was quickly transferred to 48-well plates (150 μ l/well). Fibrin gel was incubated for 30 min at 37°C to polymerize. A suspension with 150 μ L Fg suspension at 3 mg/ml, 50 μ L ascites containing ovarian cancer spheroids (preincubated or not with blocking peptides) and thrombin (1U / ml) was added on the gel initially formed. The mixture was incubated at 37°C to polymerize for 30 min. Complete medium or ascites was added to the wells. The dispersion, disaggregation and invasion of cancer cells derived spheroids in fibrin gels were followed at different times under a phase-contrast microscope.

Statistical analyses

Figures were obtained from at least 3 independent experiments carried out in triplicate. Data were expressed as mean \pm SEM. Analysis of the experimental used a paired unidirectional ANOVA test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

RESULTS

Ascites affects the viability and cell cycle of the mesothelial cells

The mesothelium is a stable barrier under physiological conditions. The effect of ascites on the stability and integrity of mesothelium were measured. To mimic the mesothelium, Met-5A cells were seeded in growth medium for 5 days to achieve a confluent monolayer. The medium was removed and the cells incubated in new growth medium or ascites (ASC#1, ASC#2, ASC#6). We chose these three ascites from the panel of 8 on the basis of different macroscopic factors between them such as in their opacity or gelatinous appearance. After 24h incubation in ascites, the mesothelial cells appeared slightly altered by destabilization and accumulation of intracellular vesicles, which increased with time (96h). In growth medium, monolayers seemed to be unchanged (Fig. 1A). Mesothelial cell viability was estimated by the trypan-blue exclusion test at 0, 24, 72 and 96 h after adding of fresh growth medium or ascites (#1, #2 or #6). After 24h incubation, no effect of ascites was seen on the viability of Met-5A cells compared to growth medium. However, at 72h ASC#1 and ASC#6 significantly inhibited the viability of Met-5A cells compared to growth medium. At the same time, ASC#2 seemed to have an intermediate effect between ASC#1/ASC#6 and growth medium on the viability of the monolayer. ASC#1 and ASC#6 significantly inhibited the proliferation of Met-5A cells compared to ASC#2. The differences between the 3 ascites were representative of their heterogeneity, but all ascites reduced the viability of the mesothelium cells (Fig. 1B). Further cell cycle analysis of Met-5A cells in monolayer was made after adding ascites (ASC#1, ASC#2, ASC#6) for 24 and 96h. Unlike growth medium, ASC#6 significantly increased the percentage of cell debris and death (sub-G1 pic) over time (Fig. 1C). Furthermore, ASC#6 significantly decreased the proportion of Met-5A cells in G0/G1 and increased the G2/M phase. From 24h incubation with ASC#1 or ASC#2, the percentage of cells in the S phase significantly decreased compared to growth medium. At 96h, the number of cells in G0/G1 phase also significantly decreased and cells in G2/M significantly increased compared to growth medium. These 3 ascites seemed to block cells in the G2/M phase of the cell cycle (Fig. 1C) and confirmed the decrease in the overall cell density seen in (Fig. 1B). However, these results nevertheless show differences between ascites. Whereas ASC#1 and ASC#2 are only associated with a decrease in cell density by blocking the cell cycle in G2/M, ASC#6 - in addition to this blockage - seems more

aggressive with a cytotoxic effect on the mesothelial monolayer. Ascites weakens the mesothelium by affecting the viability of mesothelial cells while destabilizing their distribution in the cell cycle.

Ascites destabilizes the integrity of the mesothelium

The mesothelium acts as a physiological barrier, but its destabilization facilitates the migration of cancer cells through it. The mesothelial monolayers were incubated for 24 h with growth medium or ascites. Immunofluorescent staining of N-cadherin (Cell Adhesion Molecules, CAM) and ZO-1 (Tight junction protein) showed a regular junctional localization in mesothelial monolayer in growth medium conditions. But in ascites conditions, mesothelial monolayers showed marked dislocation of intercellular N-cadherin along with diffuse staining and an irregular ZO-1 expression (Fig. 2A, C). However, the amounts of N-cadherin and ZO-1 proteins followed by western blot were unaffected by the different ascites to growth medium (Fig. 2B, D). Ascites causes destabilization of the integrity of mesothelium with a modification of the organization of cell junctions, but does not affect the synthesis of N-cadherin and ZO-1 by Met-5A cells.

Maintaining the integrity of mesothelium is due to the stability of the cell-cell junctions and the mechanical property of the cells which is conferred by their cytoskeleton and their anchoring. After 24h incubation of mesothelial cells with ascites, the staining of tubulin (microtubules) and vimentin (intermediate filaments) did not show any effect of ascites on their organization compared to growth medium. Nevertheless, ascites led to actin cytoskeletal reorganization, reflecting cell retraction. The filamentous actin organization within mesothelial cells shifted from stress fibers and cortical pattern in growth medium to diffuse and more dashed actin staining structures at the membrane periphery in the presence of ascites (Fig. 3A). However, western blot analysis indicated that the intensities of actin bands remained unchanged and only the organization of actin was disturbed whichever ascites was used (Fig. 3B-C). The kinetics of incubation carried out with ASC#4 suggested no change of actin expression over the time (data not shown). Regarding cell anchoring in growth medium, vinculin-based adhesion structures as indentations in staining were localized at the cell membrane shifted to more diffuse intensity and lost organization in the presence of ascites. Ascites induces disorganization of focal contacts and actin cytoskeletal reorganization, which results in retraction of the mesothelial cells.

To understand which signaling pathway could be involved in the reorganization of the actin cytoskeleton by ascites, we assayed Rhotekin-RBD and PAK-PBD activation to test the potential involvement of RhoA, Cdc42 and Rac1. Actin immunofluorescence analysis showed an increase in the number of cells rich in membrane ruffles in ascites compared to the growth medium (Fig. 4A). Indeed ASC#1 and #4 generated more membrane ruffles, but ASC #6 induced a mesenchymal morphology of mesothelial cells. Rac1 activation in ruffles formation has been a firmly established concept in cell biology [28–30]. We found that the staining of Rac1 showed the protein located at the membrane ruffles (Fig. 4A). Rhotekin-RBD and PAK-PBD activation was measured on the mesothelial monolayers after 30 min or 24 h of incubation with growth medium or ascites (#1, #4 or #6). The rate of activation RhoA and Cdc42 proteins was not significantly changed between growth medium and ascites. However, tests showed that the basal activation of Rac1 was low in mesothelial cells, but when these cells were incubated with ascites there was an increase in the activation as early as 30 min (Fig. 4B). This increase in Rac1 activation in cells had increased by 24 h with ASC#1 and #4. Rac 1 activation in cells with the ASC#6 remained constant over time (Fig. 4C).

Ascites causes destabilization of the integrity of mesothelium with a modification of the organization of cell junctions, but without any effect on the synthesis of N-cadherin and ZO-1 by Met-5A cells. Moreover, ascites disorganizes focal contacts and causes actin cytoskeletal reorganization dependent on the activity of Rac1. The latter could be related to the interaction of mesothelial cells with their extracellular microenvironment, in particular ECM proteins.

Ascites contributes to ECM proteins organization of mesothelium

The mesothelium is the favorite site of ovarian cancer metastases, the deposits of proteins ECM is known to promote the implantation of ovarian cancer cells. To visualize and partially characterize the ECM microenvironment of mesothelium, immunofluorescence localization of ECM proteins collagen IV, laminin (basal membrane proteins), fibronectin and fibrinogen (ECM derived plasmatic/ascitic proteins) were followed in mesothelial cells under classical or ascites conditions. Met-5A cells were seeded in growth medium for 5 days until confluent as a monolayer. The medium was removed and the monolayers incubated in fresh growth medium or ascites for 24h followed by different staining of ECM proteins. The mesothelial cells stained for collagen IV, laminin and fibronectin in growth medium, but in ascites this expression increased, and the staining was more intense, dense and associated to a network organization of proteins. Fibrinogen (Fg) and fibrin have been identified on peritoneal lining tissues in mice bearing ascites tumors [22,23]. Thus, staining of Fg showed that the mesothelial cells did not express Fg in growth medium; in ascites, staining of Fg, and more specifically fibrin networks in the mesothelial monolayer, were probably due to an intake of fibrinogen and fibrin from the ascetic fluid (Fig. 5A). Moreover, *in situ* analysis of the xenograft of ovarian cancer cells injected into the peritoneum of the mouse followed by peroxidase staining confirmed the location of Fg near the mesothelium and around the tumor spheroids adhering to it (Fig. 5 B). Thus, ascites allows the densification and the reorganization of mesothelium ECM proteins, especially the fibrinogen/fibrin.

Ascites is a reservoir of fibrinogen and fibrin

The presence of Fg and its polymerized form, fibrin, in ascites was investigated. The Fg concentration was determined by the ELISA test in a panel of 8 ascites samples compared with the growth medium. There was heterogeneity of the Fg concentrations according to the range of ascites from 266 to 1,725 µg/ml, the highest concentration approaching that found in the human plasma (2,000 to 4,000 µg/ml) [31] (Fig. 6A). These fluctuating concentrations reflect the heterogeneity of ascites composition to the source of sample. As expected, growth medium supplemented with 10% FCS did not contain fibrinogen (Fig. 6A). However, the presence of Fg is insufficient to justify the presence of its polymerized form, fibrin. Thus, thrombin, the main effector of Fg polymerization, was also explored by ELISA assay. Thrombin were present in ascites (#1, #2, #3, #4 and #5) at high concentrations, but significantly lower than for growth medium (Fig. 6B). The presence of Fg was also investigated in the panel of 8 ascites samples (and growth medium) by immunoblotting. As shown in a representative western blot, fibrinogen was detected in all the samples, with different band intensities according to the ascites, but not in growth medium. Fg was detected by the presence of 3 bands between 48 and 75 kDa, representative of the 3 pairs of α , β and γ polypeptide chains that constitute the fibrinogen molecule. Moreover, bands of ~85/97 kDa characteristic of γ - γ dimers structures of crosslinked fibrin were present. The proteolysis of fibrin crosslinked by plasmin leads to the DD fragment (D-Dimer consisting of the D domains of 2 fibrin molecules crosslinked by their γ chains) and to the E fragment (central E domain). The bands of E fragment ~ 40/44 kDa and the degraded fibrinogen have also been detected, which presumes the presence of protagonists of fibrinolysis occurring in ascites (Fig. 6C). These results demonstrate the presence of fibrinogen, thrombin and fibrin in human ascites and show that mechanisms of Fg polymerization and fibrinolysis occur in ovarian cancer ascites.

Fig.s. 5 and 6 show the different ascites that are the source of fibrinogen and fibrin, which could be reorganized by mesothelial cells. These fibrin networks were analyzed by SEM when the mesothelial monolayers were incubated with growth medium or different ascites (#2, #5 or #6) for 24h. Our observations confirmed the absence of fibrin networks when mesothelial cells were incubated in growth medium, but heterogenous networks related to the different ascites used both in terms of quantity and organization were observed (Fig. 7A). SEM indicated that the networks had well organized fibers (Fig. 7A, magnification, white arrow). Correlative Light-Electron Microscopy

(CELM) confirmed, by Fg staining, that the networks correlated to fibrin networks (Fig. 7B). Thus, ascites is a source of Fg and fibrin which deposit on and organize networks on in the mesothelium.

Furthermore, ovarian carcinoma dissemination is partly due to spheroids that become released within the peritoneal cavity before implantation into the mesothelium. As shown in Fig. 6, the different ascites were a source of fibrinogen and fibrin that could be reorganized by the ovarian cancer cells. Paraffin sections of spheroids isolated from patient ascites were also analyzed for Fg/fibrin expression. Peroxidase staining confirmed the location of Fg at the periphery and inside spheroids *in situ* (Fig. 8A).

Ascites action of Fg and its polymerized form, fibrin, on tumor spheroid formation has been investigated. Ovarian tumor spheroids were generated *in vitro* using the "Hanging Drop" technique (see Materials and Methods) in growth medium or ascites. Their formation was monitored over 5 days. To investigate and visualize the expression and organization of Fg within spheroids, we used immunofluorescence staining on spheroids generated in ascites. Fg was also present and organized in a network with fibrils at the surface of spheroids (Fig. 8B). Expression of Fg showed the protein is provided by ascites because the SKOV3 cells themselves do not express fibrinogen in growth medium. Fluorescent staining showed the specific presence of fibrinogen, but SEM analysis showed a network organization evocative of the organization in fibrin deposition on the surface of the spheroids, probably brought by ascites (Fig. 8C). These results indicate that ascites is a source of Fg and fibrin surrounding spheroids, which could be involved in their implantation on the mesothelium, favoring metastatic spread.

Ascites promotes integrin-dependent disaggregation of ovarian cancer spheroids and clearance of mesothelial cells

To access the underlying connective tissue of mesothelium and effectively establish metastasis, spheroids were initially implanted into the peritoneal mesothelium ECM matrix. As mesothelial cells express Fn, and ascites brought Fg proteins, which deposited and organized fibrin networks on the mesothelium. To study the anchorage of tumor spheroids on the mesothelium, we first explored the ability of spheroids to interact and disaggregate on Fn, Fg and fibrin, i.e. the ability of spheroids to attach to Fn or Fg proteins in ascitic tumor conditions was measured. Spheroids were deposited on glass coverslips (control) or others coated with Fn or Fg or left in a fibrin gel for 24 h in growth medium or ascites. In the growth medium, spheroids adhered to the surfaces, but they disaggregated better on Fn coated coverslips. Under ascites conditions, spheroids became more disaggregated on all surfaces compared to growth medium (Fig. 9A). Spheroids were able to adhere and disaggregate on different matrix proteins found on the mesothelium and its microenvironment. The disaggregation of spheroids was greater in ascites.

As previously demonstrated, integrins and, more particularly, α_v and $\alpha_5\beta_1$ play a key role in the behavior of ovarian cancer cells [34,35]. Thus, spheroids were pre-incubated overnight with the 2 integrin antagonists. The first, commonly used C(-RGDfc), is a blocking peptide specific to α_v integrins, and the second, Cilengitide, is specific to $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. Following incubation with integrin antagonists, spheroids were deposited on Fn or Fg coating with growth medium or ascites. After 24h incubation, the surface areas (μm^2) of Fn or Fg disaggregation were measured. As described above, regarding spheroids without peptides (ctrl), it was confirmed that ascites favored their disaggregation compared to the growth medium on Fn and Fg coatings. In growth medium, addition of the C(-RGDfc) peptide (RGD) decreased disaggregation on Fn and Fg coatings, respectively by 15.7 and 36.6%. Cilengitide significantly reduced spheroid disaggregation on Fn and Fg coatings, respectively by 78.7 and 76.2%. In ascites, the presence of RGD significantly decreased the ability of spheroids to disaggregate on Fn or Fg, respectively by 67.5 and 41.4%. Whereas cilengitide drastically inhibited spheroid disaggregation on Fn or Fg, respectively by 77.4 and 95.3% (Fig. 9B).

A three-dimensional model in fibrin gel was prepared to follow disaggregation of spheroids and the invasion of ovarian cancer cells. Spheroids were pre-incubated with the blocking peptides C (-RGDfc) peptide or cilengitide, or without peptides as the control. Spheroids enclosed in fibrin gels were incubated with growth medium or ascites. Those embedded in fibrin gels could disperse under growth medium and ascites conditions after 24 h incubation. However, the blocking peptides seem to have reduced the disaggregation in fibrin gels (Fig. 9C). At 24h, the surface areas (μm^2) of spheroids disaggregation were measured. In growth medium conditions, compared to the control, addition of RGD or cilengitide significantly inhibited the disaggregation and invasion, respectively by 59,7 and 73,1%. In ascites, RGD and cilengitide triggered a similar and a significant reduction of invasion of 55% compared to the control (Fig. 9D).

These results show the "affinity" of tumor spheroids for Fg/fibrin/Fn. Disaggregation of spheroids and the invasion of ovarian cancer cells are dependent on integrin-ECM interactions; in this way, the αV and α5 integrin families seem particularly involved in the disaggregation of spheroids.

To mimic the *in vivo* context, a suitable model of co-culture was developed to assess spheroids cell adhesion/interaction to the mesothelial monolayer to get closer to the pathological conditions of peritoneal implantation. Spheroids were directly allowed to adhere for 6 or 24h to confluent mesothelial cells in growth medium or ascites. Unlike in growth medium, immunofluorescent staining of the Fg showed that the spheroids were entangled in a Fg network in ascites conditions by 6h (Fig. 10A). SEM acquisitions confirmed the presence of fibrin network around spheroids with the ascites. Fibrin acts as an adhesive matrix which allows the spheroids to adhere to the mesothelium. Cancer cells could leave the spheroids and adhere to the mesothelium (Fig. 10B, black arrow). After 24h, the spheroids were able to adhere and disaggregate on the mesothelial monolayer with growth medium or ascites. Under ascites conditions, the spheroids disaggregated faster than in the culture medium, and the cells migrated through the mesothelial monolayer (Fig. 10C).

Transmigration and invasion of ovarian cancer cells through mesothelial cells could be promoted by ascites. Ascites is a component of the peritoneal microenvironment that can act on both cell types, weakening the mesothelium and making cancer cells more invasive reinforcing mesothelial transmigration and invasion of the underlying tissue. In the co-culture model, tumor spheroids were directly allowed to adhere for 6h to confluent mesothelial cells in ascites. SEM analysis showed a destabilization of the underlying mesothelial monolayer and the cells seemed to be "pushed" by the spheroid (Fig. 11A), a phenomenon known as clearance [36]. To observe this mechanism, the cells of the mesothelial monolayer were stained by the incorporation of nanoparticles (NPs) before unstained spheroids were placed on it and the co-culture incubated with growth medium or ascites for 24 h. The loss of fluorescence from the monolayer gave evidence of mesothelial clearance by the spheroids. Staining of the nuclear DNA with DAPI confirmed that ascites favored the disaggregation of the spheroids (Fig. 11B). Moreover, mesothelial cells staining with NPs showed the absence of fluorescence, and therefore of mesothelial cells, at the location of the spheroid. This suggests that there was a clearance mechanism in addition to the implantation process. Clearance was favored by ascites compared to growth medium (Fig. 11B). An integrin blocking experiment with their antagonists was carried out to study the involvement of integrins. Spheroids were pre-incubated with the blocking peptides C (-RGDfc) peptide or cilengitide, or without peptides as the control. They were deposited on the NP-staining mesothelial monolayers and incubated with growth medium or ascites. At 24h, the areas non-strained were measured (μm^2). In growth medium conditions, compared to the control, addition of RGD or cilengitide significantly inhibited the clearance, respectively by 71.3 and 72.6%. In ascites, RGD triggered a significant reduction of clearance by 64.2%, whereas cilengitide inhibited more drastically the clearance by 97.1% (Fig. 11C).

Fibrin in ascites allows the adhesion of ovarian cancer spheroids to the mesothelium and ascites promotes their disaggregation, followed by clearance of mesothelial cells. These results show the involvement of the α_V and $\alpha_5\beta_1$ integrin family in the mesothelium clearance by ovarian cancer spheroids.

DISCUSSION

Ovarian cancer progression is frequently associated with the development of malignant ascites. Spheroids shedding from the primary tumor found within ascites are thought to promote peritoneal carcinomatosis. We have explored the influence of ascites on ovarian cancer spheroid implantation and dissemination on the peritoneal mesothelium. First, several ascites were analyzed and the different results highlighted their heterogeneity. Ascites contains fibrinogen and its activator, thrombin, with some Fg concentrations approaching those found in plasma. The high levels of circulating fibrinogen and the permeability of the vessels leads to an extravasation of fibrinogen into the peritoneal cavity. Plasma fibrinogen levels rise in inflammatory conditions, in the presence of ovarian cancer [19]. Elevated levels of Fg can be explained by an overactivation of the coagulation pathway induced in response to the activation of the immune system to counter the tumor, which gives a pro-coagulant tumor phenotype [21]. When the tumor is in hypoxia, the tissues respond by overexpressing proteins involved in coagulation and fibrinolysis, which promotes the polymerization of Fg into Fibrin [37]. We have shown that ascitic fluid contains fibrin. Schneider et al. [10] showed that vitronectin in plasma is a powerful factor promoting cancer cell migration and is chaperoned by fibrinogen [38]. Vitronectin is found in ascites, as in plasma. Ascites is also rich in fibrinogen, which suggests an interaction between the 2 proteins, as in plasma.

In mice, the presence of fibrin deposition on the surface of the peritoneal cavity where ovarian cancer cells get trapped has been described [22,23]. After injection of tumor cells, the initial change seen is microvascular hyperpermeability to circulating macromolecules, followed by extravasation of plasma fibrinogen and its coagulation with crosslinked fibrin. Fibrin deposition is harmful in the case of peritoneal dissemination because it traps metastasizing tumor cells. These metastatic deposits become vascularized by the elevation of VEGF-A and IL-8 [22,23].

Ascites is a source of Fg and fibrin, which deposit and organize in networks on the mesothelium. Fg and fibrin seem to be key elements in the creation of a suitable microenvironment for ovarian cancers and play a key role in the development of metastatic niches.

We also set out to follow its impact on the privileged site of metastasis, the mesothelium, and on spheroid formation. Disturbances occur on the mesothelial cell cycle and/or cell death due to ascites. Ascites alters the homeostasis of the mesothelium, probably favoring the anchorage and metastasis of cancer cells. Ascites destabilizes the mesothelial monolayer with the modification of ZO-1 and N-cadherin junctions. The modification of the organization of these cell junction proteins may be a consequence of the rearrangement of the actin cytoskeleton following the modification of expression of the Rac1 pathway [39,40]. Mesothelial cells exposed to malignant ascites from type I tumors (clear and endometrioid cells) do not change their expression of E-cadherin (adherent junctions), occludin (tight junctions) and desmoglein (desmosome), but decreased expression of Connexin 43 (GAP junctions). On the other hand, the mesothelial cells subjected to a type II malignant ascites (serous and undifferentiated) are characterized by a significant reduction in the expression of the junctions intercellular tested [41]. We also show disorganization of focal contacts and actin cytoskeletal reorganization by ascites, which result in a retraction of the mesothelial cells. Moreover, ascites enhances modification and densification of ECM network on mesothelium, which illustrates the remodeling of the mesothelial microenvironment suitable for tumor cell implantation.

Moreover, the properties of senescent cells favor cancer progression. Ksiazek et al. [42] have demonstrated the presence of senescent human peritoneal mesothelial cells near cancerous tissue, which could allow the formation of a metastatic niche that facilitates intraperitoneal growth of malignant tumors. In this senescence process, ascites plays an important role, as there is an increase in senescence of mesothelial cells exposed to malignant ascites [43,44]. To summarize, our results on the destabilizations of cell-cell and cell-MEC interactions disturbed the mesothelial monolayer, making it fragile and facilitating the implantation of cancer cells.

To mimic three-dimensional free-floating ovarian cancer spheroids, the hanging drop technique was used. This approach demonstrated that ascites improves the capacity of ovarian cancer cells to form spheroids when they are maintained in a culture state independent of anchoring. The use of another culture model previously established to generate spheroids in non-adherent conditions, i.e. when the culture flasks were covered with agarose, showed similar results of the formation and compaction of spheroids between ascites and growth medium [12]. However, the spheroids were of different sizes, heterogeneous shapes and different states of compaction, which did not allow them to be used for reproducible experiments. The hanging-drop technique ensured seeding at a homogeneous cell density, which allows reproducible results. Our spheroids were generated with the SKOV3 cell line; however, we also produced spheroids with the IGROV1 cell line but they were much less compact. The formation of compact spheroids is stronger when comprised of ovarian cell lines that already had a mesenchymal phenotype [45]. Indeed, the exposure of ovarian cancer cell lines to ascites leads to changes in cellular morphologies. Within ascites, IGROV1 cells harbor an epithelial phenotype, whereas SKOV3 cells initially harboring an intermediate mesenchymal phenotype strengthen their mesenchymal markers [46]. Mesenchymal cell lines also have a higher migratory and invasive capacity than those of cell lines which did not form compact spheroids; indeed the SKOV3 line is more invasive than the IGROV1 line [45,46]. Matte et al. [47] found mesothelial cells at the center of the spheroids (*in vivo* and *in vitro* with the hanging-drop technique), which makes the spheroids more compact. Ascites promotes the compaction of spheroids, but is also a source of flaking mesothelial cells that become incorporated into the spheroids and also promote compaction. In these "hybrid" spheroids there is a strong expression of $\beta 1$ integrins, which would promote attachment to the mesothelium. The three-dimensional organization of compact spheroids leads to poor delivery of the chemotherapeutic agents to the inner of the spheroids and subsequently chemoresistance [45].

Characterization of spheroids by fluorescent analysis detects the presence of fibrinogen. In a previous study [12] we showed the role of Vn and their integrins receptors in the initial formation of spheroid. Under ascites conditions the spheroids express and aggregate various matrix proteins on their surface, and these might be involved in their implantation on the mesothelium, which would favor metastasis.

Moreover, characterization of the mesothelial extracellular matrix proteins by immunofluorescent staining showed the presence of fibronectin, laminin, vitronectin and fibrinogen, and their remodeling on networks in ascites. The disaggregation of spheroids on different coatings of fibronectin and fibrinogen (proteins present on the mesothelium) have showed that ascites promotes this disaggregation. Blockade of integrins by the RGD peptide and cilengitide reduced the disintegration of the spheroids on the different matrices. Kenny et al. [48] have shown that blocking the production of fibronectin by mesothelial cells leads to decreased adhesion, invasion, proliferation and metastasis of single ovarian cancer cells. The authors also showed that inhibition of the interaction of integrins $\alpha 5$ and $\beta 1$ with fibronectin blocks the initial and late stages of metastases. *In vitro*, like our results, spheroids were completely disaggregated on type I collagen substrates. In addition, a monoclonal antibody against the $\beta 1$ integrin subunit significantly inhibited spheroid disaggregation on all of the proteins tested (laminin, fibronectin, collagen IV) [49]. Spheroids isolated from patient ascites have completely disaggregated with the components of the extracellular matrix (laminin, fibronectin, collage I, collagen IV and hyaluronan) [3]. Adhesion of spheroids to hyaluronic acid

expressed by mesothelial cells can be directed by CD44 expressed on the surface of spheroids derived from patients [25]. The absence of CD44 expression can decrease spheroid formation [50]

These results, in agreement with ours, prove the importance of ECM proteins expressed on the surface of mesothelium or by spheroids during the stages of metastasis of ovarian cancer and the involvement of integrins in these mechanisms.

In vitro, we showed that ascites promotes the dispersion of spheroids on the mesothelial monolayer. After implantation *in vivo*, the spheroids could "push aside" mesothelial cells and gain access pass through it (transmesothelial migration) to access the underlying tissues to form metastases [51]. Iwanicki et al. [36] have shown that blocking the expression of talin I in cancerous spheroids inhibits the clearance of mesothelial cells. In addition, the recruitment of talin I seems necessary for the clearance of mesothelial cells generated by myosin. Blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin in ovarian cancer cells decreases mesothelial cell clearance, whereas overexpression of $\alpha 5\beta 1$ integrin increases their clearance. Together these data show that ovarian cancer spheroids "push aside" mesothelial cells dependent on $\alpha 5\beta 1$ integrins and talin. Ours results corroborate the involvement of the $\alpha 5\beta 1$ and show the involvement of αV integrin family in mesothelium clearance by ovarian cancer cell spheroids. Cilengitide is a cyclic RGD pentapeptide used for the treatment of glioblastomas and is being studied for treatment of several other tumors. This drug is the first small anti-angiogenic molecule targeting integrins $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ and $\alpha 5\beta 1$. With ascites, cilengitide has a better efficacy, which can be explained in ascites by the focal contacts being destabilized; it may be a redeployment of these integrins which makes them more accessible to cilengitide under these conditions.

The use of a 3D model is essential in the study ovarian cancer, especially cancer metastasis processes *in vitro*. The co-culture model developed between healthy mesothelial monolayer cells and ovarian cancer spheroids allowed us to follow the effect of ascites on the disaggregation of spheroids on the mesothelium and the clearance of the mesothelial monolayer. This 3D co-culture model mimics the early stages of peritoneal implantation and comes closer to *in vivo* conditions. In ovarian cancer, a high level of chemoresistance occurs and a difference in sensitivity to treatments between cells in 2D and 3D models has been demonstrated. It is therefore necessary to test drugs on cancer cells when they are in a 3D model that mimics the *in vivo* context [52,53]. In addition, the composition of the matrix of this model plays a role both in the composition and in the quantity of the matrix elements. Our results that show different responses to the presence of fibrinogen and fibrin in ascites, neighboring the mesothelium and around the spheroids, indicates the importance of this protagonist. Moreover, cancer cells can invade fibrin gels. Fibrin serves as a temporary matrix to facilitate neovascularization and the proliferation of fibroblasts [54]. This is why it is important to include this protagonist in the 3-dimensional modeling of co-cultures. The importance of models approaching the *in vivo* context is the use the most cellular and acellular protagonists found in the microenvironment. *In vitro* 3D models can screen different drugs and measure their effects on cancer and healthy cells. In addition, the model can be made more complex by the addition of subsequent conjunctive cells, such as fibroblasts or even adipocytes; indeed, several studies show the involvement of these non-cancer cells in metastasis of ovarian cancer [55–58].

Acknowledgments

This work was supported by the "Ligue Contre le Cancer, comité du Val d'Oise, France". The authors thank MecuP group members for constructive discussions. The authors thank Dr. Andreas Reich from "Laboratoire de

Bioimagerie et Pathologies” (UMR CNRS 7021) for obtaining of his nanoparticles. This work was realized by the facilities of the “Plateforme Microscopies & Analyses, Federation I-Mat (FR4122) of the University of Cergy-Pontoise (France)”. The authors thank Dr. Mathilde Hindié, from the “Laboratoire ERRMECe”, for her technical assistance. The manuscript was revised by Biomedes, for English language editing.

References

1. Kipps E, Tan DSP, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer*. 2013;13: 273–282. doi:10.1038/nrc3432
2. Heyman L, Kellouche S, Fernandes J, Dutoit S, Poulain L, Carreiras F. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2008;29: 231–244. doi:10.1159/000152941
3. Burleson KM, Boente MP, Pambuccian SE, Skubitiz APN. Disaggregation and invasion of ovarian carcinoma ascites spheroids. *J Transl Med*. 2006;4: 6. doi:10.1186/1479-5876-4-6
4. Shield K, Ackland ML, Ahmed N, Rice GE. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol*. 2009;113: 143–148. doi:10.1016/j.ygyno.2008.11.032
5. Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest*. 2008;118: 1367–1379. doi:10.1172/JCI33775
6. Ayhan A, Gultekin M, Taskiran C, Dursun P, Firat P, Bozdag G, et al. Ascites and epithelial ovarian cancers: a reappraisal with respect to different aspects. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc*. 2007;17: 68–75. doi:10.1111/j.1525-1438.2006.00777.x
7. Tan DSP, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol*. 2006;7: 925–934. doi:10.1016/S1470-2045(06)70939-1
8. Puiffe M-L, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, Tonin PN, et al. Characterization of Ovarian Cancer Ascites on Cell Invasion, Proliferation, Spheroid Formation, Gene Expression in an In Vitro Model of Epithelial Ovarian Cancer. *Neoplasia*. 2007;9: 820-IN8. doi:10.1593/neo.07472
9. Lane D, Goncharenko-Khaider N, Rancourt C, Piché A. Ovarian cancer ascites protects from TRAIL-induced cell death through $\alpha\beta 5$ integrin-mediated focal adhesion kinase and Akt activation. *Oncogene*. 2010;29: 3519–3531. doi:10.1038/onc.2010.107
10. Carduner L, Agniel R, Kellouche S, Picot CR, Blanc-Fournier C, Leroy-Dudal J, et al. Ovarian cancer ascites-derived vitronectin and fibronectin: combined purification, molecular features and effects on cell response. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830: 4885–4897. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.023
11. Gong L, Zheng Y, Liu S, Peng Z. Fibronectin Regulates the Dynamic Formation of Ovarian Cancer Multicellular Aggregates and the Expression of Integrin Receptors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 [cited 6 Nov 2018]. doi:10.22034/APJCP.2018.19.9.2493
12. Kellouche S, Fernandes J, Leroy-Dudal J, Gallet O, Dutoit S, Poulain L, et al. Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin. *Tumor Biol*. 2010;31: 129–139. doi:10.1007/s13277-010-0017-9
13. Carduner L, Picot CR, Leroy-Dudal J, Blay L, Kellouche S, Carreiras F. Cell cycle arrest or survival signaling through αv integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Exp Cell Res*. 2014;320: 329–342. doi:10.1016/j.yexcr.2013.11.011
14. Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1997;57: 2388–2393.
15. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*. 2010;177: 1053–1064. doi:10.2353/ajpath.2010.100105
16. Ren J, Xiao Y, Singh LS, Zhao X, Zhao Z, Feng L, et al. Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2006;66: 3006–3014. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1292
17. Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, DeFranzo B, Kim Y, Ottensmeier C. Binding of Ovarian Cancer Cells to Peritoneal Mesothelium in Vitro Is Partly Mediated by CD44H. *Cancer Res*. 1993;53: 3830–3838.
18. Strobel T, Swanson L, Cannistra SA. In Vivo Inhibition of CD44 Limits Intra-Abdominal Spread of a Human Ovarian Cancer Xenograft in Nude Mice: A Novel Role for CD44 in the Process of Peritoneal Implantation. *Cancer Res*. 1997;57: 1228–1232.
19. Luo Y, Kim HS, Kim M, Lee M, Song YS. Elevated plasma fibrinogen levels and prognosis of epithelial ovarian cancer: a cohort study and meta-analysis. *J Gynecol Oncol*. 2017;28. doi:10.3802/jgo.2017.28.e36
20. Tempelhoff G-F von, Heilmann L, Hommel G. Correspondence re: N. C. Denko and A. J. Giaccia, Tumor Hypoxia, the Physiological Link between Trousseau’s Syndrome (Carcinoma-induced Coagulopathy) and Metastasis. *Cancer Res*. 2001;61: 795–798, 2001. *Cancer Res*. 2001;61: 7697–7698.
21. Caine GJ, Stonelake PS, Lip GYH, Kehoe ST. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia N Y N*. 2002;4: 465–473. doi:10.1038/sj.neo.7900263
22. Nagy JA, Meyers MS, Masse EM, Herzberg KT, Dvorak HF. Pathogenesis of ascites tumor growth: fibrinogen influx and fibrin accumulation in tissues lining the peritoneal cavity. *Cancer Res*. 1995;55: 369–375.
23. Nagy JA, Masse EM, Herzberg KT, Meyers MS, Yeo KT, Yeo TK, et al. Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation. *Cancer Res*. 1995;55: 360–368.

24. Poulouin L, Gallet O, Rouahi M, Imhoff JM. Plasma fibronectin: three steps to purification and stability. *Protein Expr Purif.* 1999;17: 146–152. doi:10.1006/prep.1999.1103
25. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp JoVE.* 2011. doi:10.3791/2720
26. Paul-Gilloteaux P, Heiligenstein X, Belle M, Domart M-C, Larjani B, Collinson L, et al. eC-CLEM: flexible multidimensional registration software for correlative microscopies. *Nat Methods.* 2017;14: 102–103. doi:10.1038/nmeth.4170
27. Andreiuk B, Reisch A, Lindecker M, Follain G, Peyri ras N, Goetz JG, et al. Fluorescent Polymer Nanoparticles for Cell Barcoding In Vitro and In Vivo. *Small Weinh Bergstr Ger.* 2017;13. doi:10.1002/sml.201701582
28. Aspenstr m P, Fransson  , Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 2004;377: 327–337. doi:10.1042/bj20031041
29. Chhabra ES, Higgs HN. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol.* 2007;9: 1110–1121. doi:10.1038/ncb1007-1110
30. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9: 690–701. doi:10.1038/nrm2476
31. Oswald MW, Hunt HH, Lazarchick J. Normal range of plasma fibrinogen. *Am J Med Technol.* 1983;49: 57–59.
32. Pretorius E, Vieira WA, Oberholzer HM, Auer REJ. Comparative Scanning Electron Microscopy of Platelets and Fibrin Networks of Human and Different Animals. *Int J Morphol.* 2009;27: 69–76. doi:10.4067/S0717-95022009000100013
33. Shahid S, Iman A, Matti U, Rachid K, Assaf A, Eveno C, et al. Fibrin Deposit on the Peritoneal Surface Serves as a Niche for Cancer Expansion in Carcinomatosis Patients. *Neoplasia N Y N.* 2019;21: 1091–1101. doi:10.1016/j.neo.2019.08.006
34. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2010;10: 9–22. doi:10.1038/nrc2748
35. Kobayashi M, Sawada K, Kimura T. Potential of Integrin Inhibitors for Treating Ovarian Cancer: A Literature Review. *Cancers.* 2017;9. doi:10.3390/cancers9070083
36. Iwanicki MP, Davidowitz RA, Ng MR, Besser A, Muranen T, Merritt M, et al. Ovarian Cancer Spheroids Use Myosin-Generated Force to Clear the Mesothelium. *Cancer Discov.* 2011;1: 144–157. doi:10.1158/2159-8274.CD-11-0010
37. Tumor Hypoxia, the Physiological Link between Trousseau's Syndrome (Carcinoma-induced Coagulopathy) and Metastasis | Cancer Research. [cited 14 Aug 2019]. Available: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/61/3/795>
38. Schneider G, Bryndza E, Poniewierska-Baran A, Serwin K, Suszynska M, Sellers ZP, et al. Evidence that vitronectin is a potent migration-enhancing factor for cancer cells chaperoned by fibrinogen: a novel view of the metastasis of cancer cells to low-fibrinogen lymphatics and body cavities. *Oncotarget.* 2016;7. doi:10.18632/oncotarget.12003
39. Ruiz-Lafuente N, Minguela A, Parrado A. DOCK9 induces membrane ruffles and Rac1 activity in cancer HeLa epithelial cells. *Biochem Biophys Rep.* 2018;14: 178–181. doi:10.1016/j.bbrep.2018.05.004
40. Kurokawa K, Itoh RE, Yoshizaki H, Nakamura YOT, Matsuda M. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol Biol Cell.* 2004;15: 1003–1010. doi:10.1091/mbc.e03-08-0609
41. Mikula-Pietrasik J, Uruski P, Szubert S, Szpuren D, Sajdak S, Tykarski A, et al. Malignant ascites determine the transmesothelial invasion of ovarian cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;92: 6–13. doi:10.1016/j.biocel.2017.09.002
42. Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Korybalska K, Dworacki G, J rres A, Witowski J. Senescent Peritoneal Mesothelial Cells Promote Ovarian Cancer Cell Adhesion. *Am J Pathol.* 2009;174: 1230–1240. doi:10.2353/ajpath.2009.080613
43. Mikula-Pietrasik J, Uruski P, Sosińska P, Maksin K, Piotrowska-Kempisty H, Kucińska M, et al. Senescent peritoneal mesothelium creates a niche for ovarian cancer metastases. *Cell Death Dis.* 2016;7: e2565–e2565. doi:10.1038/cddis.2016.417
44. Mikula-Pietrasik J, Uruski P, Pakula M, Maksin K, Szubert S, Woźniak A, et al. Oxidative stress contributes to hepatocyte growth factor-dependent pro-senescence activity of ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med.* 2017;110: 270–279. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.06.015
45. Sodek KL, Murphy KJ, Brown TJ, Ringuette MJ. Cell-cell and cell-matrix dynamics in intraperitoneal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31: 397–414. doi:10.1007/s10555-012-9351-2
46. Carduner L, Leroy-Dudal J, Picot CR, Gallet O, Carreiras F, Kellouche S. Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal spectrum in ovarian cancer cells: enhancement of their invasive behavior partly dependant on av integrins. *Clin Exp Metastasis.* 2014;31: 675–688. doi:10.1007/s10585-014-9658-1
47. Matte I, Legault CM, Garde-Granger P, Laplante C, Bessette P, Rancourt C, et al. Mesothelial cells interact with tumor cells for the formation of ovarian cancer multicellular spheroids in peritoneal effusions. *Clin Exp Metastasis.* 2016;33: 839–852. doi:10.1007/s10585-016-9821-y
48. Kenny HA, Chiang C-Y, White EA, Schryver EM, Habis M, Romero IL, et al. Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *J Clin Invest.* 2014;124: 4614–4628. doi:10.1172/JCI74778
49. Burleson KM, Hansen LK, Skubitz APN. Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21: 685–697.
50. Gao Y, Foster R, Yang X, Feng Y, Shen JK, Mankin HJ, et al. Up-regulation of CD44 in the development of metastasis, recurrence and drug resistance of ovarian cancer. *Oncotarget.* 2015;6: 9313–9326. doi:10.18632/oncotarget.3220
51. Davidowitz RA, Iwanicki MP, Brugge JS. In vitro Mesothelial Clearance Assay that Models the Early Steps of Ovarian Cancer Metastasis. *J Vis Exp.* 2012 [cited 6 Nov 2018]. doi:10.3791/3888

52. Hogg SJ, Evans JJ, Sykes PH, Chitcholtan K. A method to investigate the anti-metabolic activity of anti-cancer agents on ovarian cancer cells cultured in a 96-well high throughput format. *J Ovarian Res.* 2015;8. doi:10.1186/s13048-015-0172-0
53. Loessner D, Rockstroh A, Shokoohmand A, Holzapfel BM, Wagner F, Baldwin J, et al. A 3D tumor microenvironment regulates cell proliferation, peritoneal growth and expression patterns. *Biomaterials.* 2018;190–191: 63–75. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.10.014
54. van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936: 426–437. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03526.x
55. Gao Q, Yang Z, Xu S, Li X, Yang X, Jin P, et al. Heterotypic CAF-tumor spheroids promote early peritoneal metastasis of ovarian cancer. *J Exp Med.* 2019;216: 688–703. doi:10.1084/jem.20180765
56. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 2013;1831: 1533–1541. doi:10.1016/j.bbalip.2013.02.010
57. Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011;17: 1498–1503. doi:10.1038/nm.2492
58. Ladanyi A, Mukherjee A, Kenny HA, Johnson A, Mitra AK, Sundaresan S, et al. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene.* 2018;37: 2285–2301. doi:10.1038/s41388-017-0093-z

Fig. 1: Ascites effects on viability and cell cycle of mesothelial cells.

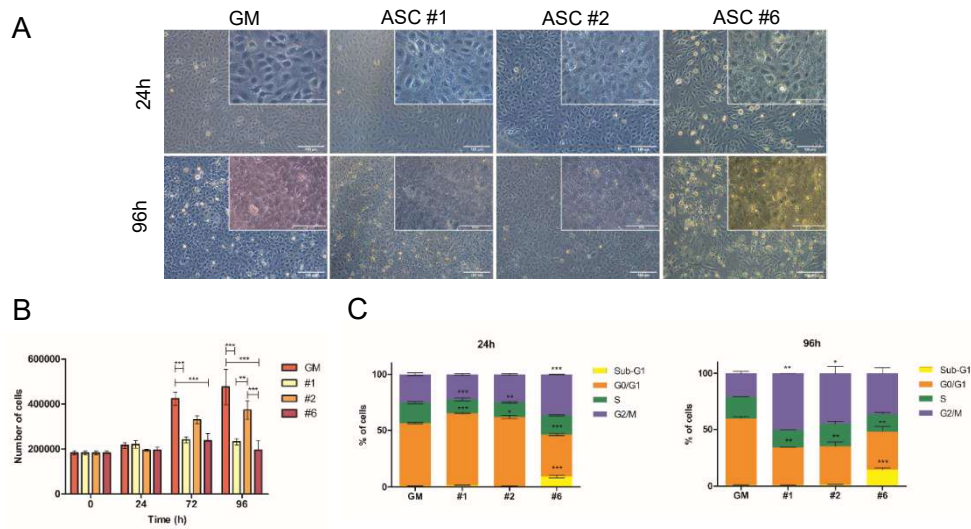


Fig. 1: Ascites effect on viability and cell cycle of mesothelial cells. Confluent mesothelial monolayers were incubated with growth medium (GM) or ascites (#1, #2 or #6) for 24h, 72h or 96h. (A) Representative light micrographs were taken at 24h and 96h. Scale bar is 100 μm and 50 μm for magnification. (B) The number of viable cells was measured by the trypan-blue exclusion test at 24h, 72h and 96h. Results are representative of at least three independent experiments and are expressed as mean ± SEM. P-values were calculated by paired one-way ANOVA test (**P<0.01, ***P<0.001) with significant differences estimated by comparison GM vs Ascites. (C) Cell cycle analysis of Met-5A cells after incubated with GM or ascites for 24 or 96h. Cells were stained with propidium iodide and analyzed in a flow cytometer. Results are representative of at least three independent experiments and are expressed as mean ± SEM. The percentage of cell cycle distribution in Sub-G1, G0/G1, S and G2/M phases were determined with BD Accuri C6 Plus Software. P-values were calculated by paired one-way ANOVA test (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) with significant differences estimated by comparison GM vs Ascites #1, #2, or #6.

Fig. 2 : Ascites effect on the mesothelium integrity.

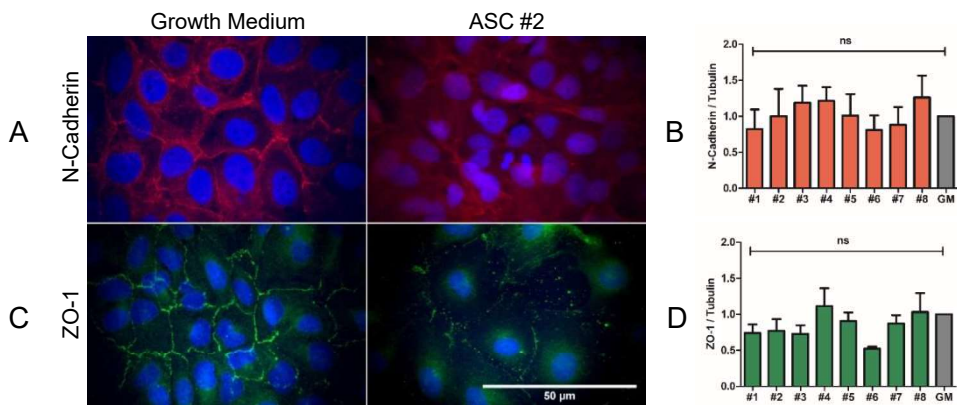


Fig. 2: Ascites effect on the mesothelium integrity. Immunofluorescent staining of N-Cadherin (A) or ZO-1 (C) expressed by monolayer of Met-5A cells after 24h of incubation with growth medium (GM) or ascites (#2). Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar is 50 μm. Met-5A monolayers were incubated with growth medium (GM) or ascites (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7 and #8) for 24h to test the all ascites samples. Representative Western blot for N-Cadherin (B) or ZO-1 (D) expression in Met-5A cells were analyzed. Equal amounts of total protein (10 μg) were separated on SDS-PAGE under reducing conditions. Tubulin was used as a loading control. Results are given as relative fold change of N-Cadherin or ZO-1 in comparison to tubulin. Data are representative of three independent experiments. P-values were calculated by paired one-way ANOVA test with no significant (ns) differences estimated by comparison GM vs Ascites.

Fig. 3 : Ascites effect on the cytoskeleton and anchorage of mesothelial cells.

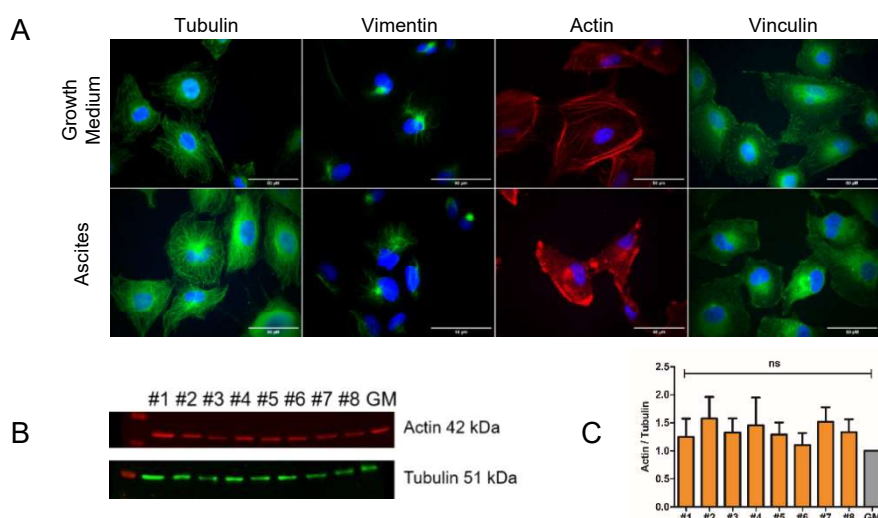


Fig. 3: Ascites effect on the cytoskeleton and anchorage of mesothelial cells. (A) Immunofluorescent staining of Tubulin, Vimentin, Actin and Vinculin expressed by Met-5A cells after 24h of incubation with growth medium (GM) or ascites. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar is 50 μ m. (B) Met-5A monolayers were incubated with growth medium or ascites (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7 and #8) for 24h to test the all ascites samples. Representative Western blot for actin expression in Met-5A cells was analyzed by western blot. Equal amounts of total protein (10 μ g) were separated on SDS-PAGE under reducing conditions. Tubulin was used as a loading control. (C) Relative fold change of actin in comparison to tubulin. Data are representative of three independent experiments. P-values were calculated by paired one-way ANOVA test with no significant (ns) differences estimated by comparison GM vs Ascites.

Fig. 4: Ascites effect on effector of actin dynamics : Rac1

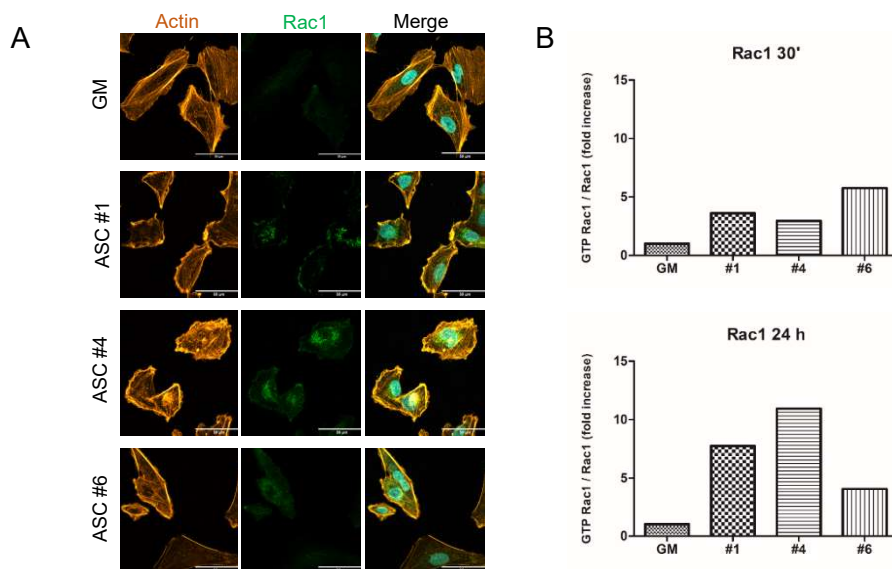


Fig. 4: Ascites effect on effector of actin dynamics: Rac1. Met-5A cells were incubated for 30 minutes or 24 hours with growth medium (GM) or ascites (#1, #4 or #6). (A) Immunofluorescent staining of Rac1 expressed in Met-5A cells. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar is 50 μ m. (B) Relative fold of activated Rac1 in comparison to the total protein were given by western blot after Rac1 pull-down activation assay. Representative data of three independent experiments.

Fig. 5 : Ascites effect on the expression of matrix proteins of the mesothelial monolayer.

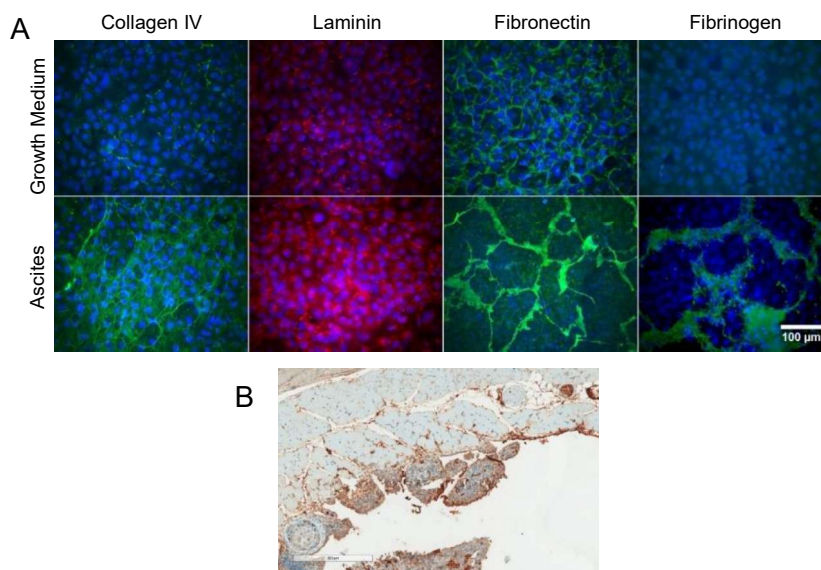


Fig. 5: Ascites effect on the expression of matrix proteins of the mesothelial monolayer. (A) Immunofluorescent staining of Collagen IV, Laminin, Fibronectin and Fibrinogen expressed by Met-5A cells monolayer after 24 hours of incubation with growth medium (GM) or ascites. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar is 100 µm. (B) Mesothelium slices of xenograft of ovarian cancer cells injected into the peritoneum of the mouse was subjected to a fibrinogen immunolocalization after sacrificing at 28 days the mouse. Scale bar is 300 µm.

Fig. 6: Characterization of fibrinogen, thrombin and fibrin in ascites.

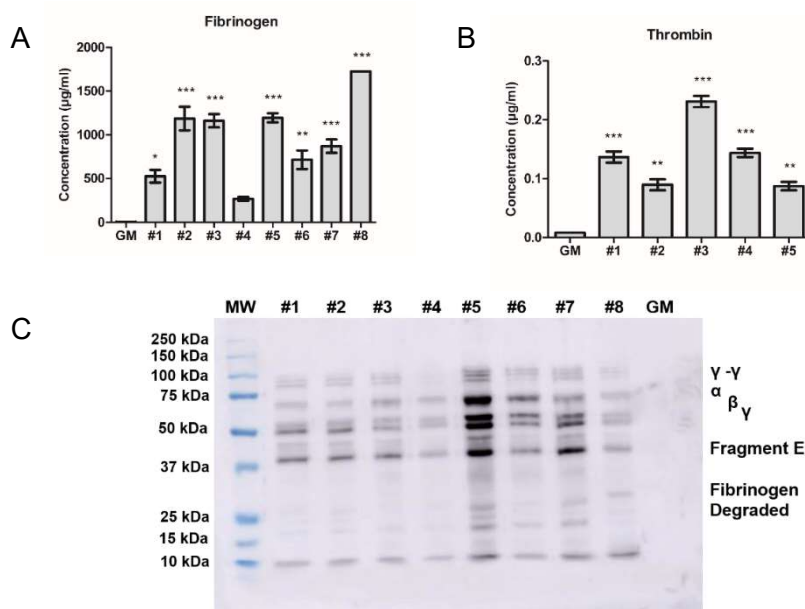


Fig. 6: Characterization of fibrinogen, thrombin and fibrin in ascites. Fibrinogen (A) and Thrombin (B) concentrations were quantified by ELISA in ascites and growth medium. Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean ± SEM. P-values were calculated by paired one-way ANOVA test (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) with Growth Medium (GM) vs Ascites #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, or #8. (C) Representative Western blot for Fibrinogen protein expression in ascites or GM. Equal amounts (10 µg) of total ascitic or GM proteins were separated on SDS-PAGE under reducing conditions. MW : Molecular Weight.

Fig. 7 : Ascites effect on the organization of fibrin network on the mesothelial monolayer.

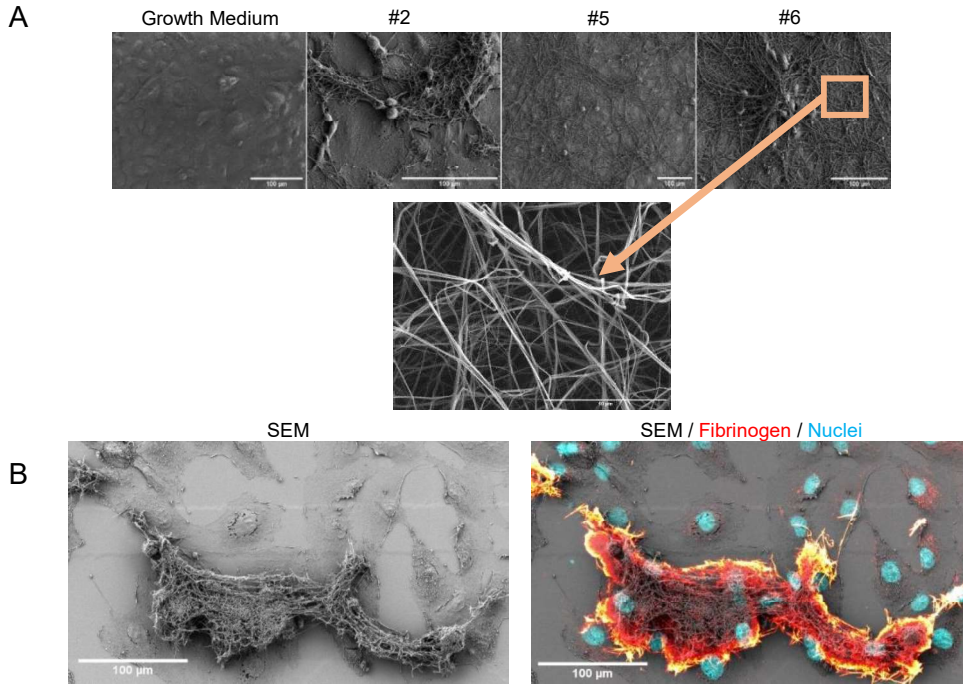


Fig. 7: Ascites effect on the organization of fibrin network on the mesothelial monolayer. (A) Met-5A cells monolayer was incubated 24 hours with growth medium or different ascites (#2, #5 or #6), and analyzed by SEM. Scale bar is 100 µm. Scale bar of the magnification is 10 µm (white arrow). (B) Met-5A cells monolayer was incubated 24 hours with ascites and was analyzed by Correlative Light-Electron Microscopy (CELM, right), fibrinogen staining (red) was analyzed with laser scanning confocal microscopy then the same sample was dried by critical point drying and analyzed by SEM (left SEM alone, right Merge). Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar is 100µm.

Fig. 8: Presence of fibrinogen within spheroids in vivo, in vitro.

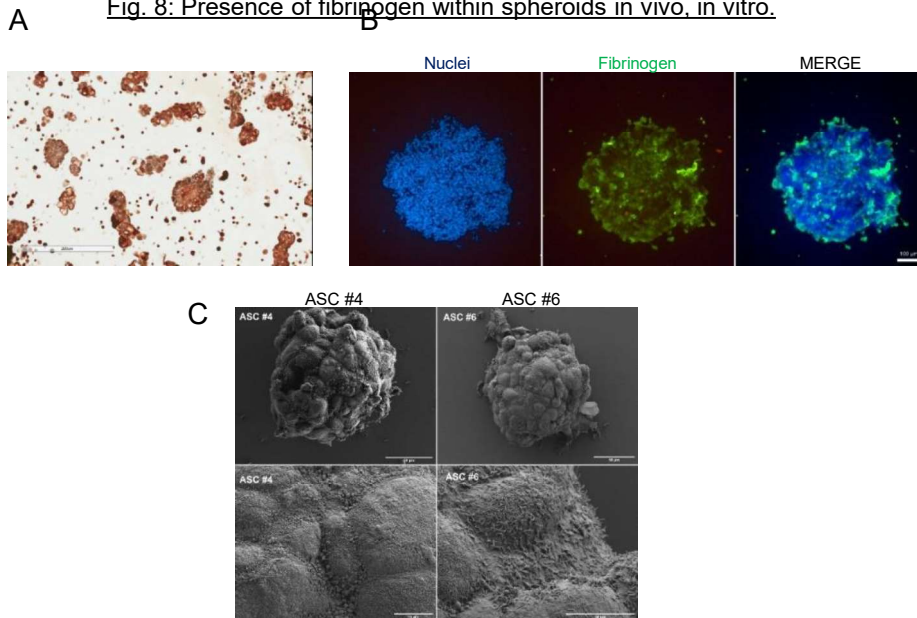


Fig. 8: Presence of fibrinogen within ovarian cancer spheroids in vivo, in vitro. (A) Immunohistochemistry staining of Fibrinogen expressed by ovarian cancer spheroids isolated from patient ascites. Scale bar is 200 µm. (B) Immunofluorescent staining of fibrinogen expressed by ovarian cancer spheroids generated in vitro in ascites condition (green). Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Staining was examined with laser scanning confocal microscopy. Scale bar is 100 µm. (C) Ovarian cancer spheroids were generated in vitro in ascites (#4 or #6) and analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM). Scale bars are 50 µm (above) and 10 µm (below).

Fig. 9: Ascites effect on spheroids dispersion on matrix coatings and fibrin gel

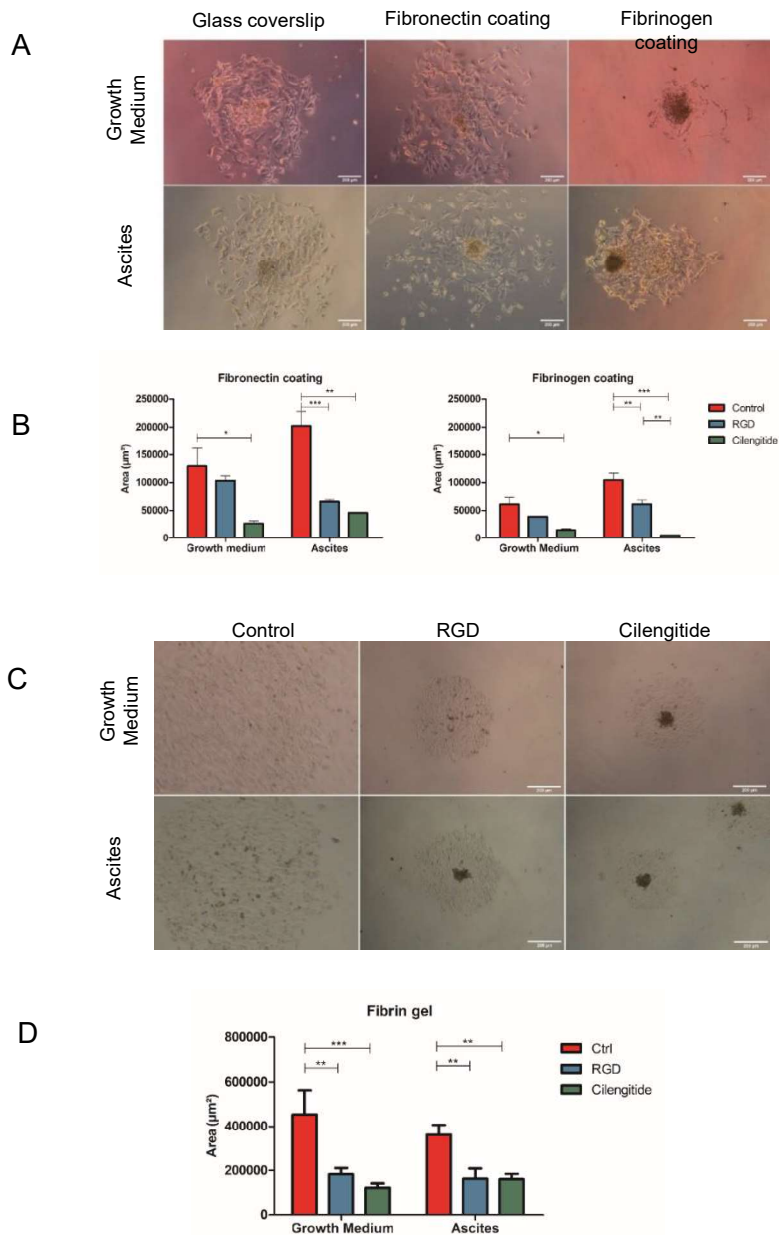


Fig. 9: Ascites effect on spheroids dispersion on matrix proteins coatings and fibrin gel. (A) ovarian cancer spheroids were deposited on glass coverslip, fibronectin coating (10 µg/ml) or fibrinogen coating (10 µg/ml) and incubated in growth medium or ascites. Representative light micrographs were taken after 24h of adhesion. Scale bar is 200 µm. Ovarian cancer spheroids were pre-incubated for 2 h 30 at 4 ° C with RGD (100 µg/ml) or Cilengitide (50 µg/ml), before being deposited on the protein coatings (Fibronectin or Fibrinogen) (B) or in a fibrin gel (D) and incubated in growth medium or in ascites. "Control" are spheroids which have been pre-incubated without the blocking peptides (ctrl). After 24h of incubation, the areas (µm²) of spheroids dispersion were calculated with the software ImageJ. Results are representative of at least three independent experiments and are expressed as mean ± SEM. P-values were calculated by paired one-way ANOVA test (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001) with significant differences estimated by comparison control vs RGD or Cilengitide. (C) Representative light micrographs were taken after 24h of invasion in fibrin gel with RGD or Cilengitide or without peptides (Control). Scale bar is 200 µm.

Fig. 10: Ascites effect on co-culture model of mesothelial monolayers and spheroids: presence and organization of fibrinogen

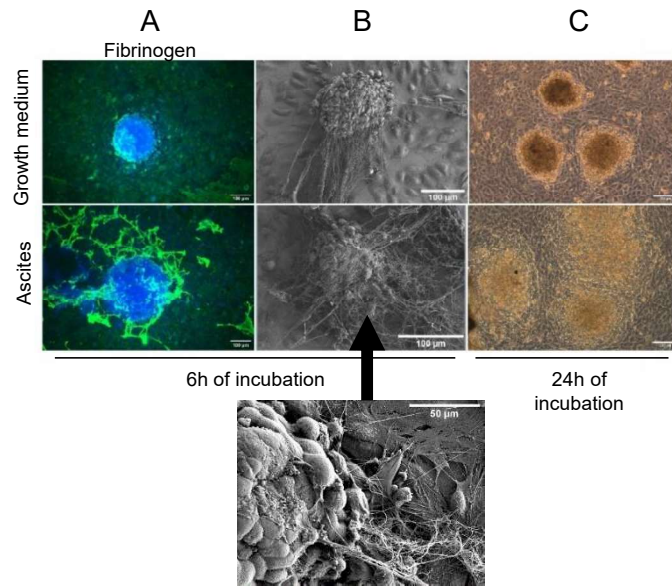


Fig. 10: Ascites effect on co-culture model of mesothelial monolayers and spheroids. Ovarian cancer spheroids were deposited on Met-5A monolayer and incubated in growth medium or ascites. (A) After 6h of incubation, immunofluorescent staining of Fibrinogen (green) and cell nuclei DAPI (blue) were done. Scale bar is 100 μm . (B) After 6h of incubation, spheroids were also analyzed by SEM. Scale bar is 100 μm and 50 μm for magnification (black arrow). (C) Representative light micrographs were taken after 24h of spheroids adhesion. Scale bar is 200 μm .

Fig. 11: Ascites effect ascites on the clearance of mesothelium by spheroids: involvement of integrins.

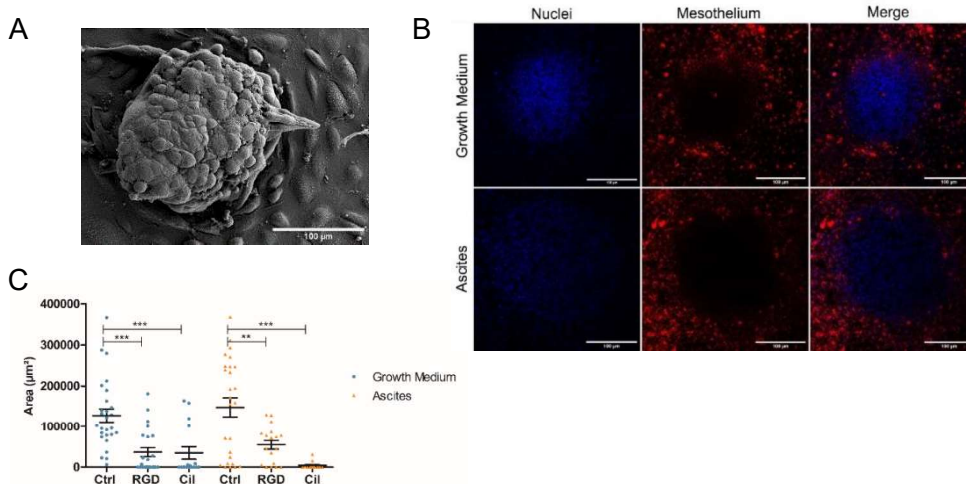
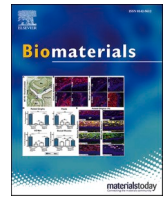


Fig. 11: Ascites effect ascites on the clearance of mesothelium by spheroids: (A) Spheroids were deposited on mesothelial monolayer in ascites for 6h and co-culture was analyzed by SEM. Scale bar is 100 μm . (B) Spheroids were deposited on mesothelial cells monolayer previously stained with nanoparticles (red). Co-cultures were incubated in growth medium or ascites for 24h. Cell nuclei were stained with DAPI (blue) and co-culture was examined with laser scanning confocal microscopy. The clearance corresponds to the area where there is no fluorescence of the nanoparticles and consequently the absence of the mesothelial cells. Scale bar is 100 μm . (C) Spheroids were pre-incubated for 2 h 30 at 4 $^{\circ}\text{C}$ with the peptides RGD (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or Cil (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), before being deposited on mesothelial cell monolayer stained with nanoparticles (red). Controls (Ctrl) are spheroids which have been pre-incubated without the blocking peptides. Co-cultures were incubated in growth medium or ascites. After 24h of incubation, the areas (μm^2) of the lack of the nanoparticles staining were measured with the software ImageJ, to quantify the clearance of mesothelial monolayer by spheroids under different conditions. Results are representative of at least three independent experiments and are expressed as mean \pm SEM. P-values were calculated by paired one-way ANOVA test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) with significant differences estimated by comparison Ctrl vs RGD or Cilengitide.



A biomimetic model of 3D fluid extracellular macromolecular crowding microenvironment fine-tunes ovarian cancer cells dissemination phenotype

Rümeysa Bascetin^{a,b,*}, Carine Laurent-Issartel^a, Cécile Blanc-Fournier^c, Charlotte Vendrely^a, Sabrina Kellouche^a, Franck Carreiras^a, Olivier Gallet^{a,1,**}, Johanne Leroy-Dudal^{a,1}

^a ERRMECe, Equipe de Recherche sur Les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules (EA1391), Institut des Matériaux I-MAT (FD4122), CY Cergy Paris University, Maison Internationale de la Recherche, 1 Rue Descartes, 95000, Neuville sur Oise Cedex, France

^b RNA Molecular Biology, F.R.S./FNRS, Université Libre de Bruxelles, Charleroi, Gosselies, Belgium

^c Biological Ressources Centre "OvaRessources", Certified NF S 96-900, Normandie University, UNICAEN, INSERM U1086 ANTICIPE, UNICANCER, Biopathology Department, Cancer Centre F. Baclesse, Caen, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Macromolecular crowding
Extracellular matrix
Ovarian cancer
Spheroid
Dissemination
Migration

ABSTRACT

An early fundamental step in ovarian cancer progression is the dissemination of cancer cells through liquid environments, one of them being cancer ascites accumulated in the peritoneal cavity. These biological fluids are highly crowded with a high total macromolecule concentration. This biophysical property of fluids is widely used in tissue engineering for a few decades now, yet is largely underrated in cancer biomimetic models. To unravel the role of fluids extracellular macromolecular crowding (MMC), we exposed ovarian cancer cells (OCC) to high molecular weight inert polymer solutions. High macromolecular composition of extracellular liquid presented a differential effect: i) it impeded non-adherent OCC aggregation in suspension and, decreased their adhesion; ii) it promoted adherent OCC migration by decreasing extracellular matrix deposition. Besides, there seemed to be a direct link between the extracellular MMC and intracellular processes, especially the actin cytoskeleton organization and the nucleus morphology. In conclusion, extracellular fluid MMC orients OCC dissemination phenotype. Integrating MMC seems crucial to produce more relevant mimetic 3D *in vitro* fluid models to study ovarian dissemination but also to screen drugs.

1. Introduction

An important challenge in ovarian cancer biology is to reproduce more relevant *in vitro* microenvironments. Designing this kind of tissue-specific tridimensional biomimetic model would help to understand the fine-tuning of cancer progression but could also be used as a more relevant model for drug screening. Although ovarian cancer mechanisms have been extensively examined at the molecular level, most of the studies are often uncoupled from the biophysical properties of the microenvironment. This microenvironment, which constantly confines cells, plays an important role in cancer development and dissemination

as a source of many complex regulating signals including biological, biochemical but also biophysical signals [1–5]. A disruption in these signals induces variation in cell responses like transdifferentiation [6]. Major changes happen at many steps in cancer progression: tissue stiffening in the primary tumor site, dissemination through liquids in vascular and lymphatic networks and, implantation to secondary metastatic sites [7,8]. In the case of ovarian cancer, a unique alteration which arises at early stages is the shedding of cells from the primary site into the peritoneal cavity filled with a pathologic fluid called ascites [9, 10]. At this step, ovarian cancer cells (OCC) are vehiculated by ascites to one of the main implantation site: the peritoneum covered with

Abbreviations: Dx, dextran; ECM, extra cellular matrix; FBS, fetal bovine serum; Fc, ficoll; FVO, fractional volume occupancy; mAb, monoclonal antibody; MMC, macromolecular crowding; NSI, nuclear shape index; OCC, ovarian cancer cell; pAb, polyclonal antibody; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris buffer saline; TRIS, 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol.

* Corresponding author. ERRMECe, Equipe de Recherche sur Les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules (EA1391), Institut des Matériaux I-MAT (FD4122), CY Cergy Paris University, Maison Internationale de la Recherche, 1 Rue Descartes, 95000, Neuville sur Oise Cedex, France.

** Corresponding author.

E-mail addresses: rumeysa.bascetin@ulb.be, rumeysa.bascetin@ulb.ac.be (R. Bascetin), olivier.gallet@cyu.fr (O. Gallet).

¹ Johanne Leroy-Dudal and Olivier Gallet are co-last authors.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120610>

Received 23 April 2020; Received in revised form 21 October 2020; Accepted 14 December 2020

Available online 16 December 2020

0142-9612/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

mesothelial cells. Cells are thus continuously confined in tailored crowded microenvironments, while *in vitro*, culture media are very diluted and far lower concentrated solutions with constant molecular composition [11,12]. Indeed, one crucial feature of biological systems, often underappreciated, is their high density of macromolecules, like proteins – glycoproteins - glycosaminoglycan - nucleic acids, present in a restricted volume. Such media are termed “crowded” rather than “concentrated” as no single species of macromolecules is necessarily present at high concentration [13]. Macromolecular crowding (MMC) is a very well-known phenomenon in cell interior but is also observed in the extracellular microenvironment. As the density in the cell interior (including the nucleus) is 50–400 mg/mL [14–16], in multicellular organisms, cells are surrounded by a crowded extracellular environment, either a complex architectural extracellular matrix (ECM) network or a liquid environment. Biological fluids like blood, a vehicle for cancer cell dissemination, contain around 80 mg/mL of macromolecules [17]. Even if the exact concentration is not described, the high density of macromolecules in ECM surrounding cells is well known [18]. Lastly, in the case of ovarian cancer, cells can also disseminate to metastatic sites through a peculiar liquid called ascites accumulated in the peritoneal cavity of unhealthy women and known for its high density of macromolecules [19,20]. The impact of ECM physical properties (like stiffness and porosity) and fluids dynamic (like shear stress) on cells have been extensively studied while the role of fluids MMC is still underappreciated [21–23]. In the case of ovarian cancer, ascites play an important role in ovarian cancer dissemination. Ascites are complex and heterogeneous fluids thus harboring specific chemical and physical properties. This suggests that they could create a confined and crowded microenvironment at the surface of the peritoneum affecting OCC implantation. For example, a fibrin network was shown to entrap OCC on mesothelial tissue [24]. It is thus substantial to understand the role of fluids MMC in ovarian cancer development to design relevant biomimetic liquid models for cancer model engineering and drug discovery.

“Macromolecular crowding” is defined by the non-specific influence of steric repulsions on specific processes occurring in highly volume occupied media. Therefore, molecular crowding has been shown to significantly alter biological, biochemical, and biophysical properties by: *i*) inducing an excluded volume effect where the volume occupied by co-solute is inaccessible to other molecules, *ii*) affecting molecules folding, *iii*) slowing down diffusion and, *iv*) increasing the binding reaction of molecules [25–28]. Altogether, these properties of MMC lead to crucial impacts on cellular properties including intracellular as well as extracellular events.

In the nucleus, intracellular crowding plays a role in microcompartmentalization of chromatin [29,30]. Thus, intracellular crowding is involved in gene expression as it: *i*) slows down the diffusion of molecules like transcription factor, *ii*) increases association rate of DNA-binding proteins like RNA polymerase and, *iii*) decreases dissociation [28,31,32]. In the cytoplasm, intracellular crowding affects transcription factors nuclear translocation, intracellular signalization, vesicle trafficking and cytoskeleton [33–36]. Several studies showed that intracellular crowding is a fundamental constraint for cell metabolism as it limits free space inside cells and so the maximum enzyme and mitochondria concentration. This crowding imposes the activation of different energy generation pathways, called the Warburg effect, to provide enough ATP supply to highly proliferative and/or active cells [37]. Intracellular crowding induced by hypotonic stress can provoke endogenous irreversible protein aggregation [38]. Intracellular overcrowding due to protein aggregation can induce a progressive switch of energy generation pathway but also decrease the maximum energy generation capacity [39]. These suppose that beyond a concentration of protein aggregates, cells cannot even satisfy their basal energy demand and eventually lead to “metabolic cell death by overcrowding”. This process could possibly be implicated in neuropathological diseases [39]. *In vitro*, molecular crowding has been shown to regulate protein structure by promoting their aggregation and/or amyloid formation [40–45].

In the extracellular space, molecular crowding enhances enzymatic reaction at cell surfaces, and promotes autocrine signaling by limiting diffusion of molecules from their production source to increase their concentration locally [25,46]. Thus, extracellular MMC enhances ECM deposition by human fibroblast and by human bone marrow mesenchymal stem cells [12,47–53]. While almost no information is available about other ECM protein apart their enhanced deposition, the mechanism of collagen deposition has been more extensively studied under MMC. Lareu & *al.* showed that enhanced collagen matrix deposition by normal primary embryonic lung fibroblasts was due to an increase in Procollagen C proteinase enhancer protein helping Procollagen C-proteinase to convert pro-collagen in collagen [48]. Several studies showed the stabilization of collagen ECM correlated with an increase of lysyl oxidase and transglutaminase activity in crowded environments [47,54,55]. Moreover, MMC shortens the lag phase of collagen fibrillogenesis thus, collagen fibrils are formed more rapidly but thinner [56,57]. Another study proposes that crowders, especially dextran sulfate, can drive ECM deposition by increasing electrostatic protein aggregation independently from their crowding capacities [58]. Zeiger & *al.* also revealed that MMC induces supramolecular assembly and alignment of extracellular collagen IV and fibronectin, which in turn also helps intracellular actin cytoskeleton alignment [12].

In the extracellular microenvironment, MMC can also help to maintain the undifferentiated state of stem cells in their niche or either promote their differentiation outside the niche [46,49,52,53,59]. This property of MMC to improve ECM deposition and cell culture is of principal interest for tissue engineering to maintain specialized cells like podocytes and accelerate *in vitro* patient autologous tissue production which is usually too long (196 days for blood vessels) [53,60,61].

So far, and as described above, many works provided information on the effect of intracellular MMC on gene expression, metabolism, and protein assembly. Many works showed the beneficial effect of extracellular MMC on matrix deposition and healthy cell behaviors. But only a few studies have been carried out to understand the effect of extracellular MMC on unhealthy cells in pathological conditions. Vazquez et al. discussed the relationship between intracellular crowding and metabolism in cancer cells and neuropathological diseases [37,39]. Two works used extracellular MMC to mimic fibrotic-like matrix and screen anti-fibrotic agents [47,62]. Gonzalez et al. showed the differential responses of normal versus liver cancer cells, and cancer derived-endothelial cells in crowded environments [63,64]. Sun & *al.* used crowding to fractionate and isolate nuclear protein in normal and cancer cells [36]. And lastly, Ranamukhaarachchi & *al.* used crowding to tune collagen gel architecture and studied breast cancer cells morphology and invasiveness [65]. Ovarian cancer is one of a kind to be directly in contact with the biological crowded fluids ascites. But, no studies on the effect of extracellular fluids MMC neither decellularized matrix produced in crowded environment seem to be reported on ovarian cancer.

Our work provides appreciable insights as studies are scarce in the literature regarding the direct relationship between fluid extracellular MMC and ovarian cancer development and behavior, a peculiar cancer disseminating from early stages through the liquid called ascites. Our data pointed at the differential role of extracellular MMC on adherent and non-adherent OCC: extracellular MMC impaired adhesion and aggregation of non-adherent OCC; extracellular MMC increased adherent OCC migration through alteration of ECM deposition. Extracellular MMC also potentially regulates intracellular processes like cytoskeleton organization and gene expression in the nucleus. The more the crowder is crowding, the more the impact on OCC would be important with a higher impact on mesenchymal-like OCC. The present work has been done to decipher the role of fluid extracellular MMC on OCC behaviors and matrix deposition with the future purpose of generating more relevant 3D *in vitro* liquid models for ovarian cancer study, drug screening, and tissue-specific tailoring.

2. Materials & methods

2.1. Antibodies and reagents

DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542) and fluorescein isothiocyanate-labeled phalloidin (p5282) were purchased from Sigma-Aldrich (France). Prolong® Gold Antifade Reagent (P36930) was supplied by ThermoFisher Scientific (France).

Ficoll 400 kDa was purchased from Ge Healthcare (17-0300-10). Dextran 200 (average molecular weight 250 kDa) was from Serva (SERA18694).

Polyclonal (pAb) and monoclonal (mAb) antibodies used in this study and their dilution for immunofluorescence and Western blot assay are reported in [Table S1](#) (Supplemental material).

2.2. Cell culture

Human adenocarcinoma cell line IGROV1 was kindly provided by Dr. J. Bénard from the INSERM U1199 BioTICLA unit (Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Aggressifs, Caen, France) and SKOV3 cells were purchased from ATCC (France) with a certificate of conformity. Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂ in their complete medium consisting of RPMI-1640 GlutaMAX (Life technologies, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biosera, France) and 1% sodium bicarbonate (Invitrogen, Cergy, France). For experiments, cells were cultured in their complete medium supplemented with different concentrations of Ficoll or Dextran.

2.3. Cell proliferation assay

Cells were harvested with trypsin-EDTA 0.25%, seeded in 48-well plate at 10⁴ cells/cm², and incubated 24 h in their complete culture medium. Adherent cell proliferation was then monitored over seven days in their complete culture medium supplemented with 0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran. At each time point, representative images were captured by phase-contrast microscopy with the objective 10×. At each time point, cells were harvested with trypsin-EDTA 0.25% and counted with Trypan Blue (T8154, Sigma, France). Results are represented as the mean of cell number ± standard deviation of at least three independent experiments in duplicate.

2.4. Cell metabolic activity

Cells were harvested with trypsin-EDTA 0.25%, seeded in 96-well plate at 15.10³ cells/cm², and incubated 24 h in their complete culture medium. Adherent cell metabolic activity was then monitored over seven days in their complete culture medium supplemented with 0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran. At each time point, the culture medium was replaced by XTT reagents (Cell proliferation Kit II, Roche, France) and cells were incubated for 2 h at 37 °C. Cell metabolic activity was estimated by absorbance measurement at 475 nm. Results are represented as the mean of absorbance of triplicate.

2.5. Spheroid formation assay

Cells were harvested with trypsin-EDTA 0.25% and suspended at 10⁴ cells/10 µl of complete culture medium supplemented with 0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran. Pending droplets of 10 µl were formed on the inward face of 24-well plate and cultured for 24 h at 37 °C. Cell aggregates were observed and captured by phase-contrast microscopy with the objective 4×.

2.6. Cell adhesion assay

Cells were harvested with trypsin-EDTA 0,25%, seeded in a 96-well

plate at 5.10⁴ cells per well in complete culture medium supplemented with 0, 12.5, 25, or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran, and incubated 30 min at 37 °C and 5% CO₂. Non-adherent cells were then washed three times with serum-free medium. Remaining adherent cells were fixed with glutaraldehyde (1% in distilled water) (G4004, Sigma-Aldrich, France) for 10 min. Wells were washed three times with distilled water and counted on three fields with the objective 10×. Results are represented as the mean of cell percentage ± standard deviation of two independent experiments in triplicate. Data are expressed as a percentage of the control condition without crowders.

2.7. Cytoplasmic actin and vinculin analysis

SKOV3 and IGROV1 cells were seeded on glass coverslips at 5.10³ cells/cm² in 48-well plate for 6 h. Cells were then starved overnight in serum-free medium and cultured for 6 h in complete medium supplemented with 0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran. Actin and vinculin were stained, and cells were imaged by confocal microscopy with the objective 63× (LSM710, Zeiss, Germany). Results are representative of at least two independent experiments in duplicate.

2.8. Cell migration assay

SKOV3 and IGROV1 cells were grown as a monolayer for 24 h in their complete culture medium using ibidi® culture-insert 2 well (BioValley, France) with respectively 15.10³ and 40.10³ cells/insert well. Culture inserts were then removed. Cells were rinsed with serum-free medium and incubated in their complete culture medium supplemented with 0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran, at 37 °C and 5% CO₂. Cell migration was monitored with the objective 10× by inverted time-lapse microscopy (DMI6000B, Leica, Germany) for 4 h at regular time intervals of 15 min.

2.9. Extracellular matrix analysis

SKOV3 and IGROV1 cells were seeded respectively at 4.10⁴ and 7.10⁴ cells/cm² for 24 h. Adherent cells were then incubated for 48 h in their complete culture medium supplemented with 0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran. Fibronectin, vitronectin, collagen I, collagen IV, and laminin were detected by immunofluorescent staining. Cells were imaged by confocal microscopy with the objective 63× (LSM710, Zeiss, Germany). Results are representative of two independent experiments in duplicate.

2.10. Immunofluorescent staining

Cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with PBS-Triton X-100 0.1% for 3 min. For cytoskeleton visualization, cells were stained for actin with FITC-phalloidin (10 µg/mL) and nuclei with DAPI (0.3 µg/mL) in PBS-BSA 1% for 30 min. For other proteins staining, non-specific sites were blocked 30 min with PBS-BSA 1% and incubated overnight at +4 °C with primary antibodies (in PBS-BSA 1%). After three washes with PBS, cells were incubated 1 h at room temperature in the dark with their respective Alexa fluor-conjugated antibody (in PBS-BSA 1%) and stained 30 min at room temperature in the dark with DAPI at 0.3 µg/mL (in PBS-BSA 1%). Coverslips were mounted with Prolong® Gold Antifade Reagent and imaged by confocal microscopy with the objective 63× (LSM710, Zeiss, Germany). Controls, where primary antibodies were replaced with PBS-BSA 1%, were negative.

2.11. Nuclear area and nuclear shape index

From the different fluorescence images acquired on SKOV3 and IGROV1 cells cultured for 48 h in culture media supplemented with 0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran, nucleus area and nucleus shape index were determined with the Particle Analysis tool of ImageJ® software

(National Institutes of Health, Bethesda, MD). The nuclear shape index (NSI) represents how much the nucleus is circular or linear [4]. NSI is comprised between 0 and 1. An NSI value tending toward 1 represents a circular object while a value of 0 matches with an elongated object. At least 827 SKOV3 and 1512 IGROV1 cells (SKOV3: min 827 - max 1827; IGROV1: min 1512 - max 2242) for each treatment group (0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran) were analyzed per experiment from at least four independent experiments in duplicate.

2.12. Western blotting of conditioned cell growth media proteins

SKOV3 and IGROV1 cells were seeded respectively at 4.10^4 and 7.10^4 cells/cm² for 24 h. Adherent cells were then incubated for 48 h in their complete culture medium supplemented with 0 or 75 mg/mL of Ficoll or Dextran. Supernatants were then recovered and their total protein concentration was assessed with the Bicinchoninic Acid Protein Assay kit (BCA1 and B9643, Sigma, France) according to the manufacturer's instruction and with Bovine Serum Albumin (P0914, Sigma, France) as standard. 100 µg of supernatant proteins were subjected to 8% bis-acrylamide SDS-PAGE electrophoresis under denaturing and reducing conditions and transferred onto a reinforced nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Life Sciences, France) for 1 h at 110V and +4 °C. The membrane was blocked for 1 h at room temperature with TTBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.4, 0.1% Tween 20) supplemented with 5% (w/v) defatted dry milk. The membrane was incubated overnight at +4 °C in TTBS-milk 3% with the primary antibody. After three washes with TTBS, the membrane was incubated for 1 h at room temperature in TTBS-milk 3% with the horseradish peroxidase-conjugated antibody. After three washes with TTBS, the immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence (WBKLS0500, Millipore) according to the manufacturer's instruction. Proteins were revealed using ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences, France).

2.13. Statistics

Data are expressed as mean ± standard deviation. Statistical significances were determined by the appropriate test as indicated in figure captions.

Significance levels were set compared to the control without crowders: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.005$ (***)

3. Results

3.1. Extracellular MMC differentially affects OCC proliferation

Ovarian cancer cells (OCC) disseminate through liquids: primarily ascites accumulated in the peritoneal cavity of unhealthy women and, other body fluids. We estimated a total protein concentration of around 75 mg/mL in two human blood plasma and three human ovarian cancer ascites (Figure S1) [17,20]. We also previously showed that both ascites and blood plasma contains high molecular weight molecules and especially fibronectin (200–250 kDa as a monomer and 400–500 kDa as a dimer) which has a preponderant role in regulating cell responses [4,66, 67]. To mimic the macromolecular crowding derived from the presence of high molecular weight molecules in these two biological fluids, cells were exposed to two commonly used inert crowders: Ficoll 400 kDa (Fc) or Dextran 250 kDa (Dx) at the concentration of 75 mg/mL, representing the total protein concentration estimated in blood plasma and ovarian cancer ascites. Fc is a deformable spherical molecule composed of a highly branched copolymer of sucrose and epichlorohydrin, while Dx is a flexible ribbon-like molecule. Each of them could respectively mimic the globular and fibrillar/unfolded state of biological molecules like fibronectin. Per literature, we showed that these two crowders have few similar biophysical features: a hydrodynamic radius (Rh) of around 5 nm, a polydispersity index of around 0.46 and, a neutral net charge.

However, these two crowders also present different features: their molecular weight and thus their different fractional volume occupancy (FVO) of 6.6% and 10% respectively for Fc and Dx (Figure S2) [48,52, 55,68–72]. In this study, we especially chose these two inert crowders as we wanted to mimic and analyze solely the effect of MMC. We could thus evaluate the effect of MMC derived from two different high molecular weight inert molecules without the interference of charge and Rh but still yielding for different FVO/crowdedness. This could help in understanding if these two crowders have either the same effect on OCC and determine the sole effect of crowding/FVO.

In this study, we worked with two OCC: SKOV3 cells with an intermediate-mesenchymal phenotype isolated from ascites and IGROV1 cells with an intermediate-epithelial phenotype originating from a primary tumor site [3,73,74]. The proliferation of SKOV3 and IGROV1 cells estimated by counting cells with trypan blue, and their metabolic activity checked with an XTT assay was assessed in medium supplemented with 0 or 75 mg/mL of Fc or Dx (Fig. 1). With Fc, both cell numbers increased and reached a plateau similarly to the control without MMC over seven days (Fig. 1B). With Dx, a stagnating SKOV3 cell number was observed upon the seven days of culture and IGROV1 cell number was three times less important compared to the control. These results were strengthened by phase-contrast microscopy: SKOV3 and IGROV1 cells covered the culture surface without MMC and with Fc within the seven days of culture - in the presence of Dx, SKOV3 cells did not proliferate but changed their morphology to form small cell aggregates; IGROV1 cells proliferation was greatly slowed down (Fig. 1D).

Correlating with the proliferation, the metabolic activity of both cell types increased within the seven days of culture and reached a plateau without MMC or with Fc (Fig. 1C). The metabolic activity of SKOV3 cells cultured with Dx remained stagnant similarly to the proliferation curve, indicating that cells did not die. Surprisingly, while IGROV1 cell proliferation with Dx was highly reduced of about 72% compared to the control, metabolic activity was only decreased by 38%. This suggests that Dx-associated MMC still enhances IGROV1 cell metabolic activity. To determine if MMC induced senescence of OCC, we performed a senescence-associated β-galactosidase activity assay. As observed in Figure S3, no significant β-galactosidase-associated blue staining was detected in both cell types.

Carduner & al. showed that OCC culture in ovarian cancer ascites induced their detachment from substratum to form multicellular aggregates in suspension [3]. Here, contrary to ascites, over the seven days of culture, we did not notice any cell detachment with neither Fc nor Dx (Fig. 1D).

Altogether, these data indicate that the two mimetic crowded environments have different effects on OCC proliferation: Fc does not impair cell proliferation and metabolic activity while more crowding Dx has a cytostatic effect and attenuates cell proliferation with a more prominent effect on mesenchymal SKOV3 cells. Still, Dx seems to increase the metabolic activity of IGROV1 cells.

3.2. Extracellular MMC prevents OCC spheroid formation

Upon their detachment, ascites promotes the compaction of OCC in multicellular aggregates named spheroid compared to culture media (Figure S4) [75]. Thus, we looked at the spheroid formation by non-adherent SKOV3 and IGROV1 cells using the pending droplet method (Fig. 2). Without MMC, we observed that both cell types gathered together to form a "single multicellular aggregate". Both cell types spheroid was altered in a concentration-dependent manner with the increasing concentration of Fc and Dx. The effect was more pronounced with SKOV3 cells which were single isolated at 75 mg/mL of Dx, while IGROV1 cells formed small aggregates. Thus, extracellular MMC prevents the aggregation of non-adherent OCC into large spheroid in a liquid environment.

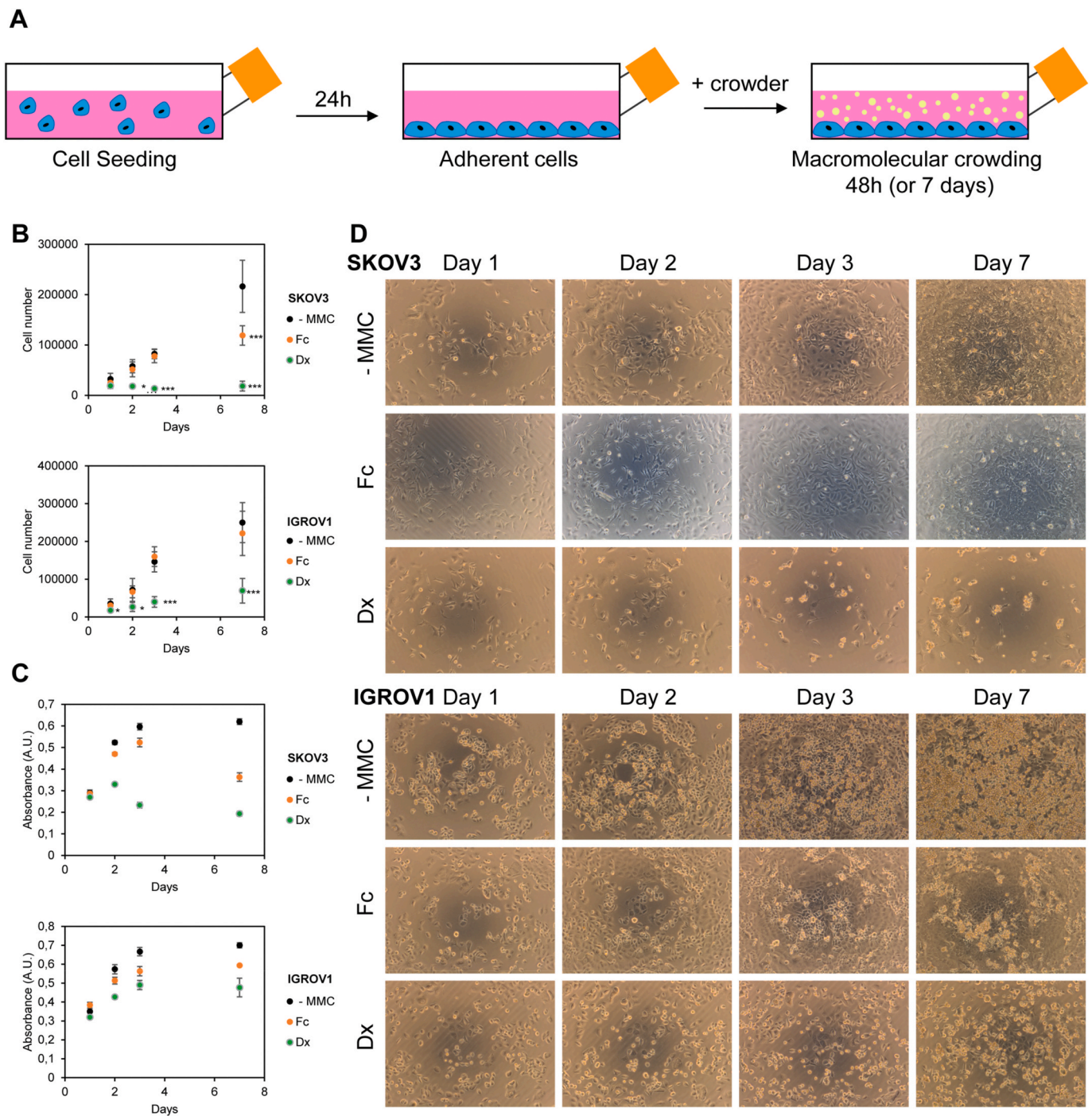


Fig. 1. Extracellular macromolecular crowding affects OCC proliferation and metabolic activity. (A) Except for adhesion and spheroid assay, SKOV3 and IGROV1 cells adhered for 24 h in their culture media before changing their media to fresh culture media supplemented with 0 (-MMC) or 75 mg/mL of Fc or Dx. Cells were then cultured for 48 h (or seven days for proliferation and metabolic activity assay). (B) Cell counting with Trypan blue monitored over seven days of culture, revealed Fc does not affect cell proliferation, while Dx slows down it. Results are represented as the mean of cell number \pm standard deviation of two independent experiments in triplicate. Significant differences were estimated by comparison with control without crowders (-MMC) ($***p < 0.005$, Student's test). (C) XTT assay shows that Fc does not affect cell metabolic activity while Dx differentially affects SKOV3 and IGROV1 metabolic activity. (D) Representative images of cells over the proliferation time course are presented for SKOV3 and IGROV1 cells cultured with 0 (-MMC) or 75 mg/mL of Fc or Dx. Scale bar: 100 μ m.

3.3. Extracellular MMC prevents OCC adhesion

One of the main events in cancer development is the implantation of OCC on distant organs to further disseminate. That is why we looked at the effect of extracellular MMC on OCC adhesion and spreading onto culture substratum (Fig. 3). Compared to the control without MMC, cell adhesion increased by about 40 and 24.6% respectively for SKOV3 and

IGROV1 cells in the presence of 12.5 mg/mL of Fc (Fig. 3A). Although cell adhesion percentage was similar to the control in the presence of 25 mg/mL of Fc, cell adhesion significantly decreased to 30.2 and 52.4% respectively for SKOV3 and IGROV1 cells in the presence of 75 mg/mL of Fc. The decline in cell adhesion was even more drastic with Dx. Cell adhesion significantly dropped to 20.4, 7.6, and 4.8% in the presence of respectively 12.5, 25 and 75 mg/mL of Dx in the case of SKOV3 and

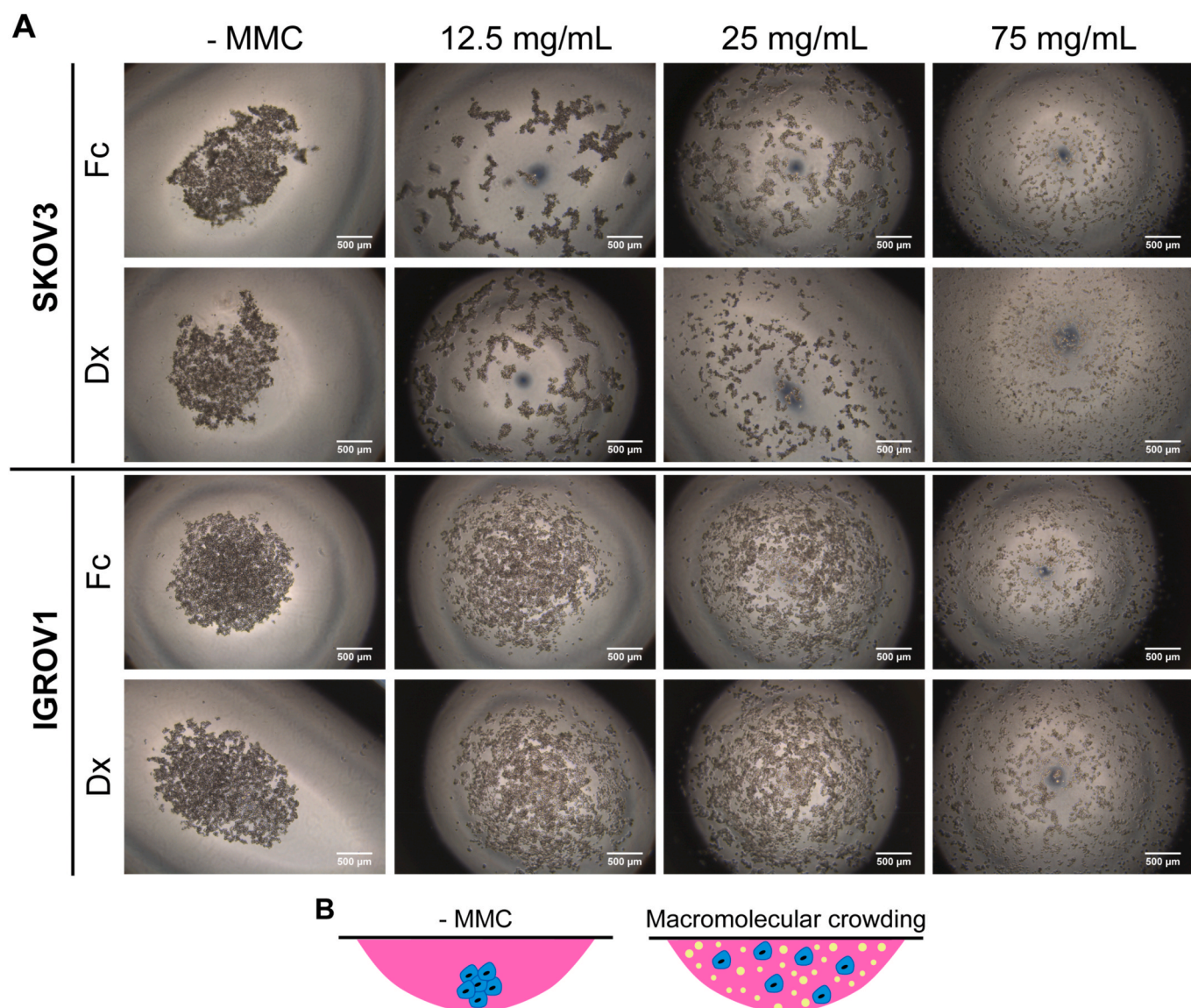


Fig. 2. Extracellular macromolecular crowding impedes OCC spheroid aggregation. (A) Spheroids were formed by 10^4 non-adherent SKOV3 (upper panel) or IGROV1 (lower panel) cells in culture medium droplet supplemented with either 0 (-MMC), 12.5, 25, or 75 mg/mL of Fc or Dx for 24 h. Representative images show that Fc and Dx prevent large spheroid formation. Scale bar: 500 μm . (B) Schematic representation of cell aggregation in culture media or crowded media.

decreased to 62.2, 56.5 and 10% in the case of IGROV1 cells. The impact of Dx is once again more prominent on mesenchymal-like SKOV3 cells than on epithelial-like IGROV1 cells. Here, we show that high MMC prevents OCC adhesion to the substratum and even more if MMC has a higher FVO like in the case of Dx.

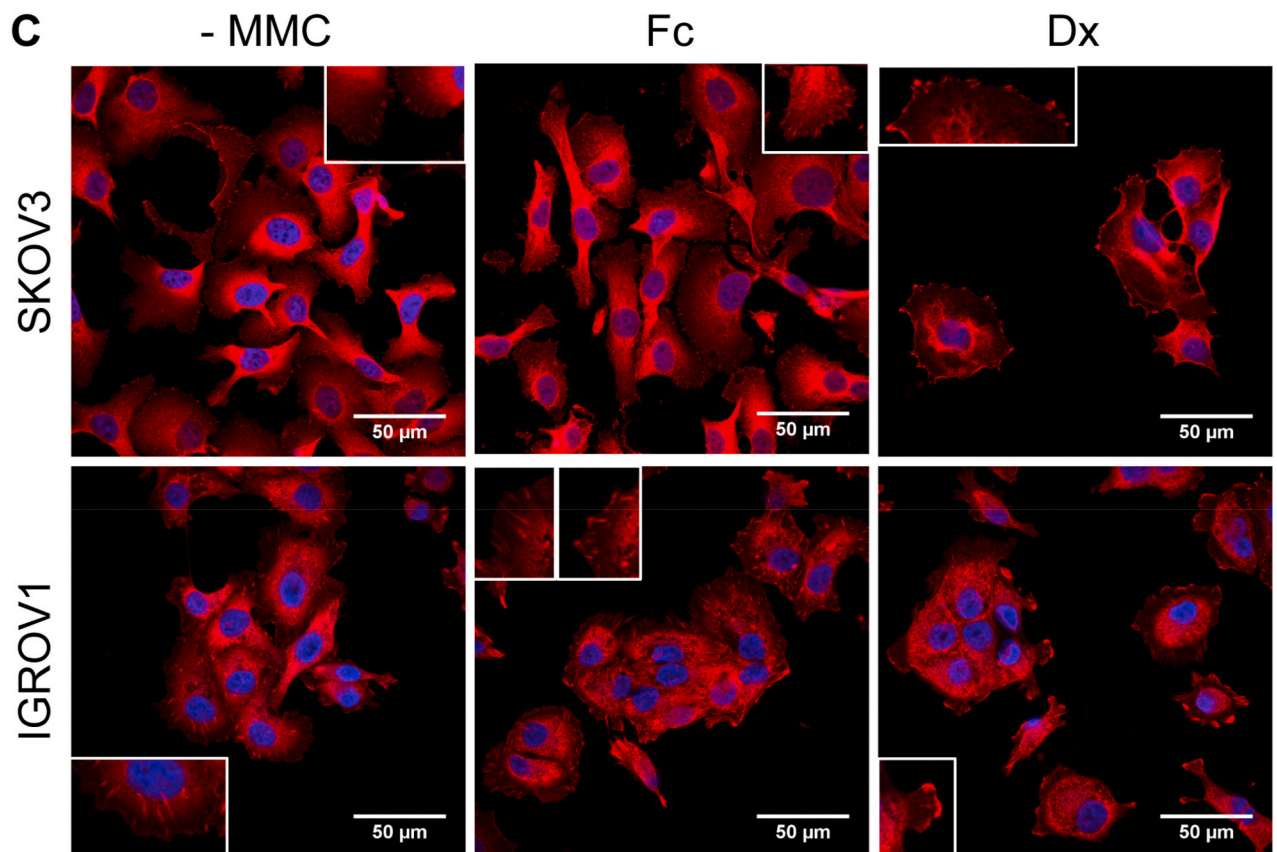
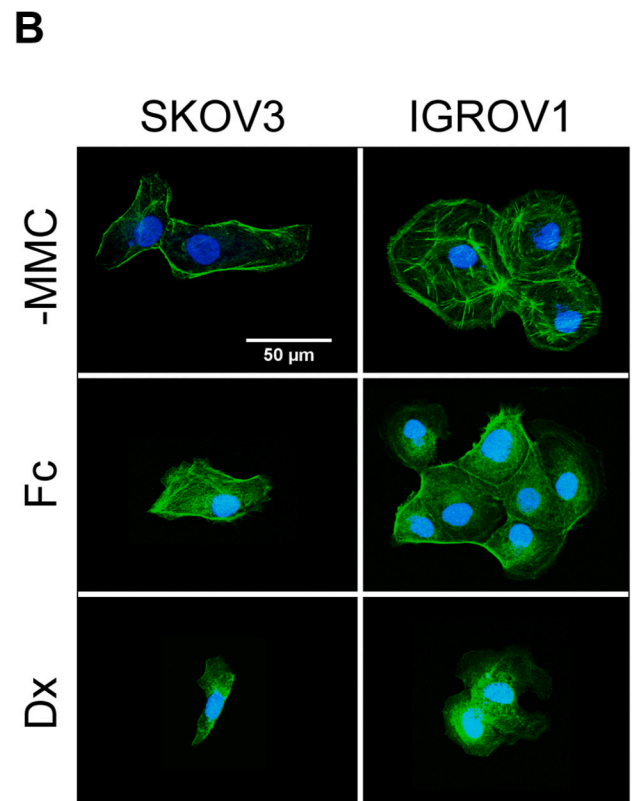
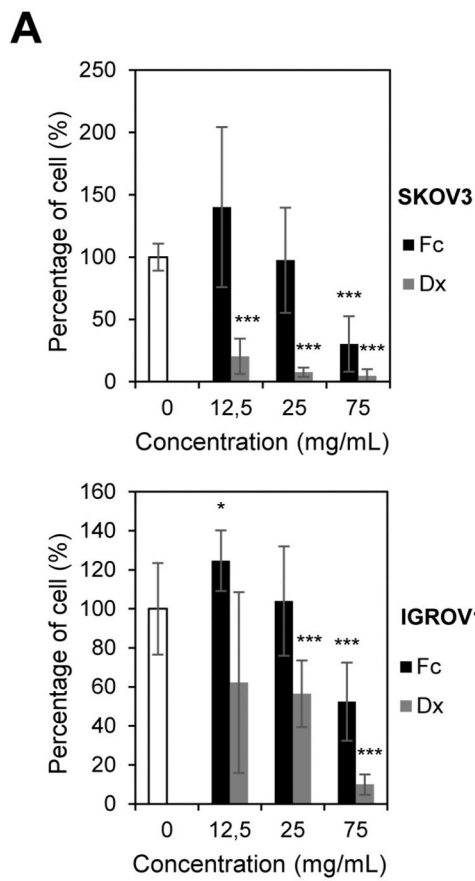
We further looked at the effect of extracellular MMC on adherent OCC actin organization, stained upon cell culture in the presence of 0 or 75 mg/mL of Fc or Dx (Fig. 3B). Without MMC, SKOV3 and IGROV1 cells were well spread, presented peripheral cortical actin and/or central stress fibers. With Fc, both cell types still presented cortical actin and stress fiber but to a lesser extent. With Dx, SKOV3 and IGROV1 cells spreading area was significantly reduced. They seemed to organize diffuse perinuclear actin caps.

We then visualized the anchoring structures of OCC by immunostaining vinculin (Fig. 3C). Dash-like structures, corresponding to focal adhesions, at the peripheral of SKOV3 cells were observed without MMC (Fig. 3C). With Fc, SKOV3 cells presented fewer focal adhesions while with Dx only large peripheral dot-like anchoring sites were seen. IGROV1 cells presented central fibrillar adhesions in control condition witnessing strong cell adhesiveness (Fig. 3C). With Fc, focal adhesions at

the peripheral of IGROV1 cells were observed with only a few fibrillar adhesions. With Dx, only large peripheral anchoring sites were observed. These results hint at the less mature organization of anchoring sites when cultured in crowded environments and could also explain the decrease in OCC adhesion.

3.4. Extracellular MMC differentially promotes OCC migration

As the different results point at a potential effect of extracellular MMC on adherent OCC motility, scratched cell monolayer was monitored in the presence of 0 or 75 mg/mL of Fc or Dx (Fig. 4). Without MMC, SKOV3 cells migrated collectively (blue arc). With Fc, SKOV3 cells covered a more important surface, seemed to preserve a collective migration but also presented individual migration patterns (white arrow) as observed with cells scattered in the open wound area. With Dx, even if the migration rate was not as important as with Fc, SKOV3 cells also migrated but in a more scattered manner. IGROV1 cells almost did not migrate without MMC but still presented a few collective migration fronts. With Fc, cells covered a higher distance collectively (blue arc) and with few cells scattering in the open wound area (white arrow).



(caption on next page)

Fig. 3. Extracellular macromolecular crowding alters OCC adhesion. (A) Adherent SKOV3 and IGROV1 cells were counted after 30 min of seeding in their culture media supplemented with either 0, 12.5, 25 or 75 mg/mL of Fc or Dx. Results show that high MMC decreases cell adhesion. Results are represented as the mean of the percentage of adherent cell \pm standard deviation of two independent experiments in triplicate. Significant differences were estimated by comparison with control without crowders ($*p < 0.05$; $***p < 0.005$, Student's test). (B) Adherent SKOV3 and IGROV1 cells were starved overnight in serum-free medium, and cultured 6 h in their culture media supplemented with 0 (-MMC) or 75 mg/mL of Fc or Dx. Cells were then stained for actin (green) and DNA (blue), or vinculin (red) and DNA (blue). Representative images, of two independent experiments in duplicate, reveal the reorganization of the actin cytoskeleton and anchoring sites in crowded environments. Scale bar: 50 μ m.

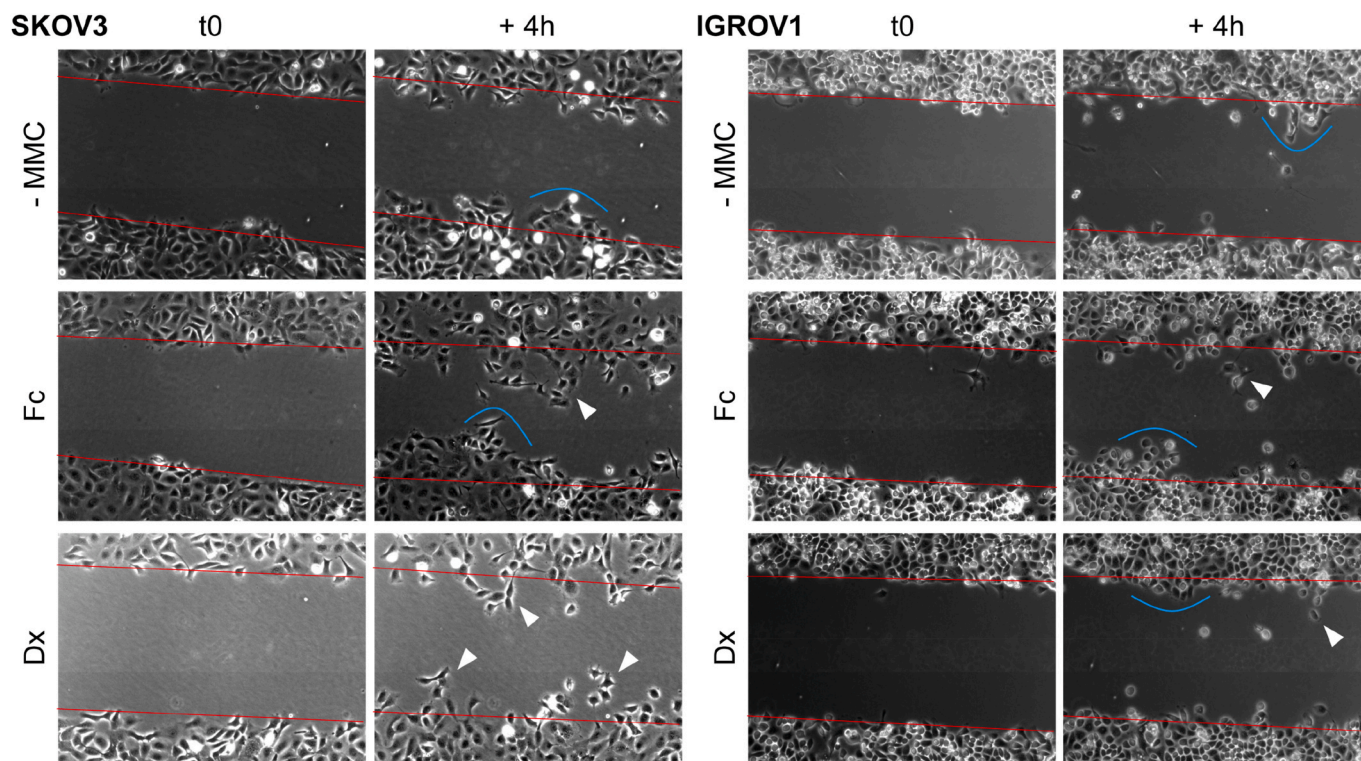


Fig. 4. Extracellular macromolecular crowding affects OCC migration. SKOV3 and IGROV1 cell migration was monitored for 4 h in their culture media supplemented with 0 (-MMC) or 75 mg/mL of Fc or Dx. Blue arcs point at the collective migration front and, white arrows point at the scattered individually migrating cells. Representative images reveal a differential effect of Fc and Dx on SKOV3 and IGROV1 cells.

With Dx, IGROV1 also did not migrate as much as with Fc, but they seemed to migrate in a collective as well as individual manner. These results hint at the differential effect of MMC on cell migration: Fc accelerates collective and individual migration of OCC; more crowding Dx promotes a more scattered migration with a lesser impact on cell velocity.

3.5. Extracellular MMC differentially affects tight and adherent junction protein

To further investigate the effect of MMC on adherent OCC, we looked at the intercellular junction in the presence of 0 or 75 mg/mL of Fc or Dx. We immunostained two junction proteins: tight junction scaffolding protein ZO-1 and transmembrane adherent junction protein E-cadherin (Fig. 5) [76]. Without MMC, SKOV3 cells presented a faint linear pattern of ZO-1 at cell-cell junctions. Surprisingly, with Fc or Dx, a more intense and jagged ZO-1 organization was observed. Junctional E-cadherin could not be detected in SKOV3 cells monolayer. Nevertheless, a more pronounced nuclear E-cadherin staining in SKOV3 cells could be observed when cultured with Dx and to a lesser extent with Fc. IGROV1 cells presented well defined intense, linear, and continuous ZO-1 junctions with no modification whatever the culture condition. Well defined intense, linear, and continuous E-cadherin junctions could also be observed without MMC or with Fc at the periphery of IGROV1 cells. With Dx, there seem to be fewer E-cadherin junctions. Here, we show a

direct link between extracellular MMC and intercellular junction proteins organization with a differential effect depending on cancer cells phenotype: increase of ZO-1 junctions and potentially nuclear E-cadherin in case of mesenchymal-like SKOV3 cells and a decrease in E-cadherin junctions in epithelial-like IGROV1 cells.

3.6. Extracellular MMC differentially affects OCC extracellular matrix

We immunostained stromal ECM proteins - fibronectin (Fn), vitronectin (Vn), collagen I (CollI) - and basal membrane proteins - laminin (Lam), collagen IV (CollIV) - deposited by SKOV3 and IGROV1 cells cultured in the presence of 0 or 75 mg/mL of Fc or Dx (Fig. 6A). Similarly to the control without MMC, with Fc, SKOV3 cells organized an intense Fn matrix with some fibrils, only a few spots of Vn and CollI, a diffuse but dense Lam matrix, and a faint CollIV matrix (Fig. 6A). With Dx, no differences were seen in Vn, CollI, and CollIV deposition. Still, a decrease in Fn and Lam deposition was observed. IGROV1 cells deposited less matrix, but a similar pattern as SKOV3 cells was observed with and without MMC. We performed similar immunostaining to analyze the ECM network of normal mesothelial Met5A cells (covering the peritoneal cavity of women) in crowded complete or serum-free media. The results revealed a similar pattern to OCC. With Fc, the deposition of Fn, CollI, Lam and CollIV was a little decreased compared to the control without MMC, while their deposition was considerably decreased with Dx (Figure S5). Contrary to previously published works, MMC has the

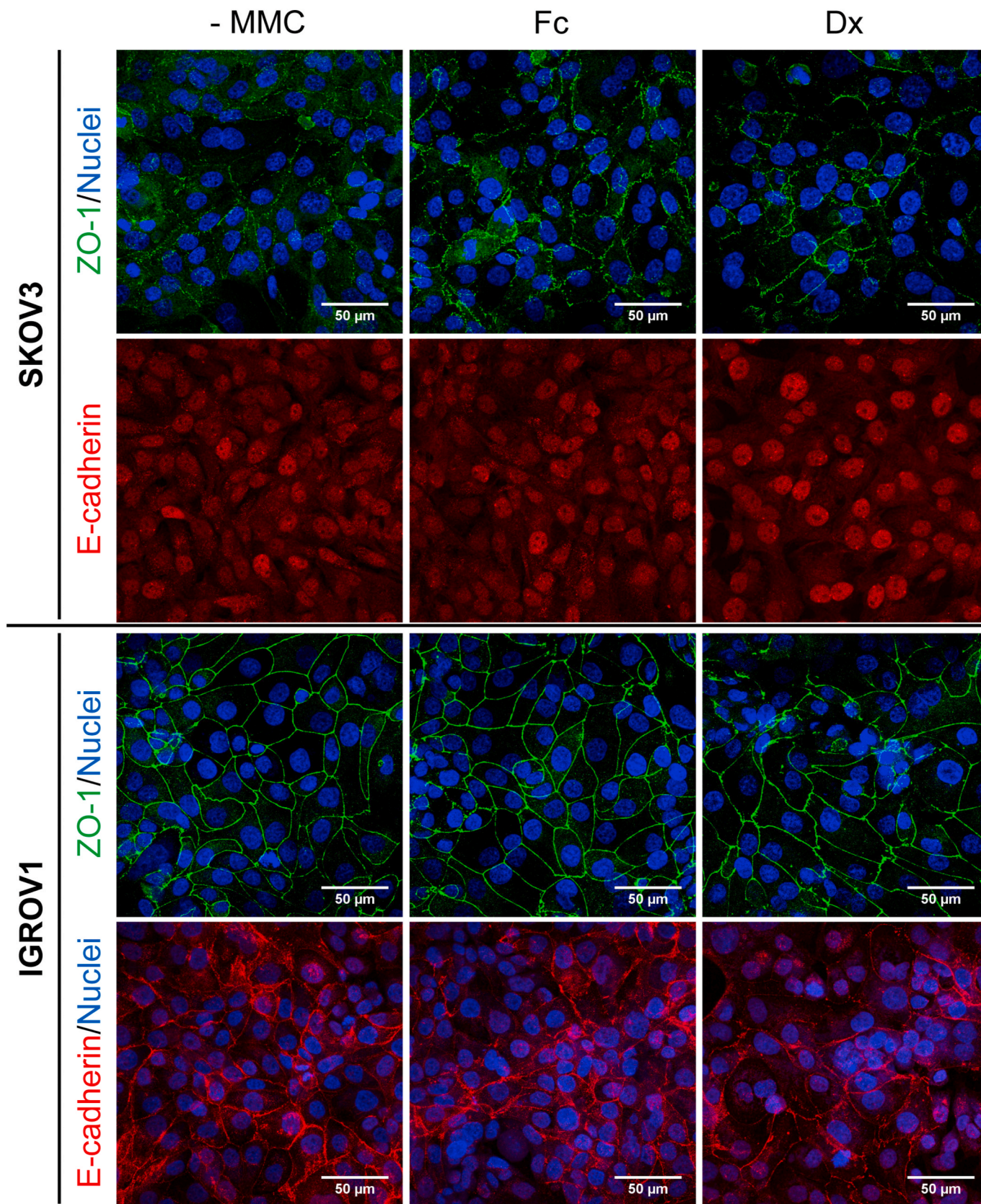


Fig. 5. Extracellular macromolecular crowding modulates OCC intercellular junction proteins organization. Adherent SKOV3 and IGROV1 cells were cultured 48 h in their culture media supplemented with 0 (-MMC) or 75 mg/mL of Fc or Dx. They were then stained for ZO-1 (green) or E-cadherin (red) and DNA (blue). Representative images show the differential effect of MMC on cells, with an increased intercellular ZO-1 and nuclear E-cadherin in SKOV3 cells and a decreased intercellular E-cadherin in IGROV1 cells. Scale bar: 50 μm.

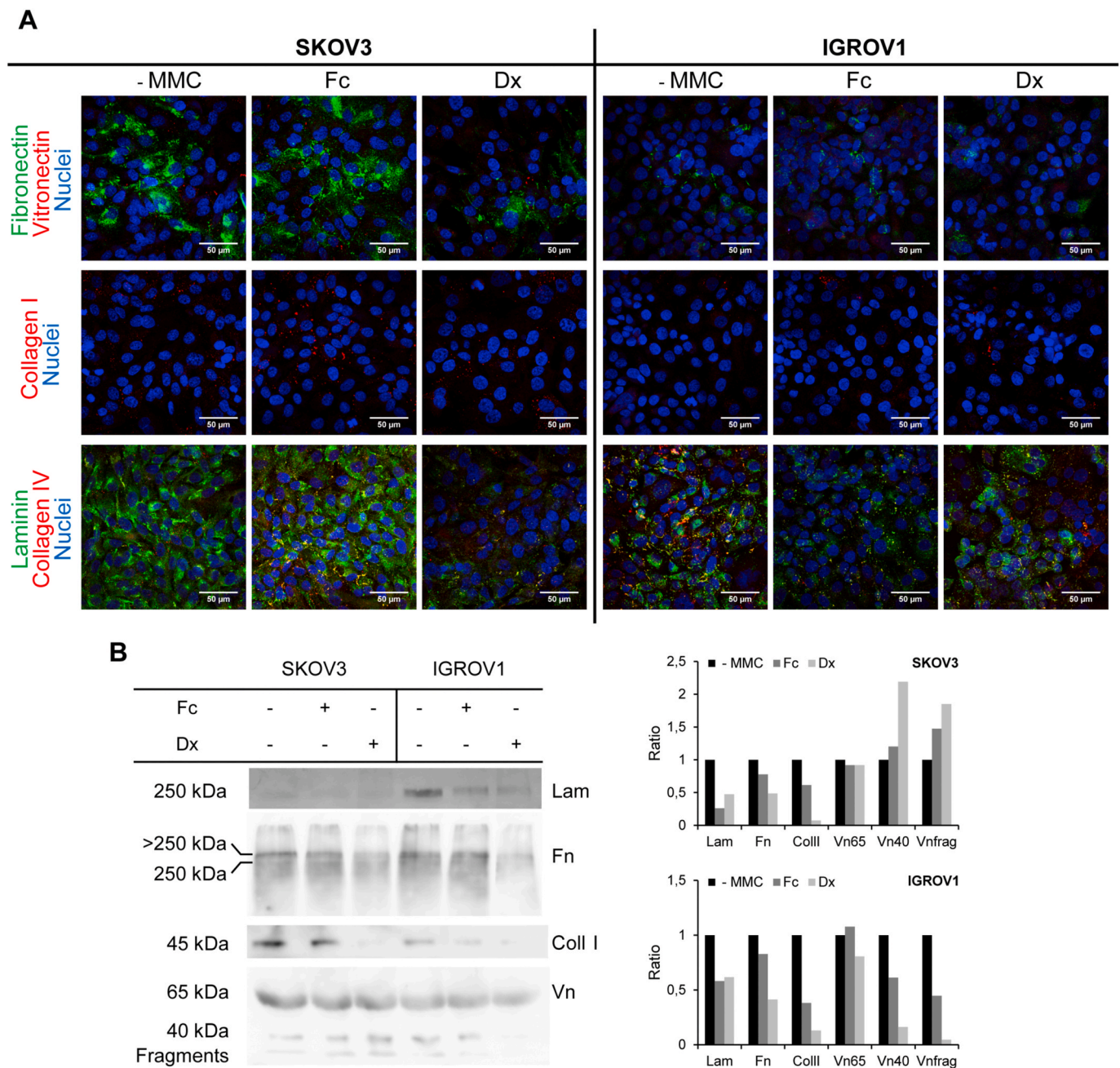


Fig. 6. Extracellular macromolecular crowding alters OCC extracellular matrix organization. Adherent SKOV3 and IGROV1 cells were cultured 48 h in their culture media supplemented with 0 (-MMC) or 75 mg/mL of Fc or Dx. (A) Stromal and basal ECM networks were then stained for fibronectin (Fn), vitronectin (Vn), collagen I (CollI), laminin (Lam), collagen IV, and nuclei. Representative images, of two independent experiments in duplicate, reveal decreased matrix deposition in presence of Dx. Scale bar: 50 μ m. (B) Fn, Vn, CollI, and Lam in SKOV3 and IGROV1 cells growth medium cultured for 48 h in the presence of 0 (-MMC) or 75 mg/mL of Fc or Dx were analyzed by Western blot. Graphics represent the densitometric estimation of Western blot. Quantification of Western blot demonstrates that Fc and Dx decrease extracellular matrix proteins release in the supernatant.

opposite effect on matrix deposition than that observed on healthy fibroblast or stem cells in literature. Here, extracellular MMC induces a decrease in ECM deposition by unhealthy OCC and normal mesothelial cells.

The conditioned growth media of OCC with Fc or Dx has been harvested and submitted to Western blot. Compared to the control, the supernatant of SKOV3 cells cultured with Fc revealed a drastic decrease of Lam and a slight decrease of Fn, CollI 45 kDa fragment, and Vn 65 kDa isoform (Fig. 6B). An increase of Vn 40 kDa and smaller fragments was observed. With Dx, these observations were even more pronounced. The supernatant of IGROV1 cells cultured with Fc also presented a decrease

in Lam, Fn, and CollI 45 kDa fragment and, Vn 40 kDa and smaller fragments. With Dx, these decreases were even more pronounced. In the tested conditioned media of OCC, gelatin zymography revealed no proteolytic activity (*data not shown*). Altogether, these data show that extracellular MMC alters ECM protein production and organization by OCC.

3.7. Extracellular MMC affects the intracellular nucleus

To further elucidate the relationship between extracellular MMC on intracellular processes, we looked at the nucleus morphology. As shown

Table 1

Extracellular macromolecular crowding impacts OCC intracellular nucleus area. Adherent SKOV3 and IGROV1 cells were cultured 48 h in their culture media supplemented with 0 (-MMC) or 75 mg/mL of Fc or Dx. The mean nucleus area, represented as mean \pm standard deviation, was quantified on more than 827 SKOV3 and 1512 IGROV1 nucleus of at least three independent experiments in duplicate.

	SKOV3			IGROV1		
	- MMC	Fc	Dx	- MMC	Fc	Dx
Mean nucleus area (μm^2)	121,8 \pm 9,4	117,8 \pm 9	140,7 \pm 11,9***	103,6 \pm 6,6	104,4 \pm 5,7	114,8 \pm 5,4***

Significant differences were estimated by comparison to the control without crowders (-MMC) (***) $p < 0.005$, Student's test) and demonstrated that Dx induces an increase in the nucleus area.

in Table 1, SKOV3 and IGROV1 cells cultured with Fc had a similar mean nucleus area as their respective control cultured without MMC. However, when cultured with Dx, the mean nucleus area of cells increased significantly by about 15 and 11% respectively for SKOV3 and IGROV1 cells compared to the control. These results were confirmed by the analysis of the nucleus area distribution which correlated with an increase of the nuclear shape index of SKOV3 and IGROV1 cells (Figure S6) [4]. These results witness of an effect of extracellular MMC on the intracellular nucleus, potentially impacting gene expression.

4. Discussion

In this study, we provide evidence that extracellular MMC could affect OCC behaviors during dissemination. Three previous studies worked on cancer cells associated with MMC. Sun & al. used MMC as a tool to extract nuclear protein from cancer cells [36]. Ranamukhaachchi & al. mixed MMC to collagen to generate collagen gel with different architecture and study the tuning of breast cancer cells morphology and invasiveness [65]. Interestingly, Gonzalez & al. showed that crowders associated viscosity enhances liver cancer cells mechanosensing and migration [63]. Ovarian cancer is one of a kind where OCC is in direct contact with the biological fluid ascites from early stages. However, none of these studies looked at the effect of extracellular fluid MMC and its confinement on OCC. OCC disseminates through crucial steps: the growth of the primary tumor, shedding of cancer cells from the primary site into the peritoneal ascites, implantation to peritoneum to disseminate, and eventually dissemination through other body fluids like blood [9]. Ascites, and eventually blood, thus impact adherent OCC at the primary site, non-adherent OCC upon shedding, OCC implantation and re-adherent OCC upon implantation and dissemination. These two liquids are naturally crowded environments as they present high total protein concentration around 75 mg/mL and, are composed of high molecular weight molecules like fibronectin (200–250 kDa as a monomer and 400–500 kDa as a dimer) known to highly influence OCC [4,17,20,66,67]. As noted by Shadid & al., to mimic MMC of biological fluids, the ideal crowding agent must provide a natural microenvironment [77]. Therefore, using ascites or blood would be the best approach. However, it would be difficult to interpret the experimental data due to their biochemical heterogeneity [19,78]. Indeed, Puiffe & al. remarkably showed that ovarian cancer cells OV-90 responses (in term of invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression) to different ascites is highly heterogeneous [79]. The study of Puiffe & al. also suggests a potential discriminatory effect on OCC between the biochemical and physical crowding properties of ascites when they heat-inactivate ascites. Therefore, we used a “bottom-up” reconstruction approach to mimic and understand MMC induced by high molecular weight molecules in fluids. We added either Fc 400 kDa or Dx 250 kDa, at the concentration of 75 mg/mL in cell culture media, a concentration representing the average total protein concentration estimated in human ovarian cancer ascites and blood. These two inert crowders, mimicking different high molecular weight biomolecules, have few similar biophysical features (charge and hydrodynamic radii). But they also present different features. Ribbon-like Dx presents a higher FVO compared to spheric Fc - 10 against 6.6% - which could differentially impact cell behaviors. FVO has previously

been calculated for different proteins present in blood and was found to be ranging between 1.32 and 18.72% witnessing the physiological relevance of our crowders concentration choice [70]. So here, a concentration of 75 mg/mL of crowders could mimic physiological MMC concentration and different physiological FVO. The influence of these two different kinds of crowders on OCC has then been investigated. The data suggested a differential OCC response depending on the cell phenotype and the crowders properties, especially the crowdedness represented by the FVO.

We looked at the impact of the two crowders on two OCC behaviors: SKOV3 cells with an intermediate-mesenchymal phenotype and IGROV1 cells with an intermediate-epithelial phenotype [3,73,74]. Fc did not affect the proliferation of either SKOV3 or IGROV1 cells, while Dx had a cytostatic effect without affecting senescence but still promoting IGROV1 cell metabolic activity. In light of literature, MMC can have a versatile effect on cell proliferation. Indeed, MMC attenuated the proliferation of human adipose stem cells while it increased human fibroblasts and human bone marrow mesenchymal stem cell proliferation [70,80]. We have to note that our team previously showed that ascites do not impact SKOV3 and IGROV1 cell proliferation [3]. Thus, Fc acts similarly to ascites, while the higher crowding property of Dx seems to oppose biochemical cues of ascites and limit cell proliferation. The differential effect of Dx on cell metabolic activities indicates that SKOV3 and IGROV1 cells potentially use different metabolic pathways in crowded environments. Indeed, it has been revealed that quiescent cells redirect their metabolic activities from generating progeny to the preservation of self-integrity and alternative functions beneficial to the organism as a whole [81]. SKOV3 and IGROV1 cells could thus be using a similar strategy in crowded environments.

MMC impeded both SKOV3 and IGROV1 cell aggregation in spheroid. These results are opposite to the effect of ascites which promotes the compaction of SKOV3 and IGROV1 spheroids [75]. These results also suggest that MMC hinders OCC aggregation and cell-cell adhesion probably by limiting the diffusion and sedimentation of cells. Indeed, many works showed that MMC reduces molecules diffusion and could thus also limit cell diffusion/sedimentation [28,31]. These results also highlight that MMC acts opposite of biochemical cues of ascites and that the biological molecules present in ascites like ECM proteins are probably major effectors for multicellular aggregation. Adding ECM proteins to crowded media could shed light on this aspect. For example, Lam and Fn, involved in spheroid maintenance, are known to be found in ovarian cancer ascites and are associated with malignant ovarian cancer and/or poor prognosis [82,83]. Interestingly, Burleson & al. showed that disaggregation of OCC spheroid is a helpful step for the colonization of mesothelial cell monolayers [84]. This suggests that MMC could be an advantageous property of fluid for OCC dissemination.

Upon shedding into biological body fluid, OCC implant to surrounding tissues in order to form metastasis. Our team showed that ascites would help OCC progression [3]. However here, beside cell-cell adhesion, extracellular MMC also hinders cell-substratum adhesion suggesting that MMC is an opposing force to ascites biochemical cues and to OCC implantation and dissemination. In the case of Fc, OCC adhesion presented a standard bell curve with a threshold concentration specific to each cell line and crowder. Low crowder concentration seems to increase cell adhesion. But high crowder concentration might

generate steric hindrance and media density might become similar to cell density impeding cell sedimentation and adhesion.

In crowded environments, SKOV3 and IGROV1 cells reduced stress fibers and cortical actin to organize instead perinuclear actin fibers. These changes were more dramatic when cells were cultured with more crowding Dx. Cells switched to less adherent phenotype with less mature anchoring structures and, MMC promoted collective as well as individual migration patterns. This kind of change can happen in biochemically different environments. Our team previously showed that SKOV3 switched toward a more mesenchymal phenotype when cultured in ovarian cancer ascites or in the presence of amyloid-like fibronectin aggregates [3,4]. Here, we show that SKOV3 and IGROV1 cells can also switch phenotype upon different biophysical environments. Confinement and low adhesion can induce a fast amoeboid migration of mesenchymal cells [85]. Thus, we could suppose that the confinement-like environment produced by extracellular MMC could emphasize more motile capacities of OCC. The study of Gonzalez-Molina & al. pointed in the same direction as our study as we both showed that MMC increases cancer cell migration [63]. Gonzalez-Molina & al. also highlighted that MMC induced mesenchymal migration was not always associated with an epithelial-mesenchymal transition switch. Cancer cells within a single tumor can simultaneously move collectively and individually [86]. Our results are a good example of coexisting migration patterns induced by MMC.

Here, we show for the first time that increased extracellular MMC could induce a more motile phenotype of OCC by a stabilization of ZO-1 and a potential translocation of E-cadherin in the nucleus in SKOV3 cells and, a decrease of intercellular E-cadherin in IGROV1 cells. Similar ZO-1 stabilization under crowded environments was previously described for stem cells [46]. Iliina & al. described the importance of ZO-1 for cell-cell interaction during collective migration [87]. Nuclear localization of E-cadherin with a concomitant loss of membrane E-cadherin has been found in several types of cancer and was systematically associated with accelerated tumor growth or increased migration, invasion, or aggressiveness [88–92]. Some studies showed that the cleaved E-cadherin fragment was translocated in the nucleus to increase tumor growth or prevent apoptosis [93,94]. Altogether the data suggest that MMC differentially promotes migration and dissemination of OCC with different junction protein organization mechanisms. This kind of junction protein reorganization is a well-known process during cell migration, and this reorganization can be different for each cell type [95].

In the overall work, attenuated cell-substratum and cell-cell adhesion in favor of accentuated migration in crowded environments seemed more prominent for SKOV3 cells compared to IGROV1 cells. This could be explained by their respective initial phenotype within the epithelial-mesenchymal spectrum: SKOV3 cells (isolated from ascites) present a mesenchymal-like phenotype, while IGROV1 cells (isolated from adenocarcinoma) have an epithelial-like phenotype and tend to form spontaneous spheroid. Indeed, it is important to note that while IGROV1 cells express $\alpha\beta3$ integrin needed for directionally persistent migration, SKOV3 cells express both $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ integrins, the latest needed for collective migration [96–98]. A study showed that IGROV1 cells expressed E-cadherin while SKOV3 does not, and this was suggested in our experiments [73]. SKOV3 cells produce higher vimentin responsible for more invasive and less adhesive phenotype [99]. Gene and micro-RNA expression analysis showed that SKOV3 highly expressed genes involved in cell movement, invasion, and homing [100]. IGROV1 cells highly expressed genes involved in cell-cell adhesion [100]. Altogether, we suggest that the higher expression of genes implicated in adhesion, and especially E-cadherin, could explain the higher cell-cell and cell-substratum adhesion rate of IGROV1 cells in crowded environments. In the case of SKOV3 cells, the expression of migratory genes, especially integrins needed for migration with the stabilization of ZO-1 junctional protein needed for collective migration, could explain their lower adhesion and higher migration rate in crowded environments.

The more motile phenotype of OCC in crowded environments was

associated with a decrease in stromal and basal ECM deposition, especially Fn and Lam matrix, and correlated with a decrease of their release in the supernatant. In the case of intermediate-mesenchymal SKOV3 cells, Dx-associated crowding seemed to instigate the cleavage of Vn into smaller fragments. Altogether, these data indicate that MMC negatively impact protein production by OCC. We showed a similar effect on normal mesothelial Met5A cells which cover the peritoneal cavity. In this study, we looked solely at the effect of MMC on matrix deposition and not on matrix maturation. Indeed, type I collagen maturation requires ascorbic acid. Winter & al. showed that the combination of ascorbic acid with MMC helps to enhance collagen I matrix deposition by myometrial smooth muscle cells. It would be interesting to look at this combination on OCC [101]. While MMC has been widely studied for its property to accelerate ECM deposition by healthy cells and enhance tissue formation for tissue engineering, we here show that extracellular MMC can have an opposite effect in the case of OCC and mesothelial cells [50,52]. This could be explained by the differences in crowders properties especially concentration, size, and type of the crowder. This witnesses that MMC differentially affects ECM deposition and migration depending on the crowder properties.

It has greatly been shown that decellularized extracellular matrix produced in crowded environments helps either maintain the stemness of cells, maintain specialized cells like podocytes, or either drive stem cell differentiation [46,49,60]. This suggests that decellularized ECM produced in crowded environments could also fine-tune cancer fate. Besides, our results suggest that mesothelial ECM, an implantation site of OCC, is modified in crowded environment.

We showed that extracellular MMC has a direct effect on nucleus as its area increased. An increase in nuclear size was also observed in cervical cancer and high-grade urothelial carcinomas [102,103]. We can suppose that the reduced ECM protein production and deposition in crowded microenvironments could be a consequence of a decrease in intranuclear MMC and gene expression in a bigger nucleus. Indeed, the excessive increase of nucleus volume impairs cell-cycle progression by diluting the cyto- and nucleoplasm, decreasing intracellular MMC, and thus mRNA and protein expression not being proportional to the increased size [28,32,104–107]. But the increased size of the nucleus could also be explained by an accumulation of molecules in the nucleus like the observed E-cadherin in SKOV3 cells. Inhibition of nuclear export could also lead to an increase of nuclear size [108].

An increase of nuclear surface suggests a potential change in the force acting from the cytoplasm. So in crowded environments, the increased perinuclear actin at the expense of decreased cortical actin filament could be one of the driving forces of nuclear area increase. Indeed, several works showed that actin regulates nucleus morphology. The formation of perinuclear actin caps especially helps the flattening of the nucleus which seems to be the case in our experiments [109,110]. A study showed the increase of the nucleus projected area with the increased substrate stiffness [111]. As described by Liu & al., the cytoskeletal caging of the nucleus help to transmit the mechanical stresses that affect nuclear shape [26]. Actin filaments generate the forces that drive the nuclear movement through interconnections between the nuclear surface and the actin caps, which would prevent nuclear rotation and allow for nuclear translocation during migration. Altogether this suggests that in crowded environment nuclear caging by actin caps would help the translocation of nucleus during the migration. Further studies should be carried out to decipher lamin and osmotic pressure involvement in nucleus size regulation in crowded environments [112, 113]. The mechanisms regulating nucleus size in a crowded extracellular environment has to be further investigated in our model.

In the overall work, the results showed that, rather than the hydrodynamic radii of molecules, the FVO, thus the crowdedness, of the crowders seems to be important in regulating cell behaviors. The smaller the crowder is, the higher the FVO is and, the more drastic is the modification of OCC behaviors.

As future strategies, coupling the physical crowding property of fluid

could change many perspectives in cancer model engineering and could be used as a more relevant model for drug screening or cancer studies. But this model could also be improved by taking into account several other parameters to fully understand the effect of extracellular MMC on OCC: concentration, molecular weight of crowder, mix of crowdings, viscosity, crowder type, their charge, and their polydispersity [68]. So far, several studies have shown the effects of intracellular MMC but the direct relationship between extracellular MMC and intracellular activities like metabolism, gene expression and, vesicle transports in OCC is still unclear. In this study, we propose that MMC could be used to develop more relevant 3D *in vitro* models for cancer study. Highly performant microvasculature and microfluidic 3D *in vitro* model has already been developed [114]. Implementation of MMC in this model could help to understand the effect of MMC on cancer cells extravasation in an even more physiologically relevant model. Some studies showed the impact of MMC on collagen organization in hydrogels or on decellularized matrices for tissue-specific tailoring, and their subsequent effect on cell behaviors [56,60,65,115,116]. MMC and decellularized mesothelial matrix generated in crowded environments could be used as more relevant models for fundamental studies and drug screening assay integrating cancers cells behaviors on matrices and/or crowded environments [47,62]. As MMC seems to have a more important role in tuning OCC behaviors and ECM, it gives rise to a wide range of future possibilities to investigate ovarian cancer including cancer model engineering or drug screening.

5. Conclusions

The proposed study demonstrates that incorporating polymers of relevant macromolecular size and concentration into the extracellular liquid microenvironment could greatly influence OCC behaviors. We identified a differential role of MMC. While extracellular MMC negatively affects non-adherent OCC adhesion and aggregation; extracellular MMC promotes adherent OCC migration by decreasing ECM deposition and reorganizing the actin cytoskeleton and nucleus. Altogether, MMC promotes the dissemination phenotype of OCC. Moreover, the higher the crowdedness is, the more important is the effect of MMC on OCC behaviors, with a more impactful effect on mesenchymal-like OCC. MMC was shown to be a simple way to design a relevant biomimetic model of ovarian cancer integrating a biophysical property of fluids. This model can easily be tailored as a theoretical study tool to analyze implantation and dissemination of OCC through crowded biological fluids. It can also be used for tissue-specific matrix design with the purpose of cancer model engineering and drug screening.

Credit author statement

Rümeza Bascetin: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Writing –Original Draft, Writing – review & editing, Visualization, Supervision; Carine Laurent-Issartel: Methodology, Investigation; Cécile Blanc-Fournier: Resources; Charlotte Vendrely: Resources; Sabrina Kellouche: Methodology, Writing – review & editing; Franck Carreiras: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – review & editing; Olivier Gallet: Validation, Resources, Writing –Original Draft, Supervision; Johanne Leroy-Dudal: Conceptualization, Validation, Resources, Writing –Original Draft, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We thank the Ligue contre le Cancer Oise for funding our project. We

thank Mélanie Briand and Laurent Poulain from Biological Resources Centre "OvaResources" (certified NF S 96–900, Cancer Center François Baclesse, Caen, France) for providing ascites samples used in this work. We thank Dr. Cedric Picot for graciously providing the senescence detection kit. We also thank Rémy Agniel and Lamia El Guermah for their help. Lastly, we thank the EA2526 LPPI unit (Laboratoire de Physicochimie des polymères et des interfaces, Cergy-Pontoise, France) for lending the Zetasizer.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120610>.

Fundings

This work was funded by the Ligue contre le Cancer Oise (France) under the grant ID [2020-051] ERRMECE-Ligue contre le Cancer.

Data availability

The raw/processed data required to reproduce these findings can be shared by the author upon request.

References

- [1] J. Leroy-Dudal, C. Demeilliers, O. Gallet, E. Pauthe, S. Dutoit, R. Agniel, P. Gauduchon, F. Carreiras, Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves α integrins and the participation of MMP2, *Int. J. Canc.* 114 (2005) 531–543, <https://doi.org/10.1002/ijc.20778>.
- [2] S. Kellouche, J. Fernandes, J. Leroy-Dudal, O. Gallet, S. Dutoit, L. Poulain, F. Carreiras, Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin, *Tumor Biol.* 31 (2010) 129–139, <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0017-9>.
- [3] L. Carduner, J. Leroy-Dudal, C.R. Picot, O. Gallet, F. Carreiras, S. Kellouche, Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal spectrum in ovarian cancer cells: enhancement of their invasive behavior partly dependant on α integrins, *Clin. Exp. Metastasis* 31 (2014) 675–688, <https://doi.org/10.1007/s10585-014-9658-1>.
- [4] R. Bascetin, L. Blay, S. Kellouche, F. Carreiras, C.R. Picot, M. Briand, R. Agniel, O. Gallet, C. Vendrely, J. Leroy-Dudal, Fibronectin amyloid-like aggregation alters its extracellular matrix incorporation and promotes a single and sparsed cell migration, *Exp. Cell Res.* 371 (2018) 104–121, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.07.047>.
- [5] V. Prévost, K. David, P. Ferrandiz, O. Gallet, M. Hindié, Diffusions of sound frequencies designed to target dehydrins induce hydric stress tolerance in *Pisum sativum* seedlings, *Heliyon* 6 (2020), e04991, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04991>.
- [6] D.G. Tang, Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity, *Cell Res.* 22 (2012) 457–472, <https://doi.org/10.1038/cr.2012.13>.
- [7] M. Saxena, G. Christofori, Rebuilding cancer metastasis in the mouse, *Mol. Oncol.* 7 (2013) 283–296, <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.02.009>.
- [8] B. Emon, J. Bauer, Y. Jain, B. Jung, T. Saif, Biophysics of tumor microenvironment and cancer metastasis - a mini review, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 16 (2018) 279–287, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.07.003>.
- [9] D.S. Tan, R. Agarwal, S.B. Kaye, Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer, *Lancet Oncol.* 7 (2006) 925–934, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70939-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70939-1).
- [10] N.M. Moss, M.V. Barbolina, Y. Liu, L. Sun, H.G. Munshi, M.S. Stack, Ovarian cancer cell detachment and multicellular aggregate formation are regulated by membrane type 1 matrix metalloproteinase: a potential role in I.p. metastatic dissemination, *Cancer Res* 69 (2009) 7121–7129, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4151>.
- [11] N.A. Chebotareva, B.I. Kurganov, N.B. Livanova, Biochemical effects of molecular crowding, *Biochemistry* 69 (2004) 1239–1251, <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0070-y>.
- [12] A.S. Zeiger, F.C. Loe, R. Li, M. Raghunath, K.J. van Vliet, Macromolecular crowding directs extracellular matrix organization and mesenchymal stem cell behavior, *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037904>.
- [13] I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, V.N. Uversky, What Macromolecular Crowding Can Do to a Protein, 2014, <https://doi.org/10.3390/ijms151223090>.
- [14] S.B. Zimmerman, S.O. Trach, Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 599–620, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90499-V](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90499-V).
- [15] J.R. Daban, Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio in higher order chromatin

- structures, *Biochemistry* 39 (2000) 3861–3866, <https://doi.org/10.1021/bi992628w>.
- [16] B. Bohrmann, M. Haider, E. Kellenberger, Concentration evaluation of chromatin in unstained resin-embedded sections by means of low-dose ratio-contrast imaging in STEM, *Ultramicroscopy* 49 (1993) 235–251, [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(93\)90230-U](https://doi.org/10.1016/0304-3991(93)90230-U).
- [17] B. Okutucu, A. Dincer, Ö. Habib, F. Zihnioglu, Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 709–711, <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2007.05.009>.
- [18] R.O. Hynes, A. Naba, Overview of the matrisome—An inventory of extracellular matrix constituents and functions, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (2012), a004903, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004903>.
- [19] E. Kipps, D.S.P. Tan, S.B. Kaye, Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research, *Nat. Rev. Canc.* 13 (2013) 273–282, <https://doi.org/10.1038/nrc3432>.
- [20] A.P. Lucas Oliveira, Proteomic analysis of ovarian cancer tumor fluid is a rich source of potential biomarkers, *J. Proteomics Bioinf.* s5 (2015) 4, <https://doi.org/10.4172/jpb.s5-004>.
- [21] L. Wang, C. Wang, S. Wu, Y. Fan, X. Li, Influence of the mechanical properties of biomaterials on degradability, cell behaviors and signaling pathways: current progress and challenges, *Biomater. Sci.* 8 (2020) 2714–2733, <https://doi.org/10.1039/d0bm00269k>.
- [22] D. Huber, A. Oskoei, X. Casadevall Solvas, Andrew Demello, G.V. Kaigala, Hydrodynamics in cell studies, *Chem. Rev.* 118 (2018) 2042–2079, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00317>.
- [23] M. Huang, S. Fan, W. Xing, C. Liu, Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics, *Math. Comput. Model.* 52 (2010) 2036–2042, <https://doi.org/10.1016/j.mcm.2010.01.024>.
- [24] J.A. Nagy, M.S. Meyers, E.M. Masse, K.T. Herzberg, H.F. Dvorak, Pathogenesis of ascites tumor growth: fibrinogen influx and fibrin accumulation in tissues lining the peritoneal cavity, *Cancer Res* 55 (1995).
- [25] R. Chapanian, D.H. Kwan, I. Constantinescu, F.A. Shaikh, N.A.A. Rossi, S. G. Withers, J.N. Kizhakkedathu, Enhancement of biological reactions on cell surfaces via macromolecular crowding, *Nat. Commun.* 5 (2014) 4683, <https://doi.org/10.1038/ncomms5683>.
- [26] N. Muramatsu, A.P. Minton, Tracer diffusion of globular proteins in concentrated protein solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 85 (2006) 2984–2988, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.9.2984>.
- [27] A.P. Minton, Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion, *Methods Enzymol.* 295 (1998) 127–149, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(98\)95038-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(98)95038-8).
- [28] A. Bancaud, S. Huet, N. Daigle, J. Mozziconacci, J. Beaudouin, J. Ellenberg, Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin, *EMBO J.* 28 (2009) 3785–3798, <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.340>.
- [29] K. Richter, M. Nessler, P. Lichter, Experimental evidence for the influence of molecular crowding on nuclear architecture, *J. Cell Sci.* 120 (2007) 1673–1680, <https://doi.org/10.1242/jcs.03440>.
- [30] K. Richter, M. Nessler, P. Lichter, Macromolecular crowding and its potential impact on nuclear function, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1783 (2008) 2100–2107, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.017>.
- [31] C. Tan, S. Saurabh, M.P. Bruchez, R. Schwartz, P. Leduc, Molecular crowding shapes gene expression in synthetic cellular nanosystems, *Nat. Nanotechnol.* 8 (2013) 602–608, <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.132>.
- [32] M. Golkaram, S. Hellander, B. Drawert, L.R. Petzold, Macromolecular crowding regulates the gene expression profile by limiting diffusion, *PLoS Comput. Biol.* 12 (2016), e1005122, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005122>.
- [33] A. Miermont, F. Waharte, S. Hu, M.N. McClean, S. Bottani, S. Leon, P. Hersen, Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 110 (2013) 5725–5730, <https://doi.org/10.1073/pnas.1215367110>.
- [34] P. Nunes, I. Roth, P. Meda, E. Féraille, D. Brown, U. Hasler, Ionic imbalance, in addition to molecular crowding, abates cytoskeletal dynamics and vesicle motility during hypertonic stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 112 (2015) E3104–E3113, <https://doi.org/10.1073/pnas.1421290112>.
- [35] R. Rashid, S.M.L. Chee, M. Raghunath, T. Wohland, Macromolecular crowding gives rise to microviscosity, anomalous diffusion and accelerated actin polymerization, *Phys. Biol.* 12 (2015), 034001, <https://doi.org/10.1088/1478-3975/12/3/034001>.
- [36] L. Sun, J. Fang, Macromolecular crowding effect is critical for maintaining SIRT1's nuclear localization in cancer cells, *Cell Cycle* 15 (2016) 2647–2655, <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1211214>.
- [37] A. Vazquez, Z.N. Oltvai, Molecular crowding defines a common origin for the warburg effect in proliferating cells and the lactate threshold in muscle physiology, *PLoS One* 6 (2011), e19538, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019538>.
- [38] K. Burkewitz, K. Choe, K. Strange, Hypertonic stress induces rapid and widespread protein damage in *C. elegans*, *Am. J. Physiol. Physiol.* 301 (2011) C566–C576, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00030.2011>.
- [39] A. Vazquez, Metabolic states following accumulation of intracellular aggregates: implications for neurodegenerative diseases, *PLoS One* 8 (2013), e63822, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063822>.
- [40] S. Mittal, R.K. Chowhan, L.R. Singh, Macromolecular crowding: macromolecules friend or foe, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1850 (2015) 1822–1831, <https://doi.org/10.1016/j.BBAGEN.2015.05.002>.
- [41] Y.Q. Fan, H.J. Liu, C. Li, Y.S. Luan, J.M. Yang, Y.L. Wang, Effects of macromolecular crowding on refolding of recombinant human brain-type creatine kinase, *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 113–118, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.04.014>.
- [42] D.M. Hatters, A.P. Minton, G.J. Howlett, Macromolecular crowding accelerates amyloid formation by human apolipoprotein C-II, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 7824–7830, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110429200>.
- [43] B. Ma, J. Xie, L. Wei, W. Li, Macromolecular crowding modulates the kinetics and morphology of amyloid self-assembly by β -lactoglobulin, *Int. J. Biol. Macromol.* 53 (2013) 82–87, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.008>.
- [44] G.A. Siddiqui, A. Naem, Aggregation of globular protein as a consequences of macromolecular crowding: a time and concentration dependent study, *Int. J. Biol. Macromol.* 108 (2018) 360–366, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.001>.
- [45] A. Sohail, S.A. Bhat, A.A. Siddiqui, M. Zaman, R.H. Khan, B. Bano, Conformational transitions induced by in vitro macromolecular crowding lead to the amyloidogenesis of buffalo heart cystatin, *J. Mol. Recogn.* 28 (2015) 699–709, <https://doi.org/10.1002/jmr.2484>.
- [46] S. McLenachan, E. Hao, D. Zhang, L. Zhang, M. Edel, F. Chen, Bioengineered Bruch's-like extracellular matrix promotes retinal pigment epithelial differentiation, *Biochem. Biophys. Reports* 10 (2017) 178–185, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.008>.
- [47] C.Z.C. Chen, Y.X. Peng, Z.B. Wang, P. V. Fish, J.L. Kaar, R.R. Koepsel, A.J. Russell, R.R. Lareu, M. Raghunath, The Scar-in-a-Jar: studying potential antifibrotic compounds from the epigenetic to extracellular level in a single well, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 1196–1209, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00387.x>.
- [48] R.R. Lareu, K.H. Subramhanya, Y. Peng, P. Benny, C. Chen, Z. Wang, R. Rajagopalan, M. Raghunath, Collagen matrix deposition is dramatically enhanced in vitro when crowded with charged macromolecules: the biological relevance of the excluded volume effect, *FEBS Lett.* 581 (2007) 2709–2714, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.020>.
- [49] Y. Peng, M.T. Bocker, J. Holm, W.S. Toh, C.S. Hughes, F. Kidwai, G.A. Lajoie, T. Cao, F. Lyko, M. Raghunath, Human fibroblast matrices bio-assembled under macromolecular crowding support stable propagation of human embryonic stem cells, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6 (2012) e74–e86, <https://doi.org/10.1002/term.1560>.
- [50] A. Satyam, P. Kumar, X. Fan, A. Gorelov, Y. Rochev, L. Joshi, H. Peinado, D. Lyden, B. Thomas, B. Rodriguez, M. Raghunath, A. Pandit, D. Zeugolis, Macromolecular crowding meets tissue engineering by self-assembly: a paradigm shift in regenerative medicine, *Adv. Mater.* 26 (2014) 3024–3034, <https://doi.org/10.1002/adma.201304428>.
- [51] A. Satyam, P. Kumar, D. Cigognini, A. Pandit, D.I. Zeugolis, Low, but not too low, oxygen tension and macromolecular crowding accelerate extracellular matrix deposition in human dermal fibroblast culture, *Acta Biomater.* 44 (2016) 221–231, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.008>.
- [52] X.M. Ang, M.H.C. Lee, A. Blocki, C. Chen, L.L.S. Ong, H.H. Asada, A. Sheppard, M. Raghunath, Macromolecular crowding amplifies adipogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by enhancing the pro-adipogenic microenvironment, *Tissue Eng.* 20 (2013) 966–981, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0337>.
- [53] D. Cigognini, D. Gaspar, P. Kumar, A. Satyam, S. Alagesan, C. Sanz-Nogués, M. Griffin, T. O'Brien, A. Pandit, D.I. Zeugolis, Macromolecular crowding meets oxygen tension in human mesenchymal stem cell culture - a step closer to physiologically relevant in vitro organogenesis, *Sci. Rep.* 6 (2016) 30746, <https://doi.org/10.1038/srep30746>.
- [54] R.R. Lareu, I. Arsianti, H.K. Subramhanya, P. Yanxian, M. Raghunath, In vitro enhancement of collagen matrix formation and crosslinking for applications in tissue engineering: a preliminary study, *Tissue Eng.* 13 (2007) 385–391, <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0224>.
- [55] C. Chen, F. Loe, A. Blocki, Y. Peng, M. Raghunath, Applying macromolecular crowding to enhance extracellular matrix deposition and its remodeling in vitro for tissue engineering and cell-based therapies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 277–290, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.003>.
- [56] J.-Y. Dewavrin, N. Hamzavi, V.P.W. Shim, M. Raghunath, Tuning the architecture of three-dimensional collagen hydrogels by physiological macromolecular crowding, *Acta Biomater.* 10 (2014) 4351–4359, <https://doi.org/10.1016/j.ACTBIO.2014.06.006>.
- [57] J.Y. Dewavrin, M. Abdurrahim, A. Blocki, M. Musib, F. Piazza, M. Raghunath, Synergistic rate boosting of collagen fibrillogenesis in heterogeneous mixtures of crowding agents, *J. Phys. Chem. B* 119 (2015) 4350–4358, <https://doi.org/10.1021/jp5077559>.
- [58] M. Assunção, C.W. Wong, J.J. Richardson, R. Tsang, S. Beyer, M. Raghunath, A. Blocki, Macromolecular dextran sulfate facilitates extracellular matrix deposition by electrostatic interaction independent from a macromolecular crowding effect, *Mater. Sci. Eng. C* 106 (2020) 110280, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110280>.
- [59] M.C. Prewitz, A. Stißel, J. Friedrichs, N. Träber, S. Vogler, M. Bornhäuser, C. Werner, Extracellular matrix deposition of bone marrow stroma enhanced by macromolecular crowding, *Biomaterials* 73 (2015) 60–69, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.014>.
- [60] A. Satyam, M.G. Tsokos, J.S. Tresback, D.I. Zeugolis, G.C. Tsokos, Cell-derived extracellular matrix-rich biomimetic substrate supports podocyte proliferation, differentiation, and maintenance of native phenotype, *Adv. Funct. Mater.* (2020) 1908752, <https://doi.org/10.1002/adfm.201908752>.

- [61] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. König, B. Victor, P. Keire, T.N. Wight, N.A. F. Chronos, A.E. Kyles, C.R. Gregory, G. Hoyt, R.C. Robbins, T.N. McAllister, Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization, *Nat. Med.* 12 (2006) 361–365, <https://doi.org/10.1038/nm1364>.
- [62] M. Graupp, H.-J. Gruber, G. Weiss, K. Kiesler, S. Bachna-Rotter, G. Friedrich, M. Gugatschka, Establishing principles of macromolecular crowding for in vitro fibrosis research of the vocal fold lamina propria, *Laryngoscope* 125 (2015) E203–E209, <https://doi.org/10.1002/lary.25103>.
- [63] J. Gonzalez-Molina, X. Zhang, M. Borghesan, J. Mendonça da Silva, M. Awan, B. Fuller, N. Gavara, C. Selden, Extracellular fluid viscosity enhances liver cancer cell mechanosensing and migration, *Biomaterials* 177 (2018) 113–124, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.058>.
- [64] J. Gonzalez-Molina, J. Mendonça da Silva, B. Fuller, C. Selden, The extracellular fluid macromolecular composition differentially affects cell-substrate adhesion and cell morphology, *Sci. Rep.* 9 (2019) 8505, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44960-3>.
- [65] S.K. Ranamukhaarachchi, R.N. Modi, A. Han, D.O. Velez, A. Kumar, A.J. Engler, S.I. Fraley, Macromolecular crowding tunes 3D collagen architecture and cell morphogenesis, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 618–633, <https://doi.org/10.1039/c8bm01188e>.
- [66] L. Poulouin, O. Gallet, M. Rouahi, J.M. Imhoff, Plasma fibronectin: three steps to purification and stability, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 146–152, <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1103>.
- [67] L. Carduner, R. Agniel, S. Kellouche, C.R. Picot, C. Blanc-Fournier, J. Leroy-Dudal, F. Carreiras, Ovarian cancer ascites-derived vitronectin and fibronectin: combined purification, molecular features and effects on cell response, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1830 (2013) 4885–4897, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.023>.
- [68] D. Gaspar, K.P. Fuller, D.I. Zeugolis, Polydispersity and negative charge are key modulators of extracellular matrix deposition under macromolecular crowding conditions, *Acta Biomater.* 88 (2019) 197–210, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.050>.
- [69] K.S. Harve, M. Raghunath, R.R. Lareu, R. Rajagopalan, Macromolecular crowding IN biological systems: dynamic light scattering (DLS) to quantify the excluded volume effect (EVE), *Biophys. Rev. Lett.* 1 (2006) 317–325, <https://doi.org/10.1142/s1793048006000215>.
- [70] R. Rashid, N.S.J. Lim, S.M.L. Chee, S.N. Png, T. Wohland, M. Raghunath, Novel use for polyvinylpyrrolidone as a macromolecular crowder for enhanced extracellular matrix deposition and cell proliferation, *Tissue Eng. C Methods* 20 (2014) 994–1002, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0733>.
- [71] C.F. Lee, S. Bird, M. Shaw, L. Jean, D.J. Vaux, Combined effects of agitation, macromolecular crowding, and interfaces on amyloidogenesis, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 38006–38019, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400580>.
- [72] G. Sahagun, S.A. Moore, M.N. Hart, Permeability of neutral vs. anionic dextrans in cultured brain microvascular endothelium, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 259 (2017) H162–H166, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.1.h162>.
- [73] R.Y.J. Huang, M.K. Wong, T.Z. Tan, K.T. Kuay, A.H. C Ng, V.Y. Chung, Y.S. Chu, N. Matsumura, H.C. Lai, Y.F. Lee, W.J. Sim, C. Chai, E. Pietschmann, S. Mori, J.J. H. Low, M. Choolani, J.P. Thiery, An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530), *Cell Death Dis.* 4 (2013), <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.442> e915–e915.
- [74] M. Rosso, B. Majem, L. Devis, L. Lapyckyj, M.J. Besso, M. Llauroad, M.F. Abascal, M.L. Matos, L. Lanau, J. Castellví, J.L. Sánchez, A. Pérez Benavente, A. Gil-Moreno, J. Reventós, A. Santamaria Margalef, M. Rigau, M.H. Vazquez-Levin, E-cadherin, A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness, *PLoS One* 12 (2017), e0184439, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184439>.
- [75] K.L. Sodek, K.J. Murphy, T.J. Brown, M.J. Ringuette, Cell–cell and cell–matrix dynamics in intraperitoneal cancer metastasis, *Canc. Metastasis Rev.* 31 (2012) 397–414, <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9351-2>.
- [76] C.M. Niessen, Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 2525–2532, <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700865>.
- [77] S. Shahid, M.I. Hassan, A. Islam, F. Ahmad, Size-dependent studies of macromolecular crowding on the thermodynamic stability, structure and functional activity of proteins: in vitro and in silico approaches, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861 (2017) 178–197, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.014>.
- [78] I. Matte, D. Lane, C. Laplante, C. Rancourt, A. Piché, Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites, *Am. J. Cancer Res.* 2 (2012) 566–580, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957308>. (Accessed 30 June 2018).
- [79] M.L. Puiffe, C. Le Page, A. Filali-Mouhim, M. Zietarska, V. Ouellet, P.N. Tonin, M. Chevrette, D.M. Provencher, A.M. Mes-Masson, Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer, *Neoplasia* 9 (2007) 820–829, <https://doi.org/10.1593/neo.07472>.
- [80] M. Patrikoski, M.H.C. Lee, L. Mäkinen, X.M. Ang, B. Mannerström, M. Raghunath, S. Miettinen, Effects of macromolecular crowding on human adipose stem cell culture in fetal bovine serum, human serum, and defined xeno-free/serum-free conditions, *Stem Cell. Int.* (2017) 1–14, <https://doi.org/10.1155/2017/6909163>, 2017.
- [81] J.M.S. Lemons, H.A. Collier, X.J. Feng, B.D. Bennett, A. Legesse-Miller, E. L. Johnson, I. Raitman, E.A. Pollina, H.A. Rabitz, J.D. Rabinowitz, Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity, *PLoS Biol.* 8 (2010), <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000514>.
- [82] J.M. Santos, S.P. Camões, E. Filipe, M. Cipriano, R.N. Barcia, M. Filipe, M. Teixeira, S. Simões, M. Gaspar, D. Mosqueira, D.S. Nascimento, P. Pinto-do-Ó, P. Cruz, H. Cruz, M. Castro, J.P. Miranda, 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 (2015) 90, <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0082-5>.
- [83] A. Cho, V.M. Howell, E.K. Colvin, The extracellular matrix in epithelial ovarian cancer - a piece of a puzzle, *Front. Oncol.* 5 (2015) 245, <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00245>.
- [84] K. Burleson, M. Boente, S. Pambuccian, A. Skubitz, Disaggregation and invasion of ovarian carcinoma ascites spheroids, *J. Transl. Med.* 4 (2006) 6, <https://doi.org/10.1186/1479-5876-4-6>.
- [85] Y.-J. Liu, M. Le Berre, F. Lautenschlaeger, P. Maiuri, A. Callan-Jones, M. Heuzé, T. Takaki, R. Voituriez, M. Piel, Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells, *Cell* 160 (2015) 659–672, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.007>.
- [86] N. V. Krakhmal, M. V. Zavyalova, E. V. Denisov, S. V. Vtorushin, V.M. Perelmuter, Cancer invasion: patterns and mechanisms, *Acta Naturae* 7 (2015) 17–28, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085941>. (Accessed 3 August 2019).
- [87] O. Ilina, P. Friedl, Mechanisms of collective cell migration at a glance, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 3203–3208, <https://doi.org/10.1242/jcs.036525>.
- [88] Y. Zhao, T. Yu, N. Zhang, J. Chen, P. Zhang, S. Li, L. Luo, Z. Cui, Y. Qin, F. Liu, Nuclear E-cadherin acetylation promotes colorectal tumorigenesis via enhancing β -catenin activity, *Mol. Canc. Res.* 17 (2019) 655–665, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0637>.
- [89] S. Serra, S. Salahshor, M. Fahig, F. Niakosari, J.M. Radhi, R. Chetty, Nuclear expression of E-Cadherin in solid pseudopapillary tumors of the pancreas, *J. Pancreas* 8 (2007) 296–303, <http://pancreas.amedpub.com/nuclear-expression-of-e-cadherin-in-solid-pseudopapillary-tumors-of-the-pancreas.php?aid=2643>. (Accessed 14 July 2019).
- [90] M.S. Elston, A.J. Gill, J.V. Conaglen, A. Clarkson, R.J. Cook, N.S. Little, B. G. Robinson, R.J. Clifton-Bligh, K.L. McDonald, Nuclear accumulation of E-Cadherin correlates with loss of cytoplasmic membrane staining and invasion in pituitary adenomas, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 1436–1442, <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2075>.
- [91] A.C. Han, A.P. Soler, C.K. Tang, K.A. Knudsen, H. Salazar, Nuclear localization of E-cadherin expression in Merkel cell carcinoma, *Arch. Pathol. Lab Med.* 124 (2000) 1147–1151, [https://doi.org/10.1043/0003-9985\(2000\)124<1147:NLOECE>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-9985(2000)124<1147:NLOECE>2.0.CO;2).
- [92] M. Barshishat, S. Polak-Charcon, B. Schwartz, Butyrate regulates E-cadherin transcription, isoform expression and intracellular position in colon cancer cells, *Br. J. Canc.* 82 (2002) 195–203, <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.0899>.
- [93] M.V. Céspedes, M.J. Larriba, M.A. Pavón, P. Álamo, I. Casanova, M. Parreño, A. Feliu, F.J. Sancho, A. Muñoz, R. Manges, Site-dependent E-cadherin cleavage and nuclear translocation in a metastatic colorectal cancer model, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 2067–2079, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100079>.
- [94] E.C. Ferber, M. Kajita, A. Wadlow, L. Tobiansky, C. Niessen, H. Ariga, J. Daniel, Y. Fujita, A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 12691–12700, <https://doi.org/10.1074/jbc.M708887200>.
- [95] S. Etienne-Manneville, Polarity proteins in migration and invasion, *Oncogene* 27 (2008) 6970–6980, <https://doi.org/10.1038/onc.2008.347>.
- [96] S. Cruet-Hennequart, S. Maubant, J. Luis, P. Gauduchon, C. Staedel, S. Dedhar, α integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells, *Oncogene* 22 (2003) 1688–1702, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206347>.
- [97] R.J. Petrie, A.D. Doyle, K.M. Yamada, Random versus directionally persistent cell migration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 538–549, <https://doi.org/10.1038/nrm2729>.
- [98] S.N. Lee, J.S. Ahn, S.G. Lee, H.S. Lee, A.M.K. Choi, J.H. Yoon, Integrins α v5 and α v β 6 mediate IL-4-induced collective migration in human airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 60 (2019) 420–433, <https://doi.org/10.1165/rmb.2018-0081OC>.
- [99] D. Fang, H. Chen, J.Y. Zhu, W. Wang, Y. Teng, H.-F. Ding, Q. Jing, S.-B. Su, S. Huang, Epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells is sustained by Rac1 through simultaneous activation of MEK1/2 and Src signaling pathways, *Oncogene* 36 (2017) 1546–1558, <https://doi.org/10.1038/ncr.2016.323>.
- [100] C.M. Beaufort, J.C.A. Helmijr, A.M. Piskorz, M. Hoogstraat, K. Ruijgrok-Ritstier, N. Besselink, M. Murtaza, W.F.J. van IJcken, A.A.J. Heine, M. Smid, M.J. Koudijs, J.D. Brenton, E.M.J.J. Berns, J. Helleman, Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes, *PLoS One* 9 (2014), e103988, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103988>.
- [101] A. Winter, L.A. Salamonsen, J. Evans, Modelling fibroid pathology: development and manipulation of a myometrial smooth muscle cell macromolecular crowding model to alter extracellular matrix deposition, *Mol. Hum. Reprod.* (n.d.). doi: 10.1093/MOLEHR/GAAA036.
- [102] D.N. Slater, S. Rice, R. Stewart, S.E. Melling, E.M. Hewer, J.H.F. Smith, Proposed Sheffield quantitative criteria in cervical cytology to assist the grading of squamous cell dyskaryosis, as the British Society for Clinical Cytology definitions require amendment, *Cytopathology* 16 (2005) 179–192, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2005.00271.x>.
- [103] K. Poropatich, J.C. Yang, R. Goyal, V. Parini, X.J. Yang, Nuclear size measurement for distinguishing urothelial carcinomas from reactive urothelium on tissue sections, *Diagn. Pathol.* 11 (2016) 57, <https://doi.org/10.1186/s13000-016-0501-7>.

- [104] J. Fidorra, T. Mielke, J. Booz, L.E. Feinendegen, Cellular and nuclear volume of human cells during the cell cycle, *Radiat. Environ. Biophys.* 19 (1981) 205–214, <https://doi.org/10.1007/BF01324188>.
- [105] J.G. Umen, The elusive sizer, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 435–441, <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2005.06.001>.
- [106] G.E. Neurohr, R.L. Terry, J. Lengefeld, M. Bonney, G.P. Brittingham, F. Moretto, T.P. Miettinen, L.P. Vaites, L.M. Soares, J.A. Paulo, J.W. Harper, S. Buratowski, S. Manalis, F.J. van Werven, L.J. Holt, A. Amon, Excessive cell growth causes cytoplasm dilution and contributes to senescence, *Cell* 176 (2019) 1083–1097, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.018>, e18.
- [107] R. Hancock, A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus, *J. Struct. Biol.* 146 (2004) 281–290, <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2003.12.008>.
- [108] F.R. Neumann, P. Nurse, Nuclear size control in fission yeast, *J. Cell Biol.* 179 (2007) 593–600, <https://doi.org/10.1083/jcb.200708054>.
- [109] S.B. Khataou, C.M. Hale, P.J. Stewart-Hutchinson, M.S. Patel, C.L. Stewart, P. C. Searson, D. Hodzic, D. Wirtz, A perinuclear actin cap regulates nuclear shape, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106 (2009) 19017–19022, <https://doi.org/10.1073/pnas.0908686106>.
- [110] J.K. Kim, A. Louhghalam, G. Lee, B.W. Schafer, D. Wirtz, D.H. Kim, Nuclear lamin A/C harnesses the perinuclear apical actin cables to protect nuclear morphology, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1–13, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02217-5>.
- [111] R. Vishavkarma, S. Raghavan, C. Kuyyamudi, A. Majumder, J. Dhawan, P. A. Pullarkat, Role of actin filaments in correlating nuclear shape and cell spreading, *PloS One* 9 (2014) 107895, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107895>.
- [112] P. Jevtić, L.J. Edens, X. Li, T. Nguyen, P. Chen, D.L. Levy, Concentration-dependent effects of nuclear lamins on nuclear size in *Xenopus* and mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 27557–27571, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.673798>.
- [113] D.-H. Kim, B. Li, F. Si, J.M. Phillip, D. Wirtz, S.X. Sun, Volume regulation and shape bifurcation in the cell nucleus, *J. Cell Sci.* 128 (2015) 3375–3385, <https://doi.org/10.1242/jcs.166330>.
- [114] M.B. Chen, J.A. Whisler, J. Fröse, C. Yu, Y. Shin, R.D. Kamm, On-chip human microvasculature assay for visualization and quantification of tumor cell extravasation dynamics, *Nat. Protoc.* 12 (2017) 865–880, <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.018>.
- [115] N. Saeidi, K.P. Karamelek, J.A. Paten, R. Zareian, E. DiMasi, J.W. Ruberti, Molecular crowding of collagen: a pathway to produce highly-organized collagenous structures, *Biomaterials* 33 (2012) 7366–7374, <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.06.041>.
- [116] V. Magno, J. Friedrichs, H.M. Weber, M.C. Prewitz, M.V. Tsurkan, C. Werner, Macromolecular crowding for tailoring tissue-derived fibrillated matrices, *Acta Biomater.* 55 (2017) 109–119, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.04.018>.

RESEARCH ARTICLE

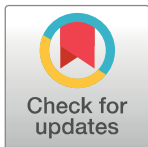
Evaluation of the potential of a new ribavirin analog impairing the dissemination of ovarian cancer cells

Anaïs Wambecke^{1,2}, Carine Laurent-Issartel¹, Johanne Leroy-Dudal¹, Florence Giffard², Fanny Cosson³, Nadège Lubin-Germain³, Jacques Uziel³, Sabrina Kellouche^{1☯*}, Franck Carreiras^{1☯*}

1 Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules, ERRMECe (EA1391), Institut des Matériaux, I-MAT (FD4122), University of Cergy-Pontoise, MIR, rue Descartes, France, **2** Normandie University, UNICAEN, INSERM U1086 ANTICIPE (Interdisciplinary Research Unit for Cancers Prevention and Treatment, BioTICLA Axis (Biology and Innovative Therapeutics for Ovarian Cancers), Esplanade de la Paix, Caen, France, **3** Laboratoire de Chimie Biologique, University of Cergy-Pontoise, mail Gay-Lussac, Cergy-pontoise, France

☯ These authors contributed equally to this work.

* sabrina.kellouche@u-cergy.fr(SK); franck.carreiras@u-cergy.fr(FC)



OPEN ACCESS

Citation: Wambecke A, Laurent-Issartel C, Leroy-Dudal J, Giffard F, Cosson F, Lubin-Germain N, et al. (2019) Evaluation of the potential of a new ribavirin analog impairing the dissemination of ovarian cancer cells. PLoS ONE 14(12): e0225860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860>

Editor: Christophe Egles, Université de Technologie de Compiègne, FRANCE

Received: July 18, 2019

Accepted: November 13, 2019

Published: December 11, 2019

Copyright: © 2019 Wambecke et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Ligue Contre le Cancer Comité de l'Oise, and the foundation of the University of Cergy-Pontoise.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Epithelial ovarian cancers are insidious pathologies that give a poor prognosis due to their late discovery and the increasing emergence of chemoresistance. Development of small pharmacological anticancer molecules remains a major challenge. Ribavirin, usually used in the treatment of hepatitis C virus infections and more recently few cancers, has been a suggestion. However, Ribavirin has many side-effects, suggesting that the synthesis of analogs might be more appropriate.

We have investigated the effect of a Ribavirin analog, SRO-91, on cancer cell behavioral characteristics considered as some of the hallmarks of cancer. Two human ovarian adenocarcinoma cell lines (SKOV3 and IGROV1) and normal cells (mesothelial and fibroblasts) have been used to compare the effects of SRO-91 with those of Ribavirin on cell behavior underlying tumor cell dissemination. SRO-91, like Ribavirin, inhibits proliferation, migration, clonogenicity and spheroids formation of cancer cells. Unlike Ribavirin, SRO-91 is preferentially toxic to cancer compared with normal cells. An *in vitro* physiologically relevant model showed that SRO-91, like Ribavirin or cisplatin, inhibits cancer cell implantation onto peritoneal mesothelium. In conclusion, SRO-91 analog effects on tumor dissemination and its safety regarding non-cancerous (normal) cells are encouraging findings a promising drug for the treatment of ovarian cancer.

Introduction

Ovarian cancer is the gynecological malignancy with the highest case-to-mortality ratio in the western world. Because ovarian cancer is often asymptomatic, it is generally diagnosed at an advanced stage, giving a poor prognosis [1]. Although the majority of tumors initially respond

to standard treatments combining surgery and platinum-based chemotherapy, frequent recurrence and subsequent acquired chemoresistance, as also widespread dissemination, are responsible for the therapeutic ineptness, leading to an overall 5-year survival rate of 40% [2]. In this context, new drugs or therapeutic strategies are needed, in particular, in finding novel cytotoxic systems or molecules that can specifically target malignant cells while sparing healthy cells.

In about 90% of cases, ovarian cancers arise from the transformation of the ovarian surface epithelium. Cells proliferate and spread prevalently by direct extension into adjacent tissues and by cancer cells exfoliating from the primary tumor into the peritoneal cavity. Thus, ovarian cancer cells are preferentially found as a solid tumor mass adhering to the ovary, as multicellular aggregates in the abdominal cavity (referred to as spheroids), and as cells adhering to and invading the peritoneal mesothelium [3,4]. The mesothelium, a single layer of flat cells covering the peritoneal cavity and its organs, is the first barrier met by ovarian tumor cells and is the major site of ovarian carcinoma metastasis before invading the underlying connective tissue rich in fibroblasts.

Considering these data, the development of small pharmacological molecules that can interfere with the molecular mechanisms conducive to the survival of cancer cells presents a major challenge. Among these molecules, ribavirin (RBV) has been suggested as useful in anti-cancer therapy [5,6] (Fig 1).

Ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) is a synthetic nucleoside well known to be a broad-spectrum anti-viral agent, and is extensively used in the treatment of hepatitis C infections and Respiratory Syncytial Virus (RSV). RBV may act through pleiotropic mechanisms as it: i) modulates immunity, inducing a shift from a Th2 to a Th1 cytokine profile *in vivo*, and in mast cell mediator release, stimulated by IgE; ii) inhibits inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) activity that is a key enzymic reaction in guanosine biosynthesis involved in viral replication; and iii) decreases RSV-mediated NF κ B activation [7]. Ribavirin is already known to be effective in cancer therapy; it targets an oncogene, the eukaryotic translation initiation factor eIF4E, elevated in approximately 30% of cancers, including many leukemias and lymphomas, breast, esophagea, and ovarian cancers. Phosphorylation of eIF4E contributes to cell transformation and increased export of a subset of growth-promoting mRNAs, such as cyclin D1 and c-Myc [8]. RBV is a potent anticancer agent, being a strong inducer of apoptosis and a moderate inducer of differentiation in leukemic cells [7]. It also reduces cell proliferation and suppresses clonogenic potential of breast cancer cells, correlating with reduced mRNA export and protein expression of important eIF4E targets [9]. RBV also has anti-proliferative and cytotoxic effects on ovarian cancer (OVCAR-5) cells [7,10]. RBV treatment in clinical trial led to substantial clinical benefit in patients with a poor prognosis in acute myeloid leukemia (AML) [11]. Besides the cost, treatment with RBV has a number of side effects, including hemolytic anemia.

Reduction in toxicity and the side effects of RBV was then a goal, and a large number of RBV analogs were synthesized, such as carba-1,2,3-triazoles, 1,2,4-triazoles, pyrazoles and tetrazoles. Triazole is a structural unit of interest in medicinal chemistry as it is isosteric in the peptide bond and is an aromatic nucleobase analog. Therefore, we have described the synthesis of ribosyl triazoles based on a C-alkynylation reaction of ribose, followed by a 1,3-dipolar cycloaddition [12]. A series of RBV analogs were synthesized, our interest being particularly focused on SRO-91 [13] (Fig 1). This compound, bearing a carbon-carbon bond between ribose and triazole, unlike ribavirin, has antiviral activity against HCV similar to this one (unpublished results). However, no studies on the anti-cancer effect of SRO-91 have been conducted to date. Considering these arguments, we have focused on the impact of SRO-91 and two other 2'-Me-C-nucleoside analogs AFA-16 and FCA-221 on ovarian cancer [14] (Fig 1),

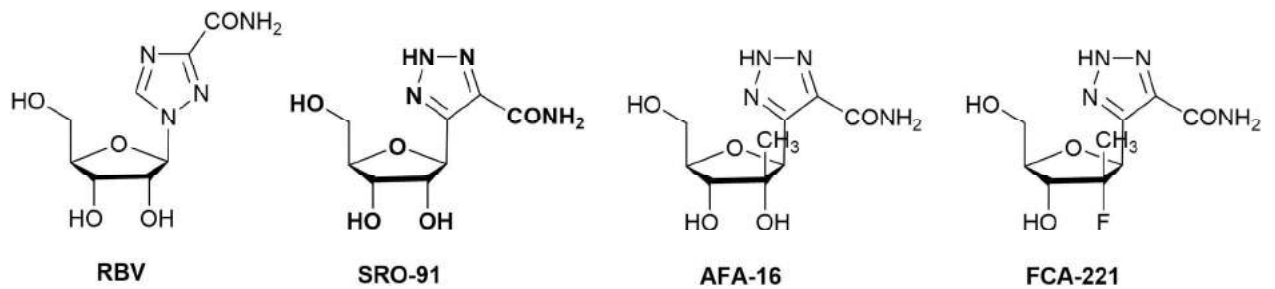


Fig 1. Structure of ribavirin (RBV), SRO-91, AFA-16 and FCA-221 analogs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g001>

and their behavior that underlies dissemination, considered as hallmarks of malignant cancers (proliferation, resisting cell death, invasiveness, etc.) [15]. We have paid particular attention on the potential safety of RBV analogs regarding non-cancerous (normal) tissue cells. Inhibitory effects of SRO-91 were found on the different hallmarks of ovarian cancer dissemination. The relevance to the use of SRO-91 as an anticancer treatment is reinforced its relative non-toxicity to non-cancerous cells that were tested.

Materials and methods

Cells and reagents

The human ovarian adenocarcinoma cell line, IGROV1, was kindly provided by Dr. J. Bénard, and SKOV3 cell lines were kindly supplied by Dr L. Poulain from the BioTICLA team INSERM U1086 (Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Aggressifs, Caen, France). The cells were grown in RPMI-1640 glutaMAX (Life technologies, France) containing 0.07% (v/v) sodium bicarbonate supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biosera, France) in a humidified air atmosphere with 5% CO₂ in air at 37°C. The 2 well characterized human ovarian cancer cell lines, IGROV1 and SKOV3, were used for their ability to mimic the progression of ovarian carcinoma when injected *in vivo* in mouse models [16]. The human mesothelial cell line, MeT-5A, was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va., USA). The cells were grown in M199 supplemented with 3.3 nM epidermal growth factor (EGF; Sigma St-Quentin-Fallavier, France), 870 nM insulin, 400 nM hydrocortisone (Sigma), 1.25 g/l sodium bicarbonate (Invitrogen) and 10% FBS. Human fibroblasts BJ cells purchased from ATCC (France), with a certificate of conformity, were cultured in DMEM (Life technologies, France) supplemented with 10% FBS. All cells were cultured in humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. Subconfluent cells were harvested with 0.25% trypsin-EDTA (Life technologies, France). For the experiments, cells were exposed to a range of concentrations of RBV or its analogs.

Lyophilized Ribavirin (Virazol®) was purchased from TCI EUROPE NV (Zwijndrecht, Pays Bas). SRO-91, AFA-16 and FCA-221 were synthesized as described by Solarte et al. and Cosson et al. [13,14]. The chemotherapeutic drug, cisplatin (*cis*-diammine-dichloroplatinum II) was purchased from Mylan (Saint-Priest, France)—cisplatin being the gold standard drug in the treatment of ovarian cancer.

Ascites samples

The ascites samples were collected at the Cancer Center F. Baclesse (Caen, France), were certified cytologically as positive for malignant cells, and stored in the OvaRessources Biological Resources Center (BRC) (NF-S 96900 quality management, AFNOR N°2016:72860.5). The

medical officer and the scientific officer of the BRC are respectively Dr Cécile Blanc Fournier and Dr Laurent Poulain. All biological collection from BRC was declared by the project Manager of the Clinical Research Department (Alexandra Leconte) to the MESR (Ministry of Education, Health and Research, France, N°DC-2010-1243 and amendments DC-2013-1849, DC-2016-2641 and DC-2017-2923). The date of the favourable opinion on the constitution of the collection is 17 of September 2011. We obtained written informed consent from the patient. The study was approved by the ethical committee “CPP North-West III” (Committee for the Protection of Persons).

Ascites samples from a 73-year-old patient with a papillary serous adenocarcinoma, stage IIIb, grade 3 were collected in May 2014. Immediately after collection, the samples were centrifuged at 400g for 5 min and the supernatants stored at -20°C. The samples were sterilized by filtration (0.2µm, low-binding) and supplemented with penicillin (200 UI/mL)/ streptomycin (200 µg/mL) before cell culturing.

Cell proliferation and viability assay

In the proliferation assay, IGROV1, SKOV3, Met-5A or Fibroblasts BJ cells were seeded in 24-well plates at 10,000/cm² and exposed to ribavirin analogs or ribavirin at 0, 20 or 50 µg/mL for 7 days of culture. The number of viable cells was measured daily by the trypan-blue exclusion test. Results are representative of 3 or more independent experiments done in triplicate, and are expressed as mean ± standard deviation.

Western blotting

Cell homogenates were prepared using lysis buffer. The lysates were centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C and the protein concentration of the supernatant determined by the Bradford method (Bio-Rad, Life Science Group, Marnes-la-Coquette, France). Equal amounts of protein (20 µg) were resolved using denaturing 9% sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel before being Western blotted using anti-PARP and cleaved PARP (9542, Cell signaling, Danvers, MA, USA) or anti-actin (A5441, Sigma-Aldrich) as a loading control. An Immobilon substrate kit (Millipore) was used for detection of bands.

BrDU incorporation

For the BrDU assay, cancer cells were seeded on to glass coverslips in 24-well plates at 10,000/cm² and exposed to SRO-91 or ribavirin at 0, 20 or 50 µg/mL for 7 days of culture. After each time-point, the medium was supplemented with BrDU (40 µM, B9285, Sigma) for 3 h before the cells were washed with PBS. They were fixed with 3% paraformaldehyde and incubated for 30 min with HCl (2N) (LCH, Chimie, Les Aires France) to denature DNA. Cells were incubated with borate salt (0.1 M, Sigma) to neutralize HCl before being permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS. Cells were incubated for 2 h at room temperature with anti-BrDU (B2531, Sigma) antibody. After washing, the coverslips were incubated with fluorescent secondary antibodies Alexa Fluor 555-conjugated anti-mouse antibody (A21424, Invitrogen). Cell nuclei were stained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542, Sigma Aldrich). Controls, in which primary antibodies were replaced with PBS, were negative. Coverslips were mounted in Prolong Gold antifade Reagent and examined with laser scanning confocal microscopy with a mosaic of 4x4 independent fields. Positive BrDU (cells/field) were quantified with the software ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Immunofluorescent staining

Cells were seeded on to glass coverslips in 24-well plates at 10,000/cm² and exposed to different concentrations of ribavirin analogs or ribavirin (20 or 50 µg/mL) for 1, 3 and 7 days of culture. At each time-point, cells were fixed with 3% paraformaldehyde (PFA) in PBS and washed with PBS containing 0.5% BSA. They were permeabilized with 0.1% Triton X100 in PBS and incubated for 2 h at room temperature with anti- α v integrins (sc-9969, Santa-Cruz) or anti-eIF4E (610270, BD PharMingen) antibodies. After washing, the coverslips were incubated with the appropriate fluorescent secondary antibodies: Alexa Fluor 555-conjugated anti-mouse antibody (A21424, Invitrogen) or Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse antibody (BD Transduction Laboratories). The actin cytoskeleton was stained with FITC- or TRITC-phalloidin (P5282 or P1981, Sigma Aldrich). For each assay, cell nuclei were stained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542, Sigma Aldrich). Coverslips were mounted in Prolong-Gold Antifade Reagent (P36930, Invitrogen) and examined by laser scanning confocal microscopy (LSM710, Zeiss). Controls, in which primary antibodies were replaced with PBS, were negative. Fluorescence microscopy figures were processed using Fiji software [17].

Analysis of the nuclear area

Cells were seeded on to glass coverslips in 24-well plates at 10,000/cm² as described above. At each time-point, cells were fixed with 3% PFA in PBS and washed with PBS containing 0.5% BSA. Cell nuclei were stained with DAPI. Coverslips were mounted in Prolong-Gold Antifade Reagent and examined by laser scanning confocal microscopy. The average area of the nuclei in µm²—according to the different conditions over time—was measured using Image J[®] software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Cell migration

Ovarian cancer cells were seeded in 24-well plates and grown until confluent. Monolayers were scratched and migration continued thereafter in SRO-91 or RBV (50 µg/mL). Cell migration was monitored by time-lapse microscopy (inverted microscope Leica DMI6000 B) for 24 h at 30 min intervals. The percentage of cell migration in 3 independent experiments was quantified using ImageJ software.

Clonogenicity assay

Cancer cells were seeded in 6-well plates at 500 cells/well (to obtain isolated cells) and incubated in the presence of SRO-91 or RBV (20, 50 µg/mL) for 7 days as described by Carduner et al. [18]. The colony-forming ability of the cells was followed daily by phase-contrast microscopy. Pictures are representative of at least 5 fields of 3 independent experiments.

Spheroid formation

The method of generating multicellular aggregates, spheroids, has previously been described [19]. Briefly, to prevent cell adhesion to a substratum, culture flasks (25 cm²) were filled with 4 mL 1% agarose (Eurobio, Courtaboeuf, France) in serum-free medium and allowed to solidify for 30 min at room temperature. Subconfluent IGROV1 cells were collected with trypsin-EDTA and resuspended in complete medium supplemented with SRO-91 or RBV (20, 50 µg/mL) at 1.5x10⁶ cells/flask. Multicellular aggregates were cultivated for 7 days and followed each day by phase-contrast microscopy. The number of multicellular aggregates was counted in at least 10 fields in each condition. Results are representative of at least 3 independent experiments.

Co-culture model and cell-cell adhesion assay

To mimic cancer cell dissemination on to a mesothelium, a co-culture assay of ovarian cancer cells and healthy mesothelial cells was used. Briefly, mesothelial cells were first grown on glass coverslips in 24-well plates until confluence in complete M199 medium. Sub-confluent cancer cells were resuspended in RPMI-1640 without FCS and labeled with 5 μ l/ml of Vybrant DiI solution (Invitrogen) by incubation for 15 min at 37°C. The DiI-labeled cells were washed 3 times and resuspended in M199-free FCS medium or ascites supplemented RBV (50 μ g/ml), SRO-91 (20, 50 μ g/ml) or Cisplatin (2.5 μ g/ml). Cancer cells (20,000/well) were added directly on to the mesothelial monolayer and incubated for 1 h at 37°C. Co-cultures of mesothelial cells grown as a monolayer and DiI-labeled tumor cells were observed using a Nomarski filter to ensure mesothelial integrity. Cells were fixed with 3% PFA and nuclei stained with DAPI. Coverslips were mounted in Prolong Gold antifade Reagent and examined by laser scanning confocal microscopy with a mosaic of 3x3 independent fields. Cancer cell adhesion to the mesothelial monolayer was determined by counting fluorescent cells on the underlying non-fluorescent mesothelial cells with the software ImageJ [®].

Statistical analyses

All figures were obtained from at least 3 independent experiments carried out in triplicate. Data are expressed as mean \pm SD. Nuclear surface area and co-culture assay were analyzed with unpaired Student's t-test (** $P < 0.001$, * $P < 0.01$, * $P < 0.05$). All other reported comparison between control and compound treatment were performed by paired one way ANOVA test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Results

RBV and its analogs (SRO-91, AFA-16 or FCA-221) were tested on several cancer cell behaviors underlying different steps of ovarian carcinoma dissemination. Thus, cell proliferation, colony formation (clonogenicity), cell migration, spheroid formation and cell implantation on the peritoneal mesothelium were estimated when treated with these molecules.

SRO-91 or Ribavirin inhibits proliferation of ovarian cancer cells

IGROV1 and SKOV3 cell proliferation were estimated after treatment with SRO-91, AFA-16, FCA-221 or RBV. In these experiments, cells were exposed to different concentrations of drugs (from 0 to 50 μ g/ml) for 7 days and the number of viable cells measured daily by the trypan-blue exclusion test. No inhibitory effect of AFA-16 or FCA-221 was seen on the growth of both cancer cells (Fig 2A). However, SRO-91 or RBV significantly inhibited the proliferation of IGROV1 and SKOV3 cells in a dose- and time-dependent manner (Fig 2B and 2C, respectively). In addition, doubling time of IGROV1 and SKOV3 cells, which is usually of 20 h and 30 h respectively, was extended after SRO-91 or RBV treatment to 33h and 43h for IGROV1 and 53h and > 96h for SKOV3, respectively. Inhibition of IGROV1 and SKOV3 cells began after 3 days of culture and was maintained until 7 days, with IC50 values of 23 μ g/ml and 19 μ g/ml for SRO-91, and 16 μ g/ml and 10 μ g/ml for RBV, respectively. The effect of RBV was notably more marked than SRO-91, and SKOV3 cells seem to be more sensitive to both molecules.

Interestingly, inhibition of cell proliferation was not associated with cell death as estimated by the trypan-blue exclusion test. Since PARP cleavage is a sign of apoptosis, it was followed by western blot (Fig 3). PARP protein was expressed in the 2 cell lines whatever the culture conditions. PARP cleavage did not occur over the time after SKOV3 cell (Fig 3A, S1 Fig) treatment

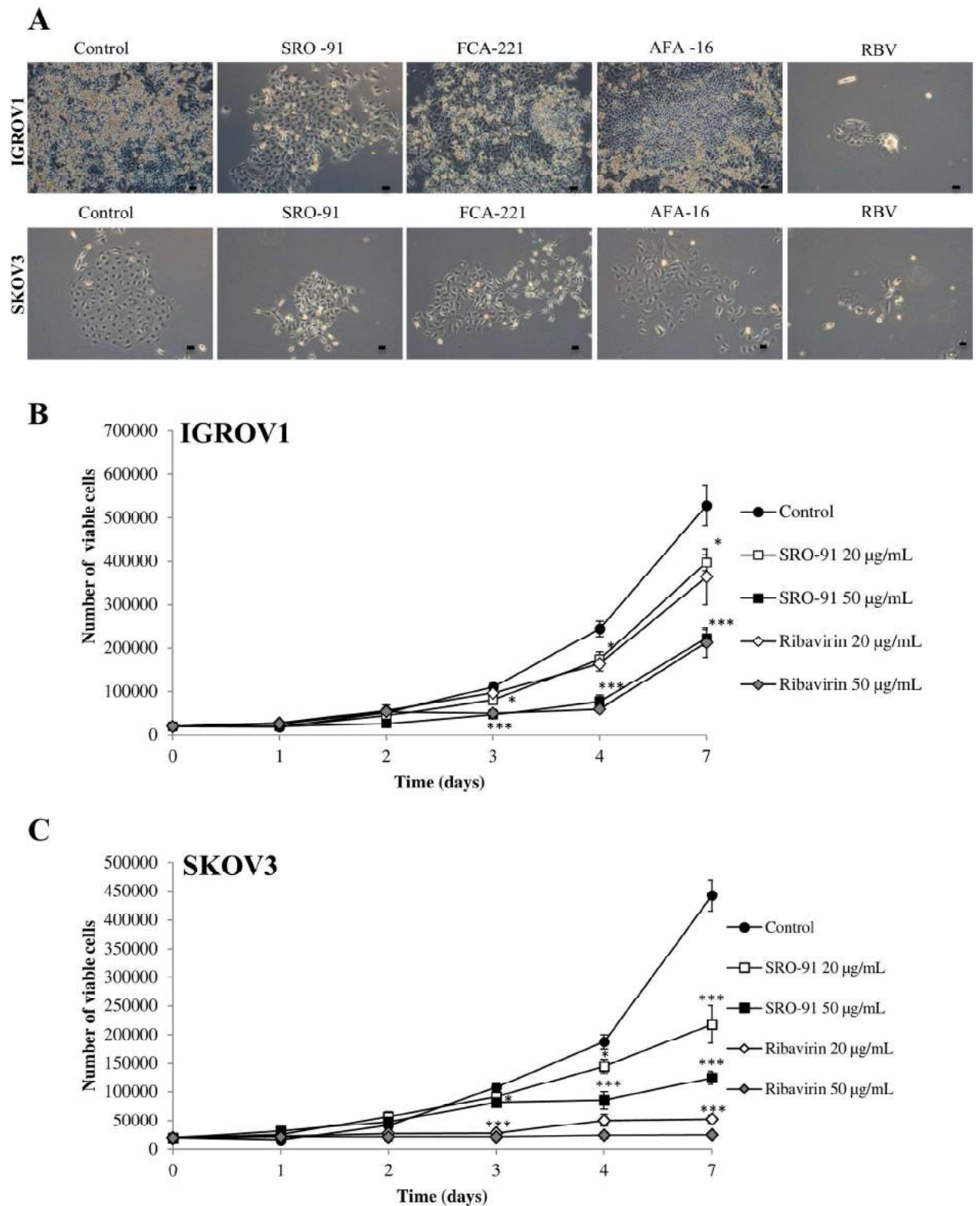


Fig 2. Viability of cancer cells after SRO-91 or ribavirin treatment. IGROV1 and SKOV3 were exposed to ribavirin analogs SRO-91, AFA-16, FCA-221 or ribavirin from 0 to 50 µg/mL for 7 days of culture. (A) Representative light micrographs were taken on day 7 (scale bar 50 µm). The number of viable (B) IGROV1 or (C) SKOV3 cells was measured daily by the trypan-blue exclusion test. Results are representative of 3 or more independent experiments done in triplicate, and are expressed as mean ± standard deviation. The inhibition of viable cells was significant from 3

days in both cells lines. For IGROV1 cells, Ctrl vs. SRO-91 or RBV 20 µg/ml (*P<0.05), Ctrl vs. SRO-91 or RBV 50 µg/ml (** P<0.001). For SKOV3 cells, Ctrl vs. SRO-91 20 or 50µg/ml (*P<0.05) Ctrl vs.RBV (** P<0.001).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g002>

with SRO-91, where it was very slight with IGROV1 cells (Fig 3B, S2 Fig) from 3 days culture, even in control condition, probably due to their capacity to form spontaneously non-adherent multicellular clusters [20]. Thus, no or very weak apoptosis occurred in SKOV3 and IGROV1

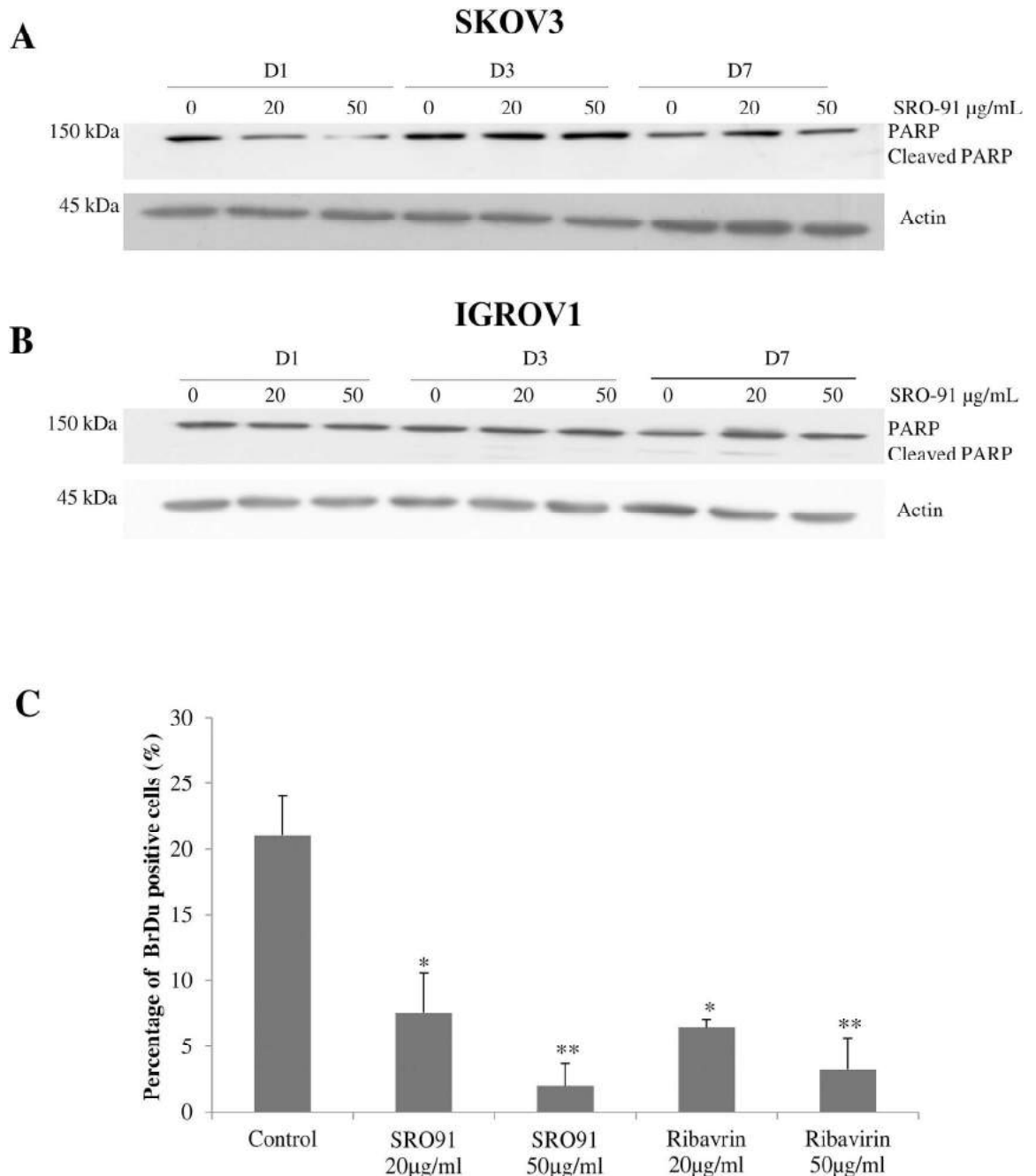


Fig 3. Expression of full length-/cleaved-PARP and S-phase analysis of cancer cells after SRO-91 treatment. Representative western blots for PARP and cleaved-PARP proteins, from SKOV3 (A) or IGROV1 (B) cells. Actin was used as a loading control. (C) Analysis of cell BrDU incorporation. Positive BrDU cells /fields after SRO-91 or RBV treatment of cancerous cells were quantified. P-values were calculated by Paired one-way ANOVA test (*P<0.05, **P<0.01).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g003>

cell under treatment. These results were consistent with the cell cycle analysis of cancer cell lines where few cells are in SubG1 peak (cell debris and apoptotic cells) independently to the treatment (S3 Fig).

To quantify cancer cells in S phase, BrdU incorporated into DNA was analyzed in the presence or absence of SRO-91 or RBV. The 2 compounds inhibited the percentage cells incorporating BrdU from day one in dose-dependent manner (Fig 3C), which correlates with an inhibition of proliferation. Cell cycle analysis showed no apparent blockage in the phases of the cell cycle, particularly S phase, but confirmed the decrease in the overall cell density upon treatment (S3 Fig).

Proliferation inhibition was not associated with cell death, but is probably due to a slow-down in the entry of cells into S-phase, which could explain the increase in the doubling time of ovarian cancer cells under treatment.

SRO-91 affects slightly cell morphology of cancer cells

The effect of SRO-91 or RBV on cancer cell cytoskeletal morphology and adherence was also estimated by staining actin and αv integrins, which also involved structure, motility and cell-cell adhesion regarding the extracellular matrix. Slight modifications were seen between control culture and treated cells. Classical stress fibers, visualized in control conditions, shifted to more obvious filamentous actin organization and cortical pattern in treated cells (Fig 4). αv integrins forming adhesion structures as indents in staining were localized at the cell membrane, but showed differences in the intensity, structure (dashes/dots), distribution and organization in treated cells. The lack of massive rearrangement of the αv integrins and cytoskeleton after SRO-91/ RBV treatment was associated to an unaltered adhesive behavior as evidenced by cell adhesion assays (S4 Fig). The effect of SRO-91 or RBV treatment on vitronectin expression, main receptor of αv integrins, or laminin another matrix protein, did not act on the organization of the extracellular matrix of ovarian cancer cells (S5 Fig). We noted that no nuclear fragmentation occurred after treatment, confirming the absence of apoptosis. Interestingly, nuclear area increased in a dose- and time-dependent manner with SRO-91 or RBV treatment (Fig 5). An analysis of the relative size of the cells that depends on the shape of the cell and the nucleus was followed by flow cytometry with the forward scatter (FS) parameter. Cell size and nuclear shape were positively correlated because FS parameter increased with the treatment (S6 Fig).

SRO-91 and RBV reduce cancer cell migration

To extend the characterization of the migratory properties of IGROV1 and SKOV3 cells in response to SRO-91 or RBV, we used a quantitative wound healing assay for making measurement of cell migration over 24 h. Cancer cells could migrate into the wounded area without addition of exogenous matrix, indicating that extracellular matrix remnants in the denuded area could sustain migration. To determine whether exogenous RBV or SRO-91 (20 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) influenced migration, we found similar effects with the 2 molecules and an inhibition of about 25% in SKOV3 cells and about 40% in IGROV1 cells, (Fig 6).

These data clearly show that RBV and its analog SRO-91 interfere with migration.

SRO-91 or RBV affects cancer cell colony formation and spheroid organization

The formation of colonies by SKOV3 and IGROV1 cells in the presence or absence of RBV or SRO-91 was followed by phase-contrast microscopy over 7 days. When cells were seeded under typical conditions, some individual colonies appeared over the time with well-defined

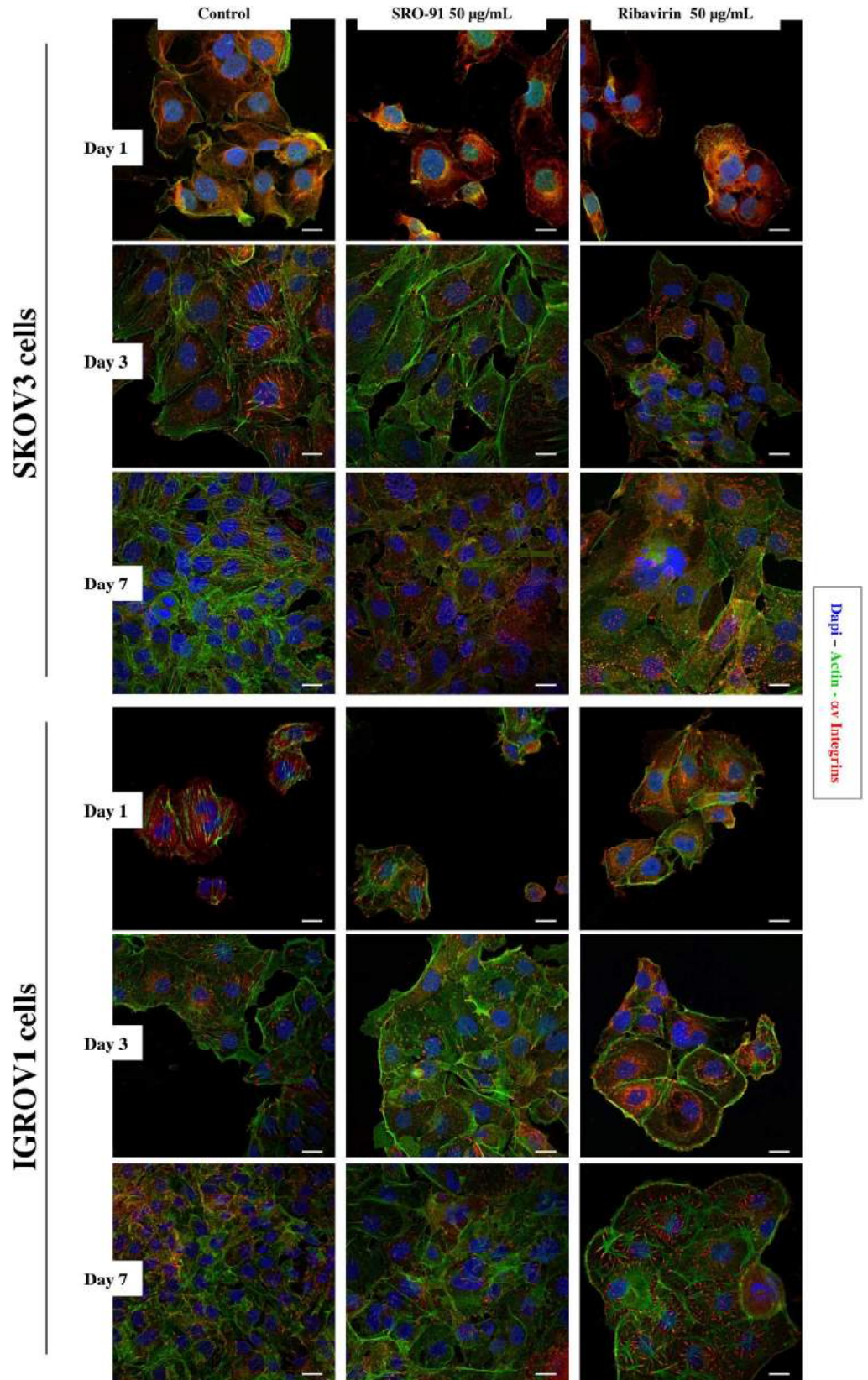


Fig 4. Cancer cells adhesive behavior and morphology. Immunofluorescent staining of actin cytoskeleton and α v integrins expressed by cancer SKOV3 and IGROV1 cells after SRO-91 or ribavirin treatment or without treatment (control). Cell nuclei were stained with DAPI. Staining was examined with laser scanning confocal microscopy. Scale bar is 30 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g004>

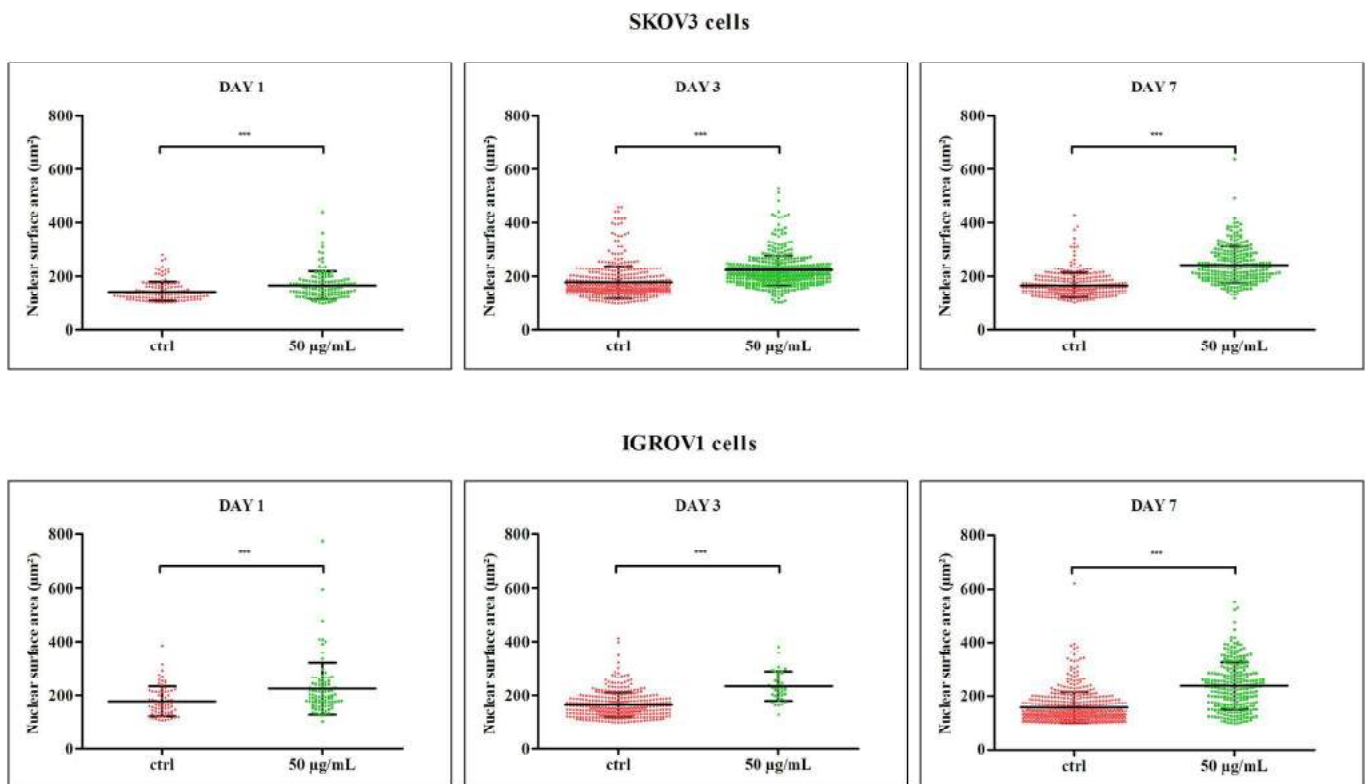


Fig 5. Analysis of the nuclear area. The average areas of the nuclei in μm^2 after SRO-91 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment of cancerous cells was quantified. P-values were calculated by the unpaired t-test (***) $P < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g005>

outlines for IGROV1 cells (Fig 7B), but were more spread in SKOV3 cells (Fig 7A). In the presence of 20 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of SRO-91, IGROV1 colonies (representative images are shown in Fig 7B) or SKOV3 plaques were significantly reduced. Similar results were obtained with RBV.

Ovarian carcinoma dissemination is partly due to multicellular aggregate formations (spheroids) that become released within the peritoneal cavity before implantation into the mesothelium. We have studied cancer spheroid formation and established a model of their culture [18,19]. In the present study, we estimated the effect of SRO-91 (or RBV) on IGROV1 spheroid formation using this model of culture conditions in a non-adhesive environment (see Materials and Methods).

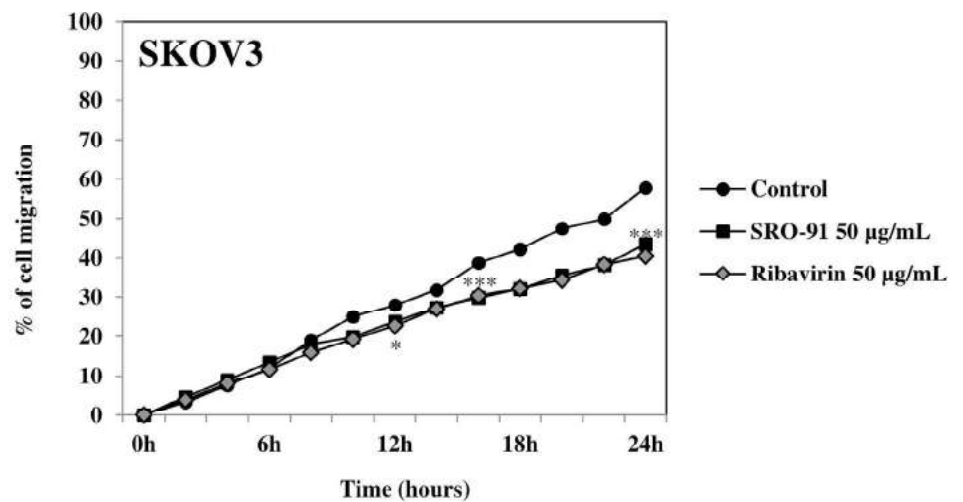
The number of spheroids was estimated after 48h of culture in the presence or absence of the compounds. SRO-91 and RBV clearly impede spheroids formation (Fig 8). Although this inhibitory effect might have gone on for 140h, renewed addition of the molecules at this time certainly led to further inhibition (Fig 8).

These results suggest that RVB and its analog SRO-91 affect these 2 aggressive phenotypes, i.e. clonogenicity and spheroid formation.

SRO-91 or RBV acts on the ovarian cancer cells by affecting the localization of eIF4E

To explore the mechanism by which SRO-91 or RBV affects ovarian cancer cell behavior, the localization of eIF4E was determined. Since eIF4E protein is overexpressed in 30% of cancers, it acts as a reference translation initiation factor associated with the translation of genes

A



B

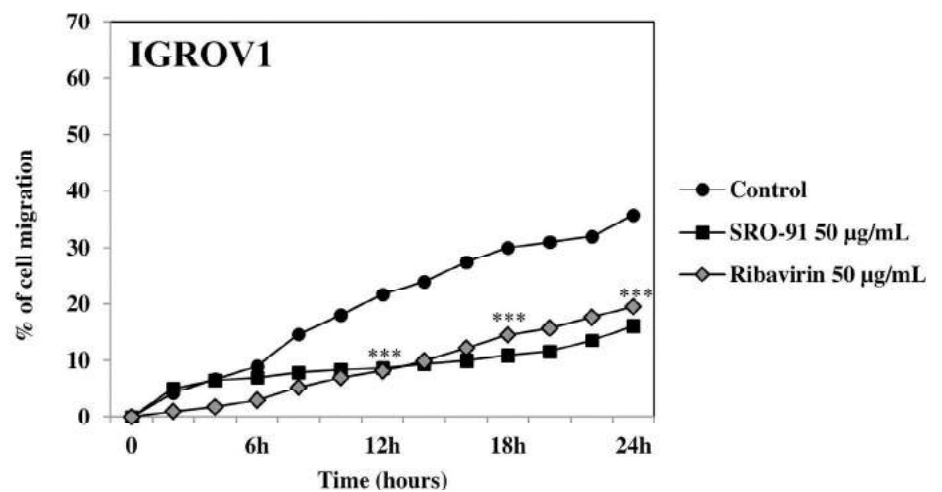


Fig 6. Cancer cells migratory properties after SRO-91 or ribavirin treatment or without treatment (control). (A) SKOV3 or (B) IGROV1 cell migration was monitored by time-lapse microscopy over 24 h. Percentage of cell migration in three independent experiments was quantified using ImageJ software. The inhibition of cell migration by SRO-91 or RBV was significant from 12h in both cells lines. P-values were calculated by Paired one-way ANOVA test (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g006>

involved in proliferation, e.g. cyclin D1 or c-myc, stimulating proliferation of cancer cells when overexpressed.

We wanted to study the localization of eIF4E in ovarian cancer cells under the effect of SRO-91. After seeding IGROV1 cells in the presence or absence of the molecules at 50 µg/mL for 1, 3 and 7 days, immunofluorescence was used to locate the eIF4E. Images of the staining showed diffuse eIF4E in the cytoplasm of untreated cells (Fig 9). In the presence of SRO-91 or RBV, labeling was confined mainly to the perinuclear level, being less diffuse in the cytoplasm

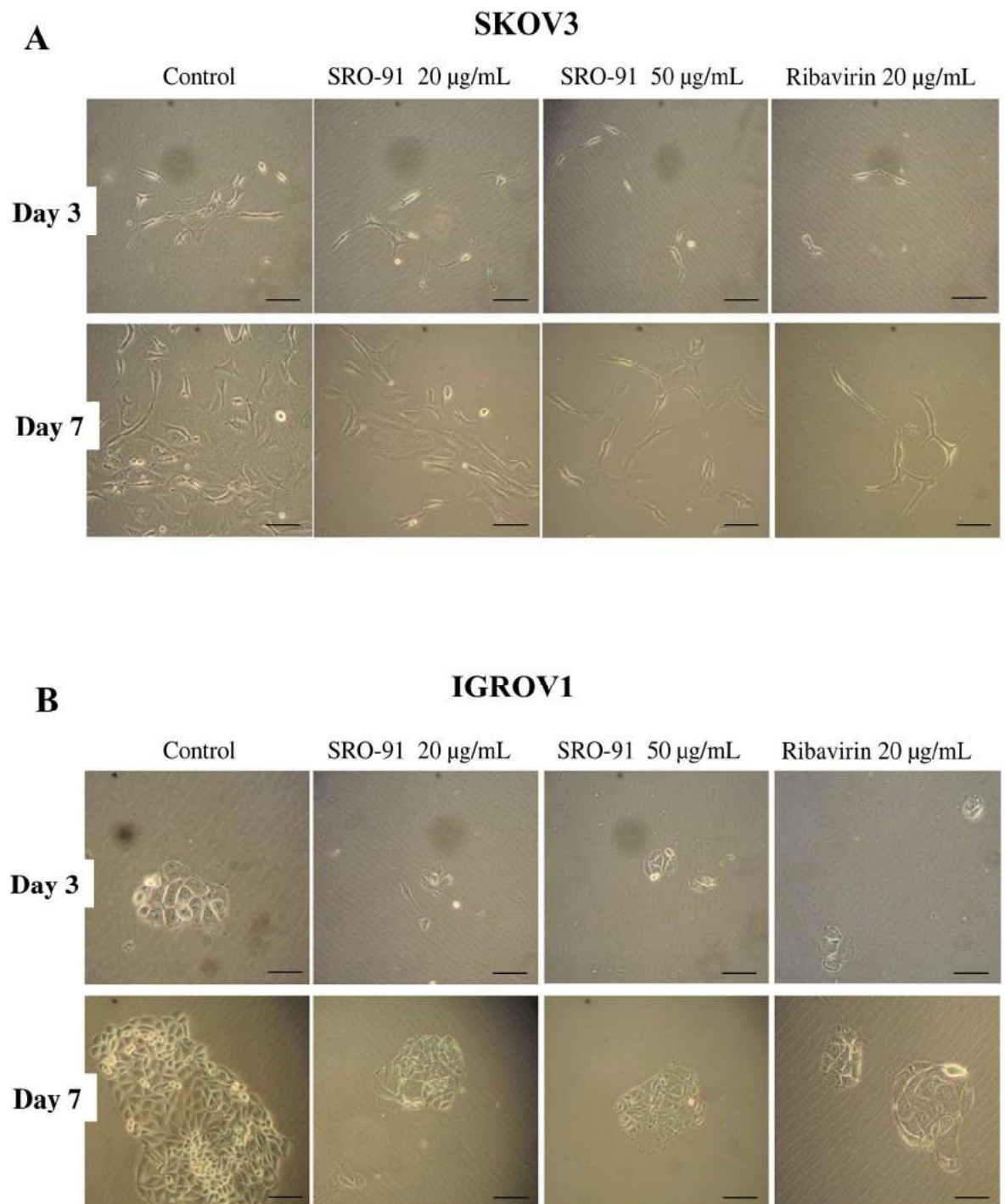


Fig 7. Cancer cells colony forming ability after SRO-91 or ribavirin treatment or without treatment (control). (A) SKOV3 and (B) IGROV1 cancer cells colony formation were followed each day during 7 days by observation of the cells by phase-contrast light microscopy. Pictures (A, B) are representative of at least five fields.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g007>

with time. IGROV1 cells express eIF4E as soon as day 1, but the SRO-91 treatment confined staining by blocking it at the perinuclear level. Western blotting showed inhibition of eIF4E expression after SRO-91 or RBV treatment (S7 Fig). Although these results need to be

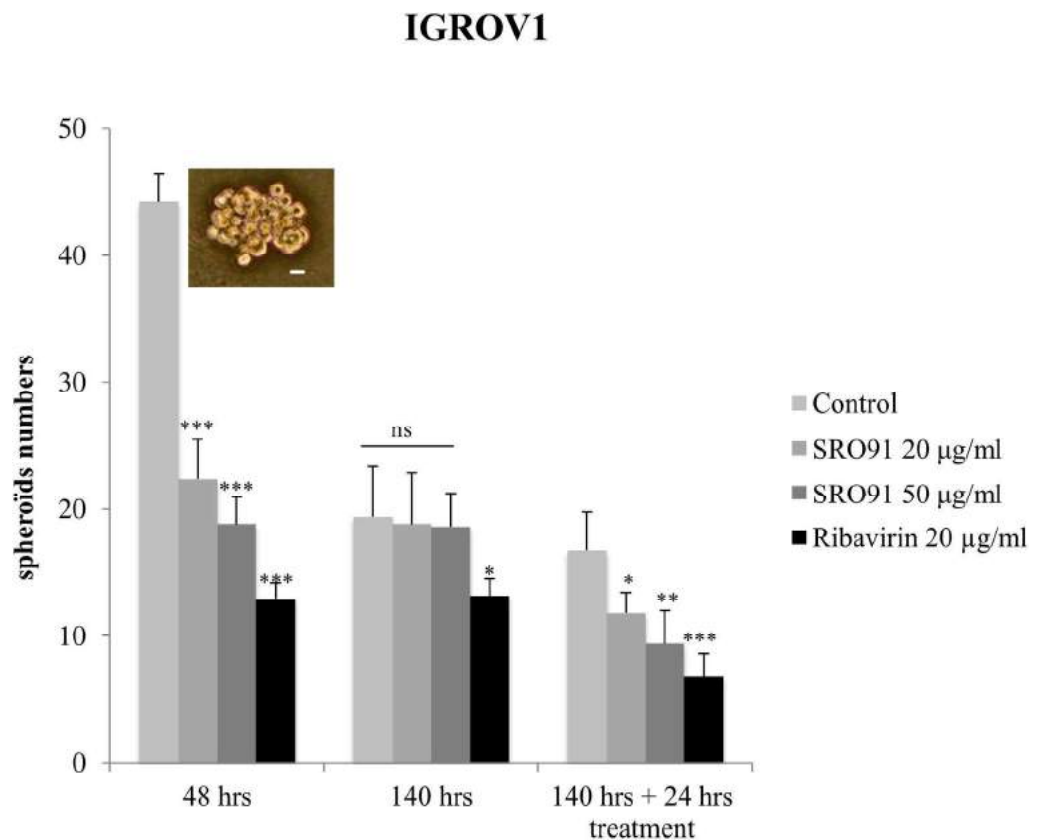


Fig 8. Cancer spheroids formation after SRO-91 or ribavirin treatment or without treatment (control). IGROV1 cancer spheroids formation was followed each day during 7 days. The number of spheroids was counted in at least ten fields in each condition. Inset: IGROV1 spheroid. Scale bar is 50 µm. Results are representative of at least three independent experiments. P-values were calculated by Paired one-way ANOVA test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. ns: no significant).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g008>

improved in more specific analysis into the mechanism of action of this molecule, one hypothesis is that SRO-91 interferes in translation regulation of the genes involved in the proliferation and migration of cancer cells by a system similar to the RBV effect.

SRO-91 has no cytotoxic effect on non-cancerous cells

Since RBV is an antiviral that can be used in anticancer treatments [5,6], one of the difficulties with it concerns potential side effects, and in particular its toxic effect on the healthy cells. As the ovarian cancer cells preferentially disseminate mainly to the mesothelium of the peritoneum and its underlying connective tissue, the effects of SRO-91 or RBV were estimated on two healthy cell models, fibroblasts (BJ) and mesothelial cells (Met-5A).

Whereas RBV drastically inhibited proliferation of mesothelial cells (Met-5A) and fibroblasts (BJ) from the first day of culture, SRO-91 had no effect on the proliferation of their cells (Figs 10A and 11A). The cell morphology and cytoskeleton were markedly modified following treatment with RBV, but SRO-91 had no significant effect (Figs 10B and 11B).

These results demonstrate that SRO-91 does not affect morphology, viability and proliferation of normal cells compared to RBV, indicating that SRO-91 is preferentially toxic to cancer cells compared to normal cells; as such it could be of interest in the treatment of ovarian cancer

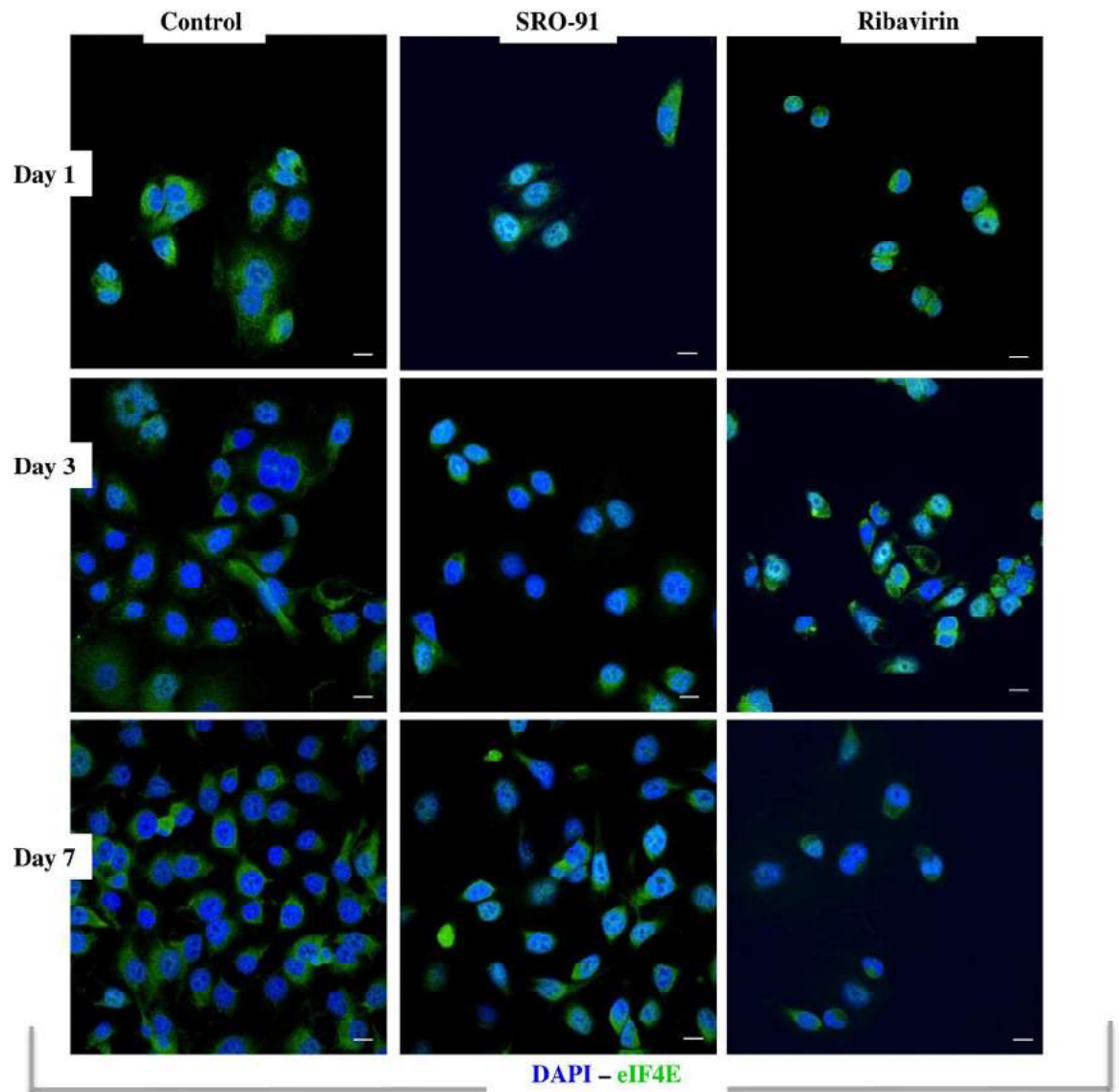


Fig 9. Localization of eIF4E in cancer cells under the effect of SRO-91. Immunofluorescent staining of eIF4E expressed by cancer cells after SRO-91 or ribavirin treatment or without treatment (control) during 7 days of culture. Cell nuclei were stained with DAPI. Staining was examined with laser scanning confocal microscopy. Scale bar is 30 μ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g009>

dissemination, particularly if it worked in combination with anti-cancer drugs such as cisplatin.

SRO-91 or RBV inhibits the implantation of cancer cells into the peritoneal mesothelium

Following implantation into the peritoneal mesothelial surface, ascites accumulates, which acts as a reservoir of nutrients and cellular components, potentiating metastasis and leading to a poorer prognosis. The ability of cancer cells to attach to the mesothelium in the presence of RBV, SRO-91 or cisplatin (gold standard drug in the treatment of ovarian cancer) in culture medium (a FCS free buffer) or in the ascitic tumor microenvironment (from patients, see [Materials and Methods](#)) was measured. A suitable model of co-culture, previously described

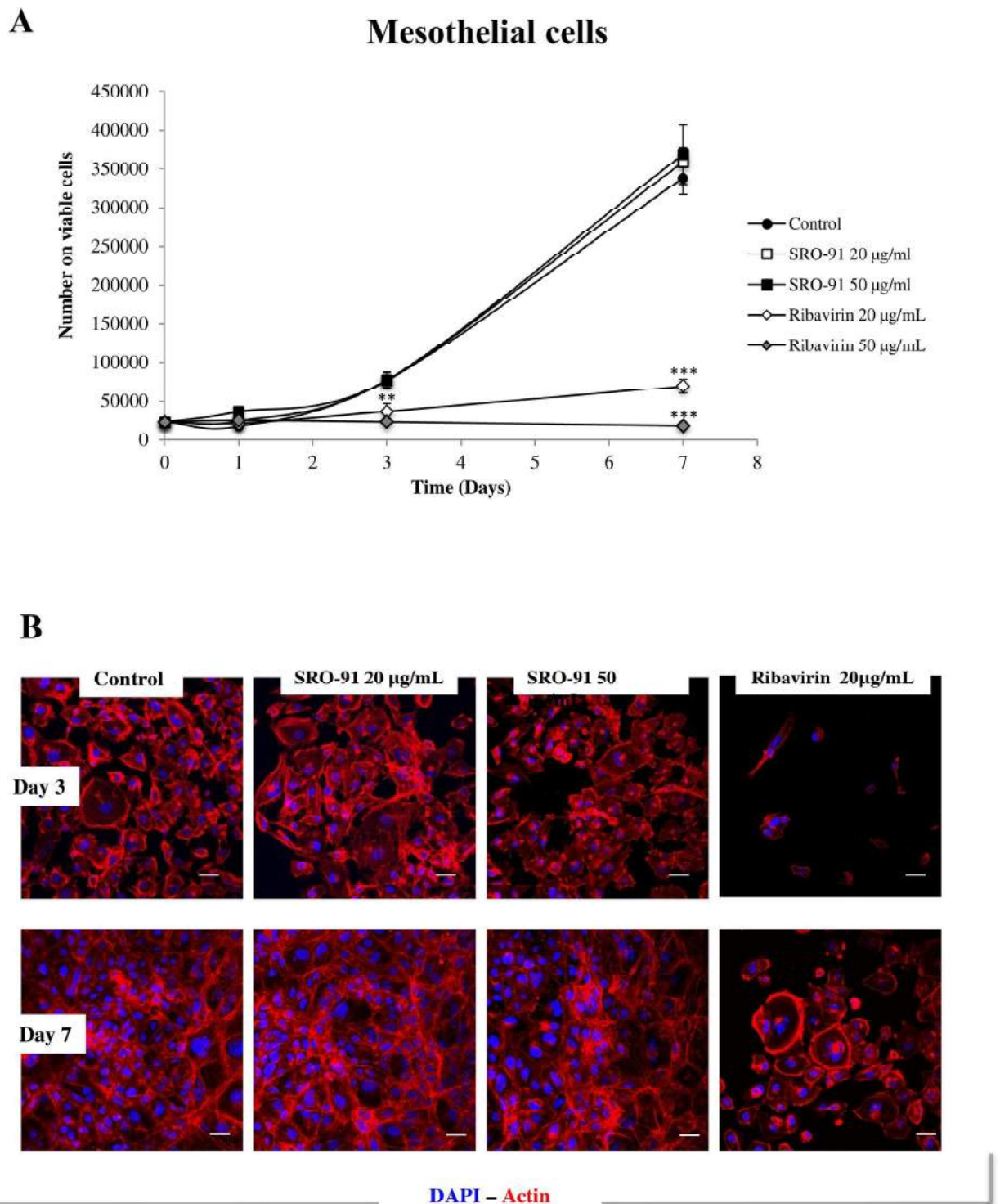
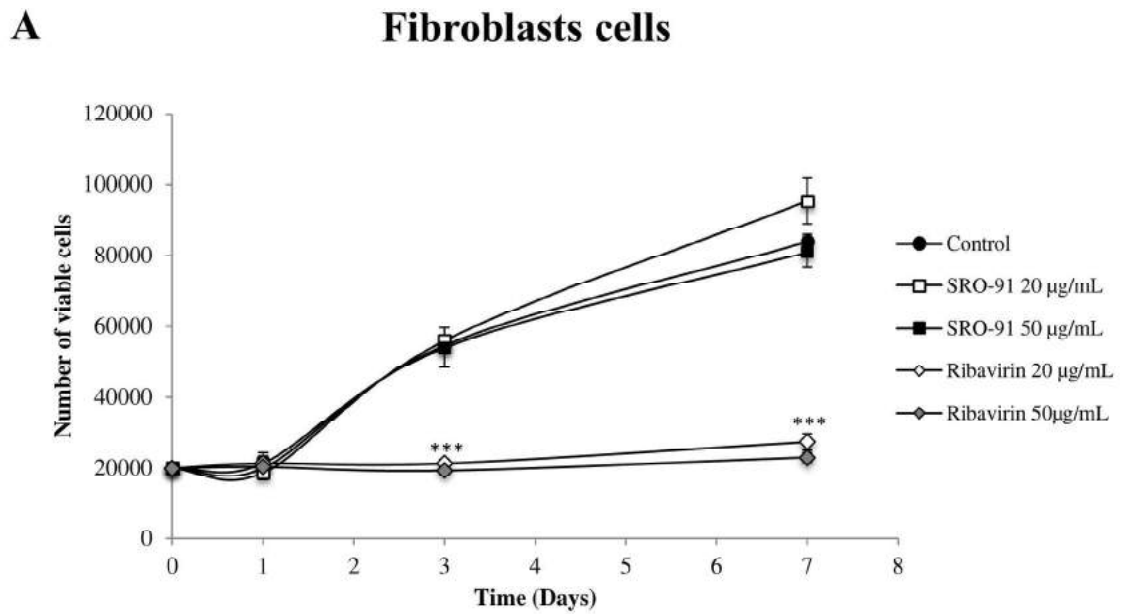


Fig 10. Viability and cell morphology of healthy mesothelial cells after SRO-91 or ribavirin treatment. (A) Mesothelial cells were exposed to ribavirin analog SRO-91 or ribavirin at 0, 20 or 50 µg/mL for 7 days of culture. The number of viable cells was measured daily by the trypan-blue exclusion test. Results are representative of at least three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean ± standard deviation. P-values were calculated by Paired one-way ANOVA test (**P<0.01, ***P<0.001). (B) Immunofluorescent staining of actin cytoskeleton expressed by mesothelial cells after SRO-91 or ribavirin treatment or without treatment (control). Cell nuclei were stained with DAPI. Staining was examined with laser scanning confocal microscopy. Scale bar is 50 µm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g010>



B

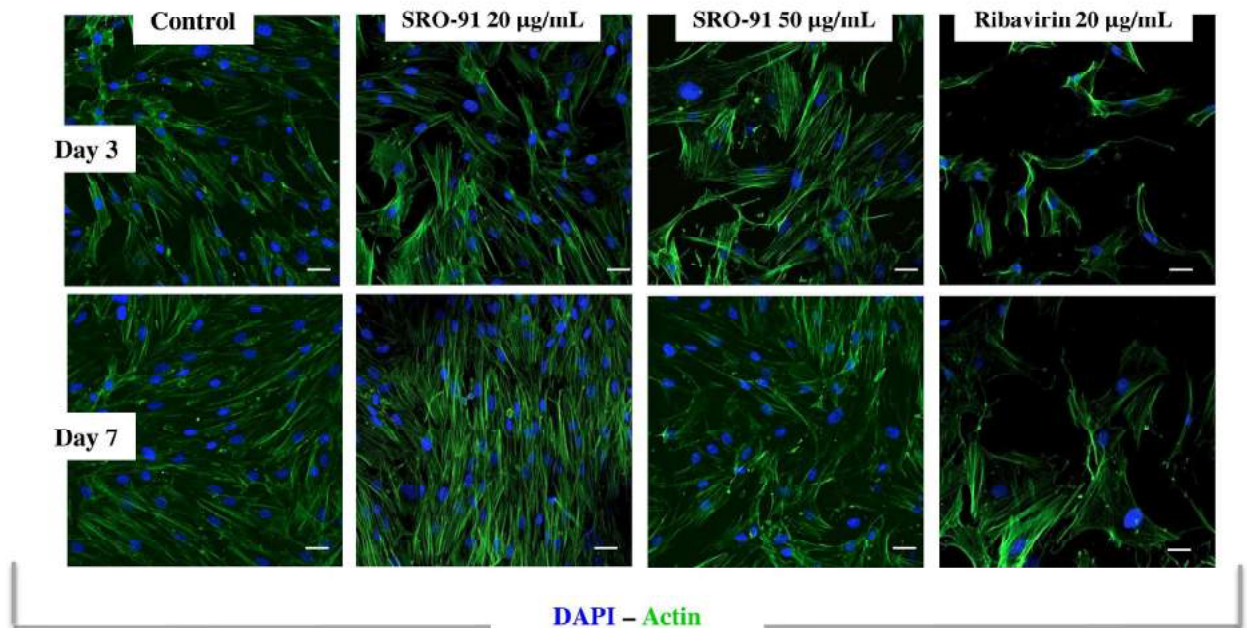


Fig 11. Viability and cell morphology of healthy fibroblasts BJ cells after SRO-91 or ribavirin treatment. (A) Fibroblasts BJ cells were exposed to ribavirin analog SRO-91 or ribavirin at 0, 20 or 50 µg/mL for 7 days of culture. The number of viable cells was measured daily by the trypan-blue exclusion test. Results are representative of at least three independent experiments performed in triplicate and are expressed as mean ± standard deviation. P-values were calculated by Paired one-way ANOVA test (**P<0.01). (B) Immunofluorescent staining of actin cytoskeleton expressed by fibroblasts BJ cells after SRO-91 or ribavirin treatment or without treatment (control). Cell nuclei were stained with DAPI. Staining was examined with laser scanning confocal microscopy. Scale bar is 50 µm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g011>

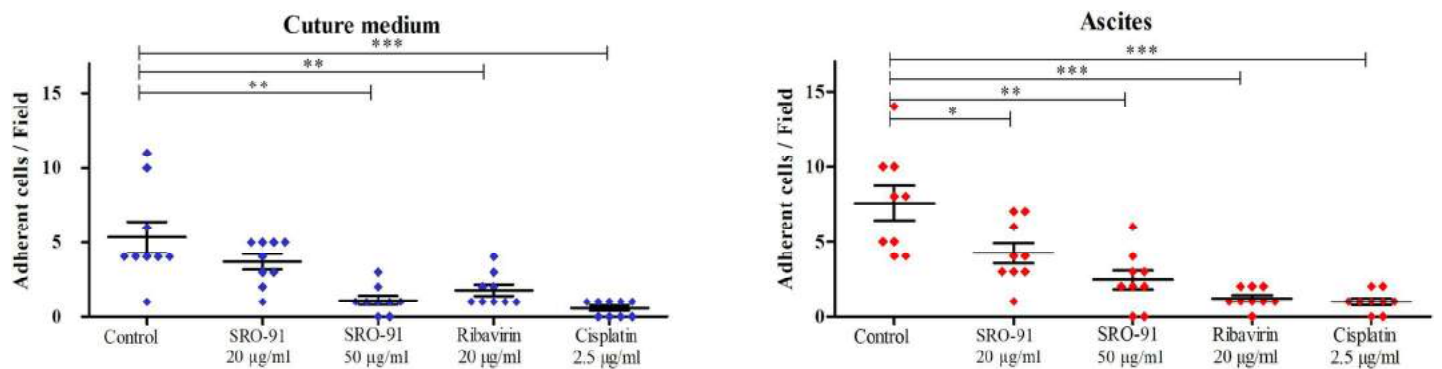


Fig 12. Implantation of cancer cells into the peritoneal mesothelium after SRO-91 or ribavirin treatment. Co-cultures of mesothelial cells grown as monolayer and DiI-labeled tumor cells were observed using a Nomarski filter to ensure mesothelial integrity. Cancer cell adhesion to the mesothelial monolayer was determined by counting fluorescent cells on the underlying non-fluorescent mesothelial cells with the software ImageJ®. P-values were calculated by the unpaired t-test was performed (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225860.g012>

by our team [21], was used to assess IGROV1 ovarian cancer cell adhesion to healthy Met-5A mesothelial cells. Cancer cells were directly allowed to adhere for 1h to confluent mesothelial cells in FCS-free culture medium (to avoid serum protein interference in the adhesion process and estimate solely the effect of treatments on this adhesion process), or in ascitic fluid to get closer to the physiopathological conditions of peritoneal implantation. In both models, SRO-91 significantly inhibited cancer cell attachment to the mesothelium, as did RBV or cisplatin (Fig 12). These findings suggest that SRO-91 might be combined with cisplatin as a promising protocol for ovarian cancer treatment.

Discussion

Among new compounds, such as RBV, have been proposed, although RBV is used in the treatment of hepatitis C infections and more recently some cancers. However, it is not without many side effects, suggesting the synthesis of analogs might be better. SRO-91, an analog of RBV, has therefore been explored regarding the behavior of ovarian carcinoma and normal cells compared with RBV.

A dose- and time-dependent inhibitory effect of SRO-91 (a more stable nucleoside due to the presence of a C-C bond making it more resistant and insensitive to glycosidases) is shown on the proliferation of SKOV3 and IGROV1 cells, in comparison with RBV, at clinically relevant concentrations. Whereas for SKOV3 cells inhibition of proliferation increased up to the 7th day of culture, this effect tends to ease off for IGROV1 cells. “Resumption” of the proliferation in the latter cell type could, on the one hand, be due to the cell cycle being shorter than that of SKOV3 cells. The time of doubling of SKOV3 cells is ~30 h, while that of the IGROV1 is ~20 h which would allow IGROV1 cells to metabolize and thus deplete the medium faster in SRO-91. On the other hand, this effect might be due to the ability of IGROV1 cells to form spheroids that have more resistance to chemotherapeutics. Indeed, these 2 ovarian cell lines could make interesting subjects for drug exposure because: (i) IGROV1 cells can form free-floating clusters in culture, whereas SKOV3 derived from ascites gave only isolated cells; (ii) they differ in their response to cisplatin [18, 22]. RBV-dependent dose-time inhibitory effects on the proliferation of breast cancer cells (MCF-7, SKBr3, BT474) and colon cancer cells (HCT-116, SW620) using a colorimetric method [9,23] or ovarian (OVCAR-5), hepatic (HepG2) and leukemic (K562) cancer lines, by trypan blue counting have been reported [7]. Variability of the responses depending on the heterogeneity of cancers may be involved, which

in some way might be related to the initial level of expression of eIF4E protein in cancer cells [23–26].

We also focused our attention on other features involved in cancer dissemination—migration, clonogenicity and spheroid formation—in response to SRO-91 or RBV treatment. An inhibitory effect of SRO-91 or RBV on all these events was found. Thiazofurin, another analog of RBV, also inhibited migration of mouse lung cancer cells and human melanoma cells [27]. Migrating cells tend to have more pseudopodia, which can be dependent on signaling involving, e.g., RhoA and ErbB2 [28]. Inhibition of cell migration by SRO-91 could therefore be due to an effect on one or more molecules of these signaling pathways, especially as it is also involved in cell adhesion. Unlike Thiazofurin [27], SRO-91 does not seem to affect the adhesion of cancer cells (S4 Fig).

The effects of SRO-91 or RBV on cell and nuclear morphology, on the cytoskeleton, and on the localization of extracellular matrix-receptor α v integrins have been explored. α v integrins and their extracellular matrix and cytoskeleton partners seem to have a central role in the behavior of ovarian cancer cells [19,21,29–31]. Thus, staining of nuclear DNA, actin and α v integrins showed that SRO-91, like RBV, has significantly increased cell and nuclear volume with slight impact on adhesion systems (rearrangement of focal adhesions) and cell morphology (actin organization), probably associated to a decrease of cell density and an effect on cell migration. This was confirmed by adhesion assays in the presence of SRO-91, which does not affect adhesion of cancer cells (S4 Fig). Moreover, staining of extracellular matrix molecules, vitronectin -main α v integrins receptor-, and laminin, shows that SRO-91, like RBV, does not act on the organization of the extracellular matrix and matrix microenvironment (S5 Fig) of cancer cells—an effect of RBV on several other cell models [7,24,32]—by its specific action on eIF4E.

The potential use of RBV analog on the dissemination of ovarian cancer cells requires more knowledge of the mechanism. However, we wanted to determine whether inhibition of proliferation was associated with cell death by analyzing the expression of the PARP cleaved protein, a late effector of apoptosis. SRO-91 does not cause PARP cleavage, which may reflect either a lack of activation of the apoptotic pathway or the activation of an effector upstream of this pathway that can modulate the cleavage of PARP. In IGROV1 cells, slight cleavage occurs after 3 days of culture, probably due to the formation of non-adherent multicellular aggregates [20]. In all cases, the inhibition of proliferation due by SRO-91 is not explicable by cell death through apoptosis as confirmed by cell cycle results. No apoptosis was observed for endothelial cells (HUVECs) treated with RBV, inhibition of proliferation being attributed to G0/G1 arrest [33]. Other studies suggest that the arrest by RBV in colon cancer cells is at the G2/M transition [23]. Our BrdU incorporation tests showed a decrease in the number of cells able to incorporate this analog, but no apparent blockage in the phases of the cell cycle, particularly S-phase (S3 Fig). These results confirm the decrease in the overall cell density upon treatment which is consistent with the slowdown of cell cycle progression, increased doubling time and inhibition of proliferation in both cell lines. The effect of bioactive molecules like TGF-beta was suggested to increase the doubling time of cells without significantly affecting the cell-cycle distribution during few days [34]. Recent study reports that when DNA damage occurred, in response to stress, DNA synthesis continues but the overall rate of S phase progression is slowed [35].

Our results show a significantly increased of nuclear area and cell shape with treatment. The growth of the nuclear volume is not correlated with the beginning of the DNA synthesis. The nuclear volume starts to increase already 6 hr prior DNA synthesis [36]. Cell shape could affect nuclear volume through a link with cell volume, as has been reported for other cell types. Relationship between cell and nuclear size and the cell cycle remains controversial [37]. Nuclear volume could be controlled by changes in biochemical signaling downstream of the

ECM and growth factors given by cell spreading. Thus, increase of cell spreading and nuclei area could be explained by chromatin decondensation [37] without apparent correlation with DNA synthesis as shown in our study. This hypothesis would require more exploration.

In this study, SRO-91 effects are similar to those obtained with RBV, which coincides with its role on many genes involved in regulation of expression of proteins with important functions in tumor progression, notably inhibition of one of them, i.e. eIF4E. eIF4E is frequently overexpressed in cancers—leukemic, breast, ovarian, esophageal, colon and cervical [5–7,9,23–26]. It affects the expression of genes involved in the cell cycle, proliferation, invasion and angiogenesis (e.g. Cyclin D1 / E1 / B1 / NBS1 / C-Myc, VEGF) by increasing their mRNAs in the cytoplasm and therefore their translation [8,9,11]. Thus, RBV acts on eIF4E, preventing it from acting as an initiator of translation. We found a similar inhibitory effect of the SRO-91 on the localization of eIF4E, confining it to a perinuclear location, where it might interfere with translation regulation of the molecules involved in the proliferation and survival of cancer cells in the presence of the SRO-91.

Few studies have investigated the cytotoxicity of RBV on non-cancerous cells, although it has been associated with cytotoxic effects [23,38]. We compared the cytotoxicity of SRO-91 and RBV on normal mesothelial cells or fibroblasts BJ at clinical concentrations. Although RBV appears to be highly toxic to Met-5A and BJ cells, SRO-91 was not. Thus the possible use of SRO-91 as anti-cancer treatments is enhanced by its preferential cytotoxic action on cancer cells, although whether this is true at higher concentration needs to be considered.

We finally compared the effects of SRO-91, RBV or Cisplatin on peritoneal implantation within an ascitic microenvironment more related to *in vivo* pathology. SRO-91 inhibited the implantation of cancer cells on Met-5A cells under classical or ascitic conditions in the same way to RBV and Cisplatin. Ascitic fluid in the peritoneal cavity seems to promote cell migration or the formation of spheroids by ovarian cancer cells [18]. The formation of spheroids is characterized by the epithelio-mesenchymal transition. Epithelial-type cells have many adherent junctions, desmosomes and tight junctions, whereas mesenchymal cells are isolated from each other and have exacerbated migration and invasive properties [39]. Incubation of cells in ascitic fluid may trigger this epithelial-mesenchymal transition, which needs an in-depth study because of the chemoresistance of cancer cells (responsible for recurrences) that has been associated with TEM [40,41]. These considerations suggest the possibility of using of SRO-91 in combination with cisplatin in cancer therapy.

Conclusions

The effects of SRO-91, an analog of RBV, on the behavior of ovarian carcinoma cells have been explored and compared to RBV. Inhibitory effects of SRO-91, similar to those of RBV, were found on the different aspects of cell dissemination, including proliferation, migration, clonogenicity, spheroid formation and peritoneal implantation. The relevance to the use of SRO-91 as an anticancer treatment is reinforced by its relative non-toxicity to non-cancerous cells that were tested. The mechanism of entry of SRO-91 to cells and to its site of action needs to be more thoroughly investigated. Thus, these results indicate the potential use of SRO-91 in anti-cancer therapy, with the added possibility of some synergism with other chemotherapeutics agents in combination therapy for ovarian and possibly other types of cancer.

Supporting information

S1 Fig. Uncropped blots for Fig 3A. Scan Blot of PARP / actin in presence of SRO-91. MW: Molecular Weight (kDa). Capture image was acquired by densitometer (Biorad). (TIF)

S2 Fig. Uncropped blots for Fig 3B. Scan Blot of PARP / actin in presence of SRO-91. MW: Molecular Weight (kDa). Capture image was acquired by densitometer (Biorad). (TIF)

S3 Fig. Cell cycle analysis of SKOV3 and IGROV1 cells treated with SRO-31 or RBV. Representative flow cytometric analysis for DNA content in ovarian cancer cells treated with 50 µg/ml of SRO-91 or RBV during 3 and 7 days. The percentage of cell cycle distribution in Sub-G1, G0/G1, S and G2/M phases were determined with Expo32 acquisition software (Beckman Coulter). (TIF)

S4 Fig. Ovarian cancer cell adhesion assay after SRO-91 treatment. Adhesion of SKOV3 and IGROV1 cells were examined on a coating of fibronectin plasma protein (10µg/ml) and treated with 0 to 50 µg/ml of SRO-91. After 2 hours, adherent cells were revealed by crystal violet coloration and absorbance was read at 595nm. Values are expressed as mean ± SD. Data represent means of three independent experiments done in triplicates. (TIF)

S5 Fig. Extracellular matrix proteins organization in treated ovarian cancer cells. Immunofluorescent staining of vitronectin and laminin expressed by IGROV1 cells after SRO-91 or ribavirin treatment (50 µg/ml) or without treatment (control). Cell nuclei were stained with DAPI. Staining was examined with laser scanning confocal microscopy. Scale bar is 50 µm. (TIF)

S6 Fig. Relative cell size and nuclear volume of ovarian cancer cells after SRO-91 treatment. Representative flow cytometric analysis for DNA content (nuclear shape) and the forward scatter (FS) parameter. The nuclear area was determined with Expo32 acquisition software (Beckman Coulter). (TIF)

S7 Fig. Uncropped blots for eIF4E expression. Representative Western blots for eIF4E in ovarian cancer cells treated with 50 µg/ml SRO-91 or RBV or without treatment (control). Tubulin was used as a loading control. MW: Molecular Weight (kDa). Capture image was acquired by densitometer (Biorad). (TIF)

Acknowledgments

The authors thank Dr. C. Blanc-Fournier and L. Poulain from François Baclesse comprehensive center and the “centre de ressource biologique” for their support in obtaining ascites samples used in this work and T. Tudela for their help in cell culture. This work was realized by the facilities of the “Plateforme Microscopies & Analyses, Federation I-Mat (FR4122) of the University of Cergy-Pontoise (France)”, especially with the help of Rémy Agniel. The manuscript was revised by Biomedes, for English language editing.

Author Contributions

Conceptualization: Jacques Uziel, Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Formal analysis: Carine Laurent-Issartel.

Funding acquisition: Nadège Lubin-Germain, Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Investigation: Anaïs Wambecke, Carine Laurent-Issartel, Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Methodology: Anaïs Wambecke, Carine Laurent-Issartel, Florence Giffard, Fanny Cosson, Nadège Lubin-Germain, Jacques Uziel, Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Project administration: Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Resources: Florence Giffard, Nadège Lubin-Germain, Jacques Uziel.

Supervision: Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Validation: Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Visualization: Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Writing – original draft: Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

Writing – review & editing: Johanne Leroy-Dudal, Sabrina Kellouche, Franck Carreiras.

References

1. Kipps E, Tan DSP, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(4):273–82. <https://doi.org/10.1038/nrc3432> PMID: [23426401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23426401/)
2. Banerjee S, Kaye SB. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013 Mar 1; 19(5):961–8.
3. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*. 2001 Apr; 22(2):255–88. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0422> PMID: [11294827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11294827/)
4. Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, et al. Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell*. 2004 Jan; 5(1):19–24. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(04\)00002-9](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(04)00002-9) PMID: [14749123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14749123/)
5. Borden KLB, Culjkovic-Kraljacic B. Ribavirin as an anti-cancer therapy: acute myeloid leukemia and beyond? *Leuk Lymphoma*. 2010 Oct; 51(10):1805–15. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.496506> PMID: [20629523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20629523/)
6. Kai J, Wang Y, Xiong F, Wang S. Genetic and pharmacological inhibition of eIF4E effectively targets esophageal cancer cells and augments 5-FU's efficacy. *J Thorac Dis*. 2018 Jul; 10(7):3983–91. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.06.43> PMID: [30174840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30174840/)
7. Kökény S, Papp J, Weber G, Vaszkó T, Carmona-Saez P, Oláh E. Ribavirin acts via multiple pathways in inhibition of leukemic cell proliferation. *Anticancer Res*. 2009 Jun; 29(6):1971–80. PMID: [19528454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19528454/)
8. Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KLB. Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res*. 2004 Dec 1; 64(23):8639–42. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2677> PMID: [15574771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15574771/)
9. Pettersson F, Yau C, Dobocan MC, Culjkovic-Kraljacic B, Retrouvey H, Retrouvey H, et al. Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 May 1; 17(9):2874–84.
10. Li W, Shen F, Weber G. Ribavirin and quercetin synergistically downregulate signal transduction and are cytotoxic in human ovarian carcinoma cells. *Oncol Res*. 1999; 11(5):243–7. PMID: [10608619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10608619/)
11. Assouline S, Culjkovic-Kraljacic B, Bergeron J, Caplan S, Cocolakis E, Lambert C, et al. A phase I trial of ribavirin and low-dose cytarabine for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia with elevated eIF4E. *Haematologica*. 2015 Jan; 100(1):e7–9.
12. Youcef RA, Dos Santos M, Roussel S, Baltaze J-P, Lubin-Germain N, Uziel J. Huisgen cycloaddition reaction of C-alkynyl ribosides under micellar catalysis: synthesis of ribavirin analogues. *J Org Chem*. 2009 Jun 5; 74(11):4318–23. <https://doi.org/10.1021/jo900594x> PMID: [19438214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19438214/)
13. Solarte C, Santos MD, Gonzalez S, Miranda LSM, Guillot R, Ferry A, et al. Synthesis of C-Ribosyl-1,2,3-triazolyl Carboxamides. *Synthesis*. 2017 May; 49(9):1993–2002.
14. Cosson F, Faroux A, Baltaze J-P, Farjon J, Guillot R, Uziel J, et al. Synthesis of ribavirin 2'-Me-C-nucleoside analogues. *Beilstein J Org Chem*. 2017; 13:755–61. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.74> PMID: [28503210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28503210/)

15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4; 144(5):646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> PMID: 21376230
16. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA, Vanderhyden BC. Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2004 Dec; 10(6):1032–42.
17. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28; 9(7):676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019> PMID: 22743772
18. Carduner L, Leroy-Dudal J, Picot CR, Gallet O, Carreiras F, Kellouche S. Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal spectrum in ovarian cancer cells: enhancement of their invasive behavior partly dependant on α v integrins. *Clin Exp Metastasis*. 2014 Aug; 31(6):675–88. <https://doi.org/10.1007/s10585-014-9658-1> PMID: 24946950
19. Kellouche S, Fernandes J, Leroy-Dudal J, Gallet O, Dutoit S, Poulain L, et al. Initial formation of IGROV1 ovarian cancer multicellular aggregates involves vitronectin. *Tumor Biol*. 2010 Apr; 31(2):129–39.
20. Carduner L, Picot CR, Leroy-Dudal J, Blay L, Kellouche S, Carreiras F. Cell cycle arrest or survival signaling through α v integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Exp Cell Res*. 2014 Jan 15; 320(2):329–42. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.11.011> PMID: 24291221
21. Heyman L, Kellouche S, Fernandes J, Dutoit S, Poulain L, Carreiras F. Vitronectin and its receptors partly mediate adhesion of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Tumour Biol*. 2008; 29(4):231–44. <https://doi.org/10.1159/000152941> PMID: 18781095
22. Villedieu M, Briand M, Duval M, Héron JF, Gauduchon P, Poulain L. Anticancer and chemosensitizing effects of 2,3-DCPE in ovarian carcinoma cell lines: link with ERK activation and modulation of p21WAF1/CIP1, Bcl-2 and Bcl-xL expression. *Gynecol Oncol*. 2007 May; 105(2):373–84. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.12.019> PMID: 17276501
23. Xi C, Wang L, Yu J, Ye H, Cao L, Gong Z. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 4E is effective against chemo-resistance in colon and cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 18; 503(4):2286–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.150> PMID: 29959920
24. Kentsis A, Topisirovic I, Culjkovic B, Shao L, Borden KLB. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 28; 101(52):18105–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406927102> PMID: 15601771
25. Tan K, Culjkovic B, Amri A, Borden KLB. Ribavirin targets eIF4E dependent Akt survival signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Oct 24; 375(3):341–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.163> PMID: 18706892
26. Assouline S, Culjkovic B, Cocolakis E, Rousseau C, Beslu N, Amri A, et al. Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood*. 2009 Jul 9; 114(2):257–60. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-205153> PMID: 19433856
27. Tóvári J, Bocsi J, Ladányi A, Lapis K, Timár J. The antitumor effect of Tiazofurin (TR) consists of anti-proliferative and anti-invasive elements. *Anticancer Res*. 1996 Dec; 16(6A):3307–12. PMID: 9042305
28. Zaoui K, Honoré S, Isnardon D, Braguer D, Badache A. Memo-RhoA-mDia1 signaling controls microtubules, the actin network, and adhesion site formation in migrating cells. *J Cell Biol*. 2008 Nov 3; 183(3):401–8. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805107> PMID: 18955552
29. Carreiras F, Rigot V, Cruet S, André F, Gauduchon P, Marvaldi J. Migration properties of the human ovarian adenocarcinoma cell line IGROV1: Importance of α v β 3 integrins and vitronectin. *Int J Cancer*. 1999 Jan 18; 80(2):285–94. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990118\)80:2<285::aid-ijc19>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990118)80:2<285::aid-ijc19>3.0.co;2-1) PMID: 9935212
30. Leroy-Dudal J, Demeilliers C, Gallet O, Pauthe E, Dutoit S, Agniel R, et al. Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves α v integrins and the participation of MMP2. *Int J Cancer*. 2005 Apr 20; 114(4):531–43. <https://doi.org/10.1002/ijc.20778> PMID: 15609323
31. Heyman L, Leroy-Dudal J, Fernandes J, Seyer D, Dutoit S, Carreiras F. Mesothelial vitronectin stimulates migration of ovarian cancer cells. *Cell Biol Int*. 2010 Apr 1; 34(5):493–502. <https://doi.org/10.1042/CBI20090331> PMID: 20121701
32. Pettersson F, Del Rincon SV, Emond A, Huor B, Ngan E, Ng J, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of eIF4E reduces breast cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Cancer Res*. 2015 Mar 15; 75(6):1102–12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1996> PMID: 25608710
33. Michaelis M, Michaelis R, Suhan T, Schmidt H, Mohamed A, Doerr HW, et al. Ribavirin inhibits angiogenesis by tetrahydrobiopterin depletion. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2007 Jan; 21(1):81–7.

34. Stoeck M, Miescher S, MacDonald HR, Von Fliedner V. Transforming growth factors beta slow down cell-cycle progression in a murine interleukin-2 dependent T-cell line. *J Cell Physiol.* 1989 Oct; 141(1):65–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041410111> PMID: 2789227
35. Chao HX, Poovey CE, Privette AA, Grant GD, Chao HY, Cook JG, et al. Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Syst.* 2017 22; 5(5):445–459.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.015> PMID: 29102360
36. Fidorra J, Mielke T, Booz J, Feinendegen LE. Cellular and nuclear volume of human cells during the cell cycle. *Radiat Environ Biophys.* 1981; 19(3):205–14. <https://doi.org/10.1007/bf01324188> PMID: 7267987
37. Roca-Cusachs P, Alcaraz J, Sunyer R, Samitier J, Farré R, Navajas D. Micropatterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in G1 and proliferation. *Biophys J.* 2008 Jun; 94(12):4984–95. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.116863> PMID: 18326659
38. Kochhar DM, Penner JD, Knudsen TB. Embryotoxic, teratogenic, and metabolic effects of ribavirin in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1980 Jan; 52(1):99–112. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(80\)90252-5](https://doi.org/10.1016/0041-008x(80)90252-5) PMID: 7361317
39. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov 25; 139(5):871–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007> PMID: 19945376
40. Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010 May; 10(3):268–78. <https://doi.org/10.2174/156800910791190175> PMID: 20370691
41. Vergara D, Merlot B, Lucot J-P, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2010 May 1; 291(1):59–66. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.09.017> PMID: 19880243

Etude de l'implantation péritonéale de sphéroïdes tumoraux ovariens dans un modèle in vitro de co-culture tridimensionnel en ascites.

Les carcinomes ovariens ont un mauvais pronostic principalement en raison de la découverte tardive de la maladie et d'un taux élevé de récurrence. Les cellules cancéreuses ovariennes se propagent dans la cavité abdominale, conduisant à des métastases péritonéales. De plus, au moins un tiers des patientes atteintes d'un Cancer épithélial de l'Ovaire (CO) présentent une accumulation de liquide inflammatoire, l'ascite, au moment du diagnostic et presque toutes ont de l'ascite au moment de la récurrence. L'influence de l'ascite sur le développement des niches pré-métastatiques, et sur les mécanismes biologiques sous-jacents conduisant à l'implantation des cellules cancéreuses au mésothélium, reste mal comprise.

L'objectif global du travail de thèse a été d'une part de déterminer l'influence de l'ascite sur l'intégrité du mésothélium et sur l'implantation des sphéroïdes tumoraux sur celui-ci, et d'autre part le développement d'un modèle de co-culture 3D sphéroïdes cancéreux/cellules mésothéliales en condition ascitique mimant ainsi les étapes précoces de la dissémination.

Nous avons ainsi démontré que l'ascite, qui est un microenvironnement tumoral particulier, influence de nombreux comportements cellulaires. L'ascite favorise la formation et le compactage des sphéroïdes CO, permet la densification et la réorganisation des protéines de la matrice extracellulaire du mésothélium et c'est une source de fibrinogène et de fibrine. L'ascite provoque également une déstabilisation de l'intégrité du mésothélium avec une modification de l'organisation des jonctions cellulaires des cellules Met-5A ainsi qu'une désorganisation des contacts focaux. De plus, l'ascite induit une réorganisation du cytosquelette d'actine dépendant de l'activité de Rac1 qui se traduit par l'apparition de « membrane ruffles ». Ces résultats suggèrent que l'ascite induit une rétraction des cellules mésothéliales ce qui pourrait faciliter l'invasion des cellules CO. Pour mimer les premiers stades de l'implantation péritonéale du CO, nous avons développé un modèle tridimensionnel *in vitro* de co-culture de sphéroïdes CO et de cellules mésothéliales en présence d'ascite. La fibrine présente dans les ascites conduit à l'adhésion des sphéroïdes CO au mésothélium, et les ascites favorisent leur désagrégation et la clairance des cellules mésothéliales. Notre étude a aussi démontré l'implication des intégrines αV et $\alpha 5\beta 1$ dans la désagrégation des sphéroïdes sur le fibrinogène, dans l'invasion de la fibrine par des sphéroïdes et sur la clairance du mésothélium.

L'étude des relations entre les propriétés moléculaires des composants de l'ascite et l'implantation de cellules CO peut être essentielle pour une meilleure compréhension de la récurrence de cette maladie mortelle permettant la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

In vitro study of the peritoneal implantation of tumoral ovarian spheroids in a 3D co-culture model in ascites conditions.

Ovarian carcinomas have a poor prognosis predominantly because of late diagnosis and high recurrence rate. Ovarian cancer cells spread widely throughout the abdominal cavity, leading to peritoneal metastasis. Moreover, at least one-third of patients with epithelial ovarian cancer (OC) accumulates an inflammatory fluids, named ascites, at diagnosis and almost all have ascites at recurrence. The influence of ascites on the development of premetastatic niches, and on the underlying biological mechanisms leading to cancer cell implantation in the mesothelium, remain poorly understood.

The overall objective of the thesis work was on the one hand to determine the influence of ascites on mesothelium integrity and on the implantation of tumor spheroids on the mesothelium. On the other hand, the development of a 3D co-culture model of cancerous spheroids and mesothelial cells in ascites, mimicking the early stage of dissemination.

We demonstrate that ascites, which is a unique tumor microenvironment, influences many cellular behaviors. Ascites promotes the formation and compaction of OC spheroids, allows densification and reorganization of the proteins of the extracellular matrix of the mesothelium, and is a source of fibrinogen and fibrin. Ascites also causes a destabilization of the integrity of the mesothelium with a modification of the organization of cell junctions in Met-5A cells and a disruption of focal contacts. In addition, ascites induces a cytoskeletal reorganization of actin dependent on the activity of Rac1 which results in the appearance of "ruffles membrane". These results suggest that ascites induces retraction of mesothelial cells which may facilitate the invasion of OC cells. To mimic the early stages of peritoneal OC implantation, we have developed a three-dimensional *in vitro* model of co-culture of OC spheroids and mesothelial cells in the presence of ascites. Fibrin in ascites leads to the adhesion of OC spheroids to the mesothelium, and ascites promotes their disaggregation and the clearance of mesothelial cells. Our study also highlighted the involvement of αV and $\alpha 5\beta 1$ integrins in spheroids disaggregation on fibrinogen, in spheroids invasion in fibrin and on the mesothelium clearance.

Investigating the relationships between the molecular properties of ascites components and OC cell implantation cells may be essential for a better understanding of the recurrence of this fatal disease leading to the discovery of new therapeutic targets.