



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Cancérologie

Présentée et soutenue par :

Benoît Thibault

le : vendredi 17 mai 2013

Titre :

Rôle des Hospicells dans la progression et la dissémination tumorale
ovarienne : implication particulière des macrophages

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

EA 4553 - Individualisation du traitement des cancers ovariens et ORLs

Directeur(s) de Thèse :

Pr. Bettina COUDERC

Pr. Jean-Pierre DELORD

Rapporteurs :

Pr. Marc POCARD

Pr. Franck CARREIRAS

Membre(s) du jury :

Dr. Bernard PIPY

Pr. Jérôme ALEXANDRE

Dr. Nicolas GUILBAUD

Dr. Laurent POULAIN

Pr. Jean-Pierre DELORD

Pr. Bettina COUDERC

« Chercher à connaître n'est souvent qu'apprendre à douter »

Madame Deshoulières

Pour mon grand-père Jean, qui guide mes pas chaque jour

Remerciements

Je tiens à remercier **les membres de mon jury** pour avoir accepté de juger mon travail et j'attends avec impatience les discussions que nous pourrions avoir autour de celui-ci.

Un immense merci à mes chefs d'équipe, **Jean-Pierre** et **Etienne** sans qui je n'aurais pas pu réaliser cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir financé ces 3 années.

Jean-Pierre, je te remercie infiniment pour toute la confiance que tu m'as accordée. Cette thèse n'aurait jamais été la même sans tous ces projets confiés, aussi bien avec l'univers médical qu'avec le monde industriel. Merci pour toutes ces discussions et ces remarques pertinentes qui m'ont fait sortir de mes connaissances de biologie fondamentale pour comprendre que la cancérologie, c'est d'abord répondre à une problématique chez la patiente. Merci également de m'avoir permis de partir de l'autre côté de l'Atlantique, à l'AACR et d'avoir tant œuvré pour mon avenir. J'espère pouvoir continuer à collaborer avec toi dans le futur.

Etienne, merci de m'avoir montré que les berrichons aussi peuvent faire de la recherche. Bien que j'aie mis du temps, je suis heureux d'avoir pu découvrir le monde mystérieux de la pharmacocinétique et j'en garderai de bons souvenirs.

Bettina, merci pour tout. D'abord, tu m'as accepté en M2R pour la grande aventure des Hospicells ! Tu m'as fait confiance et tu m'as laissé toute la liberté dont j'avais besoin pour faire avancer ce sujet. Ensuite, tu as fait tout ce que tu as pu, remué ciel et terre pour me garder en thèse. Pour ça, je te serai éternellement reconnaissant. Grâce à toi, j'ai pu participer à une infinité de projets, découvrir le monde de la médecine, partir en congrès (en France et aux USA !),... Je n'oublierai jamais toutes ces années à vivre au rythme des histoires de Cador, Topaze, ton mari, tes enfants, ta bonne humeur plus que communicative, tes blagues tout en finesse et j'en passe. Sache que si j'ai travaillé sur un sujet qui m'a passionné, je n'aurais sincèrement jamais imaginé et rêvé m'entendre aussi bien avec ma directrice de thèse. J'espère que d'une manière ou d'une autre, nous pourrions continuer à travailler ensemble pendant les années à venir.

Magali, difficile de résumer ces 4 années (et 3 mois) passées en ta compagnie dans le bureau. Je crois que nous nous sommes plutôt pas mal débrouillés. Nous avons essayé de dompter les Hospicells ensemble, avec pas mal de succès et quelques « danses des résultats ». Nous avons vu passer pas mal de monde dans ce bureau, beaucoup de rires, de private jokes, de running gag, de projets, d'idées farfelues, etc... Bon, je dois t'avouer que j'ai eu l'impression de passer ma thèse avant même de commencer à rédiger la mienne ! Tu vois, j'essaie d'écrire des remerciements aussi longs que ceux que tu as pu faire le jour de ta soutenance !

Quentin, Diane-Charlotte, merci. Bon, ok, je suis obligé d'en écrire un peu plus, de chanter vos louanges, de dire à quel point cette deuxième moitié de thèse fût agréable en votre compagnie et combien j'ai réussi à faire abstraction de votre « passion » pour la PK pour communiquer avec vous. Quentin, je te remercie infiniment pour ta gentillesse, ta capacité innée à mettre les gens en confiance, ta science des bons conseils et tes talents de chanteur (le wagon, la danse des petites, etc...). J'espère de tout mon cœur retrouver un Quentin dans mon prochain bureau....

Diane, merci pour les crimbs, ton humour (qui pourrait te mener en prison !), les nœuds, les paillettes et les histoires improbables (l'attaque de pigeon dans l'angle mort !). J'espère que tu trouveras la confiance en toi que tu mérites d'avoir pendant la suite de ta thèse.

J'espère que je ne vous manquerai pas trop. Allez, ne pleurez pas, je suis encore là pour 6 mois. Sachez en tout cas qu'à moi, vous me manquez. J'espère sincèrement retrouver des collègues tels que vous dans le futur...

Un grand merci à toute l'**EA4553**. Vous m'avez accueilli il y a un peu plus de 4 ans, alors que je n'étais qu'un jeune étudiant en M2R. Mon quotidien a été rythmé par mes discussions avec chacun d'entre vous, mes innombrables cafés (et dire que je n'aimais pas ça avant), les mots fléchés, les rires, les soirées, etc... 4 années à travailler avec des collègues que je n'aurais pas rêvé meilleurs. Vous méritez chacune et chacun un paragraphe entier, mais j'espère que vous comprendrez que je risque dans ce cas de multiplier par deux le volume de cette thèse. Un immense merci à **Thierry** (le « mulumain »), **Isabelle H** (la maman du labo), **Isabelle L** (une touche de « nord » dans ce monde de sudistes), **Sabrina** (docteur ès mots fléchés, correspondante officielle en télé-crochets), **Fabienne** (quelle bonne idée de choisir Elisa comme stagiaire), **Ben** (mon maître des souris), **Aurélien** (peu de temps passé ensemble, mais déjà beaucoup de bons moments), **Peggy** (non, je n'ai pas signé cette thèse « Bénart »), **Mélanie**, **Cécile** et **Anne-Laure**. Merci d'avoir été ma famille au labo...

Ludivine, **Laetitia**, je vous remercie pour votre extrême gentillesse et votre bienveillance à mon égard... Je suis persuadé qu'avec votre bonne humeur, je passerai une bonne fin d'année 2013 au labo. Je suis vraiment désolé de ne pas avoir pu encadrer le début de vos stages aussi bien que je l'aurais voulu. En ces temps de « crise », j'avais un peu la tête ailleurs mais maintenant c'est promis, je suis là !

Je tiens également à remercier l'intégralité des stagiaires présents ou passés, externes, internes, thésards, qui ont peuplé cette équipe et ce bureau : **Antonin** (docteur ès jeux de mots), **Sébastien** (amitiés sportives), **Faten**, **Anne** (Staub, je ne suis pas noir), **Cécile** (pour ton aide immense dans le projet), **Adrien** (fiston), **Anne-Claire** (maître en contrepèteries), **Emily** (si tu en doutes, tu es faite pour la recherche !), **Julien**, **Manu**, **Charles** et l'immense **Jhony Maalouf**.

Merci beaucoup à **Francis Bayard** pour ces longues discussions, ces remarques pertinentes et surtout pour nous avoir mis sur la piste des macrophages...

Merci à toutes « les filles du bout du couloir ». Je veux bien sûr parler de **Caroline**, **Olivia**, **Judith**. Merci pour votre bonne humeur, les concours de sapin de Noël et les sifflements dans le couloir... Caro, merci pour Casimir. Sache que je très suis fier d'avoir été ton idole !

Une place particulière pour **Anthony**, pour ta gentillesse et ta précieuse aide pour les remarques, les présentations, etc... Tu as déjà été béatifié par Magali, je n'en rajouterai donc pas !

Merci à tous les membres des équipes de recherche présentes à l'ICR. Particulièrement, je tiens à remercier **Christine**, **Iotefa**, **Fafita** et **Maud**, qui malgré leur présence excentrée au 4^e étage m'ont permis de passer énormément de bons moments. Merci pour votre aide et toutes ces heures de rires...

Merci beaucoup à tout le **service d'anatomopathologie**. Un immense merci à **Eliane** pour gentillesse et son aide infinie, quelles que soient les circonstances. Merci également à toutes les **techniciennes** qui m'ont préparé une bonne centaine d'ascites tout au long de ces 4 ans.

Un grand merci à tout le **service de chirurgie gynécologique** et tout particulièrement à **Gwenaël** pour m'avoir permis de récupérer toutes ces ascites et autres échantillons tumoraux. Merci aussi de m'avoir convié aux réunions du comité gynécologique et de m'avoir intégré à tous ces projets de recherche.

Merci à toutes les **aides de laboratoire** pour leur aide au quotidien (**Isabelle G**, **Lourdes**, **Jocelyne**).

Merci à **Sylvia** d'avoir géré mon planning chaotique.

Un immense merci à tous mes amis d'Issoudun, de Toulouse et d'ailleurs : **Michaël, Laure, Quentin, Charlène, Sylvain, Cyril, Florent, Floriane, Clémence, Lilian, Maïa, Tod, Comis, Jay, Popi, Fax, Lise, Ludo**. Chacun à votre façon, vous avez été ma bulle d'oxygène... « Je ne connais pas la moitié d'entre vous à moitié autant que je le voudrais, et j'aime moins de la moitié d'entre vous à moitié autant que vous le méritez ».

Christophe, mon grand frère qui m'a tout appris, c'est grâce à toi que je suis là aujourd'hui. Je pense que sans toi, je n'aurais jamais été aussi intéressé par les sciences et la recherche. Merci de ne jamais avoir fait de notre différence d'âge un obstacle et au contraire de nous avoir permis de partager tant de choses. Tu demeures l'un de mes modèles et j'espère arriver un jour là où tu en es déjà.

Katharina, merci pour ton soutien et surtout pour ta compassion en ce qui concerne la biologie, les manip, ... Tu sais de quelles galères je veux parler !

Merci à mon neveu **Tristan**, qui loin de toutes ces considérations scientifiques m'a rappelé que la vie et le bonheur peuvent être simples.

Papa, Maman, je ne saurais vous exprimer à l'écrit tout mon amour et toute la fierté que j'ai de vous avoir comme parents et de pouvoir vous donner ce « pavé ». Même si je sais que vous ne comprendrez peut être pas grand-chose, je suis sûr que vous le lirez avec toute votre attention ! Merci pour votre amour et votre soutien inconditionnel, de la première seconde de ma vie jusqu'à ce jour. Prenez bien soin de **Filou** qui est bien loin de tout ce travail, mais qui malgré lui y a contribué un petit peu.

Merci au reste de ma famille, notamment mes **grands-parents (Mémé, Raymond, Mamie)** et ma **marraine Mino** pour leur amour et leur soutien sans faille. Merci à mon **grand-père Jean** pour me montrer la voie chaque jour qui passe. J'aurais rêvé que tu puisses assister à tout cela. Je te dédie cette thèse.

Elisa, parmi toutes mes découvertes au laboratoire, tu es mon prix Nobel...

Résumé

Le cancer ovarien constitue la première cause de mortalité des cancers gynécologiques. Il se caractérise à stade avancé par une dissémination péritonéale, la formation de liquide d'ascite et un haut taux de mortalité. Malgré un traitement associant chirurgie et chimiothérapie (sels de platine et taxanes), la plupart des patientes récidivent. Cette récurrence est dans 50 % des cas combinée à l'acquisition d'une chimiorésistance dont l'origine pourrait provenir, entre autres, du microenvironnement tumoral.

Rafii *et al.* ont isolé des cellules originales du microenvironnement tumoral ovarien, les Hospicells, à partir de liquide d'ascite de patientes atteintes d'un cancer ovarien de stade III. Bien que leur origine soit inconnue, ces cellules présentent des homologies avec les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) ou les fibroblastes associés au cancer (CAFs). Les Hospicells sont capables de favoriser la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes par un échange membranaire de protéines d'efflux de molécules chimiothérapeutiques. De plus, les Hospicells présentent des propriétés immunosuppressives, notamment en inhibant la prolifération et la production de cytokines de certains lymphocytes T. Les travaux réalisés au laboratoire ont mis en évidence que les Hospicells permettent également une augmentation de la croissance tumorale par une activation de l'angiogenèse.

Mes travaux de thèse ont consisté à déterminer la nature des interactions entre les Hospicells et les cellules tumorales ovariennes ou d'autres cellules du microenvironnement, responsables des effets pro-tumoraux décrits précédemment. J'ai pu mettre en évidence *in vitro* et *in vivo* (modèles de xénogreffes intrapéritonéales de cellules tumorales ovariennes dans des souris immunodéprimées) que les Hospicells sont capables, par un facteur sécrété, d'induire la production d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF (cytokines pro-angiogéniques) par les cellules tumorales ovariennes. Cependant, alors que les Hospicells favorisent systématiquement la croissance tumorale *in vivo*, les résultats obtenus *in vitro* sont lignée tumorale ovarienne spécifique. Des données complémentaires obtenues au laboratoire ont montré que les interactions établies entre les cellules tumorales et les Hospicells *in vitro* ne permettent pas d'expliquer l'activation de l'angiogenèse mise en évidence *in vivo*. Nous avons donc cherché d'autres partenaires potentiels des Hospicells au sein du microenvironnement tumoral permettant d'expliquer les effets pro-tumoraux observés *in vivo*.

J'ai ainsi montré que les Hospicells sont capables d'entraîner le recrutement de macrophages au sein des tumeurs ovariennes. Les Hospicells peuvent, par un facteur sécrété, polariser les monocytes/macrophages en un phénotype pro-tumoral de macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et entraîner la sécrétion par ces cellules d'IL-6, IL-8, VEGF, TNF- α , TGF- β , IL-1 (α et β), MCP-1, etc...

Je me suis également intéressé aux voies de signalisation cellulaires potentiellement impliquées dans la sécrétion d'IL-6, IL-8 et VEGF par les cellules tumorales ou les macrophages, induite par les Hospicells. Bien que ces voies restent en cours d'études, j'ai mis en évidence que le TNF- α , l'IL-1 α , les œstrogènes, Fas Ligand, la S1P et le LPA ne sont pas impliqués dans cette sécrétion de cytokines. J'ai cependant montré une implication des voies du NO et de COX-2 dans la synthèse de VEGF par les macrophages induite par les Hospicells.

Nous établissons ainsi l'hypothèse que les Hospicells sont capables d'établir des interactions avec les cellules tumorales ovariennes et les macrophages présents au sein de la tumeur, entraînant une sécrétion de cytokines pro-tumorales. Les Hospicells permettent l'activation et la polarisation des monocytes/macrophages en un phénotype pro-tumoral entraînant ainsi le recrutement de nouveaux macrophages vers le site tumoral. Ces interactions permettent une croissance tumorale et une angiogenèse augmentée, et peuvent favoriser les processus métastatiques et la chimiorésistance. Ces résultats soulignent l'intérêt de cibler le microenvironnement, et notamment les Hospicells, dans le but d'améliorer la prise en charge de patientes atteintes d'un cancer ovarien.

Abstract

Ovarian cancer is the leading cause of death from gynaecological cancer in the world and is characterized by peritoneal dissemination, ascite development and a high rate of mortality. Advanced epithelial ovarian cancer is treated by a cytoreductive surgery and chemotherapy but most of patients experience a recurrence with the apparition of a chemoresistance. The microenvironment could be implied in this recurrence and the resistance to chemotherapies.

Rafii *et al.* isolated original cells, called Hospicells, from ascitic fluid of patients with a grade III ovarian cancer. Although their origin is unknown, these cells share homologies with mesenchymal stem cells (MSCs) or carcinoma associated fibroblasts (CAFs). Hospicells are able to enhance the chemoresistance of ovarian cancer cells *via* a membrane exchange of chemotherapeutic drugs efflux proteins. Moreover, Hospicells present immunosuppressive properties as the inhibition of proliferation and cytokine production of T lymphocytes. The research carried out in the laboratory showed that Hospicells can also enhance tumour growth by activating the angiogenesis.

My PhD focused on the description of interactions between Hospicells and ovarian cancer cells or other stromal cells, responsible for the pro-tumoral effects described previously. I highlighted *in vitro* and *in vivo* (intraperitoneal xenograft of ovarian cancer cells in immunosuppressed mice) that Hospicells are able, by a secreted factor, to induce the production of IL-6, IL-8 and VEGF (pro-angiogenic cytokines) in ovarian cancer cells. However, while Hospicells always enhance tumor growth *in vivo*, the results obtained *in vitro* are ovarian cancer cell line specific. Complementary data obtained in the laboratory showed that the interactions between ovarian cancer cells and Hospicells *in vitro* are not sufficient to explain the activation of angiogenesis highlighted *in vivo*. Therefore, we looked for another potential cellular partner for Hospicells in the tumor microenvironment that could explain the pro-tumoral effects observed *in vivo*.

I showed that Hospicells can activate the recruitment of macrophages toward ovarian tumors. Hospicells can, by a secreted factor, polarize monocytes/macrophages into a pro-tumoral phenotype of tumor associated macrophages (TAMs) and trigger the secretion by these cells of IL-6, IL-8, VEGF, TNF- α , TGF- β , IL-1, MCP-1, etc...

I also studied the cellular pathways potentially implied in the secretion of IL-6, IL-8 and VEGF by ovarian cancer cells or macrophages, induced by Hospicells. Although these pathways are still under study, I highlighted that the TNF- α , the IL-1 α , estrogens, Fas Ligand, the S1P and the LPA are not implied in this secretion of cytokines. However, I showed an implication of the NO and COX-2 pathways in the VEGF synthesis induced by Hospicells in macrophages.

We thus make the hypothesis that Hospicells are able to establish interactions with ovarian cancer cells and tumor macrophages, resulting in a secretion of pro-tumoral cytokines. Hospicells allow the

activation and polarization of monocytes/macrophages into a pro-tumoral phenotype enhancing the recruitment of new macrophages toward the tumor site. These interactions allow an enhanced tumor growth and angiogenesis, and can activate metastatic process and the acquisition of a chemoresistance. These results underline the importance of targeting the microenvironment, especially the Hospicells, in order to improve the management of patients with ovarian cancer.

Sommaire

Table des figures	5
Table des tableaux	5
Liste des abréviations	6
Introduction	9
Revue bibliographique	13
1. Le cancer des ovaires	14
1.1. Généralités.....	14
1.2. Types histologiques et stadification.....	14
1.3. Facteurs de risque et origines génétiques	16
1.4. Origines du cancer ovarien.....	17
1.5. Cellules souches cancéreuses ovariennes.....	18
1.6. Diagnostic	19
1.6.1. Imagerie.....	19
1.6.2. Marqueurs.....	19
1.7. Prise en charge thérapeutique des cancers épithéliaux de l’ovaire.....	20
1.7.1. Stades précoces (I et II)	20
1.7.2. Stades avancés (III et IV)	20
1.8. Nouvelles thérapeutiques	21
1.9. Problématiques liées au cancer ovarien.....	22
2. Microenvironnement tumoral et cancer ovarien.....	25
2.1. Généralités.....	25
2.1.1. Historique	25
2.1.2. Définition du microenvironnement tumoral.....	25
2.2. Ascite et facteurs sécrétés.....	27
2.2.1. Lipides bioactifs	28
2.2.2. Cytokines et facteurs de croissance.....	29
2.3. Matrice extracellulaire et adhésion.....	33
2.3.1. Adhésion cellule-cellule et cellule-matrice	34

2.3.2. SPARC	35
2.3.3. Autres molécules de la MEC ovarienne	36
2.4. Fibroblastes et fibroblastes associés au cancer (CAFs).....	38
2.4.1. Fibroblastes « normaux » et sénescents	38
2.4.2. Myofibroblastes et fibroblastes associés au cancer (CAFs).....	39
2.5. Cellules endothéliales et angiogenèse	41
2.5.1. Généralités sur l'angiogenèse tumorale	41
2.5.2. Interactions entre cellules tumorales ovariennes et cellules endothéliales.....	41
2.5.3. VEGF et autres facteurs pro-angiogéniques.....	43
2.5.4. Matrice extracellulaire et angiogenèse	44
2.5.5. Importance du microenvironnement dans l'angiogenèse	44
2.5.6. Traitement anti-angiogénique dans le cancer ovarien	45
2.6. Cellules souches mésenchymateuses (MSCs)	45
2.7. Adipocytes	47
2.8. Cellules mésothéliales	48
2.9. Cellules immunitaires	49
2.9.1. Rôle ambivalent du système immunitaire	49
2.9.2. Lymphocytes T CD8 ⁺	50
2.9.3. Lymphocytes T régulateurs	51
2.9.4. Lymphocytes T auxiliaires	51
2.9.5. Lymphocytes $\gamma\delta$	52
2.9.6. Cellules dendritiques	53
2.9.7. Neutrophiles	53
2.9.8. Macrophages	54
2.10. Conclusion	56
3. Hospicells.....	59
3.1. Découverte et isolation	59
3.2. Phénotype des Hospicells	60
3.3. Implication dans la chimiorésistance	60
3.4. Effets immunosuppresseurs.....	61
3.5. Rôles dans la progression tumorale ovarienne	61
3.6. Résumé des connaissances actuelles à propos des Hospicells.....	62
Matériel et méthodes	65
1. Culture Cellulaire.....	66
2. Analyse des protéines	67

3. Extinction de l'expression de gènes et étude de transcrits d'ARNm	69
4. Etude de l'angiogenèse	71
5. Modèles animaux	72
6. Etude des macrophages	73
7. Analyse statistique	74
Résultats	75
1. Résultats préliminaires et objectifs	76
2. Article 1 : Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis <i>via</i> activation of macrophages	76
2.1. Introduction	76
2.2. Publication : Ovarian ascites-derived Hospicells promot angiogenesis <i>via</i> activation of macrophages	77
2.3. Figures supplémentaires	87
2.4. Discussion	93
3. Rôle des Hospicells sur l'activation des macrophages	96
3.1. Introduction	96
3.2. Profil cytokinique des macrophages activés par les Hospicells	96
3.3. Rôle des Hospicells sur le recrutement des macrophages	100
4. Voies de signalisation impliquées dans l'activation des cellules tumorales ovariennes et des macrophages par les Hospicells	102
4.1. Introduction sur les voies de signalisation étudiées	102
4.2. Voie de Fas Ligand	102
4.1. Voie de la sphingosine-1-phosphate	104
4.2. Voie de l'oxyde nitrique	106
4.3. Voie de la cyclo-oxygénase	107
Discussion	109
1. Rôle des Hospicells sur les cellules tumorales ovariennes	110
2. Rôle des Hospicells dans l'activation des macrophages	110

3. Voies de signalisations impliquées dans les rôles pro-tumoraux des Hospicells.....	113
4. Rôle des Hospicells dans la chimiorésistance.....	116
5. Origine et nature des Hospicells.....	117
6. Les Hospicells au sein du microenvironnement tumoral ovarien.....	119
7. Les Hospicells au sein du cancer ovarien.....	120
8. Conclusion.....	121
 Bibliographie.....	 125
 Annexes.....	 147
1. Article 2 : Microenvironment cells protect ovarian cancer from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation.....	148
2. Revue 1 : Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance : Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death.....	177
3. Revue 2 : Ovarian cancer microenvironment : implications on cancer dissemination and chemoresistance acquisition.....	204

Table des figures

Figure 1 : Classement des différents types de tumeurs épithéliales de l’ovaire.....	15
Figure 2 : Origine des différents cancers ovariens	18
Figure 3 : Evolution du taux de survie dans le cancer ovarien	22
Figure 4 : Evolution fréquente du cancer ovarien à stade avancé.....	24
Figure 5 : Contributions multiples des cellules stromales dans le cancer	27
Figure 6 : Fonctions de la matrice extracellulaire	33
Figure 7 : Rôles de SPARC dans la progression tumorale ovarienne.....	36
Figure 8 : Rôles des fibroblastes et CAFs dans le microenvironnement tumoral ovarien	40
Figure 9 : Angiogenèse tumorale et modifications de la MEC	42
Figure 10 : Rôles des MSCs et des adipocytes dans le microenvironnement tumoral ovarien.....	47
Figure 11 : Différentes populations de macrophages.....	55
Figure 12 : Le microenvironnement tumoral ovarien	58
Figure 13 : Observations microscopiques d’agrégats cellulaires isolés à partir de liquide d’ascite	59
Figure 14 : Rôles connus des Hospicells dans la progression tumorale ovarienne.....	63
Figure 15 : Profil cytokinique des monocytes/macrophages actives par les Hospicells.....	97
Figure 16 : Sécrétions <i>in vitro</i> de chimiokines dans les interactions entre les monocytes leucémiques U937 et les Hospicells.....	99
Figure 17 : Test de migration de monocytes leucémiques <i>in vitro</i>	101
Figure 18 : Etude de l’implication de la voie de Fas Ligand dans la sécrétion d’IL-6 et d’IL-8 par les cellules tumorales ovariennes et les monocytes	103
Figure 19 : Etude de l’implication de la voie de la S1P dans la sécrétion d’IL-6 et d’IL-8 par les cellules tumorales ovariennes et les monocytes	105
Figure 20 : Etude de l’implication de la voie du NO dans la sécrétion de cytokines par les monocytes/macrophages	106
Figure 21 : Etude de l’implication de la voie COX-2 dans la sécrétion de cytokines par les monocytes/macrophages et les cellules tumorales ovariennes.....	108
Figure 22 : Rôle des Hospicells dans la progression tumorale ovarienne.....	123

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification internationale FIGO pour le cancer de l’ovaire	16
Tableau 2 : Statuts de sensibilité au platine	23
Tableau 3 : Facteurs contenus dans les ascites tumorales ovariennes	32

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
α-SMA	α -smooth actin muscle
ADSCs	Adipose derived stromal cells
BMP	Bone morphogenetic protein
CA-125	Cancer/Carbohydrate Antigen 125
CAF	Cancer associated fibroblast
CAM	Cell adhesion molecule
CA-MSC	Carcinoma-associated mesenchymal stem cells
CCL	CC chemokine ligand
CD	Cluster differentiation
CHIP	Intra-peritoneal chemo-hyperthermia
CLIC4	Chloride intracellular channel 4
COX	Cyclooxygenase
CPA	Antigen-presenting cell
CSC	Cancer stem cell
CXCL8	CXC chemokine ligand 8
CXCR4	C-X-C receptor type 4
DCs	Dendritic cells
EGF	Epidermal growth factor
EphA2	Ephrin receptor A2
FABP4	Fatty acid-binding protein 4
FAP	Fibroblast-activation protein
FGF-2	Fibroblast growth factor 2 ou basic fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FIGO	International Federation of Obstetricians and Gynaecologists
GM-CSF	Granulocyte macrophages colony-stimulating factor
GFP	Green fluorescent protein
GRO-1	Growth-regulated oncogene 1
HE4	Human epidymis protein 4
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor-1 α
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
Id1	Inhibitor of DNA binding 1

IFN-γ	Interferon γ
IKKβ	I κ B kinase β
IL	Interleukin
IL-1RA	IL-1 receptor antagonist
ILT3	Immunoglobuline-like transcript 3
iNOS	Nitric oxide synthase
IP-10	IFN- γ -induced protein 10
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPA	Lysophosphatidic acid
MCP	Monocyte chemoattractant protein
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDR	Multidrug resistance
MDSC	Suppressive myeloid cell
MEC	Extracellular matrix
MIF	Macrophage inhibitory factor
MMP	Matrix metalloprotease
MSC	Mesenchymal stem cell
MT1-MMP	Membrane type 1 matrix metalloprotease
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene
NAP-2	Neutrophil-activating protein-2
NF-κB	Nuclear factor- κ B
NO	Nitric oxide
NOS	NO synthase
OSM	Oncostatin M
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
PARC	Pulmonary and activation-regulated chemokine
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	PDGF receptor
PG	Prostaglandin
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PMA	Phorbol myristate acetate
PTEN	Phosphatase and tensin homolog

RANTES	Regulated and normal T cell expressed and secreted
S1P	Sphingosin-1-phosphate
SDF-1	Stromal derived factor 1
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
SV40	Simian virus 40
SVF	Fetal Calf Serum
TAM	Tumor associated macrophage
TAN	Tumor associated neutrophil
TCR	T cell receptor
TEM	Epithelial-mesenchymal transition
TGF-β1	Transforming growth factor- β 1
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinases-1
TLR	Toll like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor α
Treg	T regulator lymphocyte
TXAS	Thromboxane synthase
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VE-cadherin	Vascular endothelial cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XIAP	X-linked inhibitory of apoptosis protein

Introduction

Le cancer ovarien constitue la première cause de mortalité des cancers gynécologiques. Il se caractérise, à stade avancé (75% des cas), par une dissémination péritonéale, la formation de liquide d'ascite (épanchement liquidien péritonéal) et un haut taux de mortalité. Malgré un traitement associant chirurgie cytoréductive et chimiothérapie combinant sels de platine et taxanes, la plupart des patientes récidivent. Cette récurrence pourrait provenir de la persistance éventuelle de micro-implants tumoraux péritonéaux et, dans 50 % des cas, de l'acquisition d'une chimiorésistance par ces cellules résiduelles. L'origine de cette chimiorésistance pourrait provenir, entre autres, du microenvironnement tumoral (1-3).

Ce microenvironnement, ou stroma, est composé de la matrice extracellulaire, de facteurs protéiques et lipidiques contenus dans le liquide d'ascite ainsi que de nombreux types cellulaires tels que les adipocytes, les cellules endothéliales, les cellules souches mésenchymateuses (MSCs), les fibroblastes associés au cancer (CAFs) ou encore les cellules immunitaires. Impliqué dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes, le stroma peut également agir à tous les niveaux de la progression tumorale en régulant notamment la prolifération des cellules, les mécanismes d'angiogenèse ou de lymphangiogenèse et les processus de dissémination ou de métastases (4-6).

Rafii *et al.* ont isolé des cellules originales du microenvironnement tumoral ovarien, les Hospicells, à partir de liquide d'ascite de patientes atteintes d'un cancer ovarien de stade III (7). Bien que leur origine soit encore inconnue, ces cellules présentent des homologies avec les MSCs, les CAFs ou les cellules stromales dérivées du tissu adipeux (ADSCs). Les Hospicells sont capables de favoriser la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes par un échange membranaire de protéines d'efflux de molécules chimiothérapeutiques (7). De plus, les Hospicells présentent des propriétés immunosuppressives, notamment en inhibant la prolifération et la production de cytokines de certains lymphocytes T (8). Les travaux réalisés au sein du laboratoire ont mis en évidence la capacité des Hospicells à augmenter la croissance tumorale par une activation de l'angiogenèse potentiellement liée à l'hypoxie (9).

Ce travail de thèse s'est structuré autour de trois problématiques ayant pour but de comprendre le mode d'action des Hospicells et leurs fonctions au sein du microenvironnement tumoral ovarien.

D'une part, nous avons déterminé la nature des interactions entre les Hospicells et les cellules tumorales ovariennes. Nous nous sommes intéressés à la sécrétion par ces dernières des cytokines pro-tumorales IL-6, IL-8 et VEGF en réponse aux Hospicells. Les Hospicells étant capables d'activer l'angiogenèse *in vivo*, nous avons étudié la capacité de ces cellules seules, ou en association avec des cellules tumorales ovariennes, à activer la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales *in vitro*.

D'autre part, nous avons déterminé la capacité des Hospicells à interagir avec d'autres cellules stromales. Nous avons ainsi étudié l'infiltration des macrophages au sein de tumeurs issues de la co-injection de cellules tumorales ovariennes et d'Hospicells en comparaison aux tumeurs issues de l'injection de cellules tumorales seules. Nous nous sommes également intéressés aux interactions établies entre les monocytes/macrophages et les Hospicells. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) constituent un acteur clé du microenvironnement tumoral et sont impliqués notamment dans l'activation de l'angiogenèse tumorale et dans la dissémination métastatique. Nous avons donc étudié la capacité des Hospicells à entraîner la polarisation des monocytes/macrophages en étudiant plus spécifiquement leur profil de sécrétion cytokinique.

Pour finir, nous nous sommes intéressés au mode d'action des Hospicells en analysant les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la capacité de ces cellules à activer les cellules tumorales ovariennes et des monocytes/macrophages. Nous avons observé les voies de signalisation connues pour activer la synthèse d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF en étudiant plus particulièrement les voies suivantes : IL-1, TNF- α , œstrogènes, Fas ligand, S1P, LPA, NO et COX-2/PGE₂.

Ces études nous ont permis de déterminer de nouvelles fonctions des Hospicells dans la progression tumorale ovarienne et ainsi d'acquérir de nouvelles connaissances sur l'origine et la nature de ces cellules.

Ce manuscrit de thèse s'articulera en 3 parties. La première sera une revue bibliographique traitant du cancer des ovaires et de ses problématiques associées, du microenvironnement tumoral et de son rôle spécifique dans le cancer ovarien, et de notre modèle cellulaire d'étude, les Hospicells.

La deuxième partie sera consacrée aux travaux de recherches. Ces derniers seront présentés sous la forme d'un article paru dans *Cancer Letters* et de résultats supplémentaires qui feront l'objet d'une publication future.

La dernière partie sera une discussion des résultats obtenus et une synthèse du travail accompli. Elle permettra de déterminer les études à réaliser par la suite et de mettre en perspective les travaux de cette thèse avec les enjeux de recherche fondamentale et clinique dans le cadre du cancer des ovaires.

Ce manuscrit sera complété par une publication actuellement en révision dans *Cell Death and Disease* traitant de la capacité des Hospicells à induire la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes par l'activation du facteur anti-apoptotique XIAP. Nous terminerons ces annexes par une revue bibliographique traitant du rôle du microenvironnement tumoral dans la chimiorésistance, parue dans *International Journal of Molecular Sciences*, ainsi qu'une revue bibliographique traitant du microenvironnement tumoral ovarien prochainement soumise dans *Gynecologic Oncology*.

Revue bibliographique

1. Le cancer des ovaires

1.1. Généralités

Parmi les pathologies gynécologiques, le cancer ovarien est la première cause de mortalité dans les pays développés et constitue 225000 nouveaux cas par an pour 140200 décès dans le monde (10). En France, il représente 4620 nouveaux cas par an (données INCA, 2011) et 3150 cas de décès. Bien qu'il soit peu fréquent (8^e rang en termes d'incidence chez la femme), il reste de très mauvais pronostic et se place au 4^e rang de mortalité chez la femme (derrière les cancers du sein, du colon et du poumon en termes d'incidence totale).

Les symptômes associés au cancer ovarien à un stade précoce (I et II) sont non spécifiques, rendant sa détection très difficile : perte de poids, douleurs abdominales, nausées, etc... A un stade avancé (III et IV), les patientes présentent généralement un épanchement liquidien massif appelé « ascite » pouvant représenter plusieurs litres de liquide. Ainsi, 75% des patientes sont diagnostiquées à un stade avancé (III et IV).

Cette détection tardive est en partie responsable du faible taux de survie des patientes atteintes d'un cancer des ovaires. En Europe, à 1 an, 3 ans et 5 ans après diagnostic, les taux de survie sont respectivement de 71, 50 et 42%. La survie à 5 ans diminue significativement avec l'âge. En effet, 5 ans après diagnostic, si 71% des patientes du groupe inférieur à 45 ans survivent, seulement 13,5% des patientes du groupe 75-99 ans sont encore en vie (11).

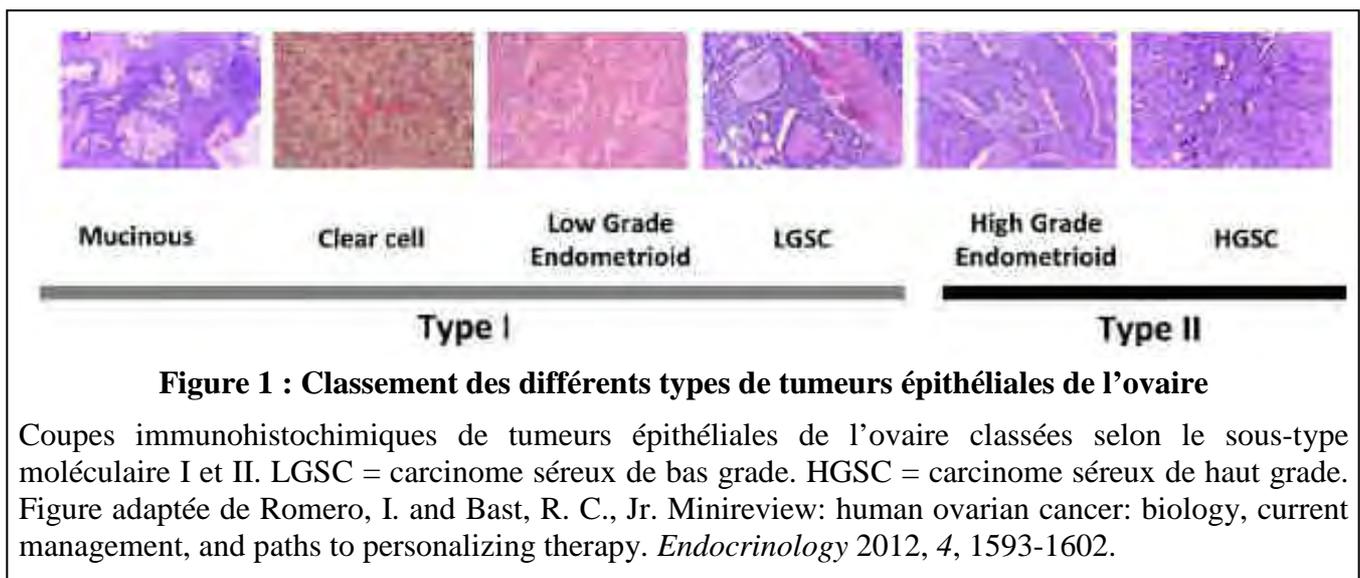
Le cancer ovarien est une pathologie survenant à un âge tardif avec un pic de fréquence à partir de 70 ans. A l'exception des formes héréditaires de la maladie et de certains cancers non épithéliaux, la survenue d'un cancer de l'ovaire avant 40 ans reste très rare.

1.2. Types histologiques et stadification

90% des cancers de l'ovaire dérivent de l'épithélium cœlomique recouvrant la surface des ovaires. Ces cancers épithéliaux peuvent être divisés en différents sous-types : les tumeurs séreuses, les tumeurs mucineuses, les tumeurs endométrioïdes, les tumeurs à cellules claires, les tumeurs épithéliales mixtes et les tumeurs indifférenciées. En 2004, Shih et Kurman proposèrent de classer les cancers épithéliaux de l'ovaire en deux types (type I et type II) sur la base de leurs voies de tumorigenèse et leurs altérations génétiques (**Figure 1**) (12).

Ainsi, les cancers épithéliaux de l'ovaire de type I sont souvent diagnostiqués à un stade précoce (confiné aux ovaires), se développent lentement, résistent aux chimiothérapies conventionnelles mais pourraient répondre à un traitement hormonal. Des mutations des gènes KRAS, BRAF, Phosphatase and tensin homolog (PTEN) ou encore Phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) sont fréquemment

retrouvées dans les cancers de type I. Au contraire, les cancers épithéliaux de l’ovaire de type II sont régulièrement diagnostiqués à un stade tardif (avec dissémination extra-ovarienne), se développent très rapidement, répondent aux chimiothérapies conventionnelles mais assez peu à un traitement hormonal. Les mutations décrites précédemment sont rarement retrouvées dans les cancers de type II (moins de 1% des cas) mais des mutations somatiques des gènes BRCA1/2 et de p53 sont très fréquentes. Cette distinction moléculaire et phénotypique des cancers épithéliaux de l’ovaire, au-delà du classement histologique, est un premier pas vers la compréhension de l’hétérogénéité des différents cancers de l’ovaire (3).



Parmi les autres cancers ovariens non épithéliaux, les tumeurs germinales malignes (3% des cancers de l’ovaire) surviennent principalement chez l’enfant ou la femme jeune et les tumeurs des cordons sexuels (7%) sont souvent caractérisées par des sécrétions hormonales.

En plus de ces lésions malignes, épithéliales ou non, nous pouvons dénoter les tumeurs borderline (frontière) à faible potentiel malin qui n’infiltrent pas le tissu sous-jacent et présentent un très bon pronostic (3).

La classification du cancer ovarien en 4 différents stades est déterminée par la Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique (FIGO) et nécessite une évaluation chirurgicale de la dissémination métastatique. En effet, l’adénocarcinome ovarien de stade I est confiné aux ovaires, le stade II présente une atteinte d’autres structures pelviennes, le stade III correspond à une dissémination dans le péritoine et/ou dans les ganglions lymphatiques régionaux et le stade IV est défini par une atteinte au-delà du péritoine (**Tableau 1**) (1).

Stades FIGO		Survie à 5 ans
Stade I : Tumeur est confinée à un ovaire / aux ovaires		84%
IA	La tumeur n'implique qu'un seul ovaire, la capsule est intacte. Aucune tumeur n'est détectée à la surface de l'ovaire. Pas de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
IB	La tumeur implique les deux ovaires, la capsule est intacte. Aucune tumeur n'est détectée à la surface de l'ovaire. Pas de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
IC	La tumeur implique un ou deux ovaires. Rupture de la capsule ovarienne ou tumeur détectée à la surface de l'ovaire ou présence de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
Stade II : La tumeur implique un ou deux ovaires et s'est étendue au petit bassin		59%
IIA	La tumeur s'est étendue et/ou implantée dans l'utérus et/ou les trompes de Fallope.	
IIB	La tumeur s'est étendue à un autre organe dans le petit bassin. Pas de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
IIC	Tumeur IIA ou IIB avec présence de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
Stade III : La tumeur implique un ou deux ovaires et s'est étendue au péritoine et aux ganglions lymphatiques régionaux		35%
IIIA	Métastases péritonéales microscopiques au-delà du petit bassin	
IIIB	Métastases péritonéales macroscopiques de taille inférieure ou égale à 2 cm au-delà du petit bassin	
IIIC	Métastases péritonéales macroscopiques de taille supérieure à 2 cm au-delà du petit bassin et/ou atteinte des ganglions lymphatiques régionaux	
Stade IV : Métastases à distance, au-delà du péritoine (foie, poumon)		22%

Tableau 1 : Classification internationale FIGO pour le cancer de l'ovaire

Traduit de la classification FIGO (International Federation of Obstetricians and Gynaecologists) <http://www.targetovariancancer.org.uk/page.asp?section=131§ionTitle=FIGO>. Les taux de survies à 5 ans sont issus du guide « affection longue durée » HAS/INCA de Janvier 2010.

1.3. Facteurs de risque et origines génétiques

Afin de favoriser la prévention des cancers de l'ovaire et de déceler au mieux les stades précoces, il est essentiel de connaître et comprendre les facteurs de risque associés à cette pathologie.

L'âge, l'obésité, la nulliparité (absence de grossesse), l'apparition précoce des premières règles, la ménopause tardive et les traitements hormonaux visant à traiter les symptômes liés à la ménopause sont associés à une augmentation du risque d'apparition d'un cancer ovarien. Au contraire, la contraception orale, la multiparité et l'allaitement (proportionnellement à sa durée) sont associés à une diminution des risques.

Des facteurs environnementaux pourraient également modifier les risques d'apparition d'un cancer de l'ovaire. En effet, les femmes caucasiennes des pays industrialisés d'Europe et d'Amérique du Nord présentent un taux élevé de cancer ovarien. Ceci pourrait s'expliquer par des différences au niveau du comportement reproductif, du régime alimentaire et des tendances au tabagisme plus élevées (1).

5 à 10% des cancers épithéliaux de l'ovaire résultent d'une prédisposition génétique pouvant provenir de mutations au niveau de deux groupes de gènes différents :

- Syndrome du cancer sein-ovaire : constitue le facteur de risque génétique le plus important pour l'apparition d'un cancer de l'ovaire et provient d'une mutation de l'un des gènes BRCA1 ou BRCA2 impliqués notamment dans la réparation des dommages double-brin de l'ADN. Le risque de développer un cancer épithélial de l'ovaire est alors de 12-20% pour une mutation des deux allèles codant BRCA1 et 39-46% pour BRCA2 (2).
- Syndrome du cancer colorectal héréditaire sans polypose (syndrome de Lynch) : connu pour être la cause de certains cancers colorectaux et cancers de l'endomètre, ce syndrome peut aussi être à l'origine de certains cancers de l'ovaire. Il résulte d'une mutation de l'un des 4 gènes du système de réparation Mismatch Repair (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2) spécialisé dans la réparation des mésappariements de l'ADN (1).

1.4. Origines du cancer ovarien

Historiquement, il était admis que toutes les tumeurs épithéliales ovariennes se développaient à partir de l'épithélium cœlomique de l'ovaire. Cependant, les résultats récents montrant la grande hétérogénéité histologique et moléculaire des cancers de l'ovaire semblent tempérer cet état de fait et indiquer que de nombreuses tumeurs dites « ovariennes » proviennent en réalité d'autres organes non ovariens.

En effet, les tumeurs séreuses de haut grade proviennent de la surface des ovaires mais aussi de la partie distale des trompes de Fallope. La plupart des tumeurs mucineuses sont en réalité des métastases provenant d'autres cancers solides gastro-intestinaux tels que le cancer du côlon ou de l'estomac. Les tumeurs à cellules claires et endométrioïdes dérivent d'endométriose (présence de tissu endométrial en dehors de la cavité utérine) elle-même associée à une menstruation rétrograde qui transporte des débris de l'endomètre *via* le flux menstruel (**Figure 2**). Les tumeurs bénignes et à faible potentiel malin (tumeurs borderline) présenteraient une origine ovarienne bien que les cellules initiatrices de telles tumeurs soient peu connues (13).

Prendre en compte le fait que le cancer ovarien regroupe un ensemble de pathologies distinctes moléculairement, mais qui partagent une même localisation anatomique, constitue la clé d'une meilleure prise en charge des patientes.

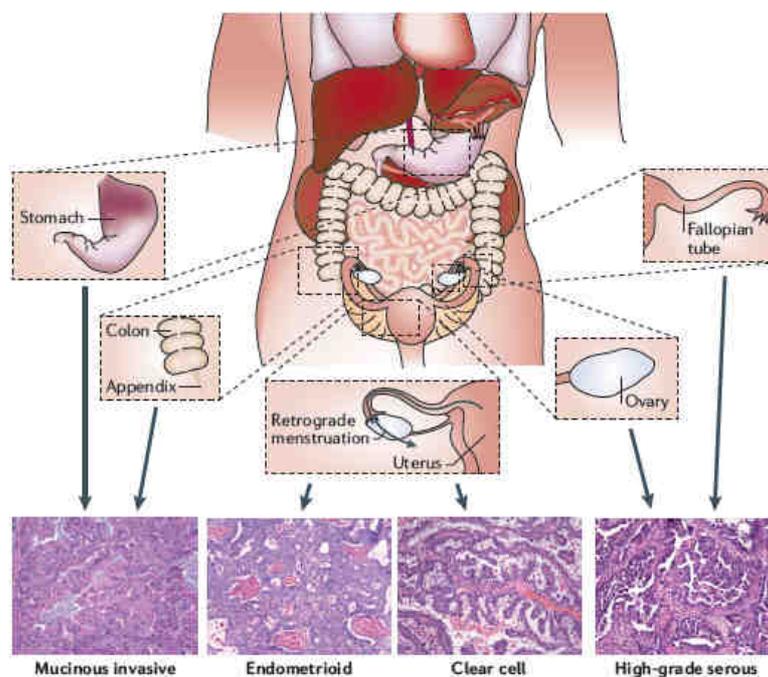


Figure 2 : Origine des différents cancers ovariens

Schéma présentant les possibles origines des différents types de cancers épithéliaux de l’ovaire. Les tumeurs mucineuses pourraient être des métastases de cancers de la sphère digestive. Les tumeurs endométrioides et à cellules claires pourraient trouver leur origine dans l’utérus et la menstruation rétrograde. L’origine des tumeurs séreuses de haut grade pourrait provenir des ovaires et des trompes de Fallope.

Figure adaptée de Vaughan, S., Coward, J. I., Bast, R. C., Jr., Berchuck, A., Berek, J. S. et.al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 2011, 10, 719-725.

1.5. Cellules souches cancéreuses ovariennes

L’hétérogénéité des tumeurs peut également se situer au niveau des cellules qui la composent. En effet, un intérêt croissant est porté sur une sous-population de cellules retrouvées au sein de la tumeur et présentant des caractéristiques de cellules souches, les cellules souches cancéreuses (CSCs). Ces cellules sont caractérisées par l’expression de marqueurs de cellules souches, dont CD44, et des capacités d’auto-renouvellement et de différenciation permettant la formation de cellules tumorales hétérogènes au sein de la tumeur.

D’autres équipes ont également identifié des CSCs ovariennes par l’expression du marqueur CD133, indiquant la nature hétérogène de ces cellules (14, 15).

Alvero *et al.* ont mis en évidence l’existence de cette hétérogénéité au sein des tumeurs ovariennes avec deux sous-populations distinguées par leur profil de sécrétion de cytokines : les cellules souches cancéreuses et les cellules cancéreuses différenciées. Les CSCs ovariennes sont retrouvées dans le liquide d’ascite, les masses tumorales et sont caractérisées par l’expression de marqueurs de cellules

souches, CD44 et Myeloid differentiation primary response gene (MyD88), et une résistance accrue à l'apoptose et aux chimiothérapies conventionnelles (16, 17).

Le traitement de lignées tumorales ovariennes SKOV-3 par des chimiothérapies conventionnelles (cisplatine et paclitaxel) permet la sélection de cellules présentant des caractéristiques de cellules souches (18). Ces chimiothérapies détruisent seulement une fraction des cellules tumorales et permettent ainsi la survie des CSCs qui pourraient être à l'origine des récurrences du cancer ovarien.

L'existence des CSCs au sein des tumeurs ovariennes et du liquide d'ascite constitue donc l'une des problématiques majeures de la pathologie ovarienne qu'il conviendra de cibler afin d'améliorer la prise en charge des patientes.

1.6. Diagnostic

1.6.1. Imagerie

L'absence de symptômes spécifiques rend le diagnostic des cancers ovariens très difficile. Ainsi, la détection d'une masse pelvienne lors d'un examen physique demeure le signe le plus significatif de la présence d'un cancer ovarien. Afin de détecter une telle masse, une échographie abdominopelvienne sus-pubienne et endovaginale est fréquemment réalisée en première intention. Cet examen peut être complété par une tomodensitométrie-abdominopelvienne avec injection de liquide de contraste permettant de localiser les masses ainsi que leur éventuel réseau vasculaire. Cependant, la validation avec certitude d'une origine cancéreuse ovarienne nécessitera toujours une analyse anatomopathologique. Celle-ci est réalisée à partir d'une biopsie prélevée par coelioscopie ou laparotomie exploratrice (Rapport HAS et INCA 2010, (1)).

1.6.2. Marqueurs

Le Cancer Antigen 125 (CA-125 ou mucin 16) est une mucine transmembranaire glycosylée de haut poids moléculaire (1 MDa). Bien que le niveau sérique de cet antigène soit traditionnellement recherché afin de détecter la présence d'un cancer ovarien, le CA-125 est un indicateur peu spécifique de cette pathologie. En effet, son niveau sérique est retrouvé élevé dans 80% des patientes atteintes d'un cancer épithélial ovarien avancé mais dans seulement 50% des patientes atteintes d'un cancer ovarien de stade I. De plus, il est fréquent de retrouver un niveau élevé de CA-125 dans des conditions bénignes ou dans le cas de pathologies non gynécologiques. En pratique, le niveau de CA-125 sérique est employé comme marqueur de suivi de la progression ou de la régression de la maladie, et prédictif d'une récurrence si son niveau augmente après traitement (1, 3, 19). Récemment, il a été démontré que le

CA-125 est capable de favoriser la tumorigenèse et le potentiel métastatique du cancer ovarien dans des modèles de souris immunodéprimées (20).

A ce jour, et malgré l'existence du CA-125, aucun test préventif basé sur la recherche de marqueurs tumoraux ne s'est révélé satisfaisant dans le dépistage du cancer ovarien. Les données récentes indiquent qu'une prévention efficace pourrait passer par la recherche d'une combinatoire de marqueurs connus et de marqueurs prometteurs. Ainsi, la détermination combinée du niveau de CA-125 et de HE4 (Human epididymis protein) est plus sensible et plus spécifique que le CA-125 seul, notamment pour les cancers ovariens de stade I (21). Plus récemment, il a été montré qu'une augmentation combinée du niveau de CA-125, HE4 et mesothelin permettrait de détecter la présence d'un cancer ovarien 1 à 3 ans avant le diagnostic clinique (22). Une approche différente vise à associer la détection du niveau de CA-125 à un ensemble de symptômes relatifs au cancer ovarien (Symptom Index), permettant ainsi une meilleure détection des cancers ovariens, en particulier de stade I, que le CA-125 seul. Cette stratégie pourrait constituer la première étape d'un processus de dépistage des cancers ovariens et ainsi détecter les tumeurs précoces chez les patientes présentant un niveau de CA-125 faible (23).

De telles approches permettront à terme de déceler la présence de cancers ovariens à des stades précoces (I et II) et ainsi de faciliter la prise en charge des patientes.

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

1.7.1. Stades précoces (I et II)

La chirurgie des cancers de l'ovaire de stade précoce consiste en une hystérectomie totale (ablation de l'utérus), une salpingo-oophorectomie bilatérale (ablation des trompes de Fallope et des ovaires) et une oméctomie (ablation du grand épiploon).

Bien que la chirurgie soit curative dans la majorité des cas, une chimiothérapie adjuvante composée de carboplatine (alkylant de l'ADN formant des ponts inter ou intra-brins) et de paclitaxel (poison des microtubules) peut être administrée afin d'éviter la récurrence survenant pour 10 à 30% des patientes (1).

1.7.2. Stades avancés (III et IV)

Pour les cancers ovariens de stade avancé, la chirurgie est dite cytoréductive ou de « debulking ». Elle consiste en une résection identique à la chirurgie des stades précoces avec élimination des cellules disséminées dans le péritoine et des implants péritonéaux. L'objectif à stade avancé est d'éliminer tout implant visible (macroscopique) dans le péritoine afin d'éviter une potentielle récurrence.

La chimiothérapie conventionnelle est une association de carboplatine et de paclitaxel administrée en intraveineuse pendant 6 cycles. Une chimiothérapie néo-adjuvante, dite « d'induction » peut être réalisée si la résection complète ne peut pas être obtenue d'emblée. Afin de diminuer la masse tumorale, la chirurgie est alors réalisée entre deux cures de chimiothérapie de 3 cycles chacune voire après une cure de 6 cycles, permettant ainsi une résection optimale (1, 2, 19).

Afin d'améliorer l'élimination des implants péritonéaux microscopiques, la chirurgie de « debulking » peut être associée à une chimio-hyperthermie intra-péritonéale (CHIP) consistant en un bain de chimiothérapie chauffé à 43°C pendant une durée de 30 à 90 minutes en contact direct avec les organes dans le péritoine (24). Plusieurs études randomisées ont démontré l'avantage clinique à administrer du cisplatine (présentant le même effet que le carboplatine) et du paclitaxel par voie intrapéritonéale comparé à une administration en intraveineuse malgré une toxicité accrue. L'étude d'Armstrong *et al* met notamment en évidence une augmentation de la survie globale de 15 mois chez les patientes atteintes d'un cancer des ovaires de stade III traitées par voie intrapéritonéale comparé au groupe traité par intraveineuse (25). L'hyperthermie possède des effets cytostatiques et agit de manière synergique avec la chimiothérapie en augmentant sa pénétration intra-tissulaire (24).

1.8. Nouvelles thérapeutiques

La détection des implants tumoraux pendant la chirurgie demeure l'un des facteurs limitant dans la prise en charge du cancer ovarien. Ainsi, l'utilisation de marqueurs fluorescents permettant la détection des cellules tumorales en per-opératoire et ainsi l'élimination d'implants péritonéaux inframillimétriques non visibles à l'œil nu pourrait constituer une voie d'amélioration significative du traitement des cancers ovariens et est actuellement en cours d'étude pré-clinique chez l'animal (26).

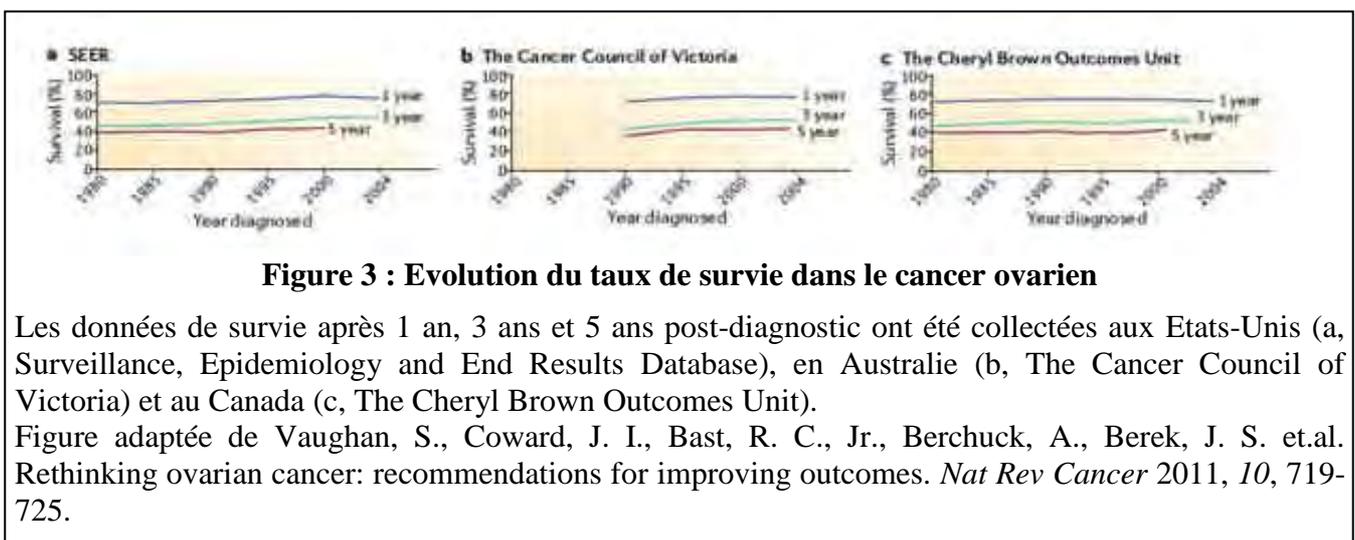
Depuis l'introduction des sels de platines (cisplatine et carboplatine) comme chimiothérapie de référence dans le cancer des ovaires, peu de nouveaux traitements permettant d'apporter un bénéfice thérapeutique sont arrivés sur le marché. Parmi les nouvelles molécules, le bevacizumab (Avastin), un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a récemment montré des résultats encourageants. En effet, plusieurs études de phase III ont montré que cet inhibiteur de l'angiogenèse, en combinaison avec la chimiothérapie conventionnelle, induit une augmentation de la survie sans progression mais pas de la survie globale. Ces résultats ont été observés chez des patientes atteintes de cancer des ovaires de stade avancé, sensible ou non au platine ou dans des cas de récurrence. Cependant, des travaux complémentaires doivent être réalisés afin de déterminer le meilleur schéma d'administration du bevacizumab, l'importance relative des effets indésirables observés face au bénéfice thérapeutique modéré ainsi que le coût potentiel d'une inclusion de la molécule dans le traitement de référence du cancer ovarien (27).

La prise en compte de l'hétérogénéité des tumeurs ovariennes représente l'une des pistes les plus prometteuses dans l'amélioration de la prise en charge des patientes. Dans ce contexte, l'olaparib, un inhibiteur de PARP (poly ADP-ribose polymerase), enzyme spécialisée dans la réparation des dommages de l'ADN, a montré des résultats positifs. Une récente étude clinique de phase II montre que l'olaparib entraîne une augmentation significative de la survie sans progression chez des patientes présentant une récurrence de cancer des ovaires sévères de haut grade sensible au platine. Cette molécule est sensiblement plus efficace chez les patientes présentant des mutations des gènes BRCA1 et 2, fréquentes dans le cancer ovarien. Les cellules cancéreuses présentant de telles mutations doivent alors réparer les cassures de l'ADN *via* des systèmes de réparation alternatifs, les rendant ainsi plus sensibles aux inhibiteurs de PARP (28).

Des molécules telles que le bevacizumab ou l'olaparib ouvrent la voie aux thérapeutiques ciblant les caractéristiques propres à chaque type de cancer ovarien et pourraient constituer la clé de l'amélioration de la prise en charge des patientes et de leur survie (3).

1.9. Problématiques liées au cancer ovarien

Depuis plus de 30 ans et l'introduction du cisplatine dans le traitement de référence du cancer ovarien, les taux de survie ont malheureusement très peu évolués (**Figure 3**) (13).



Comme nous l'avons vu précédemment, ce cancer est détecté à un stade tardif (III ou IV) dans 75% des cas avec un envahissement du péritoine par les cellules tumorales. La prise en charge (chirurgie et chimiothérapie) permet alors de faire entrer la patiente dans une phase de rémission clinique. Malheureusement, une récurrence peut survenir à partir d'implants tumoraux péritonéaux invisibles pendant la chirurgie. D'abord biologique, avec une augmentation des marqueurs CA-125, la récurrence est ensuite clinique et des masses tumorales sont visibles par imagerie. Le temps de rémission

après la fin de la chimiothérapie définit le statut de sensibilité au platine des patientes (**Tableau 2**) et permet de déterminer la 2^e ligne de chimiothérapie à administrer.

Statut	Définition
Réfractaire au platine	Progression pendant la chimiothérapie
Résistante au platine	Récidive dans les 6 mois suivant la fin de la chimiothérapie
Sensible ou partiellement sensible au platine	Récidive après 6 mois suivant la fin de la chimiothérapie

Tableau 2 : Statuts de sensibilité au platine

Tableau adapté de Romero, I. and Bast, R. C., Jr. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* 2012, 4, 1593-1602. (3)

Ainsi, si les patientes sont sensibles au platine, la 2^e ligne sera identique à la première avec une combinaison de sels de platine et de paclitaxel. Les patientes résistantes ou réfractaires recevront une deuxième ligne de chimiothérapie comprenant des molécules telles que le topotecan, la doxorubicine liposomale (Caelyx), ou pourront être incluses dans des essais cliniques permettant ainsi d'identifier des molécules potentiellement actives (**Figure 4**).

Afin d'améliorer la prise en charge des patientes et de cibler au mieux les recherches cliniques dans le domaine, il est nécessaire de comprendre les problématiques liées au cancer ovarien : la détection de la pathologie à un stade tardif, son hétérogénéité peu prise en compte dans la prise en charge de la patiente et la chimiorésistance innée ou acquise des cellules tumorales constituant le point de départ d'une maladie résiduelle et d'une possible récurrence (1-3, 13). Si l'hétérogénéité et la chimiorésistance peuvent en partie être expliquées par des caractéristiques intrinsèques de la cellule tumorale (localisation cellulaire, mutations) et l'existence de cellules souches cancéreuses, la littérature indique une importance croissante du microenvironnement (29).

Les interactions entre les cellules tumorales ovariennes et leur stroma, à savoir la matrice extracellulaire et les cellules environnantes, tiennent une place majeure dans la progression tumorale ovarienne et feront l'objet de la deuxième partie de cette revue bibliographique.

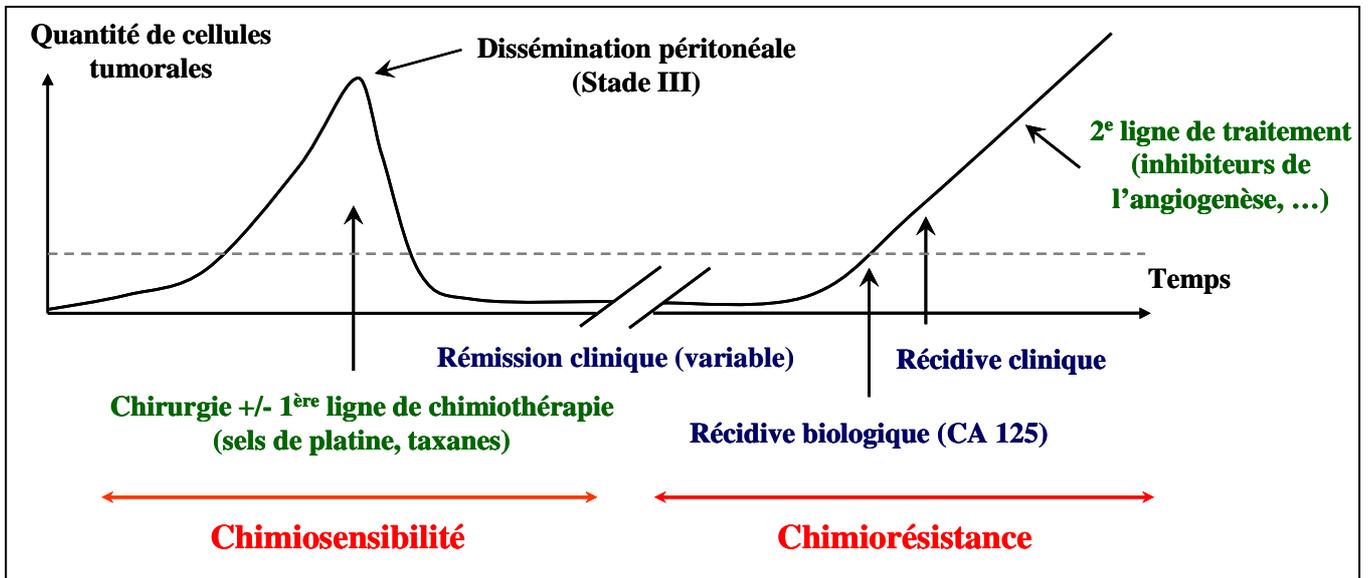


Figure 4 : Evolution fréquente du cancer ovarien à stade avancé

Graphique représentant l'évolution classique (pour environ 3 patientes sur 4) d'un cancer ovarien détecté à stade avancé (III). Malgré une résection complète de la tumeur, une récidive peut survenir à partir de micro-implants tumoraux péritonéaux. Les cellules tumorales peuvent alors acquérir une chimiorésistance compliquant fortement la prise en charge de la patiente.

2. Microenvironnement tumoral et cancer ovarien

2.1. Généralités

2.1.1. Historique

Historiquement, les premières recherches établissaient que l'apparition et le développement d'un cancer n'étaient dus qu'à l'accumulation dans les cellules tumorales de mutations génétiques, notamment au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. La cellule tumorale était alors placée au centre de la cancérogenèse comme l'établissait Boveri en 1914 dans sa théorie de la mutation somatique (30). Stephen Paget comprend très tôt l'importance de « l'organe » dans le développement d'un cancer et conçoit la première définition de ce que nous appelons aujourd'hui le microenvironnement. Sa théorie du « seed and soil » élaborée en 1889 indique que les métastases du cancer du sein ne s'établissent pas dans un organe au hasard. En effet, les cellules tumorales (seed) nécessitent un tissu (soil) propice au développement de la tumeur (31).

De nombreux résultats ont permis d'appuyer cette hypothèse et ont montré que des cellules tumorales placées dans un microenvironnement « normal » ne permettent pas la formation de tumeurs mais qu'au contraire, un microenvironnement activé permet d'induire la carcinogenèse de cellules normales (32). Par exemple, l'introduction de cellules mammaires normales dans une glande mammaire soumise à des radiations ionisantes, un puissant oncogène, permet le développement de tumeurs indiquant le rôle primordial du microenvironnement dans le développement d'un cancer (33).

La revue « The Hallmarks of Cancer » de Hanahan et Weinberg parue en 2000 définit les six capacités distinctives des tumeurs : un potentiel réplicatif illimité, un échappement à l'apoptose, une autosuffisance en facteurs de croissance, une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, un potentiel invasif et métastatique et une angiogenèse activée. L'importance du microenvironnement n'est alors pas prise en compte (34). C'est seulement une décennie plus tard que le microenvironnement tumoral apparaît parmi l'ensemble des critères acquis par les tumeurs et permettant leur développement (35).

2.1.2. Définition du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement, ou stroma, consiste en l'ensemble des cellules non tumorales, des facteurs sécrétés et de la matrice extracellulaire environnant la tumeur. L'ensemble des cellules stromales est composé de fibroblastes, de cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins, de cellules souches mésenchymateuses, d'adipocytes ou encore de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, neutrophiles, etc...). Ce stroma est très hétérogène et peut varier en fonction du type

tumoral ou du stade de la maladie. En effet, les cellules tumorales sont capables de moduler la composition de leur microenvironnement en recrutant certains types cellulaires (cellules souches mésenchymateuses, cellules endothéliales) ou en modifiant leur phénotype (fibroblastes, cellules immunitaires). En retour, le microenvironnement est capable de réguler la progression tumorale. En effet, si certaines cellules stromales peuvent induire la mort des cellules tumorales à un stade précoce de cancérisation, le stroma devient globalement pro-tumoral à stade avancé. Le microenvironnement peut réguler les différents critères définis par Hanahan et Weinberg et ainsi activer la croissance tumorale, l'angiogenèse et favoriser le processus métastatique (**Figure 5**) (4, 31). De plus, le stroma est fortement impliqué dans l'acquisition d'une chimiorésistance par les tumeurs comme l'attestent un nombre grandissant de travaux dont nous avons réalisé une revue bibliographique (**Annexe 2**) (29).

Contrairement à la plupart des tumeurs solides, le cancer de l'ovaire se distingue par sa dissémination péritonéale à stade avancé (III et IV). Les cellules tumorales contribuent alors à la formation de liquide d'ascite par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, créant un microenvironnement riche en cellules inflammatoires et en facteurs protéiques et lipidiques. De plus, la capacité des cellules tumorales ovariennes à adhérer la paroi du péritoine, le mésothélium, permet de nombreuses interactions avec les cellules stromales présentes (cellules mésothéliales, adipocytes, etc...) et la matrice extracellulaire (36). Le microenvironnement des cancers ovariens, notamment à stade avancé, est donc extrêmement riche.

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'acquisition d'une chimiorésistance par les cellules tumorales ovariennes constitue l'une des problématiques majeures dans les cancers ovariens. L'intérêt croissant porté au rôle du microenvironnement dans cette chimiorésistance, ainsi que ses nombreux rôles dans la progression tumorale, définit le stroma comme un champ de recherche qu'il convient d'explorer afin d'améliorer la prise en charge du cancer ovarien.

Nous décrirons dans cette partie, ainsi que dans une revue bibliographique prochainement soumise dans *Gynecologic Oncology*, les différents acteurs du microenvironnement tumoral en s'intéressant plus particulièrement à leurs rôles dans le cancer ovarien (**Annexe 3**).

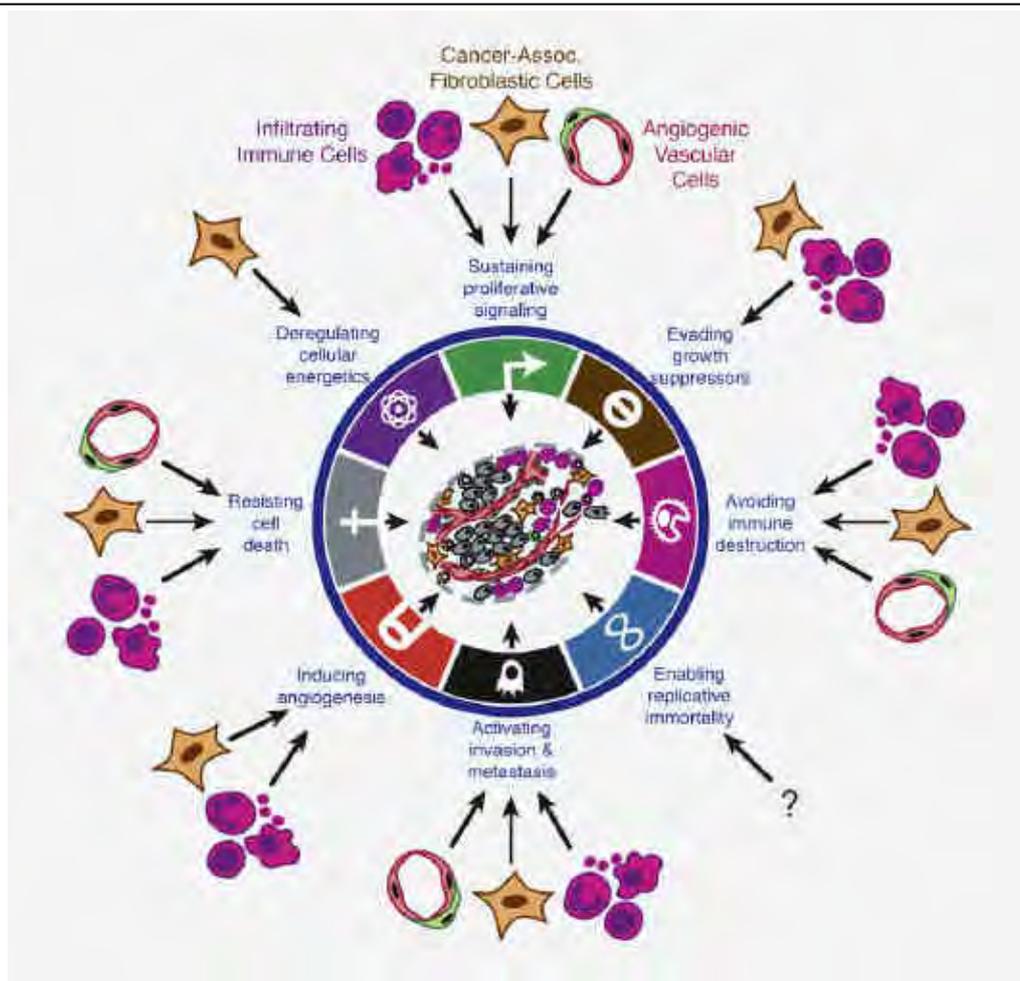


Figure 5 : Contributions multiples des cellules stromales dans le cancer

Les cellules stromales (cellules immunitaires infiltrantes, cellules fibroblastiques associées au cancer et cellules vasculaires angiogéniques) sont capables d'activer la progression tumorale en régulant les différents critères caractéristiques du cancer définis par Hanahan et Weinberg : autosuffisance en facteurs de croissance (en vert dans le cercle), résistance aux signaux inhibiteurs de croissance (en marron), échappement à la destruction par le système immunitaire (en rose), activation de l'invasion et du processus métastatique (en noir), activation de l'angiogenèse (en rouge), résistance à la mort cellulaire (en gris), dérégulation du métabolisme (en violet). Les tumeurs présentent également un potentiel répliatif illimité dont l'implication du microenvironnement n'a pas été définie.

Figure adaptée de Hanahan, D. and Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012.

2.2. Ascite et facteurs sécrétés

Le cancer ovarien à stade avancé (III et IV) est caractérisé par un envahissement du péritoine par les cellules tumorales. Ce phénomène est responsable d'un processus inflammatoire appelé « ascite » correspondant à une accumulation de liquide dans l'abdomen. L'ascite contient de nombreux types cellulaires tels que des cellules tumorales ou des cellules immunitaires mais aussi une quantité non négligeable de facteurs protéiques, lipidiques ou dérivés de la matrice extracellulaire sécrétés par les cellules tumorales et les cellules péritonéales (37, 38). La liste de ces différents facteurs, aussi bien

protéiques que lipidiques, est trop longue pour en réaliser une description exhaustive. De plus, leur contribution dans la progression tumorale ovarienne n'est pas toujours connue. Il est néanmoins nécessaire de connaître les molécules principalement décrites dans la littérature, responsables de la régulation de la progression tumorale ovarienne mais aussi de modifications du phénotype des cellules du microenvironnement.

2.2.1. Lipides bioactifs

Les lipides bioactifs, notamment l'acide lysophosphatidique (LPA), la sphingosine-1-phosphate (S1P) et les molécules dérivées de l'acide arachidonique représentent une part importante des molécules présentes dans le liquide d'ascite et constituent des régulateurs clés des mécanismes inflammatoires et tumoraux (36).

Parmi ces molécules, le LPA est un petit phospholipide bioactif produit, entre autres, par les cellules mésothéliales, les fibroblastes, les adipocytes et les cellules tumorales ovariennes. Sa présence dans le sérum et le liquide d'ascite de patientes atteintes d'un cancer ovarien est corrélée avec un mauvais pronostic (39, 40). Ses actions dans le cancer ovarien sont diverses et largement décrites dans la littérature. Des études passées ont initialement montré que ce lipide est capable de protéger les cellules tumorales ovariennes HEY de la mort cellulaire induite par le cisplatine (41). En parallèle, des travaux ont mis en évidence que le LPA peut favoriser la prolifération des cellules tumorales ovariennes, notamment par une activation de la voie des MAP kinases (39, 40, 42), et permettre leur survie à long terme en réactivant l'expression de la télomérase *via* les voies PI3K et hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) (43). Des études réalisées sur un modèle murin (greffes intra-péritonéales et orthotopiques de cellules tumorales ovariennes) ont montré la capacité du LPA à favoriser la croissance, la migration, l'invasion et le potentiel métastatique de tumeurs ovariennes (44). La diversité d'action de ce lipide peut s'expliquer d'une part par sa capacité à induire la sécrétion de cytokines impliquées dans la progression tumorale ovarienne telles que l'interleukine 6 (IL-6) (45, 46), l'IL-8 (45-48) et le VEGF (49) et d'autre part par ses effets directs sur des protéines régulatrices de la matrice extracellulaire (MEC). En effet, le LPA peut stimuler l'activation de pro-matrix metalloprotease-2 (proMMP-2) (50), la production de MMP-9 (51), diminuer le niveau d'inhibiteur de métalloprotéases (TIMPs) (52) ou encore stimuler l'expression d'urokinase-type plasminogen activator (uPA) (53) dans les cellules tumorales ovariennes. La liaison de l'uPA à son récepteur a récemment été montrée comme présentant des effets pro-inflammatoires et entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire dans les tumeurs ovariennes (54). L'ensemble de ces effets contribue à la dégradation de molécules de la MEC et ainsi à l'invasion des cellules tumorales ovariennes et à leur potentiel métastatique.

Les sphingolipides jouent également un rôle dans la progression tumorale ovarienne, notamment la sphingosine-1-phosphate (S1P). Synthétisée à partir d'une phosphorylation de la sphingosine, la S1P a été par le passé découverte à des concentrations micrométriques dans le liquide d'ascite de patientes atteintes d'un cancer ovarien, induisant la mort des cellules cancéreuses en suspension et la croissance des cellules adhérentes (55). Plus récemment, des effets antagonistes de ce sphingolipide dépendant de sa concentration cellulaire ont été démontrés. De faibles concentrations de S1P (0,5 μ M) inhibent l'invasion de cellules cancéreuses ovariennes Dov13 alors que de fortes concentrations (20 μ M) sont responsables d'une augmentation de leur invasion. Cet antagonisme peut s'expliquer par une représentation différentielle des récepteurs au S1P (S1P 1 à 5) en fonction de sa concentration (56, 57). Ces données ont été confirmées sur la lignée tumorale ovarienne OVCAR-3 où le S1P favorise à la fois la migration et l'invasion cellulaire (58)

L'axe des cyclo-oxygénases (COX) et des prostaglandines (PG) constitue un régulateur important de la tumorigenèse. Parmi les métabolites lipidiques provenant de cette voie, la prostaglandine E₂ (PGE₂), produit de dégradation de l'acide arachidonique par la COX, stimule la prolifération des lignées tumorales ovariennes MDAH-2274 et SKOV3 et réduit leur apoptose en activant l'expression de COX-2 et des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 et Bax (59). Des données obtenues chez les patientes atteintes de cancer ovarien à stade avancé ont montré une corrélation entre l'expression de COX-2 et les paramètres de prolifération et d'angiogenèse tumorale (60). L'expression de cette enzyme est également associée à une chimiorésistance et à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer ovarien (61). Dans l'ascite, la PGE₂ active la voie du stromal derived factor-1 α (SDF-1 α) et de son récepteur C-X-C receptor type 4 (CXCR4) dans les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) qui migrent alors dans le microenvironnement ascitique. L'activation de la COX-2 par la PGE₂ dans les MDSCs crée ainsi une boucle de régulation positive permettant une activation constante de la voie SDF-1 α /CXCR4 et une rétention de ces cellules dans l'ascite (62). La voie des COX et des dérivés de l'acide arachidonique, notamment la PGE₂, représente donc un axe important du microenvironnement tumoral ovarien dont l'inhibition constitue une piste prometteuse en clinique.

2.2.2. Cytokines et facteurs de croissance

Les protéines, aussi bien cytokines que facteurs de croissance, composent la seconde population des molécules contenues dans l'ascite pouvant aussi bien être sécrétées par les cellules tumorales ovariennes que par les cellules du microenvironnement. Nous nous intéresserons ici à l'IL-6, l'IL-8, le VEGF, l'EGF, le TNF- α et le TGF- β , régulièrement retrouvés dans le liquide d'ascite et impliqués à tous les niveaux de la progression tumorale ovarienne.

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique présentant des effets pro et anti-inflammatoires, sécrétée entre autres par les cellules tumorales ovariennes, les cellules mésothéliales, les fibroblastes, les macrophages (63) et dont l'expression est corrélée avec un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer des ovaires (64-66). Son récepteur, l'IL-6R, est surexprimé dans les tissus tumoraux comparés aux cellules ovariennes saines (67). De plus, la voie STAT3 dépendante de la liaison de l'IL-6 à son récepteur est constitutivement active dans certaines lignées tumorales ovariennes (68). Les effets de l'IL-6 sur les cellules tumorales ovariennes sont multiples. En effet, cette cytokine peut favoriser la prolifération, la migration et l'invasion de lignées tumorales ovariennes, mais aussi diminuer leur apoptose et ainsi contribuer à la progression de la maladie (68, 69). L'IL-6 peut également activer les cellules endothéliales et ainsi favoriser l'angiogenèse tumorale (70, 71). Cette cytokine est de même impliquée dans l'une des problématiques majeures du traitement des cancers ovariens, la chimiorésistance. Le traitement au paclitaxel entraîne une augmentation de l'IL-6 dans le sérum et l'ascite de patientes (72, 73) et la production autocrine de cette cytokine par les cellules tumorales ovariennes est responsable d'une résistance au cisplatine et au paclitaxel plus importante (74). Les effets de l'IL-6 passeraient alors par une augmentation de l'expression de protéines de détoxification de chimiothérapies (MDR1 et GSTpi) et de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL et XIAP) et une activation des voies de prolifération (MAP kinases) et de survie cellulaire (PI3K/Akt).

L'IL-8, aussi appelée CXC chemokine ligand 8 (CXCL8), est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée entre autres par les cellules tumorales ovariennes, les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules mésothéliales (75). L'expression de cette cytokine dans les cancers ovariens est associée à un stade avancé et est corrélée avec une mortalité élevée (76-78). L'IL-8 peut agir de manière directe et indirecte sur la progression tumorale. En effet, l'expression de cette cytokine et de son récepteur dans les cellules tumorales ovariennes est corrélée à la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* induite par une action autocrine de l'IL-8 (79). Des travaux menés sur des modèles de tumeurs ovariennes chez la souris ont également montré des effets de cette cytokine sur le microenvironnement tumoral. Une inhibition de l'expression de l'IL-8 dans les tumeurs entraîne une diminution de la croissance tumorale *via* une plus faible vascularisation des tumeurs et une diminution de la dissémination métastatique *via* une synthèse réduite des MMP-2 et MMP-9 (77). De même que pour l'IL-6, la production autocrine d'IL-8 par les cellules tumorales ovariennes est responsable d'une résistance accrue au cisplatine et au paclitaxel (74). En opposition avec les résultats précédents, Lee *et al.* a montré que l'expression de l'IL-8 dans les cellules cancéreuses ovariennes pourrait réduire la croissance tumorale en augmentant l'infiltration des neutrophiles et des macrophages (80).

Le VEGF est une cytokine pro-angiogénique majeure augmentant la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que la perméabilité des vaisseaux préexistants (81). L'expression de

cette cytokine dans le cancer des ovaires est associée à un mauvais pronostic pour la patiente (76). Une étude menée sur un modèle *in vivo* de cancer ovarien montre que l'immunoneutralisation du VEGF par un anticorps monoclonal, le A4.6.1, entraîne une diminution de la croissance de tumeurs sous-cutanées obtenues à partir d'implantation de cellules tumorales ovariennes SKOV-3. Sur des tumeurs intrapéritonéales SKOV-3, l'inhibition du VEGF ne diminue que partiellement la croissance tumorale mais supprime totalement la formation de liquide d'ascite (82). La voie de signalisation impliquant le facteur de transcription nuclear factor- κ B (NF- κ B) semble responsable de l'expression du VEGF, mais aussi de l'IL-8, entraînant ainsi une augmentation de l'angiogenèse et de la tumorigenicité de cellules tumorales ovariennes (83). Des travaux réalisés chez la souris sur des modèles de cancer ovarien, antérieurs aux études cliniques des molécules ciblant le VEGF décrits précédemment (partie 1.7), ont montré l'intérêt d'inhiber cette cytokine afin d'améliorer la prise en charge des patientes. En effet, l'association d'inhibiteurs du VEGF avec le paclitaxel réduit sensiblement la croissance tumorale et le développement de liquide d'ascite comparé à l'utilisation de paclitaxel seul (84, 85).

L'epidermal growth factor (EGF) est un facteur de croissance dont l'expression du récepteur (EGFR) est corrélée avec un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer ovarien (86). Pourtant, l'utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR tels que le cetuximab ou l'erlotinib n'ont pas montré de bénéfice clinique dans le traitement des cancers ovariens. Cette constatation pourrait être due au fait que les mutations de ce récepteur, associées avec la réponse thérapeutique à ces molécules, sont très peu retrouvées dans le cancer ovarien comparé à d'autres types tumoraux (87). Cependant, des travaux indiquent que l'EGF, comme le LPA, stimule la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes HEY au cisplatine (41). De plus, ce facteur de croissance est capable d'induire la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans les cellules de la surface de l'épithélium ovarien (88, 89).

Le tumor necrosis factor- α (TNF- α) est une cytokine clé dans la régulation des processus inflammatoires, longtemps considérée comme anti-tumorale. Cependant, les études menées ces 25 dernières années ont permis de mettre en évidence les effets immunosuppresseurs de cette cytokine et sa capacité à activer la croissance tumorale (90). Dans le cancer ovarien, il a par exemple été montré que l'expression de TNF- α est corrélée avec le grade de la tumeur (91). De plus, la production autocrine de cette cytokine par les cellules tumorales ovariennes permet de favoriser la synthèse de monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), SDF-1, IL-6, macrophage inhibitory factor (MIF) et VEGF, favorisant ainsi l'angiogenèse et la dissémination péritonéale (92). Des études récentes ont également montré que la production de TNF- α favorise la synthèse d'IL-17, permettant ainsi le recrutement de cellules myéloïdes et l'activation de la progression tumorale ovarienne (93). Le TNF- α permet donc la création d'un environnement cytokinique pro-tumoral.

Le transforming growth factor- β (TGF- β) est une cytokine présentant des effets anti et pro-tumoraux, impliquée notamment dans la TEM (94). Il a été montré que le TGF- β , dont l'expression est

associée à l'angiogénèse tumorale ovarienne, entraîne l'invasion des cellules tumorales *via* l'activation de MMPs (95, 96).

En résumé, le liquide d'ascite constitue un réservoir de facteurs protéiques et lipidiques régulant la progression tumorale ovarienne de manière directe ou indirecte par une action sur le microenvironnement (**Tableau 3**). La connaissance de ces différentes molécules et des mécanismes impliqués permet de déterminer des facteurs pronostics ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer des ovaires.

Molécule	Cellules productrices	Rôles dans le cancer ovarien
LPA	Cellules mésothéliales, fibroblastes, adipocytes, cellules tumorales ovariennes	Mauvais pronostic. Protection contre le cisplatine. Active la prolifération des cellules tumorales, la réexpression de la télomérase, la croissance tumorale, la migration, l'invasion et le processus métastatique
S1P	Présence dans l'ascite tumorale ovarienne	Régulation de la migration et de l'invasion tumorale
Voie COX et PGE₂	Cellules tumorales ovariennes	Mauvais pronostic. Active la prolifération et inhibe l'apoptose des cellules tumorales. Expression corrélée avec l'angiogénèse et la chimiorésistance. Active la sécrétion de SDF-1
IL-6	Cellules mésothéliales, fibroblastes, macrophages, cellules tumorales ovariennes	Mauvais pronostic. Active la prolifération, la migration, l'invasion des cellules tumorales. Active l'angiogénèse. Protection contre le cisplatine et le paclitaxel
IL-8	Cellules mésothéliales, cellules endothéliales, monocytes, cellules tumorales ovariennes	Mauvais pronostic. Active la prolifération, la croissance, l'angiogénèse et l'invasion tumorale. Protection contre le cisplatine et le paclitaxel. Recrutement des macrophages et des neutrophiles
VEGF	Cellules endothéliales, cellules tumorales ovariennes	Mauvais pronostic. Active l'angiogénèse et la formation de liquide d'ascite
EGF	Cellules tumorales ovariennes	Mauvais pronostic. Active la transition épithélio-mésenchymateuse. Protection contre le cisplatine
TNF-α	Cellules tumorales ovariennes, macrophages	Mauvais pronostic. Active la synthèse de MCP-1, SDF-1, IL-6, MIF, VEGF et d'IL-17. Active l'angiogénèse et le processus métastatique
TGF-β	Cellules tumorales ovariennes, macrophages	Activation de l'angiogénèse et de l'invasion tumorale

Tableau 3 : Facteurs contenus dans les ascites tumorales ovariennes

Tableau non exhaustif présentant les principaux facteurs, protéiques et lipidiques, contenus dans les ascites tumorales ovariennes, ainsi que leurs rôles et la liste non exhaustive des cellules responsables de leur production.

2.3. Matrice extracellulaire et adhésion

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau tridimensionnel complexe et dynamique, composé de protéines, de glycosaminoglycanes et de polysaccharides. Sa composition est très hétérogène et diffère selon la localisation ou le contexte, physiologique ou pathologique.

La MEC est un composant non cellulaire majeur du microenvironnement permettant de maintenir l'architecture des tissus, régulant la migration des cellules et la diffusion de facteurs de croissance ou agissant comme co-récepteurs de ces molécules. Les molécules de la MEC peuvent également agir directement sur les cellules par leurs domaines endogènes de facteurs de croissance ou après la libération de fragments bioactifs, les sites cryptiques, après dégradation par des protéases (**Figure 6**) (97).

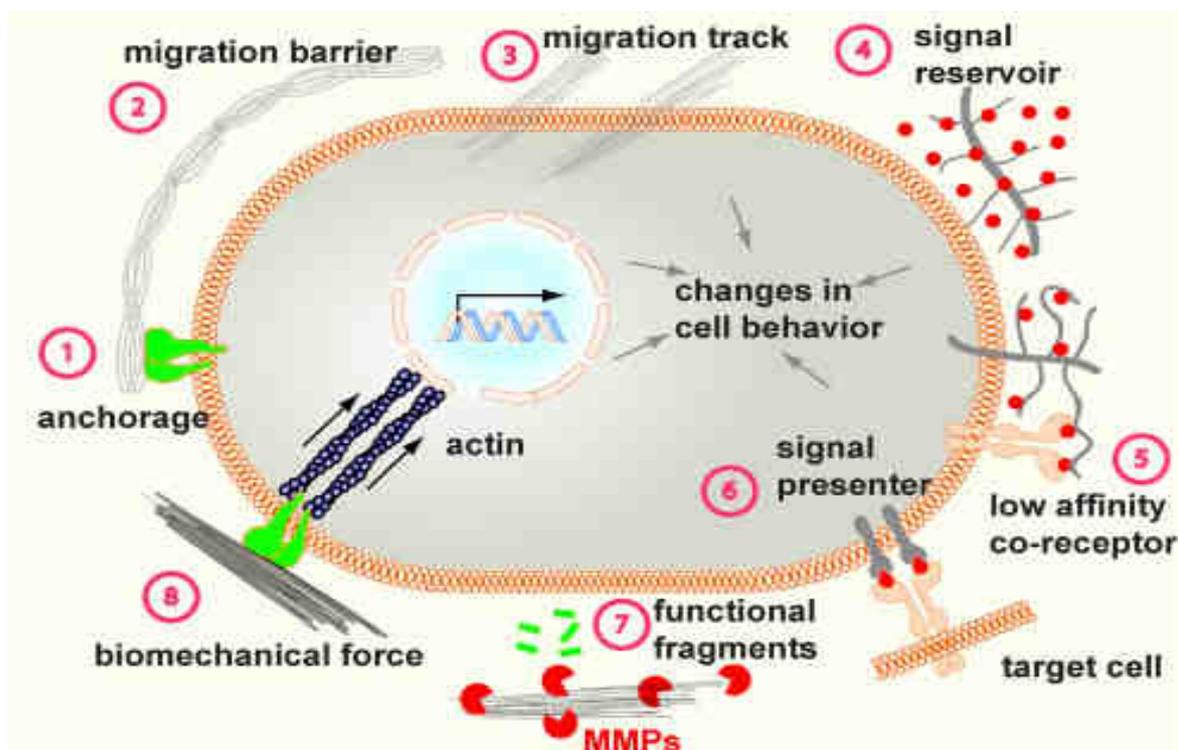


Figure 6 : Fonctions de la matrice extracellulaire

Selon sa composition, la matrice extracellulaire (MEC) permet l'ancrage à la membrane basale (1), la régulation positive ou négative de la migration cellulaire (2 et 3), la liaison de facteurs de croissance et ainsi la régulation de leur diffusion (4). Certaines molécules de la MEC peuvent se lier à des facteurs de croissance et agir comme co-récepteurs (5) ou présentateurs (6). La MEC peut agir directement sur la cellule *via* ses domaines endogènes de facteur de croissance ou ses fragments bioactifs dérivés du clivage par des protéases telles que les MMPs (7). Les cellules peuvent percevoir les propriétés biomécaniques de la MEC, telles que la rigidité ou l'élasticité, et s'y adapter.

Figure adaptée de Lu, P., Weaver, V. M., and Werb, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012

Dans le contexte tumoral, des dérégulations de la dynamique de la MEC (quantité, composition) sont à l'origine de modifications de ses propriétés. La MEC constitue ainsi une « niche » propice au

développement d'un microenvironnement pro-tumoral et favorise des mécanismes tels que l'angiogenèse ou la dissémination métastatique. Les principaux acteurs de ce remodelage de la MEC sont les cellules stromales, notamment les fibroblastes et les cellules immunitaires (97).

Dans le cancer ovarien, la dissémination métastatique se produit dans le péritoine, une région riche en MEC, et est notamment régie par l'adhésion des cellules tumorales ovariennes à cette matrice. De manière plus globale, l'adhésion des cellules tumorales ovariennes entre elles ou à la matrice et leur agencement dans l'espace (culture en monocouche ou tridimensionnelle) sont des régulateurs majeurs de la prolifération ou de la résistance à la chimiothérapie (98).

Nous aborderons donc les molécules d'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice exprimées par les cellules tumorales ovariennes ainsi que les principales molécules de la MEC retrouvées dans le microenvironnement tumoral ovarien en s'attardant plus particulièrement sur SPARC, une molécule matricielle largement décrite dans la littérature.

2.3.1. Adhésion cellule-cellule et cellule-matrice

Pendant la dissémination métastatique, les cellules tumorales ovariennes se déplacent dans le péritoine en fonction des flux du liquide d'ascite sous forme de cellules seules ou de sphères de cellules appelées « sphéroïdes ». La formation de ces sphéroïdes, qui pourrait être induite par les interactions entre la laminin-1 et l'intégrin $\beta 1$, permet une meilleure résistance des cellules tumorales ovariennes au cisplatine et souligne ainsi l'importance de l'organisation des cellules entre elles (99). La formation de ces sphéroïdes est également induite par la claudine 4, une protéine surexprimée dans la plupart des cancers ovariens et impliquée dans la formation de jonctions serrées (100). De plus, l'expression de cette protéine est corrélée à la présence de cytokines pro-angiogéniques (IL-8, CXCL1, CXCL2, etc...) montrant un rôle pro-tumoral de la claudine 4 dans le cancer des ovaires (101).

L'organisation spatiale des cellules tumorales ovariennes semble donc être un facteur de régulation important de la progression tumorale. Des travaux récents appuient cette hypothèse et montrent que les cellules tumorales ovariennes agencées en 3 dimensions sur une matrice de nanofibres de RADA16-I résistent mieux à la chimiothérapie (5-FU, paclitaxel) que des cellules cultivées en 2 dimensions (102).

L'adhésion des cellules tumorales ovariennes aux protéines de la MEC (décrites en partie 2.3.3) régule également de nombreux mécanismes tumoraux. Ces cellules surexpriment notamment la mésothéline, un antigène de différenciation initialement découvert à la surface des cellules mésothéliales. Cette protéine est attachée à la membrane plasmique par une ancre de glycoposphatidyl inositol et augmente l'invasion des cellules tumorales ovariennes en induisant la sécrétion de MMP-7 *via* les voies MAPK/ERK et JNK (103).

De même, de nombreuses molécules d'adhésion cellulaire (cell adhesion molecules, CAM) non retrouvées dans le tissu sain sont exprimées par les cellules tumorales ovariennes et permettent l'interaction de ces cellules entre elles ou avec des molécules de la MEC. Parmi ces molécules, la neural CAM (NCAM) est retrouvée dans les tumeurs ovariennes et son expression est corrélée avec le grade des tumeurs. Non exprimée dans le tissu sain, cette molécule stimule la migration et l'invasion des cellules tumorales ovariennes *in vitro*, et la dissémination métastatique chez la souris. Cet effet pro-tumoral est dû à l'interaction de NCAM avec le récepteur au facteur de croissance des fibroblastes (fibroblast growth factor receptor, FGFR) (104, 105). De même, l'expression de LICAM est corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer ovarien et pourrait induire une meilleure migration cellulaire et une dissémination métastatique plus importante *via* la sécrétion d'IL-1 β et l'activation de NF- κ B (106, 107). Cette molécule peut également diminuer l'apoptose des cellules tumorales ovariennes induite par le cisplatine (108).

2.3.2. SPARC

SPARC, pour secreted protein acidic and rich in cystein, est une glycoprotéine matricielle transitoirement sécrétée par les cellules tumorales et les cellules stromales. Cette protéine interagit avec de nombreux composants de la MEC et des facteurs de croissance tels que le FGF-2 ou le VEGF, régulant l'expression de métalloprotéases de la matrice (MMP) et modulant l'architecture du cytosquelette de certains types cellulaires. Les effets de SPARC dans le cancer sont controversés. En effet, cette protéine est considérée comme pro-tumorale dans le mélanome et le cancer du sein mais présenterait des effets bénéfiques dans d'autres modèles tel que le cancer ovarien comme le montrent les travaux de Said *et al* (**Figure 7**).

L'expression de SPARC est diminuée dans les cellules tumorales ovariennes comparée aux cellules épithéliales ovariennes « normales » et la restauration de son expression entraîne l'apoptose des cellules tumorales ovariennes, induisant une diminution de la croissance tumorale et de la tumorigenicité (109, 110). Cette protéine est capable d'inhiber l'adhésion des cellules tumorales ovariennes, médiée par les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, aux molécules de la MEC, en particulier à la fibronectine et à la vitronectine (111, 112). Cependant, SPARC n'interagit pas seulement avec les molécules de la MEC mais aussi avec des cytokines ou des lipides bioactifs. Son action résulte en une « normalisation » du microenvironnement tumoral avec des effets antagonistes aux molécules pro-inflammatoires de l'ascite. Ainsi, SPARC inhibe les effets prolifératifs du VEGF (113) et la prolifération, le chimiotactisme et l'invasion des cellules tumorales ovariennes induits par l'IL-6 (112). Les effets pro-invasifs, le chimiotactisme et les sécrétions d'IL-1, IL-6, IL-8 et MCP-1 par les cellules tumorales ovariennes SKOV-3, induits par le LPA, sont de même inhibés par SPARC (51). SPARC

peut également réguler les interactions entre les cellules tumorales ovariennes et les cellules mésothéliales et macrophages. Ainsi, l'activation du facteur de transcription NF- κ B et la production d'IL-6, uPA, PGE₂ et isoprostane-8 résultant de ce dialogue sont inhibées (51). SPARC agit donc de façon large et « normalise » le microenvironnement tumoral ovarien.

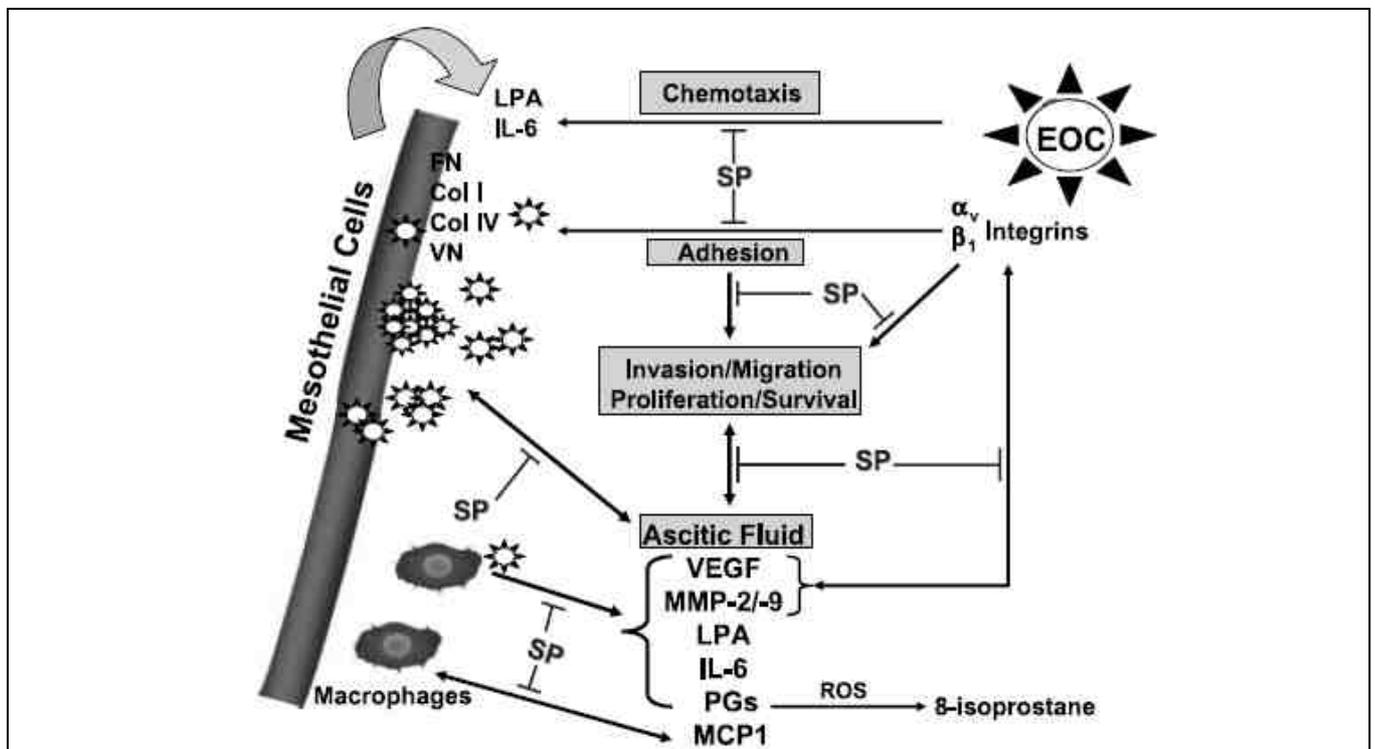


Figure 7 : Rôles de SPARC dans la progression tumorale ovarienne

Schéma montrant les principales voies régulées par SPARC (SP) dans le cancer ovarien. Ses effets sont larges et sont responsables d'une diminution de l'adhésion, invasion, migration, prolifération et survie des cellules tumorales ovariennes (EOC). SPARC peut également inhiber la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par les macrophages ou encore empêcher la dialogue entre les cellules mésothéliales et les cellules tumorales ovariennes. FN : fibronectine, VN : vitronectine, ROS : espèces réactives de l'oxygène.

Figure adaptée de Said, N., Socha, M. J., Olearczyk, J. J., Elmarakby, A. A., Imig, J. D. et al. Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC. *Mol.Cancer Res* 2007

2.3.3. Autres molécules de la MEC ovarienne

Bien que SPARC soit la molécule matricielle dont les rôles sont les plus largement décrits dans le cancer ovarien, d'autres protéines de la MEC telles que l'acide hyaluronique, le versican, la périostine ou encore la vitronectine régulent l'adhésion des cellules tumorales ovariennes et leurs capacités de motilité et d'invasion.

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane dont la liaison au récepteur CD44 entraîne une adhésion des cellules tumorales ovariennes et dont l'expression stromale est corrélée à un mauvais pronostic chez la patiente (114-119). Dans un modèle de xélogreffe de cellules tumorales ovariennes

humaines chez la souris, l'inhibition de CD44 par un anticorps bloquant réduit l'adhésion des cellules tumorales ovariennes au péritoine et leur capacités de dissémination (118). Cependant, les effets de l'acide hyaluronique sur l'angiogenèse semblent plus difficiles à interpréter. En effet, l'acide hyaluronique synthase et les hyaluronidases régulent les quantités d'acide hyaluronique de haut et de bas poids moléculaires qui sont respectivement anti et pro-angiogéniques (120).

Le versican, un protéoglycane interagissant avec l'acide hyaluronique et son récepteur CD44, présente une expression augmentée dans les tumeurs ovariennes et leur microenvironnement par rapport au tissu sain. Cette expression est corrélée à un mauvais pronostic chez la patiente mais ne constitue pas un indicateur indépendant de survie (121). Les travaux de Ween *et al.*, résumant les capacités du versican et de l'acide hyaluronique à favoriser la motilité et l'invasion des cellules tumorales ovariennes, mettent en évidence l'intérêt des thérapies actuelles ciblant ces molécules (122).

Parmi les molécules de la MEC retrouvées dans le microenvironnement tumoral ovarien, la périostine a été récemment décrite pour ses rôles dans la progression tumorale ovarienne. En effet, cette protéine, dont l'expression est corrélée dans le cancer ovarien avec le stade de la maladie, entraîne une augmentation du potentiel métastatique de tumeurs ovariennes dans des modèles de souris immunodéprimées, avec une angiogenèse accrue et une diminution de l'apoptose des cellules tumorales (123, 124). La périostine est un ligand des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, récepteurs aux molécules de la MEC dont les rôles sont majeurs dans l'adhésion des cellules tumorales à la matrice. En effet, la liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la vitronectine est responsable d'une augmentation de la prolifération et de la motilité de la lignée tumorale ovarienne OV-MZ-6 (125).

Les cellules tumorales ovariennes sont également capables de modifier la quantité et la composition de la MEC par l'expression des métalloprotéases matricielles. Par exemple, certaines lignées tumorales (Hey, OVCAR429, ES-2 et HOC-7) expriment la membrane type 1 MMP (MT1-MMP) qui dégrade le collagène et favorise l'invasion. Au contraire, les cellules ovariennes SKOV-3 et OVCAR-3 n'expriment pas cette protéine et sont incapables d'envahir des matrices de collagène I polymérisées (126). De plus, l'activité de la MT1-MMP pourrait se révéler primordiale dans la dissémination métastatique intra-péritonéale (127). De nombreux travaux montrent que l'expression de métalloprotéases telles que MT1-MMP, MMP-2, MMP-9 ou TIMP-2 est corrélée avec une faible survie des patientes atteintes d'un cancer des ovaires.

La composition en protéines de la MEC ovarienne et péritonéale ainsi que la régulation de ces protéines par les cellules tumorales et les métalloprotéases se révèlent donc être des régulateurs majeurs de la progression tumorale ovarienne et de la dissémination métastatique (128-130).

2.4. Fibroblastes et fibroblastes associés au cancer (CAFs)

2.4.1. Fibroblastes « normaux » et sénescents

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes constituant le principal composant cellulaire du tissu conjonctif. Ces cellules sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie de la MEC en permettant sa synthèse (collagène, fibronectine et laminine) et sa dégradation (MMPs). Les fibroblastes sont également impliqués dans la régulation de la différenciation épithéliale, de l'inflammation et la guérison des blessures, notamment grâce à leurs fonctions contractiles et leurs effets sur la MEC. Le cancer étant souvent comparé à une blessure qui ne guérit pas, l'étude de l'importance des fibroblastes dans le microenvironnement tumoral se révèle primordiale (**Figure 8**).

Dans le contexte ovarien, les cellules tumorales stimulent directement l'expression d'uPA dans des lignées fibroblastiques LEP par la libération de facteurs paracrines (FGF-2, HB-EGF, HGF, IGF-1 et IL-1 α) ou indirectement par l'induction d'une boucle autocrine de FGF-2 dans ces cellules (131). Comme nous l'avons décrit précédemment, la liaison de l'uPA à son récepteur entraîne des effets pro-inflammatoires et une augmentation de la perméabilité vasculaire dans les tumeurs ovariennes (54). De plus, les interactions entre les cellules tumorales et des fibroblastes entraînent une libération de proMMP-2 et de TIMP-2 par ces cellules. La MMP-2, forme active de la proMMP-2, permet une dégradation de molécules de la MEC et entraîne l'invasion des cellules tumorales ovariennes. Au contraire, la TIMP-2 produite par les fibroblastes inhibe l'activation de proMMP-2 en MMP-2, mettant ainsi en avant le rôle des fibroblastes dans le maintien de l'homéostasie matricielle (132, 133). Bien que ces fibroblastes n'aient pas été clairement définis dans cette étude, il est probable que leur phénotype corresponde à celui des fibroblastes associés au cancer (CAFs) que nous décrirons dans la partie suivante.

Le cancer ovarien est une maladie survenant dans la majorité des cas chez des femmes âgées avec un pic de fréquence de 70 ans. Ce vieillissement est caractérisé par une augmentation du nombre de fibroblastes sénescents capables de favoriser la prolifération cellulaire et la tumorigenèse de cellules épithéliales (134). Dans l'ovaire, la transformation des fibroblastes normaux en fibroblastes sénescents pourrait être initiée par le growth-regulated oncogene 1 (GRO-1) dont l'expression est activée dans les cellules épithéliales ovariennes transformées par Ras et les cellules tumorales ovariennes (135).

En retour, les fibroblastes sénescents sont capables de déclencher la transformation néoplasique de cellules épithéliales partiellement transformées (surexprimant la protéine C-myc) par un facteur sécrété. Bien que ce facteur n'ait pas encore été clairement identifié, des candidats potentiels tels que l'ostéopontine, SDF-1, VEGF, amphireguline, HGF et l'IL-6, tous impliqués dans la régulation des fibroblastes pré-sénescents et sénescents, sont à l'étude (136).

2.4.2. Myofibroblastes et fibroblastes associés au cancer (CAFs)

Parmi les cellules du microenvironnement tumoral, les myofibroblastes ou fibroblastes associés au cancer (CAFs) sont les plus abondantes. Bien que ces deux appellations soient régulièrement associées au même type cellulaire, elles correspondent en réalité à deux situations différentes. Les myofibroblastes sont des cellules caractérisées par l'expression de l' α -smooth muscle actin (α -SMA) et initialement retrouvées transitoirement au niveau de blessures et dans des situations d'inflammation chronique. Au sein des tumeurs, les myofibroblastes ou CAFs sont connus pour leur large spectre de fonctions pro-tumorales dont l'activation de la croissance et des processus métastatiques. Malgré la forte hétérogénéité de ces cellules, ainsi qu'une origine et un phénotype discutés, elles sont parfois caractérisées par l'expression de protéines telles que la fibroblast-activation protein (FAP), la desmine et le platelet derived growth factor receptor β (PDGFR- β) (5, 137, 138).

Bien que les CAFs ne soient pas présents dans le tissu ovarien normal, ils sont retrouvés dans les tumeurs bénignes, les cancers ovariens borderline et sont abondants dans les adénocarcinomes ovariens, notamment les tumeurs séreuses de bas et de haut grade (139, 140). Ainsi, quelques travaux se sont intéressés aux interactions entre les cellules tumorales ovariennes et les CAFs (**Figure 8**).

Les lignées tumorales ovariennes SKOV-3 et OVCAR-3 sont capables de sécréter des exosomes, vésicules membranaires riches en protéines, induisant l'expression d' α -SMA dans les cellules stromales dérivées du tissu adipeux (ADSCs). Ainsi, les cellules tumorales ovariennes seraient capables de modifier leur microenvironnement et d'induire la formation de CAFs à partir de cellules proches des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) retrouvées dans le tissu adipeux (141). D'autres travaux montrent que le milieu conditionné par les cellules tumorales ovariennes augmente la quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les fibroblastes, induisant dans ces cellules une augmentation de l'expression de chloride intracellular channel 4 (CLIC4) et une transdifférenciation en myofibroblastes (142). Les cellules tumorales ovariennes sont également capables d'activer des fibroblastes « normaux » (isolés à partir d'omentum normal) et entraînent leur prolifération et l'expression d' α -SMA par une voie de signalisation dépendant du transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) (143).

Les cellules tumorales ovariennes sont donc capables de créer un microenvironnement propice à la différenciation de cellules stromales, notamment les ADSCs et les fibroblastes, en CAFs.

En retour, les CAFs sont capables d'agir sur les tumeurs ovariennes et leur microenvironnement. Zhang *et al.* ont montré que dans les cancers épithéliaux de l'ovaire, une forte proportion de CAFs est corrélée à un stade avancé, une forte probabilité de métastases dans les ganglions lymphatiques et l'omentum, et une augmentation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse (139). Comme nous l'avons décrit précédemment, des fibroblastes normaux provenant de l'omentum peuvent être activés

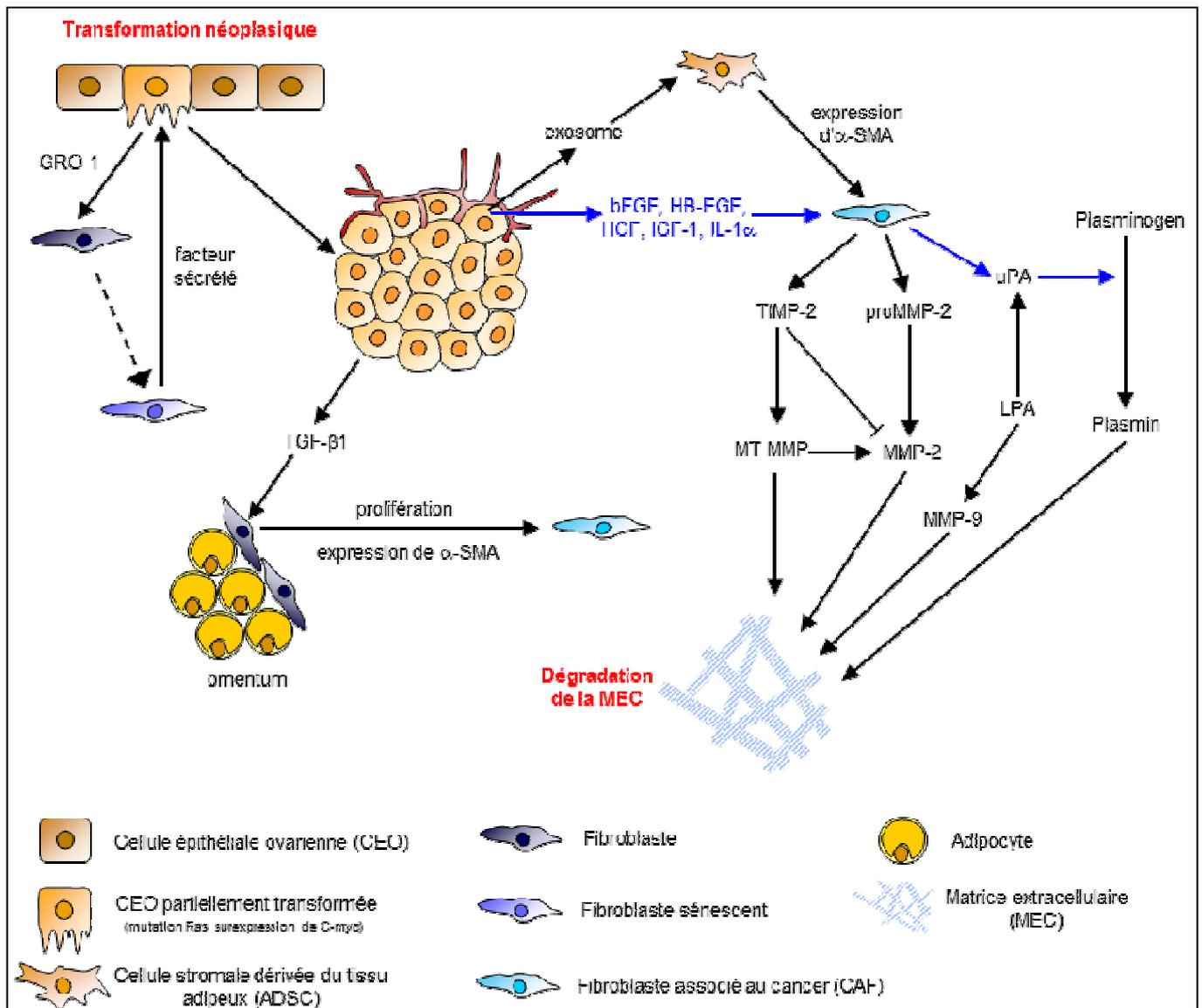


Figure 8 : Rôles des fibroblastes et CAFs dans le microenvironnement tumoral ovarien

Schéma non exhaustif représentant les rôles connus des fibroblastes normaux, sénescents ou associés au cancer (CAFs) dans la progression tumorale ovarienne. La sénescence des fibroblastes pourrait être induite par la sécrétion de GRO-1 par les cellules tumorales ovariennes et les cellules épithéliales ovariennes partiellement transformées (mutation de Ras). En retour, les fibroblastes sénescents pourraient favoriser la transformation néoplasique de ces cellules transformées. Les cellules tumorales ovariennes sont capables d'induire la formation de CAFs à partir de fibroblastes normaux présents au niveau de l'omentum ou à partir d'ADSCs. Ces CAFs sont capables modifier la composition de la MEC par des régulations sur les MMPs.

en CAFs par les cellules tumorales ovariennes. Ces cellules sécrètent alors du MMP-2 et activent l'expression de HGF dans les cellules tumorales entraînant une augmentation de leur adhésion et leur invasion dans l'omentum (143). Parmi les marqueurs spécifiques des CAFs, FAP semble être un régulateur important du microenvironnement tumoral ovarien et une cible thérapeutique potentiellement intéressante. En effet, sa mise en silence par des siRNA dans des CAFs entraîne une diminution de la prolifération des cellules et de l'expression de gènes marqueurs de cellules souches. Étonnamment, l'inhibition de l'expression de FAP dans les cellules tumorales ovariennes SKOV-3

n'exprimant pas ce gène entraîne une diminution de la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffe chez la souris (144).

Bien que le rôle des CAFs dans le microenvironnement tumoral ovarien ait été peu étudié à ce jour, il semblerait que ces cellules agissent à de nombreux niveaux de la progression tumorale ovarienne.

2.5. Cellules endothéliales et angiogenèse

2.5.1. Généralités sur l'angiogenèse tumorale

Les vaisseaux sanguins, composés de cellules endothéliales parfois associées à des péricytes (cellules de couverture) et des cellules musculaires lisses, permettent de fournir en oxygène et en nutriments les tissus sains et les tumeurs. La diffusion de l'oxygène à travers les tissus étant limitée à 100-200 μm , la formation de nouveaux vaisseaux est nécessaire à la croissance des tumeurs et au processus métastatique. Ce mécanisme, appelé angiogenèse tumorale, permet la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (145-147) (**Figure 9**). Judah Folkman montre en 1971 que la croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse et que ce phénomène constitue un facteur limitant de la cancérogénèse qu'il serait intéressant de cibler afin d'améliorer les thérapies existantes (148).

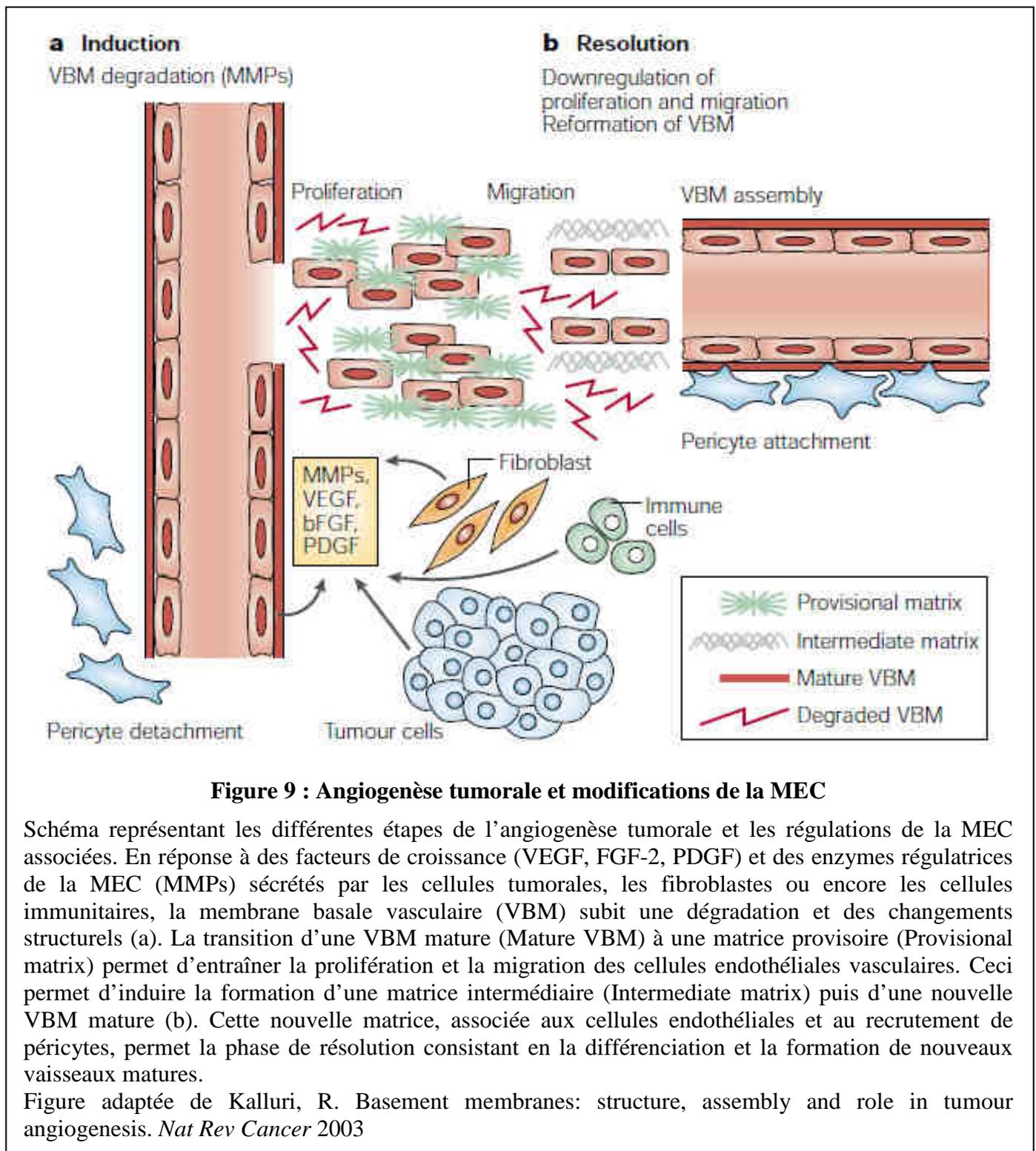
Nous savons désormais que l'angiogenèse est hautement régulée par les facteurs anti ou pro-angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales et leur microenvironnement (149). La proportion de ces différentes molécules au sein de la tumeur définit un équilibre appelé « switch angiogénique ». Celui-ci sera alors déclenché quand les signaux activateurs sont plus importants que les signaux inhibiteurs de l'angiogenèse.

L'incapacité à mettre en évidence de nouvelles thérapies efficaces dans le traitement du cancer ovarien et l'intérêt croissant porté au développement de médicaments anti-angiogéniques ont conduit de nombreuses équipes à étudier l'implication de l'angiogenèse dans le cancer des ovaires.

2.5.2. Interactions entre cellules tumorales ovariennes et cellules endothéliales

Hollingsworth *et al.* se sont intéressés en 1995 à l'angiogenèse tumorale dans les stades avancés de cancer ovarien et ont pu démontrer qu'une faible vascularisation des tumeurs est corrélée avec une meilleure survie des patientes (150). Des travaux récents ont confirmé l'intérêt d'utiliser l'angiogenèse des tumeurs ovariennes comme facteur pronostique. En effet, le nombre de cellules progénitrices

endothéliales circulantes est significativement plus élevé dans le sang de patientes atteintes d'un cancer ovarien par rapport à un sujet sain. De plus, le nombre de ces cellules est corrélé avec le stade de la maladie et la masse tumorale résiduelle (151).



Les cellules tumorales ovariennes sont capables d'activer les processus angiogéniques en agissant sur la différenciation de cellules progénitrices immatures. *In vitro*, les cellules tumorales ovariennes provenant des tumeurs primaires, de métastases ou de lignées cellulaires, peuvent induire, par la

sécrétion de VEGF et de Pleiotropine, la différenciation de monocytes en cellules exprimant CD14 et le VEGFR-2. Cette sous-population cellulaire est décrite comme étant des progéniteurs endothéliaux montrant des propriétés angiogéniques telles que la capacité à former une structure tubulaire sur un substrat de Matrigel (152, 153).

Il a récemment été montré que certaines cellules tumorales ovariennes pourraient elles-mêmes constituer une base pour la formation de nouveaux vaisseaux. En effet, les CSCs décrites précédemment et découvertes par Alvero *et al.* entraînent une augmentation de la vascularisation de tumeurs ovariennes injectées par xénotransgreffe dans des souris immunodéprimées. *In vitro*, ces cellules exprimant CD44 sont capables de former des structures tubulaires sur des substrats de Matrigel et d'exprimer des marqueurs endothéliaux telles que la vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) et le CD34. Ces CSCs peuvent ainsi constituer des progéniteurs endothéliaux capables de se différencier par une voie de signalisation dépendante de I κ B kinase β (IKK β) mais indépendante du VEGF (154). L'importance de ces cellules dans la vascularisation des tumeurs est appuyée par des travaux supplémentaires montrant que des CSCs ovariennes retrouvées dans le liquide d'ascite et exprimant CD133 ne montrent pas de capacités tumorigènes mais contribuent à l'angiogenèse tumorale (155).

L'étude des voies de signalisation cellulaires activées dans les cellules tumorales ovariennes et potentiellement impliquées dans l'angiogenèse tumorale a mis en évidence l'importance de l'axe PI3K/Akt. En effet, une sécrétion de VEGF dépendante d'Akt3 par les cellules tumorales ovariennes contribue au recrutement de cellules progénitrices endothéliales par l'augmentation de l'expression d'inhibitor of DNA binding 1 (Id1), facteur impliqué dans le recrutement de ces cellules (156, 157).

2.5.3. VEGF et autres facteurs pro-angiogéniques

Parmi les facteurs pro-angiogéniques, le VEGF est une molécule clé dont l'importance dans le cancer ovarien a été largement décrite précédemment (partie 2.2.2). Cette molécule est exprimée dans 70% des cancers ovariens et sa concentration dans le sérum et le liquide d'ascite est corrélée avec la progression de la maladie, son stade et la réponse à la chimiothérapie (158, 159). La production de VEGF est associée à la formation de liquide d'ascite et constitue un marqueur de leur malignité (160, 161).

L'expression des récepteurs au VEGF n'est pas restreinte aux cellules endothéliales. En effet, les cellules tumorales ovariennes expriment le VEGFR-1 et/ou le VEGFR-2 et 85% des tumeurs ovariennes montrent une forte expression du VEGFR-2. L'activation de ce récepteur est liée au mécanisme angiogénique mais aussi à l'activation des cellules tumorales ovariennes. En effet, l'inhibition du VEGFR-2 entraîne une diminution de la migration et de l'invasion des cellules tumorales ovariennes *in vitro* et une diminution de la croissance tumorale *in vivo*. Cet effet peut

s'expliquer par une diminution de la vascularisation tumorale, de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose (162).

Bien que le VEGF constitue la cytokine pro-angiogénique la plus largement étudiée, de nombreux autres facteurs sont capables de réguler la formation de nouveaux vaisseaux au sein des tumeurs. Nous avons notamment décrits précédemment l'implication de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF- α ou de certaines molécules de la MEC dans l'angiogenèse tumorale ovarienne (parties 2.2 et 2.3). Cependant, l'étude de l'implication de facteurs tels que MIF ou l'ephrin receptor A2 (EphA2) dans l'angiogenèse montre la régulation complexe de ce phénomène.

En effet, MIF est surexprimé dans certaines lignées tumorales ovariennes, les tumeurs ovariennes et le liquide d'ascite. La déplétion de cette chimiokine entraîne une diminution de la vascularisation des tumeurs ovariennes et une diminution de la proportion de cellules endothéliales dans le liquide d'ascite. Les effets pro-angiogéniques de MIF pourraient être indirects, par la stimulation de facteurs tels que le VEGF, l'IL-6 ou le TNF- α (163).

EphA2 est un récepteur à activité tyrosine kinase surexprimé dans 76% des cancers ovariens, associé aux stades avancés et aux tumeurs de haut grade. Sa surexpression dans les cellules tumorales ovariennes et les cellules endothéliales est corrélée à l'expression de protéines telles que MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP, fortement impliquées dans l'angiogenèse et les processus d'invasion (164).

2.5.4. Matrice extracellulaire et angiogenèse

La dynamique de la MEC et de l'angiogenèse sont des processus intimement liés, notamment dans le cancer ovarien (**Figure 9**). Dans un modèle de dissémination péritonéale, proche des observations cliniques réalisées dans le cancer ovarien, il a été montré que le VEGF active la MMP-2 (165). De plus, la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales ovariennes entraîne une synthèse de MMP-9 par des cellules stromales telles que les cellules endothéliales (166). Parmi les autres protéines régulatrices de la MEC, MMP-1 peut induire l'angiogenèse tumorale par l'activation du protease activated receptor-1 (PAR-1) et une augmentation de la sécrétion d'IL-8 et de GRO- α (aussi appelé GRO-1) par les cellules tumorales ovariennes (167).

2.5.5. Importance du microenvironnement dans l'angiogenèse

La production de facteurs pro-angiogéniques est régulée par l'organisation tridimensionnelle des cellules tumorales ovariennes et leur microenvironnement. En effet, la production de cytokines telles que l'IL-8 et le VEGF est augmentée dans des lignées tumorales ovariennes quand ces dernières sont organisées en sphéroïdes par rapport à une culture en monocouche (168). De plus, le niveau de VEGF

et de FGF-2 est significativement plus élevé dans le plasma de souris porteuses de tumeurs intrapéritonéales comparé à des souris portant des tumeurs sous-cutanées montrant l'importance du microenvironnement péritonéal dans la vascularisation des tumeurs ovariennes (169).

De nombreux types cellulaires sont capables de moduler les processus angiogéniques, notamment par la sécrétion des facteurs décrits précédemment, et peuvent ainsi agir sur la progression tumorale ovarienne. Ces régulations seront présentées dans les parties suivantes concernant l'importance de chacun des types cellulaires dans le microenvironnement tumoral ovarien.

2.5.6. Traitement anti-angiogénique dans le cancer ovarien

Comme nous l'avons vu en première partie de ce manuscrit, peu de nouveaux traitements ont apporté un réel bénéfice thérapeutique dans le traitement du cancer ovarien depuis l'introduction des sels de platine. L'intérêt croissant porté à l'inhibition de l'angiogenèse dans le cancer et l'arrivée de la première molécule anti-angiogénique, le bevacizumab, ont permis d'ouvrir un nouvel espoir thérapeutique. Ainsi, comme nous l'avons largement décrit (partie 1.8), l'utilisation de cet anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF permet d'induire une augmentation de la survie sans progression des patientes atteintes d'un cancer ovarien mais ne modifie pas la survie globale. L'arrivée de nouvelles molécules anti-angiogéniques et leur utilisation en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles permettent d'envisager une amélioration de la prise en charge des cancers de l'ovaire (27).

2.6. Cellules souches mésenchymateuses (MSCs)

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont caractérisées par leurs capacités d'auto-renouvellement, d'adhérence au plastique, l'expression de marqueurs tels que CD73, CD90, CD105 et la possibilité de se différencier en plusieurs types cellulaires dont les adipocytes, les chondrocytes ou les ostéocytes. Initialement retrouvées dans le stroma de la moelle osseuse, ces cellules multipotentes adultes sont également présentes dans de nombreux tissus tels que les muscles, le sang, le cerveau ou encore le tissu adipeux (170).

Les MSCs sont connues entre autres pour aider à la formation d'une niche hématopoïétique, pour leur rôle immunosuppresseur et pour leurs capacités à réparer des tissus endommagés. En ce sens, ces cellules représentent un outil de choix pour la reconstruction tissulaire (os, cartilage, muscle, etc...) (170).

De par leur tropisme vers les tumeurs et leur faible immunogénicité, ces cellules constituent également d'excellents vecteurs pour l'introduction de gènes thérapeutiques. En effet, Jiang *et al.* ont

montré que *in vitro*, les MSCs modifiées pour exprimer l'endostatine, un facteur anti-angiogénique migrent vers les cellules tumorales ovariennes SKOV-3. L'endostatine inhibe alors la prolifération de ces cellules et active leur apoptose (171). Plus récemment Zheng *et al.* ont utilisé des MSCs dérivées de placenta humain modifiées pour délivrer cette même endostatine au sein de tumeurs ovariennes chez la souris. Les MSCs migrent alors préférentiellement au sein des tumeurs réduisant leur volume et leur vascularisation sans toxicité apparente (172).

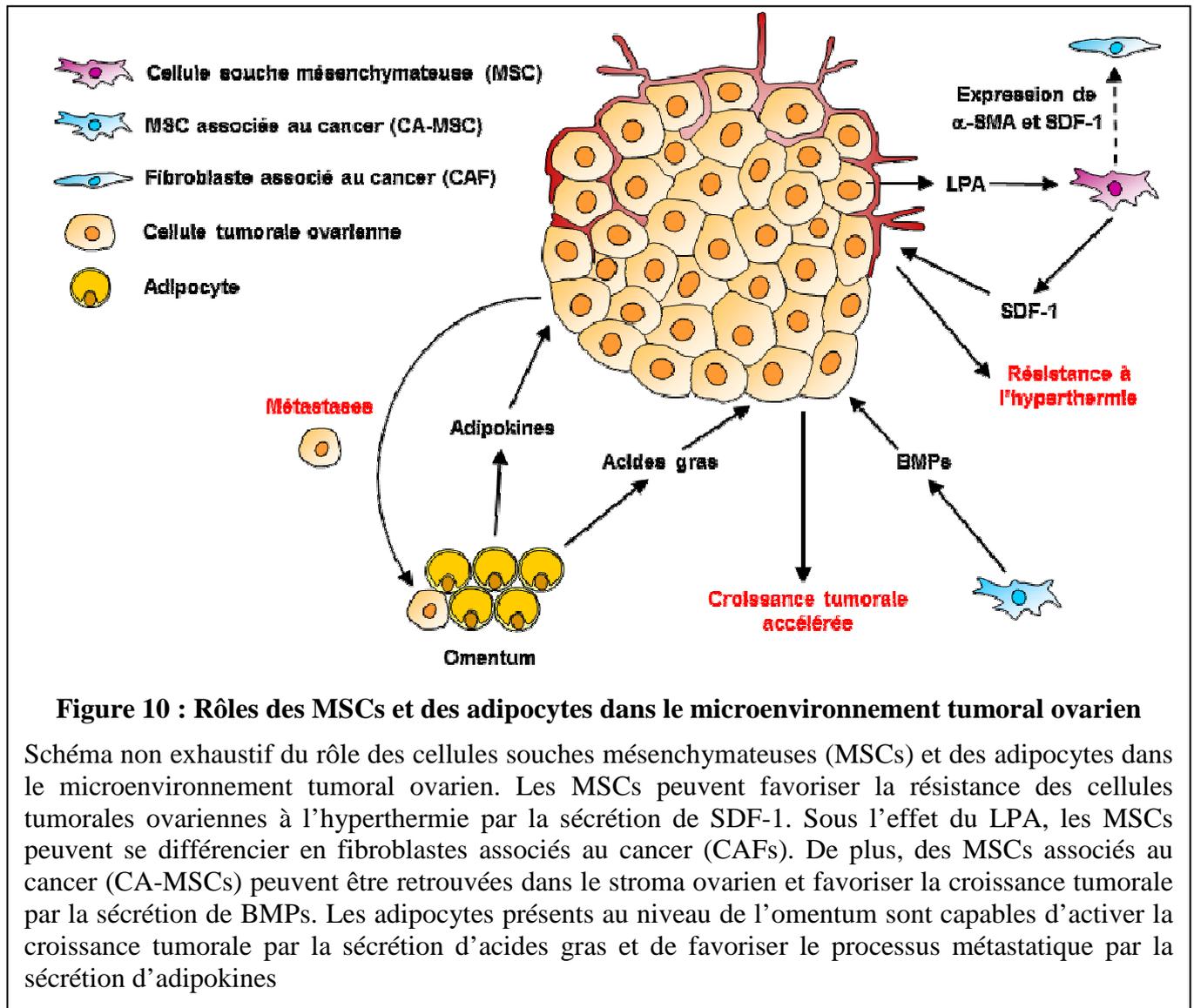
Malgré un intérêt thérapeutique potentiel de ces cellules dans le traitement des cancers ovariens, les études concernant les effets de MSCs dans la progression tumorale demeurent préoccupantes. Alors que des données montrent des effets anti-tumoraux des MSCs dans certains types de cancers (lymphome, leucémies, etc...), de nombreux travaux mettent en évidence des capacités pro-tumorales de ces cellules (173). Karnoub *et al.* montrent notamment que dans le cancer du sein, les interactions entre les MSCs et les cellules tumorales entraînent une augmentation de la sécrétion de CCL5, aussi appelée RANTES, résultant en une très forte augmentation de la dissémination métastatique (174). Il est donc nécessaire de connaître les effets des interactions entre les cellules tumorales ovariennes et les MSCs et les conditions associées afin de déterminer la possibilité d'utiliser sans risque ces cellules comme vecteurs dans le traitement du cancer ovarien.

Les cellules tumorales ovariennes sont capables de modifier leur propre microenvironnement en agissant directement sur les MSCs. En effet, par la sécrétion de LPA, les lignées tumorales ovariennes SKOV-3 et OVCAR-3 peuvent activer l'expression d' α -SMA et de SDF-1 dans les MSCs dérivées du tissu adipeux. Ces cellules se différencient alors en CAFs dont nous avons précédemment décrits les effets pro-tumoraux (partie 2.4.2) (175). Le SDF-1 sécrété par les MSCs permet d'augmenter la résistance des cellules tumorales ovariennes au traitement par hyperthermie (42°C) qui constitue l'une des indications thérapeutiques de référence dans le traitement du cancer ovarien (176). Des travaux récents ont montré, dans des modèles tridimensionnels de membranes amniotiques, que ces cellules activent la migration et l'invasion des cellules tumorales ovariennes par la sécrétion d'IL-6 (177).

De nombreuses équipes discutent de l'existence, au sein de la tumeur, de MSCs présentant un phénotype particulier, les MSCs associés au cancer (CA-MSCs). A titre d'exemple, McLean *et al.* ont isolé des CA-MSCs à partir de tumeurs ovariennes. Ces cellules présentent une morphologie et des capacités de différenciation de MSCs normales mais possèdent des différences moléculaires. Elles expriment notamment les bone morphogenetic protein (BMP) 2, 4 et 6 responsables d'une augmentation de la croissance tumorale comparé aux effets des MSCs « normales » (178).

Finalement, il a récemment été montré que des MSCs issues de cordon ombilical ne se différencient pas en CAFs au contact de cellules tumorales ovariennes contrairement aux MSCs issues de la moelle osseuse (179). Ces données mettent en évidence la forte hétérogénéité de ces cellules et l'importance de leur origine dans la progression tumorale.

Bien que les études concernant les interactions entre les MSCs et les cellules tumorales ovariennes soient peu nombreuses, celles-ci mettent globalement en avant un effet pro-tumoral de cette association (**Figure 10**). Il est donc indispensable de connaître les conditions pour lesquelles les MSCs favorisent la progression tumorale ovarienne avant d’imaginer l’utilisation de ces cellules comme outil thérapeutique dans le cancer ovarien.



2.7. Adipocytes

L’omentum, ou épiploon, est une structure péritonéale correspondant à deux feuillets accolés recouvrant les intestins (grand omentum) et s’étendant de l’estomac au foie (petit omentum). Cette structure, principalement composée d’adipocytes, forme un tablier graisseux constituant le site préférentiel des métastases dans le cancer ovarien. Cette constatation souligne l’importance des adipocytes dans le microenvironnement tumoral ovarien (180). De plus, une méta-analyse récente

semble indiquer, malgré une forte hétérogénéité entre les études, que l'obésité est corrélée à une survie plus faible des patientes atteintes d'un cancer ovarien (181).

Les adipocytes sont capables induire le recrutement de cellules tumorales ovariennes par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8, MCP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) et l'adiponectine. De plus, les adipocytes seraient capables de transférer des lipides vers les cellules tumorales ovariennes *via* la protéine fatty acid-binding protein 4 (FABP4), fournissant ainsi de l'énergie à la tumeur permettant sa croissance accélérée (180).

Bien que les adipocytes aient été considérés par le passé comme de simples cellules stockant les lipides, leur implication dans le microenvironnement tumoral est maintenant évidente (**Figure 10**). Le nombre d'études concernant le rôle des adipocytes dans la progression tumorale ovarienne est très faible mais se révèle être une voie de recherche prometteuse.

2.8. Cellules mésothéliales

La cavité péritonéale ainsi que les organes qui la composent sont tapissés par une monocouche de cellules mésothéliales dont les rôles physiologiques sont, entre autres, de favoriser le mouvement de liquides péritonéaux ou la présentation d'antigènes (182). Dans un contexte tumoral, ces cellules sont capables de réguler l'adhésion et la motilité des cellules tumorales ovariennes, de sécréter des cytokines et des facteurs de croissance, et d'établir un dialogue avec les cellules tumorales ovariennes.

Les cellules mésothéliales expriment plusieurs molécules d'adhésion cellulaire et de la MEC et constituent en ce sens un régulateur majeur de l'adhésion et de la motilité des cellules tumorales ovariennes dans le péritoine. Elles expriment notamment l'acide hyaluronique dont les rôles dans l'activation de l'adhésion des cellules tumorales ont été décrits précédemment (partie 2.3.1). De plus, les cellules mésothéliales, en partie par la sécrétion de fibronectine, induisent la motilité des cellules tumorales ovariennes et ainsi leur dissémination dans le péritoine (183). Dans la cavité péritonéale, les cellules tumorales forment des agrégats et sont organisées dans une structure en trois dimensions appelée « sphéroïde ». Cette structure est souvent considérée comme non-adhésive mais pourrait en réalité adhérer aux cellules mésothéliales *via* la liaison à l'intégrine $\beta 1$ (184).

Dans des travaux récents, Kenny *et al.* ont développé un modèle d'omentum en trois dimensions constitué de MEC, de fibroblastes humains et de cellules mésothéliales humaines afin d'étudier le processus métastatique dans le cancer ovarien. Ils montrent que les cellules mésothéliales de l'omentum sont capables d'inhiber l'adhésion et l'invasion de lignées tumorales ovariennes par contact cellulaire et pourraient ainsi agir comme barrière protectrice contre l'invasion du tissu sous-jacent par les cellules tumorales (185). Ces données s'opposent aux résultats précédents qui montraient l'étude

des cellules mésothéliales en deux dimensions et mettent en avant la nécessité d'étudier ces cellules dans leur contexte microenvironnemental.

Les cellules mésothéliales sont capables de produire de l'IL-6 (186) et du LPA (187), précédemment décrits (partie 2.2) comme activant la progression tumorale ovarienne en agissant sur les capacités d'adhésion, de migration et d'invasion des cellules tumorales ou encore en activant l'angiogenèse. Sous l'effet de l'IL-1, les cellules mésothéliales sécrètent du basic fibroblast growth factor (FGF-2) impliqué dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (188). De plus, les cellules inflammatoires et les macrophages résidant au niveau du péritoine sécrètent de l'IL-1 β activant les cellules tumorales ovariennes ainsi que les cellules mésothéliales qui en réponse produisent du VEGF (189). Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules mésothéliales sont responsables d'une production de MCP-1, uPA, PGE₂ et isoprostane-8, impliqués dans la progression tumorale (51).

Le microenvironnement tumoral ovarien présente des spécificités liées à la cavité péritonéale. En effet, les cellules mésothéliales qui la composent sont capables de réguler la progression tumorale ovarienne, notamment pendant le processus de dissémination métastatique. Ce type cellulaire, ainsi que les interactions qu'il peut établir avec d'autres cellules du microenvironnement est donc à prendre en compte dans l'établissement de modèles de stroma ovarien.

2.9. Cellules immunitaires

2.9.1. Rôle ambivalent du système immunitaire

Le système immunitaire est principalement constitué de leucocytes (ou globules blancs) dont le rôle est de protéger l'organisme contre le « non soi », à savoir les pathogènes (virus, bactéries, parasites), les molécules et cellules étrangères mais aussi contre les cellules tumorales. La réponse immunitaire peut être divisée en deux étapes distinctes :

- Innée (non spécifique) : composée entre autres des monocytes, macrophages et neutrophiles.
- Acquisée (spécifique) : composée entre autres des cellules dendritiques, lymphocytes CD8⁺ (cytotoxiques), lymphocytes $\gamma\delta$, lymphocytes CD4⁺ régulateurs (Tregs) et lymphocytes CD4⁺ auxiliaires (helper, Th).

Bien que le système immunitaire soit capable de détruire les tumeurs en formation, celles-ci peuvent détourner les cellules immunitaires de leur rôle premier et créer un microenvironnement pro-tumoral. La composition et le phénotype des différentes cellules du système immunitaire au sein de la tumeur définissent un équilibre qui tend vers des effets anti ou pro-tumoraux (190).

A un stade avancé, le cancer ovarien se définit par une dissémination péritonéale souvent caractérisée par la présence de liquide d'ascite. Comme nous l'avons décrit précédemment, l'ascite est

composée de nombreux facteurs solubles mais aussi de cellules immunitaires mettant ainsi en avant l'importance de l'immunité dans le microenvironnement tumoral ovarien.

La composition en cellules immunitaires, et notamment en lymphocytes, diffère selon le stade du cancer ovarien et permet d'établir des hypothèses quant au pronostic des patientes. En effet, Zhang *et al.* ont montré que la présence de lymphocytes T CD3⁺ (marqueur de tous les lymphocytes T) est corrélée avec une meilleure survie des patientes atteintes d'un cancer des ovaires (191). Plus récemment, Fialova *et al.* ont étudié la composition en cellules immunitaires infiltrant les tumeurs chez des patientes à différents stades. Les stades précoces (I) sont ainsi caractérisés par une forte réponse Th17 suivie par un recrutement de cellules Th1 au stade II. Dans les stades avancés (III et IV), des lymphocytes T régulateurs exprimant Helios (facteur de transcription spécifique de la lignée hématopoïétique impliqué dans la régulation du développement des lymphocytes) et une forte quantité de cellules dendritiques et de monocytes/macrophages sont retrouvés (192). Finalement, Milne *et al.* ont montré que le nombre « absolu » de lymphocytes (circulant dans le sang périphérique) mesuré au moment du diagnostic est associé au pronostic et à l'agressivité des tumeurs mais pas avec le nombre de lymphocytes T CD8⁺ infiltrants (193).

Il est essentiel de connaître les fonctions (anti ou pro-tumorales) des différentes cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral ovarien afin de définir de nouvelles thérapies agissant sur l'immunité.

2.9.2. Lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺, ou lymphocytes T cytotoxiques, sont des cellules spécialisées dans la destruction des cellules infectées par des virus ou des cellules anormales telles que les cellules tumorales. Elles sécrètent la perforine, permettant la formation de pores dans la membrane plasmique des cellules cibles, et la granzyme, qui active les caspases entraînant ainsi la mort cellulaire par apoptose.

Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent à la surface des cellules tumorales des antigènes correspondant à des cellules du « non soi ». Les lymphocytes T CD8⁺ représentent ainsi une « barrière » anti-tumorale. En effet, il a été mis en évidence que les lymphocytes CD8⁺ infiltrants les tumeurs ainsi qu'un haut ratio CD8⁺/lymphocytes T régulateurs sont corrélés avec un bon pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (194, 195).

Comme nous l'avons précédemment discuté, les cellules souches cancéreuses (CSCs) ovariennes constituent l'une des problématiques majeures dans le cancer ovarien de par leur résistance aux chimiothérapies conventionnelles. Des travaux récents montrent que l'activation de lymphocytes T cytotoxiques par des cellules dendritiques fusionnées avec des CSCs ovariennes permet la destruction

de ces dernières. En effet, les lymphocytes ainsi activés sécrètent de l'Interféron γ (IFN- γ) permettant d'activer la mort des CSCs exprimant le marqueur souche CD44. La clé de l'inhibition de la chimiorésistance et de la récurrence dans le cancer ovarien pourrait donc passer par l'utilisation des lymphocytes T cytotoxiques activés en association avec des chimiothérapies conventionnelles (196).

2.9.3. Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont une population de cellules responsables de la tolérance immunitaire aux antigènes du soi et de l'inactivation du système immunitaire par leurs fonctions immunosuppressives. Ces cellules participent ainsi à l'équilibre du système immunitaire en inhibant d'autres cellules T effectrices. Peng *et al.* ont récemment fait la revue des populations de Tregs présentes dans le cancer ovarien et ont discuté des applications potentielles de ces cellules en clinique. La dynamique de ces cellules (phénotype, prolifération, migration) est fortement liée aux régulations par le microenvironnement et les cellules tumorales (197).

Comme décrit précédemment (partie 1.5), il existerait deux sous-populations de cellules cancéreuses ovariennes, les cellules souches cancéreuses (type I) et les cellules cancéreuses différenciées (type II). Ces dernières sont capables d'augmenter la production de Tregs, créant ainsi un microenvironnement immunologiquement « tolérant » empêchant une réponse immunitaire (17). Les Tregs favoriseraient ainsi la formation d'un microenvironnement pro-tumoral.

En effet, la présence d'un nombre important de ces cellules dans la tumeur est corrélée avec un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer ovarien. Ces Tregs, caractérisés par l'expression de CD4, CD25 et FoxP3, peuvent être recrutés par la chimiokine CCL12 sécrétée par les cellules cancéreuses ovariennes et les macrophages environnants (198).

Cibler les Tregs constitue une stratégie potentiellement efficace pour traiter le cancer ovarien. Ces cellules faisant partie d'un réseau complexe au sein du microenvironnement, il faudra déterminer les conditions nécessaires à leur reprogrammation (197).

2.9.4. Lymphocytes T auxiliaires

Les lymphocytes T auxiliaires (T helper ou Th) sont des cellules T naïves, exprimant CD4 et activées par les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). Ces cellules peuvent être divisées en différents sous-types : Th1, Th2 et Th17, obtenus selon l'environnement cytokinique et les interactions avec les CPAs. Toutes ces cellules sont des activateurs du système immunitaire mais diffèrent par leur production de cytokine et leurs cellules cibles.

Les cellules Th1 sécrètent de l'IFN- γ , du TNF- α et sont responsables de l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) ou des macrophages anti-tumoraux. Au contraire, les cellules Th2 sont caractérisées par la sécrétion d'IL-4, l'activation des TAMs abordés ultérieurement et donc de la progression tumorale (199). Même si aucun lien direct entre les cellules Th2 et le cancer ovarien n'a été établi, certaines des cytokines produites par ces cellules sont retrouvées dans l'ascite et leur présence est corrélée avec un mauvais pronostic pour les patientes (200).

Les cellules Th17, sécrétant l'IL-17, sont connues pour présenter des effets anti et pro-tumoraux et pour interagir avec les Tregs (201). Ces cellules sont également présentes dans les tumeurs ovariennes et leur expansion pourrait être due à la sécrétion de cytokines par les CPAs associées aux tumeurs et les cellules tumorales ovariennes (202). De plus, il a été montré que l'IL-2 peut entraîner la conversion de Tregs associés au cancer en cellules Th17 (203). Comme nous l'avons décrit précédemment, Fialova *et al.* ont montré une forte réponse immune des cellules Th17 aux stades précoces du cancer des ovaires. Des données récentes indiquent qu'une forte densité de cellules productrices d'IL-17 est corrélée avec la présence de macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et un bon pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer ovarien (204). Bien que la présence des lymphocytes Th17 ait été confirmée dans le cancer ovarien à différents stades, les effets spécifiques de ces cellules sur la progression tumorale doivent être établis. Il en est de même pour les cellules Th1 et Th2 dont les rôles dans le cancer ovarien sont très peu connus.

La place des lymphocytes T auxiliaires dans le microenvironnement tumoral ovarien reste donc à définir afin de déterminer leurs potentiels effets anti ou pro-tumoraux.

2.9.5. Lymphocytes $\gamma\delta$

Les Lymphocytes $\gamma\delta$ sont des lymphocytes T CD3⁺ exprimant un T cell receptor (TCR) avec des chaînes γ et δ par opposition aux lymphocytes T « conventionnels » présentant un TCR avec des chaînes α et β . Ces cellules non conventionnelles constituent un faible pourcentage parmi les lymphocytes T, agissent dans l'immunité innée et acquise et montrent des fonctions anti-tumorales. En effet, ces cellules sont capables de réduire la prolifération des cellules souches cancéreuses ovariennes et d'augmenter leur apoptose et leur sensibilité à la chimiothérapie (cisplatine et paclitaxel) *via* la production d'IL-17 (205).

Bien que ces cellules soient peu étudiées dans le cancer ovarien, les lymphocytes $\gamma\delta$ pourraient jouer un rôle en perspective d'une immunothérapie associée à des chimiothérapies classiques.

2.9.6. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigènes responsables de l'activation des lymphocytes T pendant l'immunité adaptative et peuvent être divisées en deux sous-catégories : myéloïdes (mDCs) et plasmacytoïdes (pDCs).

L'équilibre de ces DCs est modifié au sein de la tumeur, permettant une modification de son immunité. En effet, Wei *et al.* ont montré l'existence de pDCs associées aux tumeurs ovariennes capables d'induire une immunosuppression des lymphocytes T CD8⁺ (206).

Des données récentes mettent en évidence un rôle des DCs dans la vascularisation des tumeurs ovariennes avec des effets opposés selon le sous-type dendritique. Les tumeurs ovariennes pourraient exclure les mDCs présentant des propriétés anti-angiogéniques et recruter les pDCs qui activent l'angiogenèse par la sécrétion de TNF- α et d'IL-8 (207). De plus, des DCs infiltrants les tumeurs (exprimant CD11 et DEC205) peuvent acquérir des caractéristiques de cellules endothéliales et de péricytes telles que l'expression de SMA et de VEGF-A, participant ainsi à la maintenance du réseau vasculaire. La déplétion de ces DCs entraîne une apoptose vasculaire, une nécrose tumorale, sensibilise les cellules tumorales ovariennes au topotécan et active l'immunité anti-tumorale (lymphocytes T cytotoxiques) (208).

Les pDCs présentent une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle selon leur localisation dans le microenvironnement tumoral ovarien. En effet, les pDCs provenant de l'ascite ont des fonctions pro-inflammatoires tandis que les DCs associées aux tumeurs sont immunosuppressives et corrélées avec un rechute précoce et un mauvais pronostic (209, 210).

Alors qu'initialement, les DCs étaient décrites comme impliquées exclusivement dans l'immunité, les données récentes montrent que ces cellules activent la progression tumorale ovarienne, en agissant notamment sur l'angiogenèse.

2.9.7. Neutrophiles

Parmi les cellules phagocytaires, les neutrophiles sont des cellules circulantes spécialisées dans la défense de l'hôte contre les microorganismes étrangers. Cependant, bien que ces cellules aient été initialement connues pour leurs fonctions bactéricides, l'intérêt des neutrophiles dans un contexte tumoral est croissant. Ces cellules peuvent être retrouvées sous deux sous-types : les neutrophiles N1 présentant des fonctions pro-inflammatoires et anti-tumorales, et les neutrophiles N2 avec des propriétés pro-tumorales et immunosuppressives.

Les neutrophiles associés aux tumeurs (TANs) ont un phénotype distinct et peuvent présenter des caractéristiques N1 ou N2 selon le contexte tumoral (211, 212). A ce jour, aucune étude portant sur le rôle direct des TANs dans la progression tumorale ovarienne n'a été menée. Cependant, nous avons

précédemment décrits les résultats de Lee *et al.* montrant que la production d'IL-8 par les cellules tumorales ovariennes est responsable d'une diminution de la croissance tumorale due en partie à un recrutement de neutrophiles (80).

L'intérêt croissant porté sur la possibilité d'agir sur l'immunité afin de mettre en place de nouvelles thérapeutiques dans le cancer ovarien met en évidence la nécessité d'étudier le rôle des neutrophiles dans cette pathologie.

2.9.8. Macrophages

Les monocytes et les macrophages sont des leucocytes dérivés de progéniteurs myéloïdes localisés dans la moelle osseuse. Après maturation, les monocytes sont retrouvés dans la circulation sanguine à partir de laquelle ils peuvent migrer vers différents tissus par extravasation et se différencier en macrophages. Le recrutement des macrophages est permis par la libération de chimiokines telles que l'IL-1 et le TNF- α par les cellules sentinelles résidents dans les tissus, en réponse à une infection par un pathogène ou un phénomène inflammatoire.

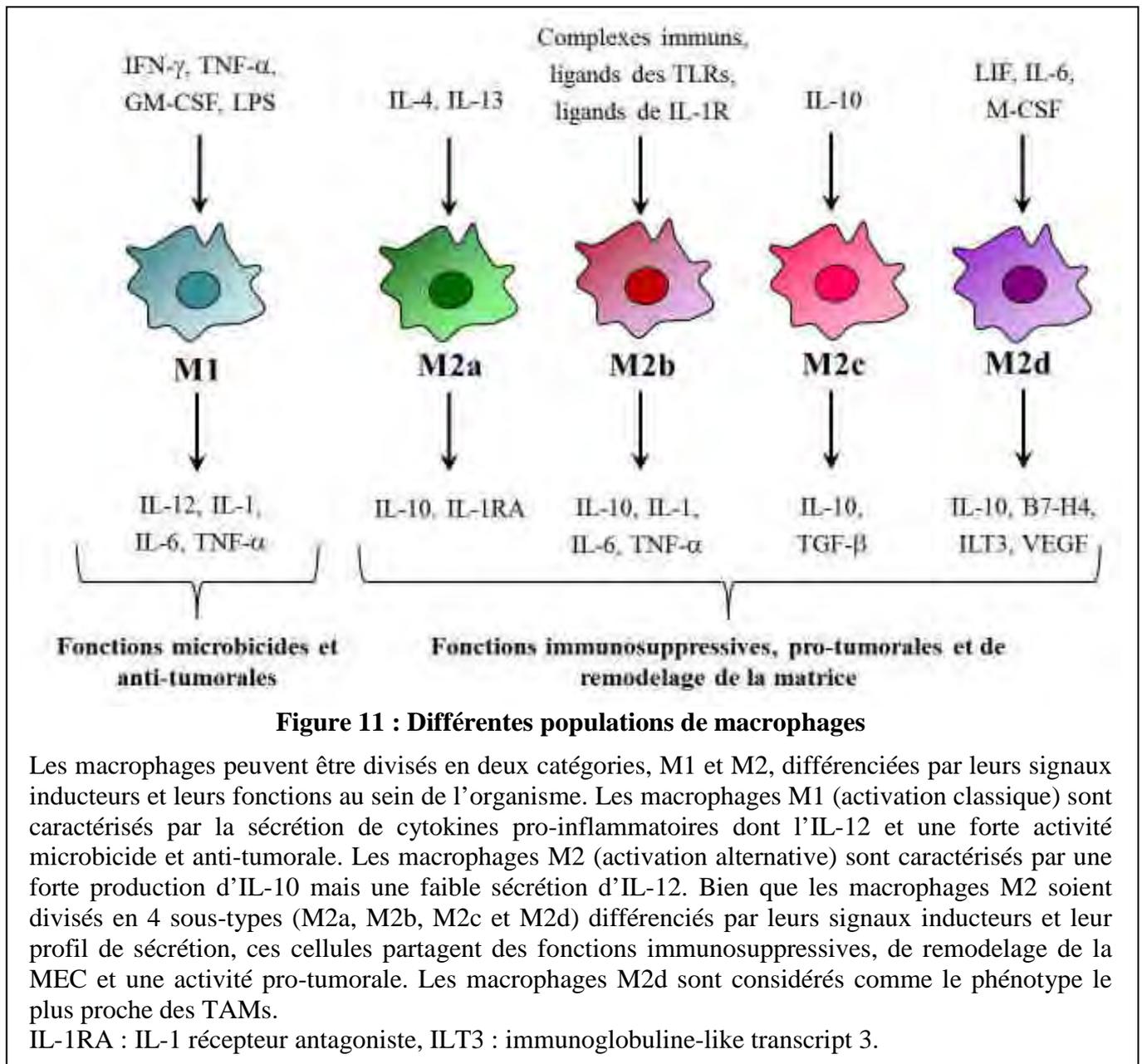
Les macrophages sont des acteurs majeurs de la régulation des processus tumoraux. Selon le contexte microenvironnemental (cytokines, interactions avec les autres cellules) ou le stade tumoral, les macrophages peuvent acquérir des phénotypes distincts, appelés M1 et M2 (213-215) (**Figure 11**).

Les macrophages M1 correspondent à une activation dite « classique », induite par des cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α , le granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ou une stimulation pathogénique. Ces cellules, caractérisées par la production d'IL-12, IL-6, IL-1 et TNF- α sont spécialisées dans la défense de l'hôte contre les microorganismes et présentent une activité anti-tumorale (213, 215).

Les macrophages M2 issus d'une activation « alternative » partagent un phénotype commun représenté par une forte production d'IL-10 et une absence de sécrétion d'IL-12 (213). Malgré des caractéristiques communes, ces cellules peuvent être divisées en 4 phénotypes distincts selon leur signal d'induction : M2a (IL-4 et IL-13), M2b (ligands des toll like receptors (TLRs) et de l'IL-1R), M2c (IL-10) et M2d (leukemia inhibitory factor (LIF) et IL-6) (216). Bien que chaque sous-type présente ses fonctions propres, les macrophages M2 jouent globalement des rôles dans la réparation des tissus, le remodelage de la MEC et activent la progression tumorale (213).

Bien que les définitions diffèrent selon les équipes, de nombreux travaux s'accordent à montrer que les TAMs présenteraient un phénotype comparable aux macrophages M2 avec de fortes capacités immunosuppressives. La majorité des travaux indique que la présence de TAMs dans les tumeurs est corrélée avec un mauvais pronostic pour les patients et que ces cellules sont capables d'agir à tous les niveaux de la progression tumorale. En effet, les TAMs favorisent la croissance et l'invasion tumorale,

l'angiogenèse, l'immunosuppression, la chimiorésistance et les processus métastatiques (29, 217, 218). Il convient ainsi de définir l'importance relative des macrophages dans le microenvironnement tumoral ovarien.



Les cellules tumorales ovariennes sont capables de réguler l'activité des macrophages et de les différencier en un phénotype TAM visible par l'expression du récepteur mannose et des récepteurs scavenger (219). Récemment, des travaux appuient ces résultats et montrent que la présence de LIF, IL-6 et M-SCF dans le liquide d'ascite de patientes atteintes d'un cancer ovarien entraîne la différenciation des macrophages dans un phénotype M2d, proche des TAMs (216). Alvero *et al.*, dont nous avons précédemment décrit les résultats, montrent que les deux sous-populations de cellules tumorales ovariennes, souches et différenciées, sont respectivement capables d'induire la différenciation des macrophages dans un profil réparateur des tissus tumoraux ou un profil

immunosuppresseur (17). L'ensemble des travaux énoncés montre que les tumeurs ovariennes ainsi que leur microenvironnement, notamment le liquide d'ascite, sont capables de polariser les macrophages dans un phénotype pro-tumoral.

En retour, les macrophages ainsi activés sont capables d'agir sur les cellules tumorales ovariennes et la progression tumorale. En effet, les TAMs sont capables d'activer l'invasion des cellules tumorales ovariennes *via* les voies de signalisation du TNF- α , du NF- κ B et de la c-Jun N-terminal kinases (JNK) (219, 220). De plus, les travaux de Takaishi *et al.* montrent que les interactions entre des macrophages M2 et les cellules tumorales ovariennes SKOV-3 sont responsables d'une activation de Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), protéine impliquée dans la progression tumorale, dans ces deux types cellulaires (221). Les macrophages, potentiellement par la sécrétion de VEGF, favorisent la production de liquide d'ascite et la dissémination métastatique dans le péritoine de souris (222).

Au sein du microenvironnement tumoral ovarien, les macrophages sont également capables d'agir sur la régulation des cellules immunitaires. En effet, les macrophages, tout comme les cellules tumorales ovariennes, entraînent la migration de Tregs vers la tumeur par la sécrétion de macrophage-derived chemokine (MDC), suppriment l'immunité médiée par les lymphocytes T et contribuent à l'augmentation de la croissance tumorale (198). D'autres études montrent également un rôle de ces macrophages sur la régulation des cellules T. Il a notamment été montré qu'une sous-population de macrophages présents dans le stroma des tumeurs ovariennes et exprimant la molécule co-stimulatrice B7-H4 réduit la prolifération et la production de cytokines des cellules T. Ces macrophages agissent ainsi comme des régulateurs négatifs de l'immunité T et leur présence est corrélée avec le nombre de Tregs infiltrant les tumeurs et un mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer ovarien (223, 224).

La découverte récente dans le liquide d'ascite de cytokines permettant la différenciation des macrophages en sous-type M2d dont le phénotype est proche des TAMs combiné au rôle clé de ces cellules dans le microenvironnement fait de leur inhibition un enjeu thérapeutique majeur dans le traitement du cancer ovarien.

2.10. Conclusion

Depuis une décennie, un intérêt croissant est porté sur le microenvironnement. Il est maintenant clairement établi que l'accumulation de mutations dans une cellule n'est pas suffisante au développement d'une tumeur et qu'un microenvironnement activé est nécessaire à l'apparition d'un cancer.

Comme nous l'avons vu au cours de cette deuxième partie, le microenvironnement tumoral ovarien, majoritairement péritonéal, est extrêmement varié. Tout d'abord, la grande richesse de facteurs protéiques et lipidiques contenus dans le liquide d'ascite et sécrétés par les cellules tumorales ovariennes et les cellules stromales contribue à la formation d'un microenvironnement pro-inflammatoire. Ces facteurs, combinés aux interactions établies avec les cellules tumorales, permettent aux cellules stromales normales de voir leur phénotype modifié. Le microenvironnement tumoral ovarien est ainsi riche en CAFs, CA-MSCs, TAMs et autres cellules propres à l'activation par des cellules tumorales. De plus, la cavité péritonéale, lieu de la dissémination des cellules tumorales ovariennes, permet l'interaction de ces dernières avec le mésothélium, riche en adipocytes, cellules mésothéliales et composants de la matrice extracellulaire (**Figure 12**) (**Annexe 3**).

Le microenvironnement tumoral favorise la progression tumorale ovarienne en agissant sur la croissance, l'angiogenèse et le potentiel métastatique des tumeurs. De plus, la bibliographie est riche en données indiquant l'importance du stroma dans l'établissement d'une chimiorésistance, problématique clé dans le cancer ovarien. La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, notamment au niveau du microenvironnement, permettra d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer des ovaires.

C'est dans ce contexte que le laboratoire s'est intéressé à un type cellulaire original du stroma ovarien, les Hospicells, dont les rôles se situent aussi bien dans l'activation de la croissance tumorale et de l'angiogenèse que dans l'établissement d'une chimiorésistance.

La revue des données connues à ce jour sur les Hospicells fera l'objet de la troisième et dernière partie de cette introduction bibliographique.

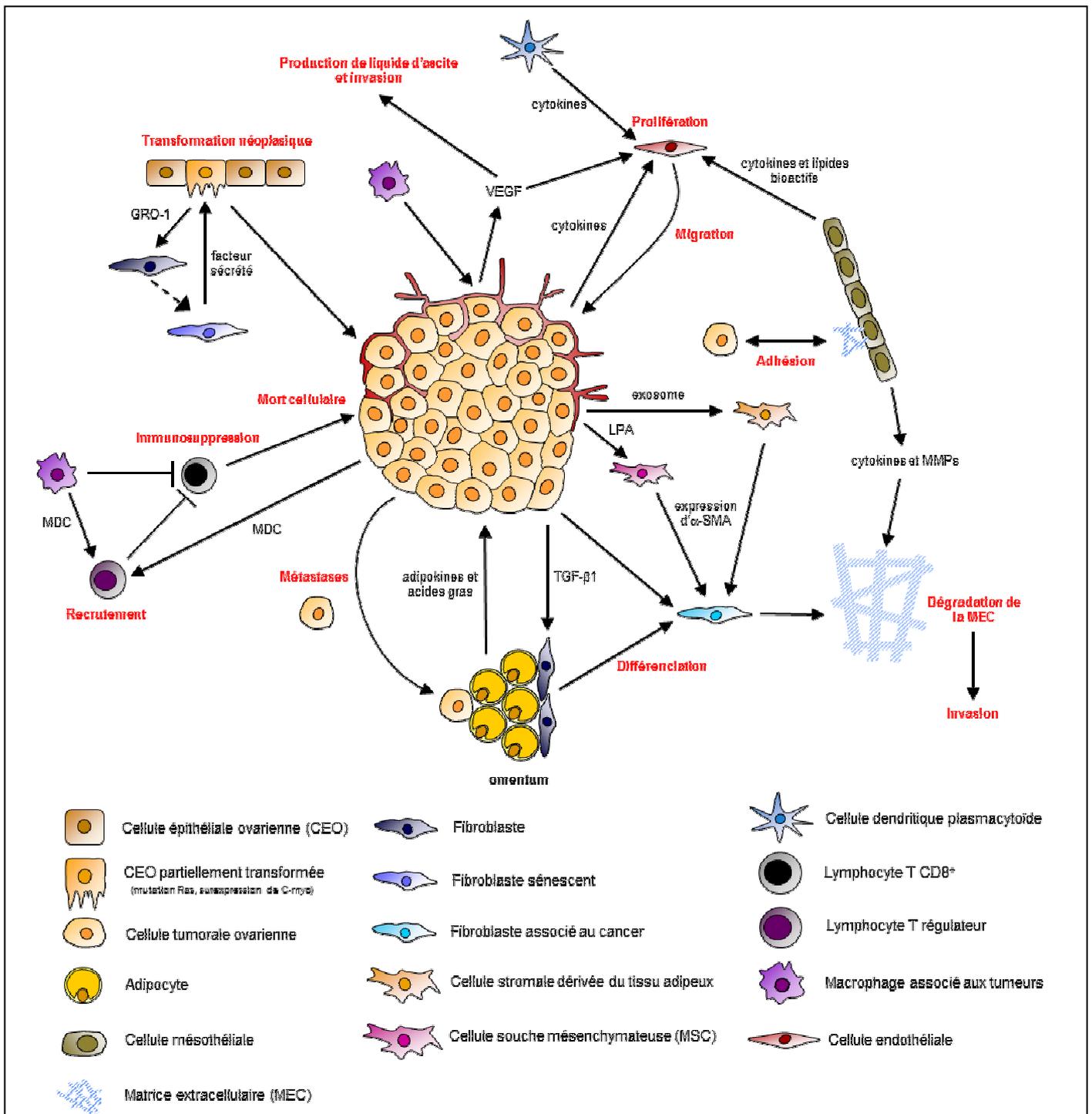


Figure 12 : Le microenvironnement tumoral ovarien

Schéma non exhaustif représentant les différents acteurs du microenvironnement tumoral ovarien. Les cellules tumorales ovariennes sont capables de réguler la composition de leur microenvironnement en entraînant notamment la différenciation de fibroblastes, de cellules souches mésenchymateuses et de cellules stromales dérivant du tissu adipeux en fibroblastes associés au cancer. Ces cellules, tout comme les cellules mésothéliales, peuvent dégrader la matrice extracellulaire et ainsi favoriser l'invasion des cellules tumorales. Les cellules mésothéliales sont également capables d'activer l'angiogenèse et de réguler l'adhésion des cellules tumorales. Les macrophages associés aux tumeurs peuvent réguler l'angiogenèse, la production d'ascite mais aussi d'entraîner le recrutement de lymphocytes T régulateurs et d'inhiber les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8⁺. Les adipocytes présents au niveau de l'omentum activent la croissance tumorale mais aussi le processus métastatique par la sécrétion d'adipokines et d'acides gras.

3. Hospicells

3.1. Découverte et isolation

En 2007, Arash Rafii et Massoud Mirshahi isolent des agrégats cellulaires à partir de liquide d'ascite de patientes atteintes d'un cancer ovarien de stade III et naïves de tout traitement chimiothérapeutique (7). Les observations microscopiques réalisées sur ces agrégats montrent la présence de cellules stromales présentant une forte affinité pour les sphéroïdes de cellules tumorales (**Figure 13A et B**). Bien que fortement associées aux agrégats, ces cellules présumées mésothéliales (exfoliées pendant la dissémination métastatique) peuvent être dissociées après 10 à 15 jours de mise en culture (**Figure 13C**) puis clonées par dilution limite (Brevet FR0756077). Ces cellules stromales interagissant fortement avec les cellules tumorales ovariennes ont été appelées Hospicells.

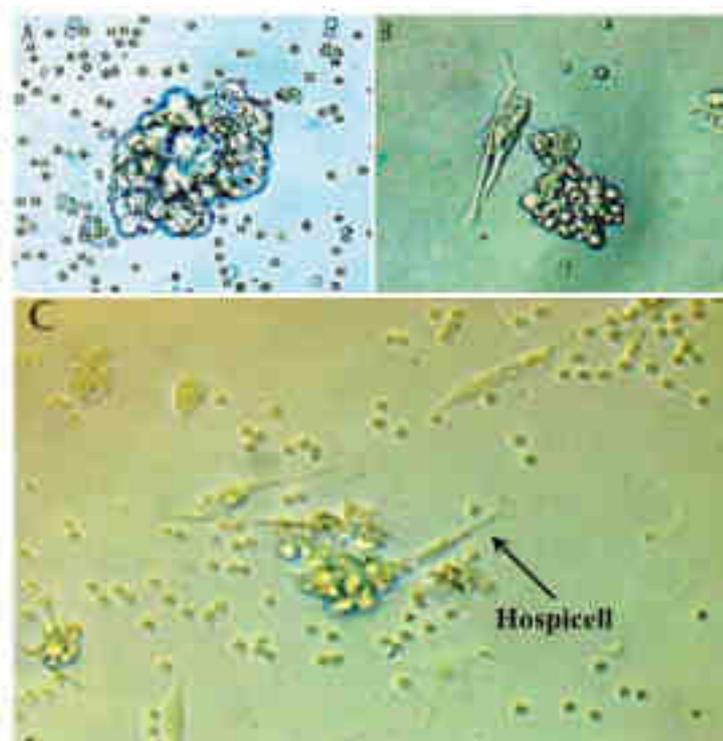


Figure 13 : Observations microscopiques d'agrégats cellulaires isolés à partir de liquide d'ascite

Observations réalisées en microscopie optique sur du liquide d'ascite isolé à partir de patientes atteintes d'un cancer ovarien de stade III. **A** : Agrégats cellulaires isolés à partir de liquide d'ascite (x40). **B** : Agrégats cellulaires ensemencés sur boîte de culture (x40). **C** : Désagrégation progressive de cellules stromales d'aspect pseudo-fibroblastique fortement associées aux cellules tumorales ovariennes, les Hospicells, après 10 jours de culture (x20).

Images provenant de Rafii, A., Mirshahi, P., Poupot, M., Faussat, A. M., Simon, A. et.al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One* 2008.

3.2. Phénotype des Hospicells

D'un point de vue morphologique, les Hospicells présentent un aspect pseudo-fibroblastique avec de longs pseudopodes et une large surface de contact rappelant des fibroblastes (normaux ou associés aux tumeurs) ou des cellules mésenchymateuses (7).

Les différents travaux réalisés sur ces cellules ont permis de caractériser ces cellules par l'expression de CD9, CD10, CD29, CD146 et CD166 (7, 9). De plus, les Hospicells n'expriment pas de marqueurs de lignée hématopoïétique (CD45, CD3, CD4, CD68), de CAFs (α -SMA) ou de cellules souches (CD34). Cette combinatoire d'antigènes de surface ne correspond à aucun marqueur de lignée cellulaire connu mais présente quelques similitudes avec les MSCs (expression de CD29 et CD166) bien que les Hospicells ne possèdent pas la capacité de se différencier en ostéocytes, chondrocytes et adipocytes (225). De même, les Hospicells partagent avec les MSCs les capacités immunosuppressives (8) ou à interagir avec les cellules tumorales (174).

3.3. Implication dans la chimiorésistance

Les premiers travaux réalisés par Rafii *et al.* visaient à étudier le rôle des Hospicells dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes (7). En effet, la co-culture de cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 et d'Hospicells entraîne une résistance au carboplatine et au taxol, chimiothérapies conventionnelles dans le cancer ovarien, multipliée par 2 à 2,5 par rapport à une culture des OVCAR-3 seules. Cet effet est spécifique des Hospicells et nécessite un contact entre les deux types cellulaires.

Les auteurs se sont ensuite intéressés au mode d'action de la chimiorésistance induite par les Hospicells et ont mis en évidence que ces dernières sont capables, par un phénomène appelé « trogocytose oncologique », d'échanger des fragments de membranes avec les cellules tumorales ovariennes. De ce fait, les Hospicells sont capables de transférer aux cellules tumorales des protéines d'efflux de drogues chimiothérapeutiques qu'ils présentent à leur surface, les Multidrug resistance (MDR), et ainsi permettre leur survie. Cependant, bien que le taxol soit éflué par des protéines de la famille MDR, le carboplatine est majoritairement éliminé par les transporteurs du fer (226, 227). Sa prise en charge par les protéines MDR est donc faible, indiquant que les Hospicells protègent probablement les cellules tumorales ovariennes de l'apoptose par d'autres mécanismes.

Des études réalisées en immunohistochimie sur 29 patientes atteintes d'un cancer ovarien ont montré que la présence d'Hospicells, marquées par CD10, est corrélée avec un statut de chimiorésistance (7). Bien que cette observation ait été réalisée sur un faible nombre de patientes, l'ensemble de ces résultats met en évidence la nécessité de comprendre les interactions entre les

cellules tumorales ovariennes et les Hospicells et l'intérêt de cibler ces dernières dans le but d'améliorer les traitements existants.

3.4. Effets immunosuppresseurs

Les Hospicells sont également capables de moduler la prolifération et la fonction des cellules immunitaires. En effet, ces cellules sont capables d'inhiber la prolifération et la production de cytokines des lymphocytes T $CD4^+$, $CD8^+$ et $\gamma\delta$ (8). Cet effet immunosuppresseur est indépendant de tout contact cellulaire et est induit par la nitric oxide synthase (iNOS) et la production de NO par les Hospicells.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'infiltration de lymphocytes T, notamment de $CD8^+$, constitue un facteur de bon pronostic dans le cancer de l'ovaire (193, 195). L'inhibition de la prolifération et de la production de cytokines de ces cellules par les Hospicells permettrait donc l'échappement des tumeurs ovariennes au système immunitaire.

Il est intéressant de noter que les MSCs sont également capables de produire du NO et d'induire fonctions immunosuppressives, indiquant des similitudes supplémentaires entre ces cellules et les Hospicells (228).

3.5. Rôles dans la progression tumorale ovarienne

Le rôle des Hospicells dans la progression tumorale ovarienne a également été étudié. Afin de faciliter la mise en culture de ces cellules, les Hospicells ont été immortalisées par l'antigène T du virus simien 40 (SV40). Cette modification ne modifie pas le profil d'expression de marqueurs de surface des Hospicells ni leur capacité à interagir avec les cellules tumorales ovariennes.

Pasquet *et al.* ont montré que les Hospicells ne sont pas capables d'activer la prolifération de cellules tumorales ovariennes *in vitro* (9). Cependant, les souris immunodéprimées ayant reçu *in vivo* une injection sous-cutanée de cellules tumorales ovariennes (lignées OVCAR-3, SKOV-3 et IGROV-1) en association avec des Hospicells développent des tumeurs de volume et d'index prolifératif plus importants que des souris injectées avec des cellules tumorales seules. De même, l'injection intrapéritonéale d'Hospicells en association avec des cellules tumorales ovariennes entraîne une survie plus faible des souris ainsi qu'un volume tumoral et de liquide d'ascite plus important.

De plus, les tumeurs co-injectées avec les Hospicells se révèlent être plus vascularisées, ce qui pourrait expliquer leur volume tumoral plus important. Il a été montré que les tumeurs issues d'une co-injection de cellules tumorales ovariennes et d'Hospicells présentent une augmentation de l'expression de HIF-1 α , régulateur clé dans l'expression du VEGF. De plus, le niveau de cette cytokine hautement

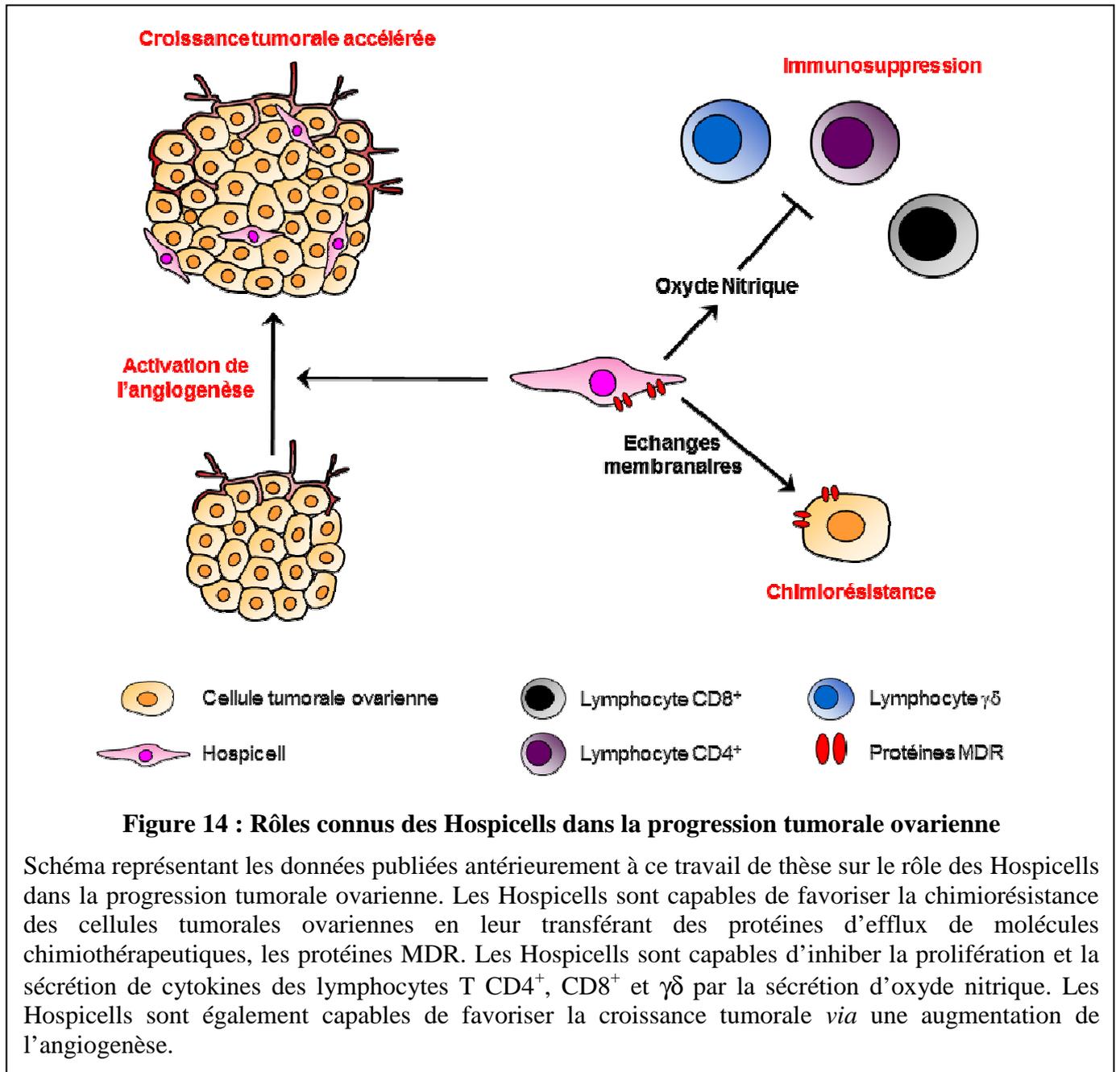
pro-angiogénique se révèle être plus important dans le liquide d'ascite de souris co-injectées avec des Hospicells comparé à des souris injectées par des cellules tumorales ovariennes seules.

Les Hospicells permettent donc d'activer la croissance tumorale ovarienne *via* une action sur l'angiogénèse dont le mode d'action pourrait provenir d'une activation de l'expression de HIF-1 α et de VEGF.

3.6. Résumé des connaissances actuelles à propos des Hospicells

Les Hospicells sont des cellules stromales retrouvées dans le cancer ovarien dont le phénotype, bien qu'encore peu défini, présente des similitudes avec les MSCs. Les Hospicells possèdent un rôle immunosuppresseur des cellules T, activent la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes et favorisent la croissance tumorale *via* un rôle sur l'angiogénèse (**Figure 14**). Ces cellules constituent ainsi une cible de choix dans l'élaboration de nouvelles thérapeutiques et dans l'optique d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer ovarien.

Il est donc nécessaire de comprendre les interactions entre les Hospicells et les cellules tumorales ovariennes responsables des effets décrits précédemment.



Matériel et méthodes

1. Culture Cellulaire

Lignées cellulaires

Les Hospicells et les fibroblastes CHN ont été obtenus de M. Mirshahi (INSERM UMR 736) (7, 9). Les cellules humaines d'adénocarcinome ovarien OVCAR-3, SKOV-3 et les cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVECs) (ATCC[®] HTB-161, HTB-77 and CRL-1730) ont été obtenues de l'« American Type Culture Collection » (Manassas, VA). Les cellules humaines d'adénocarcinome ovarien IGROV-1 sont un don de l'Institut Gustave Roussy, Villejuif. Les cellules HEK 293T (cellules humaines embryonnaires de rein) sont obtenues de qBiogen (France).

Les cellules OVCAR-3, IGROV-1, SKOV-3 et les Hospicells sont cultivées dans un milieu RPMI supplémenté avec 10% de SVF, de la pénicilline/streptomycine (100 IU/mL/100 µg/mL) et 2 mM de L-Glutamine (Cambrex Biosciences).

Les monocytes leucémiques U937 et THP1, les fibroblastes CHN, les cellules HEK 293T sont cultivés dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), de la pénicilline/streptomycine (100 IU/mL/100 µg/mL) et 2 mM de L-Glutamine (Cambrex Biosciences). Les cellules U937 et THP1 sont activées en macrophages par l'addition de 20 nM de phorbolmyristateacetate (PMA, Sigma) 48 heures avant le début des expériences.

Les cellules HUVECs sont cultivées dans des plaques pré-ensemencées avec 0,2% de gélatine provenant de peau de porc (Sigma, USA), avec du milieu de culture de cellules endothéliales (ECGM, Promocells, Allemagne) contenant 5% de sérum de veau fœtal, supplémenté avec 5 ng/mL d'EGF, 0,2 µg/mL d'hydrocortisone, 0,5 ng/mL de VEGF, 10 ng/mL de bFGF, 20 ng/mL de facteur de croissance apparenté à l'insuline (LongR3 IGF-1), 1 µg/mL d'acide ascorbique et 22,5 µg/mL d'héparine.

Afin d'isoler les monocytes humains primaires, un gradient de ficoll est réalisé à partir de sang circulant (buffy coat). Les cellules mononuclées du sang périphérique isolées sont lavées deux fois au PBS 2mM EDTA puis ensemencées pendant 1 heure à 37°C dans du milieu RPMI contenant 2 mM glutamine, 10 % de SVF et de la pénicilline/streptomycine (100 IU/mL/100 µg/mL). Ce temps d'une heure permet aux cellules d'adhérer à la boîte de culture. Les cellules non adhérentes sont éliminées et les monocytes sont cultivés pendant 2 à 3 jours en fonction des expériences réalisées.

Pour l'étude de l'implication des œstrogènes, les cellules OVCAR-3 sont cultivées dans du milieu RPMI sans rouge de phénol supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal déstéroïdé, de la pénicilline/streptomycine (100 IU/mL/100 µg/mL) et 2 mM de L-Glutamine (Cambrex Biosciences). Le Faslodex (ICI), un inhibiteur de l'expression du récepteur aux œstrogènes est utilisé à 10⁻⁶M pendant 48 heures sur les cellules OVCAR-3 seules ou en association avec les Hospicells dans le but d'inhiber la signalisation cellulaire dépendante des œstrogènes.

Les cellules sont régulièrement testées pour l'absence de mycoplasmes.

Préparation de milieu conditionné

10^6 Hospicells ou 10^6 cellules tumorales ovariennes sont cultivées dans des boîtes de Pétri de diamètre 100 mm (Falcon, Becton Dickinson) dans du RPMI supplémenté avec 10% de SVF, de la pénicilline/streptomycine (100 IU/mL/100 µg/mL) et 2 mM de L-Glutamine (Cambrex Biosciences) pendant 48 heures. Les milieux conditionnés sont prélevés, filtrés à 0,22 µm et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Formation de sphéroïdes de cellules tumorales

Des monocouches confluentes de cellules tumorales ovariennes, d'Hospicells et de cellules HUVECs sont décollées. La quantité nécessaire de cellules est reprise en suspension dans du milieu de culture contenant 0,25% (masse/volume) de méthylcellulose (Sigma) et ensemencée dans des plaques 96 puits non adhérentes à fond rond (Greiner, Frickenhausen, Allemagne). Dans ces conditions, toutes les cellules en suspension contribuent à la formation d'un seul sphéroïde, de taille et de nombre de cellules définis, par puits. Les sphéroïdes sont cultivés pendant au moins 24 heures et utilisés pour l'expérience souhaitée.

2. Analyse des protéines

ELISA (Enzyme-like immunosorbent assay)

Les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3, IGROV-1 ou SKOV-3 sont cultivées seules à $2,5 \cdot 10^5$ cellules ou en association avec $2,5 \cdot 10^5$ d'Hospicells ou en présence de milieu conditionné par les Hospicells dans des plaques 6 puits dans un volume final de 1 mL.

Les cellules OVCAR-3 shRNA scramble ou shRNA IL-8 sont cultivées seules à $2,5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans des plaques de culture 6 puits ou en association avec $2,5 \cdot 10^5$ d'Hospicells shRNA scramble ou shRNA IL-8 dans un volume final de 1 mL.

Les cellules U937 ou THP-1 activées 48 heures par du PMA sont cultivées dans du milieu RPMI complet à $2,5 \cdot 10^5$ cellules ou en association avec $2,5 \cdot 10^5$ Hospicells ou en présence de milieu conditionné par les Hospicells dans des plaques 6 puits dans un volume final de 1 mL. Après 48 heures de culture, les milieux conditionnés sont collectés et congelés à -20°C jusqu'à analyse. L'IL-6, l'IL-8 et le VEGF sont quantifiés en utilisant un kit ELISA spécifique « DuoSet® ELISA Development System » (R&D Systems) selon les instructions du fournisseur.

Dans le cas de l'inhibition de la voie Fas Ligand/Fas, les milieux conditionnés par les Hospicells sont incubés avec 1 µg/mL d'anticorps bloquant Fas Ligand (anti-human Fas-L NOK-1, BioLegends) avant culture avec les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 ou les monocytes leucémiques.

Dans le cas de l'inhibition de la voie du LPA, les cellules tumorales ovariennes ou les monocytes leucémiques sont pré-incubés (une heure avant de recevoir les Hospicells ou leur milieu conditionné) avec du Ki16425 (antagoniste des récepteurs au LPA sélectif pour LPA₁ et LPA₃, SelleckBio) à 10 µM. Les milieux conditionnés sont collectés après 24 heures de culture.

Dans le cas de l'inhibition de la voie du NO, les monocytes/macrophages humains primaires ou les Hospicells sont cultivés seules ou en association, en présence ou non d'un inhibiteur de la NO synthase, le L-NAME (Cayman Chemical) à 100 µM. Les milieux conditionnés sont collectés après 48 heures de culture.

Dans le cas de l'inhibition de la voie COX-2, les monocytes/macrophages humains primaires ou les cellules tumorales ovariennes SKOV-3 sont cultivés ou non pendant 3 heures avec un inhibiteur de la COX-2, le NS-398 (Sigma Aldrich) à 50 µM. Des monocytes/macrophages humains primaires ou des cellules SKOV-3 cultivés en absence de NS-398 sont mis en présence de milieu conditionné par les Hospicells cultivées ou non pendant 3 heures avec du NS-398 à 50 µM. Les milieux conditionnés sont collectés après 48 heures de culture.

Test Luminex

Les cellules OVCAR-3, SKOV-3 et IGROV-1 sont cultivées dans du milieu RPMI complet à $2,5 \times 10^5$ cellules par puits dans des plaques de culture 6 puits avec $2,5 \times 10^5$ Hospicells ou avec du milieu conditionné par les Hospicells pendant 48 heures dans un volume final de 1 mL. Après 48 heures de culture, les milieux conditionnés sont récupérés et congelés à -20°C jusqu'à analyse. Le TNF- α et l'IL-1 α sont quantifiées en utilisant un kit « Milliplex human cytokine Multiplex Immunoassay » (Millipore) grâce à la technologie Luminex, selon les indications du fournisseur et avec l'aide de la plate-forme de phénotypage de Ranguel (Toulouse).

Zymographie

Après 48 heures de culture dans du milieu RPMI sans sérum, le milieu conditionné par les Hospicells est récupéré après centrifugation puis concentré par centrifugation dans un filtre « amicon » (Millipore). 50 µg de protéines sont dénaturées en absence d'agent dénaturant et chargées sur un gel de polyacrylamide 10% contenant 2 mg/mL de gélatine (Sigma Aldrich). Le gel est incubé en présence de 2,5% de Triton X-100 à température ambiante pendant 30 minutes. Les pro-gélatinases (proMMP) sont activées par incubation du gel dans un tampon contenant 50 mM Tris (pH 7,5), 0,15 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,05% Brij 35 et 1mM 4-Aminophenylmercuric acétate (APMA, Sigma). Le gel est ensuite incubé dans du tampon de développement 50 mM Tris (pH 7,5), 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,02% Brij 35 à 37°C toute la nuit. Le gel est finalement coloré avec 0,25% de bleu de Coomassie et la protéolyse est mise en évidence par l'apparition de bandes blanches sur fond bleu.

Préparation des extraits protéiques

Les extraits protéiques sont préparés en « grattant » une monocouche de cellules et en incubant l'extrait cellulaire obtenu pendant 30 minutes dans la glace avec du tampon RIPA (Tris 50mM, NaCl 150mM, SDS 0,1%, NaDeoxycholate 0,5%, NP40 1%, inhibiteurs de protéases). Après 15 minutes de centrifugation (14000 rpm), les surnageants sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. Les concentrations protéiques sont déterminées en utilisant le « Bradford Assay » (Bio-Rad).

Western Blot (Fas Ligand, PDGFR- α , PDGFR- β , FAP, MMP-2 and MMP-9)

Les protéines sont séparées par SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide 10%. Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF activée au méthanol. Les membranes sont saturées 2 heures dans du TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl) / 0,1% Tween 20/ 5% lait et incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre le Fas Ligand humain (1 :4000, sc-957, Santa Cruz Biotechnology), le PDGFR- α ou le PDGFR- β (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) ou un anticorps primaire monoclonal de souris dirigé contre FAP (1:1000, Calbiochem), MMP-2 or MMP-9 (1:1000, R&D systems). Les membranes sont lavées 3 fois avec du TBS/ 0,1% Tween 20 (TT) puis incubées 1 heure et 30 minutes avec un anticorps secondaire (1:4000 anti-souris ou 1:4000 anti-lapin selon l'anticorps primaire, Cell Signaling Technology) couplé à la Horse Raddish Peroxydase (HRP). Les membranes sont lavées 3 fois avec du TT puis 2 fois avec du TBS. Les immunocomplexes sont révélés avec du « Enhanced Chemiluminescence » (GE Healthcare, Amersham) et visualisées avec un scanner STORM.

3. Extinction de l'expression de gènes et étude de transcrits d'ARNm

Inhibition de l'expression de l'IL-8 par l'expression stable d'un shRNA

Un shRNA ciblant la séquence de l'ARNm de l'IL-8 humaine (Sigma) a été conçu : shRNA IL-8 = 5'CGCGUCCCCACCGAAGGAACCAUCUUCAAGAGAGAUGGUUCCUCCGGUGGUUUUGGAAAUCGAUACC3'. Une séquence « scramble » (dirigée contre aucune séquence connue) a été conçue comme contrôle négatif : shRNA scramble = 5'CGCGUCCCCUUCUCCGAACGUGUCA CGUUUCAAGAGAACGAGACACGUUCGGAGAAUUUUUGGAAAUCGAUAC. Les séquences ADN correspondant à ces shRNA sont clonées dans un vecteur d'expression pLVTHM codant pour la Green Fluorescent Protien (GFP) permettant de sélectionner les cellules transduites. Pour produire les lentivirus, les cellules HEK 293T sont transfectées avec 20 μ g de vecteur d'intérêt pLVTHM + shRNA IL-8 ou scramble, 10 μ g de pCMV delta R8-74 (gagpol) et 6 μ g de pMD2G (env) (Tronolab). Le milieu

de culture est retiré 12 heures après transfection et les surnageants viraux sont récupérés toutes les 12 heures pendant 60 heures dans le but de transduire les cellules OVCAR-3 ou les Hospicells.

Inhibition de l'expression de la Sphingosine kinase 1 (SphK) par l'expression stable d'un shRNA

Différentes séquences codant pour des shRNA dirigés contre l'ARNm codant la sphingosine kinase 1 ont été évaluées par transfection pour leur efficacité à inhiber l'expression de la sphingosine kinase dans des cellules la surexprimant comme les MSCs ou les Hospicells. Une séquence a été sélectionnée : 5'CGCGTCCCCGCGTCATGCATCTGTTCTACGTTCAAGAGACGTAGAACAG ATGCATGACGCTTTTTGGAAAT3'. Une séquence « scramble » (dirigée contre aucune séquence connue) a été conçue comme contrôle négatif : 5'CGCGUCCCCUUCUCCGAACGUGUCACGUU UCAAGAGAACGAGACACGUUCGGAGAAUUUUUGGAAAUCGAUAC. Les séquences d'ADN correspondant à ces shRNA ont été clonées dans un vecteur d'expression pLVTHM codant pour la Green Fluorescent Protien (GFP) permettant de sélectionner les cellules transduites. Pour produire les lentivirus, les cellules HEK 293T sont transfectées avec 20 µg de vecteur d'intérêt pLVTHM + shRNA SphK1 ou scramble, 10 µg de pCMV delta R8-74 (gagpol) et 6 µg de pMD2G (env) (Tronolab). Le milieu de culture est changé 12 heures après transfection. Le surnageant de 36 heures post transfection est filtré à 0,45 µm et utilisé pour transduire des Hospicells. Les Hospicells sont analysées 48 heures après pour l'expression de la GFP par cytométrie en flux et l'inhibition effective de la sphingosine kinase 1 par dosage de son activité

Dosage de l'activité SphK 1

80 µg de protéines sont repris dans un tampon (Tris/HCl 20mM pH 7,4, 20% glycérol, 1mM β-mercaptoethanol, 1mM EDTA, 1mM sodium orthovanadate, 40mM β-glycerophosphate, 15mM NaF, 10µg/mL leupeptine, 10µL/mL aprotinine, 1mM de phenylmethylsulfonyl fluoride et 0,5mM 4-desoxyridoxine) avec 10µL de sphingosine 1mM, de l'ATP froid (20mM), du MgCl₂, et de l'ATP [P³²]. Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à 37 °C puis la réaction est arrêtée par l'ajout de HCl 1N et de CHCl₃/MeOH/HCl. Après centrifugation, la phase inférieure organique est récupérée, à laquelle nous ajoutons du chloroforme et du KCl. Après centrifugation (10 min, 600g), la phase inférieure est lavée avec une solution de MeOH/CHCl₃/KCl 2N/H₂O/HCl 2N. Une centrifugation est réalisée (10 min, 600g) afin de récupérer la phase organique qui est ensuite évaporée toute la nuit. Les échantillons sont repris dans une solution de CHCl₃/MeOH (2/1). La séparation des différents composés est réalisée par chromatographie sur couche mince sur plaque de silice grâce à un tampon de migration 1-butanol/méthanol/acide acétique/eau (80/20/10/20) pendant 3 heures et 15 minutes. Les composés radiomarqués sont visualisés par autoradiographie. La silice contenant la S1P est récupérée

et la radioactivité est quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard). Les dosages ont été réalisés à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS, Toulouse).

Préparation des ARNm et qRT-PCR

L'ARN total est extrait à partir d'une monocouche de cellules par le « RNeasy mini kit » (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. 2µg d'ARN sont utilisés pour réaliser de l'ADNc en utilisant le « Iscript cDNA synthesis kit » (Bio-Rad). Les amorces utilisées pour les gènes d'intérêt et les gènes de ménage (β -actin) sont conçus par ordinateur à l'aide programme « Beacon Designer » (Premier Biosoft). La RT-PCR et qRT-PCR sont réalisées en utilisant respectivement le « Hot StarTaq master mix » (Qiagen) et le « SYBR Green master mix » (Bio-Rad).

4. Etude de l'angiogenèse

Test de migration et d'invasion des cellules tumorales ovariennes et des cellules endothéliales HUVECs

La capacité des Hospicells à induire la migration des cellules tumorales ovariennes est évaluée à l'aide de chambres de Boyden (Dutscher) composées de deux compartiments séparés par une membrane de polyéthylène poreuse de 8 µm de diamètre : l'insert (haut) et le puits (bas). $2,5 \cdot 10^4$ Hospicells sont ensemencés dans les puits (plaque 24 puits) avec du milieu RPMI supplémenté avec 2% de sérum de veau fœtal. Des cellules tumorales ovariennes sont ensemencées dans l'insert et incubées à 37°C pendant 20 heures. Les cellules du compartiment supérieur sont enlevées mécaniquement avec un grattoir. Les cellules ayant migré sont estimées par microscopie avec un objectif 10x. Les mêmes expériences sont réalisées avec ensemencement de cellules tumorales ovariennes ou de cellules HUVECs dans les puits et des Hospicells dans les inserts afin d'évaluer la migration des Hospicells vers les cellules tumorales ovariennes ou les cellules HUVECs. Chaque condition est réalisée en triplicat. Les expériences sont répétées trois fois. Afin d'évaluer la migration des cellules endothéliales HUVECs, ces cellules sont déprivées en sérum pendant 24 heures et une suspension cellulaire de milieu RPMI supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal contenant $2,5 \cdot 10^4$ cellules HUVECs est ensemencée dans les compartiments supérieurs (filtres de polycarbonate préparés avec 1% de gélatine). Les cellules ensemencées dans les puits sont l'un des suivantes : 5 sphéroïdes de $5 \cdot 10^3$ cellules tumorales ovariennes ou Hospicells ou 5 sphéroïdes de $2,5 \cdot 10^3$ cellules tumorales ovariennes et $2,5 \cdot 10^3$ Hospicells. Les cellules peuvent migrer pendant 16 heures. Les cellules ayant migré sont marquées avec une solution d'amidoblack (Sigma) et leur nombre est estimé par microscopie.

Prolifération des cellules HUVECs

5.10^3 cellules HUVECs sont ensemencées dans des plaques pré-ensemencées avec de la gélatine au jour 0 dans du milieu ECGM complet (comme décrit précédemment). Au jour 1 et aux jours suivants, les milieux sont remplacés par du milieu conditionné (réalisé comme décrit précédemment). Aux jours 3, 4, 5 et 7, un test colorimétrique au 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Etats-Unis) permettant le marquage de cellules vivantes est réalisé.

Test d'angiogenèse in vitro

5.10^2 cellules HUVECs sont utilisées pour réaliser un sphéroïde par puits. Les sphéroïdes sont cultivés 2 jours avant d'être intégrés dans du collagène. Une solution de collagène de queue de rat (BD Biosciences) est préparée avec du PBS et est ensuite mélangée (1 :1) avec du milieu de culture contenant 48 sphéroïdes (milieu ECGM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal ou du milieu conditionné pendant 48 heures dans les mêmes conditions que la culture des cellules HUVECs). 0,5% (masse/volume) de méthylcellulose est ajoutée au mélange afin d'éviter la sédimentation des sphéroïdes avant la polymérisation du gel de collagène. Les gels contenant les sphéroïdes sont transférés dans des plaques 24 puits pré-chauffées. Les gels sont incubés à 37°C, 5% de CO₂, et 100% d'humidité. Après 24 heures, l'angiogenèse *in vitro* est informatiquement quantifiée par mesure de la longueur des extensions membranaires poussant à partir de chaque sphéroïde à l'aide d'un logiciel d'imagerie (Olympus, Allemagne) par analyse d'au moins 5 sphéroïdes par condition.

5. Modèles animaux

Des souris femelles Swiss athymiques, âgées de 4-5 semaines (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) ont été hébergées dans des cages avec couvercle à filtre et gardées dans une installation stérile, maintenue selon les réglementations de la « Federation of European Laboratory Animal Science Associations » en accord avec les déclarations de l'AACR pour l'utilisation d'animaux en recherche en cancérologie. L'agrément du comité éthique animal de l'Institut Claudius Regaud a été obtenu pour l'utilisation de modèles animaux et des protocoles d'études. Une période de quarantaine de deux semaines a été imposée pour chaque souris avant le début de l'étude.

5 souris par groupe ont reçu par injection intrapéritonéale au jour 0 : groupe A : 5.10^7 cellules OVCAR-3 (modifiées génétiquement pour exprimer la GFP), groupe B : 5.10^7 cellules OVCAR-3 (modifiées génétiquement pour exprimer la GFP) en association avec 5.10^7 Hospicells, ou groupe C : 5.10^7 cellules OVCAR-3 (modifiées génétiquement pour exprimer la GFP) en association avec 5.10^7

fibroblastes CHN. Les animaux porteurs de tumeurs sont sacrifiés au jour 20 et le liquide d'ascite contenu dans leur péritoine est récupéré.

6. Etude des macrophages

Test de migration des macrophages

Les capacités chimiotactiques et de migration des monocytes leucémiques sont évaluées à l'aide de chambres de Boyden (Dutscher) composées de deux compartiments séparés par une membrane de polyéthylène poreuse de 8 μm de diamètre : l'insert (haut) et le puits (bas). 3.10^4 monocytes leucémiques THP1 ou U937 sont ensemencés dans l'insert. 3.10^4 cellules HEK 293T, monocytes leucémiques THP1 ou U937 sont ensemencés seuls ou en association avec $7,5.10^3$ Hospicells dans des plaques 24 puits. Chaque condition est réalisée en triplicat. La membrane est fixée à l'acide trichloroacétique à 10% puis colorée au bleu de Schwartz à 5%. Les cellules ayant migré sont estimées par microscopie optique en comptant 9 champs par condition. Le potentiel de migration est exprimé en valeur arbitraire où le nombre de monocytes leucémiques (THP1 ou U937) ayant migré vers les cellules HEK 293T est fixé à un.

Détection des macrophages par marquage ProSense680

Les cellules contrôles (HEK 293), les Hospicells et les macrophages murins sont ensemencés sur des boîtes de pétri de 3,5 cm diamètre au jour 1. Les macrophages murins sont obtenus en rinçant le péritoine d'une souris sacrifiée avec 5 mL de NaCl 0,9%. Ce volume est récupéré, centrifugé 5 minutes à 1200 rpm et les cellules sont ensemencées. 18 heures après, 8 μL de ProSense680 (0,16 nmoles) sont ajoutés aux cellules HEK 293, aux Hospicells ou aux macrophages. 7 heures après, les cellules sont fixées puis analysées au microscope à fluorescence (Leica Microsystems) avec un objectif 100x.

5 souris par groupe ont reçu par injection intrapéritonéale au jour 0 : groupe A : 5.10^7 cellules OVCAR-3 (modifiées génétiquement pour exprimer la GFP) en association avec 5.10^7 Hospicells, groupe B : 5.10^7 cellules OVCAR-3 (modifiées génétiquement pour exprimer la GFP). 19 jours après injection, les souris reçoivent 2 nmoles de Prosens 18 heures avant analyse, selon les instructions du fournisseur (Perkin Elmer, France). Les tumeurs sont prélevées et fixées dans 3% de paraformaldéhyde (PFA) pendant 24 heures puis un mélange de 3% de PFA et 20% de sucrose pendant 24 heures supplémentaires. Les tissus tumoraux sont encastrés dans un composé optimal de la température de découpage (OCT) (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Pays Bas), congelés à -55°C . Des sections de 10 μm d'épaisseur sont découpées à partir des blocs d'OCT à l'aide d'un cyostat (Leica CM3050 S) à -20°C .

Un marquage au DAPI est utilisé pour visualiser les noyaux cellulaires. La fluorescence tumorale due à la GFP ou au Prosens est détectée par excitation selective à l'aide d'une source lumineuse (Leica Microsystems, Wetzlar) ou un filtre GFP (λ_{exc} :480/40, λ_{em} :527/30) ou un filtre Cy5.5 (λ_{exc} : 665/45, λ_{em} : 725/50) (Chroma Technology, Brattleboro, Etats-Unis). Des images 16-bit à haute résolution de 1392x1040 pixels sont capturées à l'aide d'une caméra CCD (coolSNAP-HQ2, Roper Scientific) et retouchées pour leur contraste et leur luminosité à l'aide du logiciel MetaVue 6.2 (Universal Imaging).

Test Luminex

Les monocytes humains primaires ou les Hospicells sont ensemencés seuls ou en association à une concentration de $2,5 \cdot 10^6$ cellules (par type cellulaire) par puits de plaque 6 puits. Après 48 heures de culture, les milieux conditionnés sont récupérés et congelés à -20°C jusqu'à analyse. 42 cytokines, chimiokines et facteurs de croissance humains sont quantifiés en utilisant un kit « Milliplex MAP Human cytokine/chemokine kit » (Millipore) grâce à la technologie Luminex, selon les indications du fournisseur et avec l'aide la plate-forme de phénotypage de Roche Diagnostics (Penzberg, Allemagne).

Analyse semi-quantitative des protéines

Les monocytes leucémiques U937 ou les Hospicells sont ensemencés seuls ou en association à une concentration de $2,5 \cdot 10^6$ cellules (par type cellulaire) par puits de plaque 6 puits dans du milieu RPMI complet. Après 24 heures, le milieu est aspiré et remplacé par du RPMI sans sérum. Après 24 heures de culture, les milieux conditionnés sont récupérés et congelés à -20°C jusqu'à analyse. L'analyse semi-quantitative des protéines contenues dans les milieux conditionnés est réalisée en utilisant un RayBio[®] Human Cytokine Antibody Array 6 (RayBiotech) selon les indications du fournisseur. La quantité relative de protéines est déterminée par mesure de l'intensité moyenne de deux spots révélés par autoradiographie. Cette intensité est quantifiée par le logiciel PDQuest (BioRad) et normalisée par rapport à l'intensité des contrôles positifs inclus dans le kit.

7. Analyse statistique

Afin de comparer les valeurs « contrôle » et « à tester », des tests de Student bilatéraux ont été réalisés. $P < 0,05$ indique une différence significative

Résultats

1. Résultats préliminaires et objectifs

L'importance du microenvironnement dans la progression tumorale ovarienne et la chimiorésistance a été largement décrite précédemment. L'isolation récente d'un nouveau type cellulaire, les Hospicells, impliqué dans ces différents processus, constitue la perspective d'une meilleure compréhension et prise en charge du cancer ovarien.

Les résultats préliminaires du laboratoire ont montré que les Hospicells sont capables de favoriser la croissance tumorale par une augmentation de l'angiogenèse (9). Les objectifs de mon travail de thèse étaient d'étudier les interactions entre les Hospicells et les cellules tumorales ovariennes responsables de cette activation de l'angiogenèse. De plus, mes travaux ont consisté à déterminer l'existence d'interactions entre les Hospicells et d'autres cellules du microenvironnement responsables d'une activation de la progression tumorale ovarienne.

Ces résultats ont donné lieu à une publication parue dans *Cancer Letters* en 2012 dont je suis le premier co-auteur.

2. Article 1 : Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages

2.1. Introduction

Les Hospicells, bien que de phénotype inconnu, partagent des caractéristiques communes avec les MSCs ou les CAFs telles que la morphologie, la contribution à la progression tumorale ou la capacité à migrer vers les tumeurs solides (7, 9). Le premier objectif de ce travail consistait donc à analyser l'expression et la sécrétion, par les Hospicells, de protéines impliquées dans de nombreux mécanismes tumoraux afin de mieux comprendre l'origine de ces cellules et leur rôle au sein du microenvironnement tumoral ovarien.

Les travaux de Pasquet *et al.* réalisés au sein de l'équipe ont montré que la co-injection d'Hospicells avec des cellules tumorales ovariennes dans des souris immunodéprimées entraînent une augmentation de la croissance tumorale, de la production d'ascite et de la vascularisation des tumeurs par rapport à une injection de cellules tumorales seules. Des analyses réalisées par microscopie à fluorescence sur ces tumeurs ont montré une forte interaction des Hospicells avec les cellules tumorales ovariennes au sein des masses tumorales. Le second objectif de ce travail a donc été d'étudier l'effet direct des Hospicells sur les cellules endothéliales et la possible existence d'un autre partenaire cellulaire des Hospicells responsable de leurs effets sur la progression tumorale ovarienne.

2.2. Publication : Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages

Cancer Letters 326 (2012) 59–68



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cancer Letters

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



Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages

Magali Castells^{a,b,1}, Benoît Thibault^{a,b,1}, Eliane Mery^a, Muriel Golzio^{b,c}, Marlene Pasquet^a, Isabelle Hennebelle^a, Philippe Bourin^d, Massoud Mirshahi^e, Jean Pierre Delord^a, Denis Querleu^a, Bettina Couderc^{a,b,*}

^a EA-4552, Institut Claudius Regaud, F-31062 Toulouse, France

^b Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31052 Toulouse, France

^c Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France

^d Service d'Ingénierie Cellulaire, Etablissement Français du Sang Pyrénées Méditerranée, F-31300 Toulouse, France

^e INSERM UMR 736, F-75000 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2012

Received in revised form 15 June 2012

Accepted 16 July 2012

Keywords:

Ovarian cancer

CA-MSC

Cytokines

Angiogenesis

Macrophages

ABSTRACT

Within the microenvironment, Carcinoma-associated mesenchymal stem cells (Hospicells) are able to influence ovarian tumor development via, among others, the facilitation of angiogenesis in the tumor site allowing an accelerated tumor growth. We demonstrate the presence of a chemotaxis between endothelial cells and Hospicells, and a cell line specific increased secretion of pro-angiogenic cytokines such as IL-6, IL-8 and VEGF from ovarian adenocarcinoma cells. Hospicells are also able to attract and activate macrophages to a M2 phenotype and allow them to secrete a huge quantity of pro-angiogenic cytokines, favorable to tumor progression of all the associated ovarian adenocarcinoma cells tested.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Epithelial Ovarian carcinoma (EOC) is the sixth most common malignancy in woman and the leading cause of death from gynaecological cancer in the world. The current management of OC is based on complete cytoreductive surgery and chemotherapy. Survival rates range from 26% to 51% [1–3]. OC spreads by continuous involvement of adjacent organs or by disseminated peritoneal growth [4]. Complete clinical remission could be routinely obtained by a combination of surgery and chemotherapy based on platinum and taxanes. However, 70% of patients experience clinical recurrence within 18–28 months [5]. The high prevalence of intraperitoneal recurrence suggests that unidentified disease, left at the end of apparently complete surgery, is not controlled by chemotherapy and subsequently grows in patients in apparent complete remission. After early recurrence or several recurrences, response to chemotherapy is impaired [6].

The metastatic potency of tumor cells and the resistance to chemotherapies are largely acquired from paracrine signals from tumor-associated stromal cells. The cytokine-rich inflammatory microenvironment of tumors may contribute to cancer growth and spread [7,8]. OC cells produce various cytokines such as IL-6, IL-8 or TNF- α which are involved in cancer progression, but little is known about the cellular interactions which lead to tumor cell activation [7,9]. Indeed, solid tumors are composed of neoplastic cells as well as non-malignant resident stromal cells and migratory hematopoietic cells which are part of the microenvironment. The complex interactions between cell types in this microenvironment regulate tumor growth, progression, metastasis, angiogenesis and resistance to chemotherapies [10–14]. Among the microenvironment cells, Hospicells were first described, by Rafii et al. [15] from ascitic fluid of ovarian adenocarcinoma-bearing patients. Since this first description, they have also been isolated from bone marrow of breast cancer-bearing patients. Hospicells can induce chemoresistance, display immunosuppressive abilities [16–18] and promote tumorigenesis in *in vivo* models [19].

They share homologies with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) which are often recruited to solid tumors, integrate into the tumor stroma, and contribute to tumor development (carcinoma associated (CA-) MSC). They: (i) co-express CD9, CD10, CD29, CD146,

* Corresponding author. Address: Institut Claudius Regaud, 20-24 rue du pont St. Pierre, F-31052 Toulouse, France. Tel.: +33 5 61 42 46 44; fax: +33 5 61 42 46 31. E-mail address: couderc.bettina@claudiusregaud.fr (B. Couderc).

¹ These authors contributed equally to this work.

CD166 and HLA1; (ii) express some pro-inflammatory molecules; (iii) show close association with tumor cells; (iv) do not express HLA-DR [19]. Indeed, MSCs that are isolated as mononucleated and adherent cells from bone marrow (BM-MSC) and other connective tissue sources are typically heterogeneous. Lee et al. have shown that approximately 67% of established clones from randomly plated MSC clones differentiated into each and all of osteogenic, chondrogenic, adipogenic, and fibroblastic lineages within chemically defined media [20]. When BM-MSCs are recruited to tumor stroma, they can differentiate into myofibroblast-like tumor-associated Fibroblasts (TAFs) or CA-MSCs and become part of the tumor microenvironment that supports tumor growth [21–23]. Recently, it has been suggested that MSCs could be related to Fibroblasts [21,24]. In OC, Jeon et al. have shown that OC-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human adipose tissue-derived MSCs (hADMSC) into TAFs, elevating the expression of SDF-1 α through a TGF- β -mediated autocrine stimulation of smad2 [25]. To gain a better understanding of the Hospicells phenotype and their function in the context of a tumor, we investigated the expression and secretion of key proteins involved in the major mechanisms of cancer progression: angiogenesis, invasion and inflammation. Hospicells expressed some specific TAF markers: both PDGFR- α and β , Fibroblast-associated protein (FAP), Tenascin-C and Thrombospondin. However they did not express desmin or α SMA, two proteins commonly used for TAF definition. Hospicells secreted MMP2 in pro and active form, indicating how these cells are invasion efficient (Supplementary data Fig. 1). They also express the enzyme cyclooxygenase 2 (COX-2) which allows the synthesis of prostaglandins, key molecules in the inflammation process, suggesting that Hospicells play a role in the inflammation state observed during cancer progression. Hospicells are original cells which share homologies with MSCs and TAFs and could be associated with an intermediary state between the two types of cells. [19,21,22].

Previously, we demonstrated a role of Hospicells in ovarian cancer progression [19]. *In vivo*, their co-injection with adenocarcinoma cells enhanced tumor growth whatever the tumor model used (subcutaneous and intra-peritoneally established xenografts in athymic mice). In addition, their injection increased the development of ascites in tumor-bearing mice. Fluorescent microscopy revealed an association between Hospicells and ovarian adenocarcinoma cells within the tumor mass. Tumors obtained by co-injection of Hospicells and human ovarian adenocarcinoma cells presented an increased microvascularization indicating that Hospicells could promote tumorigenicity of ovarian tumor cells *in vivo* via their action on angiogenesis [19]. In the present study we firstly focused on the direct effect of Hospicells on endothelial cell proliferation, migration and differentiation. As Hospicells did not interfere directly with angiogenesis, we analyzed the synthesis of cytokines, VEGF, IL-6 and IL-8, from adenocarcinoma cells, Hospicells, or both in combination. We found that these molecules were produced by specific tumor cells in the presence of Hospicells. Because they increase tumor progression whether the adenocarcinoma cells used [19], we looked for another partner of Hospicells involved in the tumor growth: macrophages [10,26]. Macrophages are involved in virtually each step of tumor progression, reaching from possible eradication of tumors to promoting invasiveness and metastatic spread. It has been shown that non-classically activated macrophages are abundant in ovarian tumors where they promote initial vascularization of the developing lesion and during metastases [27–29]. Macrophages infiltrating cancer tissues in various malignant tumors including ovarian adenocarcinomas are referred to tumor-associated macrophages (TAMs), which modulate the tumor microenvironment by suppressing anti-tumor immune reactions and inducing angiogenesis [30]. TAMs are generally considered to belong to the alternatively activated macrophages population

(M2) because of their anti-inflammatory functions. Macrophages in the ascites of advanced adenocarcinoma patients are polarized to M2 macrophages. Little is known about the molecules involved on the phenotypic polarization of TAM even if it is clear that M2-polarized TAM support tumor proliferation and that the density of M2-polarized macrophages is positively associated with a poor prognosis in patients with ovarian adenocarcinoma [30]. Cancer-derived factors could play an indispensable role in macrophages differentiation. Here, we evidenced a cell-to-cell interaction between primary macrophages and Hospicells. We showed that Hospicells are able to attract and activate macrophages to secrete huge quantities of pro-angiogenic cytokines, such as IL-6, IL-8 and VEGF, which are favorable to angiogenesis, tumor progression and acquisition of chemoresistance.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Hospicells [15,17,19] and CHN cells (human corneal Fibroblasts [31]) were obtained from M. Mirshahi (INSERM UMR 736). Human ovarian adenocarcinoma cell (HOAC) lines OVCAR-3, SKOV-3 and Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (ATCC® Numbers HTB-161, HTB-77 and CRL-1730) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). HOAC line IGROV-1 was a gift from the Institut Gustave Roussy, Villejuif [32,33]. HEK 293T cells were from qBioGen (France). Buffy-coats were obtained from the Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée as byproducts of the processing of blood donations from healthy volunteers that had signed a written informed consent. According to the French legislation, ethical committee approval is not necessary for the use of byproducts from blood donation provided that an informed consent was signed by the healthy volunteer. Human monocytes were isolated from fresh blood samples collected from different healthy donors. Peripheral blood monocytes were recovered from the mononuclear cell population as described previously [34]. HUVEC were cultured in coated plates with 0.2% gelatin from porcine skin (Sigma, USA), with endothelial cell growth medium (ECGM, Promocell, Germany) containing 5% of Fetal Calf Serum (FCS), supplemented with 5 ng/ml of EGF, 0.2 μ g/ml of hydrocortisone, 0.5 ng/ml of VEGF, 10 ng/ml of bFGF, 20 ng/ml of insulin-like growth factor (LongR3 IGF-1), 1 μ g/ml of ascorbic acid and 22.5 μ g/ml of heparine.

HEK293T, and Fibroblasts were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FCS, penicillin/streptomycin (100 IU/ml/100 μ g/ml) and 2 mM L-Glutamine (Cambrex biosciences). Hospicells, OVCAR-3, SKOV-3 and IGROV-1 cells were routinely cultured as described previously [19] in RPMI with 10% FCS. Cell lines were routinely checked for mycoplasma.

2.2. Generation of tumor cell spheroids

Spheroids were generated as previously described [35]. Briefly, confluent monolayers of ovarian cancer cells, Hospicells, and HUVEC were trypsinized. Corresponding numbers of cells are suspended in media containing 0.25% (w/v) methylcellulose (Sigma) and seeded in non-adherent round bottom 96-well plates (Greiner, Frickenhausen, Germany). Under these conditions, all suspended cells contributed to the formation of a single spheroids per well of defined size and cell number. Spheroids were cultured for at least 24 h and used for the corresponding assay.

2.3. Cell migration and invasion

To examine whether Hospicells induced HOAC migration, 24-well polycarbonate Transwell migration inserts (8 μ m pore size, BD Biosciences) were seeded with 2.5×10^4 Hospicells in 2% FCS/RPMI medium into the lower compartment. HOAC in 2% FCS/RPMI medium were added to each of the upper chambers and incubated at 37 °C for 20 h. Cells in the upper compartment were removed mechanically by scraping. Cells that migrated to the underside of the membrane were stained and counted under a 10 \times objective. The same experiments were performed with HOAC or HUVECs seeded in the lower compartment and Hospicells in the upper compartment to assess the migration of Hospicells towards HOAC or endothelial cells. All assays were done in triplicate. Experiments were repeated three times. For HUVECs migration, cells were serum-starved for 24 h, and a cell suspension containing 2.5×10^4 HUVEC cells in 5% FCS/RPMI was prepared and seeded into the upper chamber onto a polycarbonate filter coated with 1% gelatin. Cells seeded into the bottom chamber were one of the following: 5 spheroids of 5×10^3 HOAC or Hospicells or 5 spheroids of 2.5×10^3 HOAC and 2.5×10^3 Hospicells. Endothelial cells were allowed to migrate for 16 h. Cells that had migrated to the bottom of the membrane were stained with amidoblack solution (Sigma). Microscopy was used to count migrated cells.

2.4. Proliferation of HUVECs

To prepare conditioned media 10^6 of ovarian adenocarcinoma cells or 10^6 of Hospicells or 5×10^7 of both type of cells were seeded in 100 mm diameter Petri dishes (Falcon, Becton Dickinson) in ECGM with 5% of FCS for 48 h. Media were then collected and $0.22 \mu\text{m}$ filtered. Conditioned media have been used without dilution. 5000 HUVECs were seeded in gelatin-coated plates at day 0 in complete ECGM (medium with all supplements provided by the manufacturer). At day 1, media were replaced by conditioned media, and then changed every day. On days 3, 4, 5 and 7, a colorimetric assay of living cells using 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA) was performed.

2.5. *In vitro* angiogenesis assay

Five hundred HUVECs were used to make a single spheroid per well and spheroids were cultivated 2 days before being collagen embedded. Rat tail collagen (BD Biosciences) solution was prepared with PBS prior to use and then mixed with 1:1 volume of room temperature medium containing 48 spheroids (ECGM + 10% FCS or 48 h conditioned medium prepared in the same cell number conditions as HUVECs proliferation experiment in ECGM with 10% FCS and $0.22 \mu\text{m}$ filtered). 0.5% (w/v) methylcellulose was added to the mix to prevent sedimentation of spheroids prior polymerization of the collagen gel. The spheroids containing gels were rapidly transferred into pre-warmed 24-well plates. Gels were incubated at 37°C , 5% CO_2 , and 100% humidity. After 24 h, *in vitro* angiogenesis was digitally quantified by measuring the length of sprouts that grew out of each spheroid using digital imaging software (Olympus, Germany) analyzing at least 5 spheroids per experimental group and experiment.

2.6. Animals

Female Swiss athymic nude mice, 4–5-weeks-old (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed in filter-capped cages and kept in a sterile facility, which was maintained in accordance with the standards of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations in accordance with the AACR statement for the use of animals in cancer research. The Claudius Regaud Institute animal ethics committee approval was obtained for the use of the animal model and the study protocols. A 2-week quarantine period was imposed on all mice before starting the study.

2.7. Preparation of conditioned media for IL6, IL8 or VEGF quantification

10^6 adenocarcinoma cells, Hospicells or primary monocytes were seeded were seeded in 100 mm diameter Petri dishes (Falcon, Becton Dickinson) in RPMI with 10% of FCS for 48 h. Media were then collected, $0.22 \mu\text{m}$ filtered and stored at -20°C until used.

2.8. ELISA (Enzyme-like immunosorbent assay)

OVCAR-3, SKOV-3, IGROV-1 cells or primary monocytes were cultured in complete medium at 2.5×10^5 cells/well in 6-well culture plates together with 2.5×10^5 Hospicells or medium alone in a final volume of 1 mL. After 48 h of culture, supernatants were collected and frozen at -20°C until analysis. IL-6, IL-8 and VEGF were quantified using a specific ELISA (DuoSet[®] ELISA Development System (R&D Systems)) according to the manufacturer's protocol.

2.9. Detection of IL-6, IL-8 and VEGF in ascites from OC xenografts

Five mice per group received i.p. at day 0: group A: 5×10^7 genetically modified GFP expressing OVCAR-3 cells, group B: 5×10^7 genetically modified GFP expressing OVCAR-3 cells admixed with 5×10^7 Hospicells or group C: 5×10^7 genetically modified GFP expressing OVCAR-3 cells admixed with 5×10^7 CHN Fibroblasts. Tumor bearing animals were sacrificed at day 20 and ascites were collected.

2.10. Detection of Prosens[®] targeted macrophages in OC xenografts

Five mice per group received s.c. at day 0: group A: 10^7 genetically modified GFP expressing OVCAR-3 cells admixed with 10^7 Hospicells or group B: 10^7 genetically modified GFP expressing OVCAR-3 cells. Tumor bearing animals received 19 days after 2 nmol of Prosens[®] 18 h prior to analysis, as specified by the manufacturer (Perkin Elmer, France). Tumors were then removed and fixed in 3% PFA for 24 h, 3% PFA 20% sucrose for another 24 h. The tissue was then mounted in the optimum cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, NL), frozen at -55°C . Sections of $10 \mu\text{m}$ thickness were cut from the OCT compound blocks using a cryostat (Leica CM3050 S) at -20°C . DAPI staining in Moviol mounting medium was used for the visualization of cell nuclei. The histological sections of tumors were observed under a Leica DMIRB fluorescence microscope (Leica Microsystems) with an $100\times$ oil objective. GFP or Prosens fluorescence in the tumors was detected by selective excitation produced with a compact arc source (Leica Microsystems, Wetzlar) and a GFP filter (λ_{ex} :480/40; λ_{em} :527/30) or Cy5.5 filter (λ_{ex} :665/45;

λ_{em} :725/50) (Chroma Technology, Brattleboro, VT). High-resolution 16-bit images of 1392×1040 pixels were captured using a cooled CCD camera (coolSNAP-HQ2, Roper Scientific) and processed for contrast and brightness using MetaVue 6.2 software (Universal Imaging).

2.11. Detection of F4/80 mRNA on tumors

Total RNA was extracted from frozen tumors (OVCAR-3 cells or OVCAR-3/Hospicells injected 5 days before the sacrifice of the mice) using RNeasy mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. $2 \mu\text{g}$ of RNA was used to make cDNA using Iscript cDNA synthetics kit (Bio-Rad). Primers for the genes of interest as well as for the housekeeping gene β -actin were designed using the computer program Beacon Designer (Premier Biosoft). RT-PCR, qRT-PCR was performed using respectively Hot StarTaq master mix (Qiagen) and SYBR Green master mix (Bio-Rad Laboratories). Details and sequences of the primers are available upon request.

2.12. Statistical analysis

Student's two-sided *t* test was used to compare values of test and control samples. $p < 0.05$ indicated a significant difference.

3. Results

3.1. Mutual attraction between Hospicells and HOACs

Hospicells have been isolated due to their co-localization with tumor cells. MSCs as well as TAFs could attract tumoral cells and moreover, factors released by ovarian cancer cells may be potential mediators of stromal cell migration.

In order to evaluate the tropism of Hospicells for ovarian cancer cells (OVCAR-3, IGROV-1 or SKOV-3 cells) and *vice versa*, we performed *in vitro* migration assays using Transwell chambers. Immortalized human Fibroblasts (CHN) were also investigated. The migration of different cells was compared to that of cell line HEK 293T, known not to affect cell migration. As shown in Fig. 1A, all HOAC lines studied induced Hospicells migration (1.5–2-fold induction of the migration compared to the effect of the HEK 293T cells). In the same way, while Fibroblasts did not induce HOACs migration, Hospicells induced HOACs migration (1.5–2-fold induction compared to the effect on the HEK 293T cells) (Fig. 1B). Hospicells were also attracted toward themselves. This underlines a chemoattraction between Hospicells and HOACs. This chemoattraction could explain the fact that in previous studies we have shown that Hospicells could join HOACs *in vivo* when they are injected s.c. to the mouse 3 days after the injection of the HOACs [19] and the fact that in biopsies from patients with FIGO stage 3 and 4 ovarian cancer, a lot of Hospicells are visualized by immunohistochemistry around the adenocarcinoma cells [15].

3.2. Hospicells stimulated attraction of endothelial cells *in vitro*

Angiogenesis is a limiting step for tumor growth which involves different processes such as endothelial cell migration, proliferation and differentiation (for review see [36,37]).

In a previous study we noticed by immunohistochemistry that Hospicells could be found around the tumor near the vessels [19] suggesting a role of these cells on angiogenesis.

We determined here whether a chemoattraction existed between Hospicells and endothelial cells. Hospicells were able to slightly migrate to HUVECs *in vitro* (not shown, 1.2-fold induction). In ovarian cancer patients, the peritoneal cavity may contain ascites in which tumor cells can exist as floating single cells, multicellular aggregates and as an implanted tumor within the abdominal cavity. To reproduce these conditions, we used spheroids. HUVECs migrated towards Hospicells as well as HOACs (Fig. 1C). The combination Hospicells/HOAC did not allowed a better migration of the HUVECs than Hospicells alone (Fig. 1C). We highlighted a chemoat-

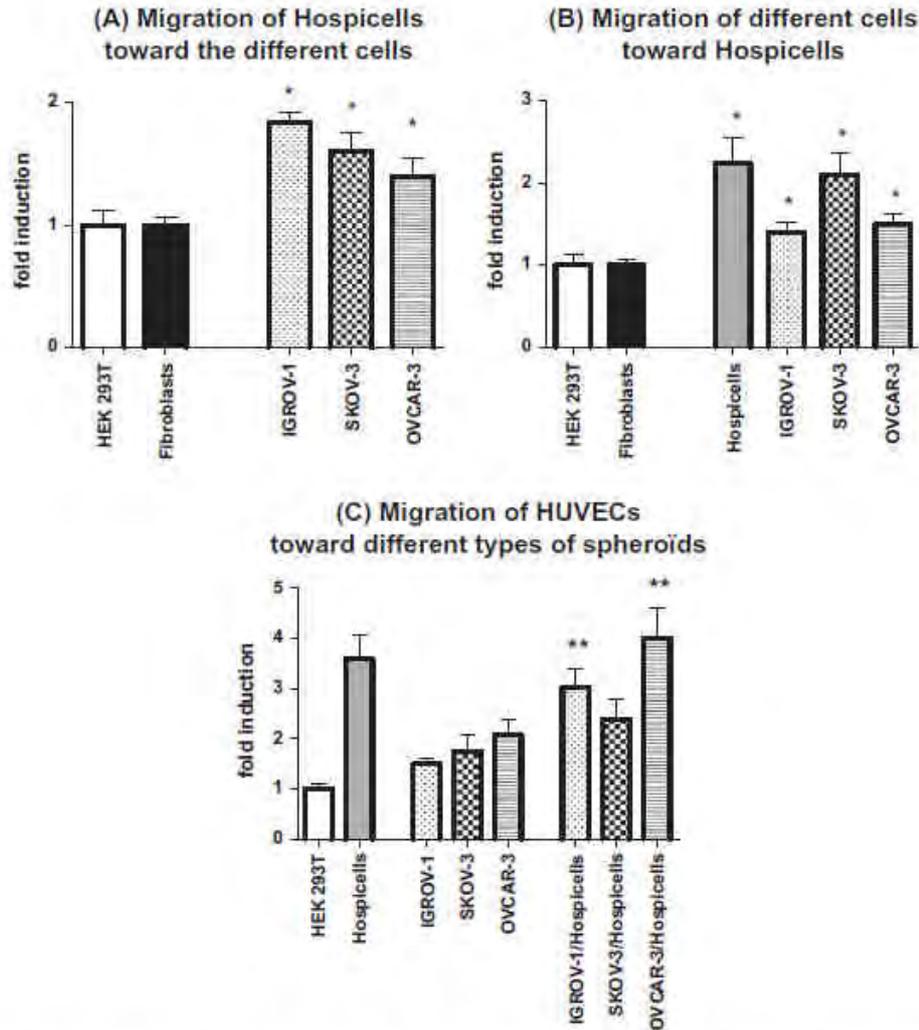


Fig. 1. Cell migration *in vitro*. The chemotaxis index (fold induction) was calculated as the ratio of the number of cells that migrated toward target cells to the number of cells that migrated toward HEK 293T cells. (A) Migration potentiality of Hospicells toward ovarian adenocarcinoma cells is analyzed using boyden chamber assay. * $p < 0.05$ versus HEK 293T. (B) Hospicells attraction abilities to ovarian adenocarcinoma cells are analyzed using boyden chamber assay. * $p < 0.05$ versus HEK 293T. (C) Homotypic Hospicells spheroids or heterotypic (Hospicells/ovarian adenocarcinoma cells) spheroids attraction potentiality to endothelial cells (HUVEC). All conditions are significantly different from HEK 293T condition ($p < 0.05$). ** $p < 0.005$ HUVEC migration toward heterotypic spheroids versus migration toward homotypic spheroids. Mean percentages of three independent experiments done in triplicate are shown. (Mean fold induction \pm SE).

traction between tumor cells and Hospicells which then could attract endothelial cells as well as other Hospicells.

3.3. HUVECs did not proliferate under Hospicells stimulation

Hospicells alone or in combination with HOACs were expected to over express many growth factors and consequently give a proliferation advantage to HUVECs. To evaluate this hypothesis, we used conditioned medium either from HOACs alone or mixed with Hospicells, as growth medium for HUVECs and analyzed the HUVEC's proliferation daily. As shown by Fig. 2A, HUVECs showed no or very little proliferation in HOACs' and/or Hospicells' supernatant. Hospicells did not induce endothelial cell proliferation when associated with cancer cells.

3.4. HUVEC differentiation potential of Hospicells \pm HOACs

The effect of Hospicells on endothelial cell differentiation was evaluated. Sprouting assays were performed in conditioned media from different cells or co-cultured cells as described in materials

and methods. We showed that neither ovarian cancer cells nor Hospicells induced endothelial cell differentiation (Fig. 2B). Fibroblasts (CHN) either alone or in co-culture with cancer cells were able to induce endothelial cell differentiation. Interestingly, when we used conditioned medium from co-cultured Hospicells, we observed a cell line dependent effect: SKOV-3 cells in co-culture with Fibroblasts as well as with Hospicells exhibited abilities to differentiate endothelial cells. Moreover, Hospicells, in co-culture with SKOV-3, promoted a strong endothelial cell differentiation as the sprouts mean length was equivalent to the positive control condition in which endothelial cells were surrounded by 25 ng/ml of VEGF and FGF-2.

3.5. Crosstalk between Hospicells and tumor cell lines *in vitro*

The SKOV-3 cell line dependent effect of Hospicells on endothelial cell differentiation could be related to cell crosstalk between HOACs (SKOV-3 cells) and Hospicells. As endothelial cell differentiation could be related to VEGF secretion, we first evaluated the VEGF concentration of the Hospicells's supernatant, of the adeno-

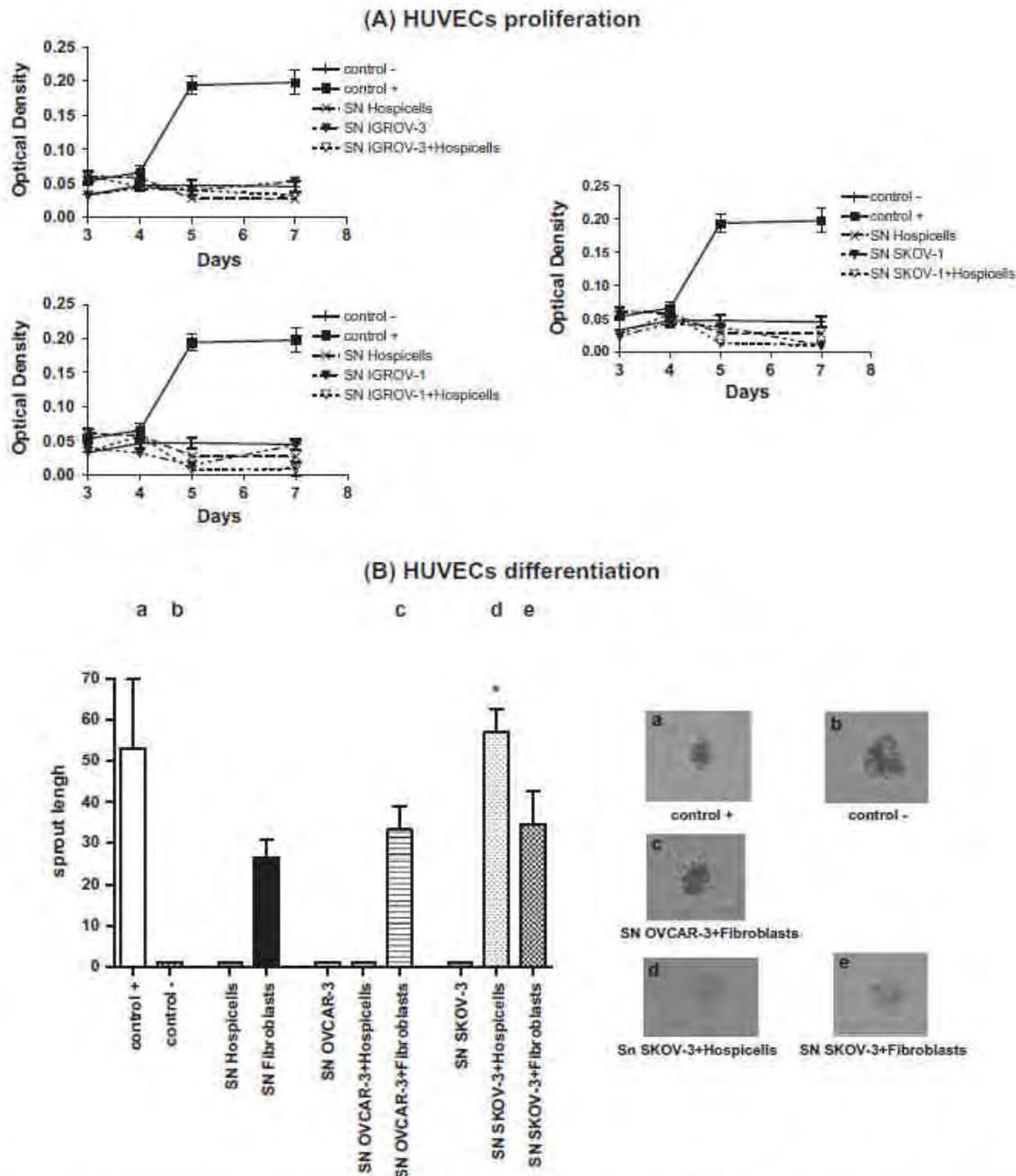


Fig. 2. Angiogenesis *in vitro*. HUVEC were stimulated with supernatants (SN) from different cells or combination of cells (ex. SN OVCAR-3 = OVCAR-3 supernatant). (A) *In vitro* assessment of the proliferative effect of Hospicells and/or ovarian adenocarcinoma cells. Optical density measurements of MTT colorimetric assay (living cells coloration) was used to determine HUVEC proliferation during 3–7 days. control –: ECGM + 5% FCS, control +: complete ECGM. (B) Sprouting assay of HUVEC spheroids stimulated with supernatants (SN) for 24 h. control –: ECGM + 5% FCS, control +: ECGM + 5% FCS + 25 ng/ml of VEGF + 25 ng/ml of FGF-2. Histogram shows cumulative angiogenic sprout length of 5 spheroids from one representative assay of three experiments. (Mean ± SD, * $p < 0.05$) and representative sprouting assay imaging from the condition a to e of the histogram.

carcinoma cells supernatant as well as of the co-culture's supernatants. Hospicells expressed few amount of VEGF (<2 pg/ml/10⁷ cells). OVCAR-3, SKOV-3 and IGROV-1 cells in culture synthesized 4, 1.5 or 10 ng of VEGF/ml/10⁷ cells/24 h, respectively. As shown in Fig. 3A, while we did not noticed an effect of Hospicells cultured with either OVCAR-3 or IGROV-1 cells on VEGF secretion, we observed an higher amount of VEGF in the supernatant (SN) of co-cultured SKOV-3 and Hospicells compared to supernatants of either SKOV-3 or Hospicells alone. There was a cell line dependent effect of the Hospicells and SKOV-3 co-culture upon VEGF secre-

tion. This enhanced VEGF synthesis could be related to the observed effect of Hospicells on endothelial cell differentiation when SKOV-3 and Hospicells were co-cultured (Fig. 2). In previous data [19] we have shown that Hospicells induced a tumor growth enhancement whichever HOAC line was used. Since other cytokines, such as IL-6 and IL-8, could also be involved in angiogenesis, we also evaluated the synthesis of these two pro-inflammatory molecules in the supernatants of HOACs, Hospicells and the combination of the two. Hospicells alone secreted a negligible quantity of IL-6 and IL-8 (<1 pg/mL) compared to OVCAR-3, IGROV-1 and

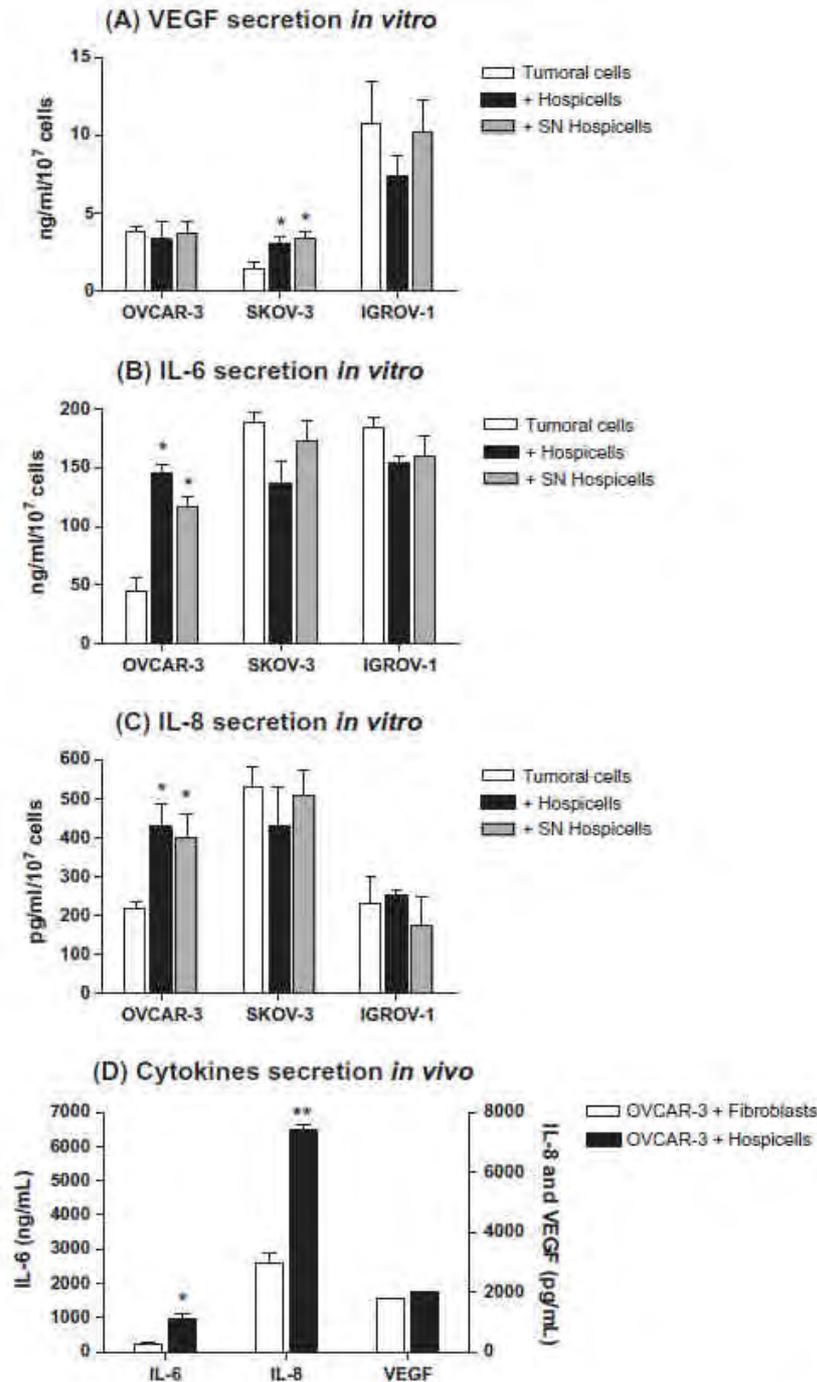


Fig. 3. Crosstalk *in vitro* and *in vivo* between ovarian adenocarcinoma cells and Hospicells. Ovarian adenocarcinoma cells (OVCAR-3, SKOV-3 or IGROV-1) were cultured alone or in combination with Hospicells (+ Hospicells) or in the presence of Hospicells' supernatants (+ SN Hospicells) during 24 h. VEGF (A), IL-6 (B) or IL-8 (C) concentrations were quantified using respectively a VEGF, IL-6 or IL-8 ELISA. For a graphic homogeneity, IL-6 and IL-8 concentrations for SKOV-3 and OVCAR-3 conditions respectively were divided per ten. Histogram shows means concentrations of three independent experiments done in triplicate (Mean \pm SE, A: * $p < 0.05$ B, C: * $p < 0.001$ versus tumoral cells.). (D) IL-6, IL-8 and VEGF concentrations in mice ascites collected 20 day after intraperitoneal injections of OVCAR-3 cells in combination with Hospicells or Fibroblasts were quantified using an ELISA. Histogram shows one representative assay done in triplicate (Mean \pm SD, * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ versus OVCAR-3 + Fibroblasts).

SKOV-3 cells (>50 ng/mL). When the OVCAR-3 cells were cultivated with Hospicells, a 3-fold and 2-fold increase in the quantity of IL-6 and IL-8 were observed, respectively (Fig. 3B and C). These data have revealed the existence, *in vitro*, of a crosstalk between OVCAR-3 cells and Hospicells resulting in increased secretions of IL-6 and IL-8. This effect is OVCAR-3 cell line specific because it was not observed with IGROV-1 and SKOV-3 cell lines, while a

co-culture of Hospicells and SKOV-3 cells induced a higher level of VEGF in the cell culture supernatant (Fig. 3A). As HOACs and Hospicells could secrete VEGF, IL-6 or IL-8, we next determined which cells were involved in the higher synthesis rate of these three molecules. For this purpose we first evaluated if supernatant from Hospicells culture could induce the secretion of IL-6, IL-8 or VEGF from HOACs and *vice versa*. Increased secretion of IL-6 and

IL-8 was observed when OVCAR-3 cells were cultivated with Hospicells supernatant (Fig. 3B and C). This implied that *in vitro*, Hospicells activate via at least one secreted factor, the OVCAR-3 cells to secrete an increased quantity of IL-6 and IL-8. We subsequently confirmed this observation by using cells transduced with a DNA construct encoding shRNA directed to the mRNA encoding IL-8 (Supplementary Fig. 2). The crosstalk between the two types of cells involved an effect of Hospicells on the adenocarcinoma cells which induced the synthesis of IL-6, IL-8 or VEGF.

3.6. *In vivo*

To investigate the existence of a crosstalk *in vivo*, we injected nude mice intraperitoneally with OVCAR-3 cells alone, with OVCAR-3 associated with Fibroblasts (CHN) or with OVCAR-3 cells associated with Hospicells. Three weeks post-injection, we collected tumor ascites developed by the mice and tested it for IL-6 and IL-8 concentrations. IL-6 and IL-8 levels were 2.5 and 3.75 higher, respectively, in mice injected with OVCAR-3 cells in combination with Hospicells, compared to mice injected with OVCAR-3 cells in combination with Fibroblasts. This implies that *in vivo*, the crosstalk between Hospicells and OVCAR-3 is as important as *in vitro*. As expected, similar to *in vitro*, if the presence of Hospicells induced an increase in VEGF expression we did not notice an increase in VEGF synthesis in ascites of mice implanted with a combination of Hospicells and OVCAR-3 cells compared to mice which received OVCAR-3 cells only (Fig. 3D).

3.7. Ovarian ascites-derived Hospicells could promote angiogenesis via activation of macrophages

The moderate effect of Hospicells on HOAC secretion of cytokines, which seems to be HOAC line specific, did not offer an explanation of the effects observed *in vivo* in previous work where we described that tumor development is largely increased in presence of Hospicells whether we injected OVCAR-3, IGROV-1 or SKOV-3 cells. Therefore, Hospicells must have another partner. In the context of the ovarian cancer microenvironment, inflammation is of great importance. Macrophages are known to invade the tumor stroma in many cancers as tumor-associated macrophages (TAMs) even though their role is incompletely understood. In order to evaluate the recruitment of macrophages induced by Hospicells, we used enzyme-targeted optical sensors (ProSense680) that are activated by cathepsins expressed by TAMs [38,39]. The probe generates far-red fluorescence when cleaved by cathepsin (B, L, S) and plasmin. As Hospicells do not express cathepsins (they do not present protease activity and are not labeled by ProSense680 (Supplementary Fig. 3)), fluorescence microscopy signals ω -localization by immunoreactive staining for cathepsin and macrophages or neutrophils. We noticed a protease activity distributed within tumors of adenocarcinoma/Hospicells while a very low protease activity was observed in tumors obtained with HOACs alone. We could figure an higher number of ProSense680-labeled macrophages in the presence of Hospicells rather than in their absence (Fig. 4A and B). The levels of expression of F4/80 mRNA were quantified

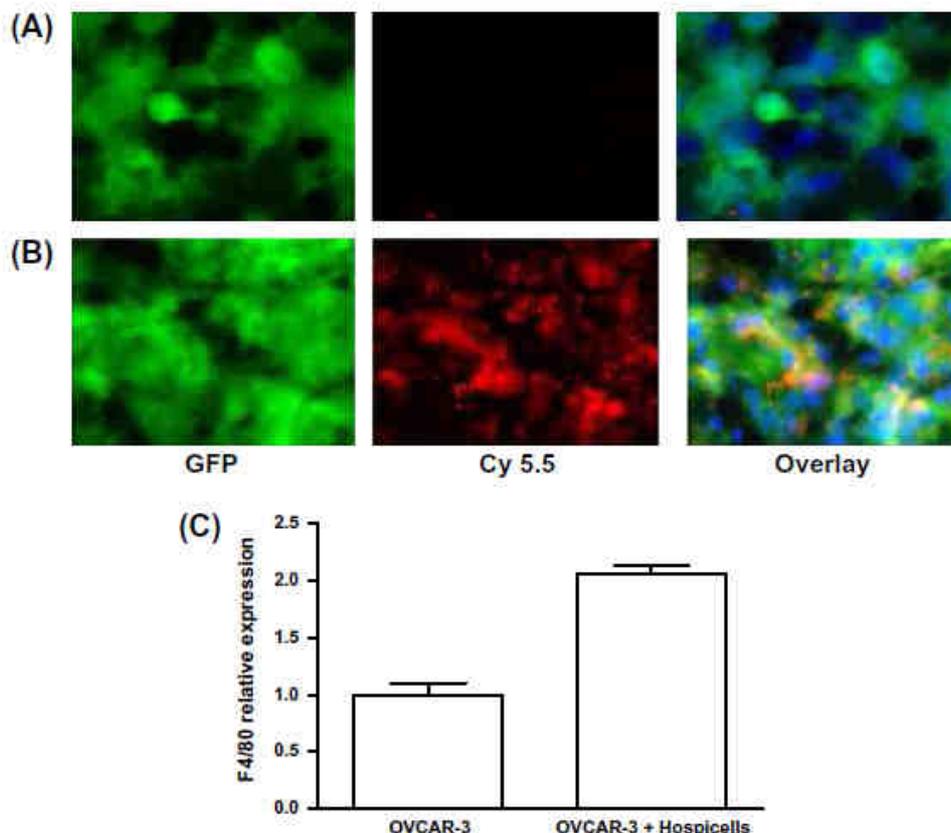


Fig. 4. *In vivo* fluorescence imaging using ProSense 680 for cathepsin activity and F4/80 mRNA quantification. Mice were injected with eGFP expressing adenocarcinoma cells \pm Hospicells. They developed solid tumors which were analyzed 20 days post-injection by fluorescence microscopy on histological section 24 h after ProSense 680 injection. Same results were obtained with OVCAR-3^{GFP}, SKOV-3^{GFP} and IGROV-1^{GFP} cells. Fluorescence imaging of ovarian tumors obtained by adenocarcinoma cells injection (A) or obtained by adenocarcinoma cells + Hospicells injection (B) are shown. eGFP expressing Tumor cells were detected with a GFP filter set (left) and the ProSense 680 was detected with a cy5.5 filter set (center). The merge of both pictures (right) was carried out to localize cathepsin activity. (C) Quantitative PCR (qPCR) was used to quantify F4/80 mRNA from tumors obtained by injection of OVCAR-3 alone or in combination with Hospicells. Results are expressed as relative F4/80 mRNA expression, means \pm s.e.m.; n = 3; ($P = 0.05$).

as an index of the accumulation of inflammatory cells (macrophages) in the tumors. We performed qRT-PCR analysis from mRNA extracted from frozen tumors obtained by injection of 10^7 OVCAR-3 alone or associated with 10^7 Hospicells using F4/80 primers. As showed Fig. 4C we detected a two fold increase in the F4/80 mRNA in tumors obtained with the association of OVCAR-3 cells and Hospicells than in tumors obtained with the injection of OVCAR-3 cells alone.

By immunohistochemistry using an anti CD68 antibody (1/15, Serotec) we detected a slight increase amount of macrophages on the tumors periphery when tumors were obtained through the injection of the association of Hospicells and OVCAR-3 cells than

on OVCAR-3 cells alone at day 5 post-injection as at day 20 (data not shown).

To study a possible interaction between Hospicells and macrophages, the protein levels of IL-6, IL-8 and VEGF in the supernatant from a co-culture of Hospicells and either monocytes or PMA-activated leukemia monocytic cell lines (macrophages) were determined. Monocytes alone secreted a negligible quantity of IL-6 and VEGF (<1 pg/mL) and a small quantity of IL-8 (<1 ng/mL). When the two cellular types were co-cultured, we observed a huge increase in the level of IL-6 (1 ng/mL), IL-8 (5 ng/mL) and VEGF (900 pg/mL) compared to cultures of each cell type alone (Fig. 5). Hospicells and macrophages (whether they are primary monocytes or PMA-activated leukemia monocytic cell lines (Fig. 5 and Supplementary Fig. 3)) were able to establish a crosstalk that resulted in an increased secretion of studied cytokines. In order to determine which cellular type was responsible for this increase, we cultured Hospicells or monocytes with supernatant from the other cell types. We observed the same elevation in IL-6 and IL-8 levels as described before when monocytes were cultured with Hospicells' supernatant. Thus, Hospicells release a soluble factor which triggers secretion of IL-6 and enhances secretion of IL-8 in monocytes. We did not notice an elevation of the VEGF secretion when monocytes were cultured in the presence of Hospicells supernatant while there was an elevation of the VEGF synthesis when monocytes and Hospicells were co-cultured. Only contact between the two cell types was able to trigger secretion of VEGF, thus implying that this contact initiates a signaling pathway resulting in increased secretion of VEGF by Hospicells or monocytes. Signaling pathways implied in VEGF secretion or IL-6/IL-8 secretion might be different.

4. Discussion

Human ovarian adenocarcinoma from grade 3 or 4 present high recruitment of Hospicells compared to grade 1 or 2 tumors, suggesting a role of Hospicells in tumor progression and chemoresistance [15]. This observation has been confirmed with breast cancer tumors [17]. In previous work, we showed that co-injection of Hospicells with different types of HOAC induced a high increase in tumor development in Nude mice. We demonstrated that Hospicells were localized around the tumor nodules and close to neovessels suggesting a role of Hospicells in angiogenesis [19]. Here, our goal was to determine whether Hospicells could have a direct impact on angiogenesis and to analyze their effects on endothelial cell migration, proliferation and differentiation. We highlighted a chemoattraction between tumor cells and Hospicells. Hospicells could then attract endothelial cells as well as other Hospicells.

We did not observe a direct effect *in vitro* of Hospicells on endothelial cells proliferation or differentiation. However, Hospicells are able to establish a crosstalk with tumor cells. One result of this interaction is the up regulation of VEGF synthesis by SKOV-3 HOAC. The supernatant from a co-culture of SKOV-3 cells and Hospicells was able to induce differentiation of the endothelial cells that could be induced by the VEGF secretion. As additional factors could have been involved, we performed an *in vivo* angiogenesis assay in the chick chorioallantoic membrane (CAM) as it provides a physiological setting to allow investigation of pro- and anti-angiogenic agent interactions. We evaluated the effect of co-injecting Hospicells and different HOACs on tumor angiogenesis. We revealed a slight induction of angiogenesis, dependent on cell line, for the co-injection of SKOV-3 and Hospicells (data not shown) suggesting that the Hospicells function depends on neighboring cells. We analyzed whether the presence of Hospicells could be related to secretion of pro-angiogenic factors from adenocarcinoma cells. VEGF, IL-6 and IL-8

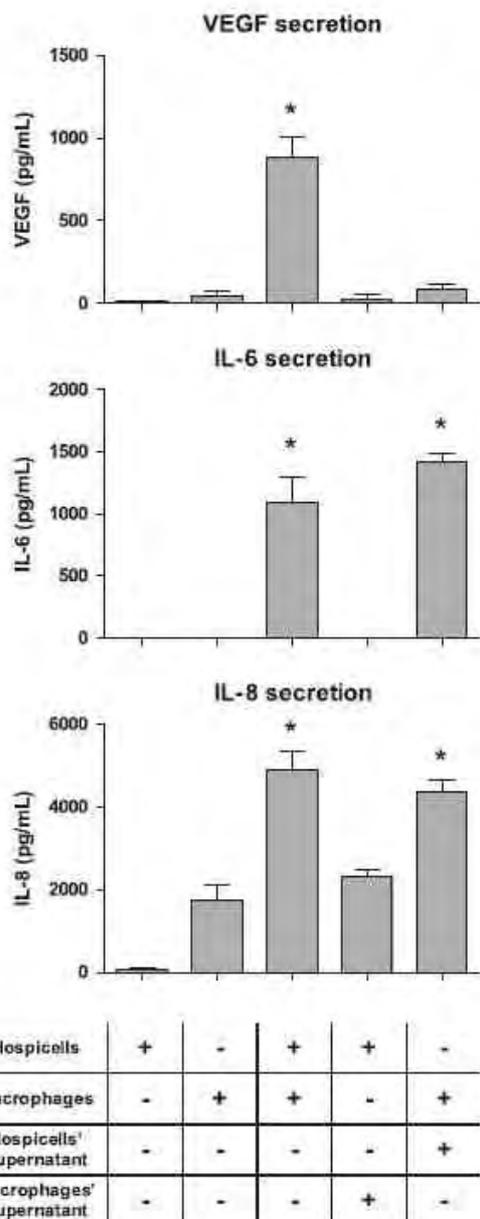


Fig. 5. *In vitro* crosstalk between Hospicells and Macrophages. Primary Monocytes were cultured alone (2nd bar) or in combination with Hospicells (+ Hospicells) (3rd bar) or in the presence of Hospicells supernatant (+Hospicells supernatant) (5th bar) during 24 h. Hospicells were cultured alone (1st bar) or in the presence of Monocytes supernatant (+ Macrophages supernatant) during 24 h. VEGF, IL-6 or IL-8 concentrations were quantified using respectively a VEGF, IL-6 or IL-8 ELISA. Histograms show one representative assay of three experiments. (Mean \pm SD, A: * $p < 0.05$, B: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, C: * $p < 0.05$).

were studied as these molecules have been involved in ovarian cancer progression [40] and chemoresistance [41]. Hospicells alone did not secrete a high amount of these factors but they induced adenocarcinoma cells to secrete such pro-angiogenic molecules. This effect is cell line dependent since Hospicells induced VEGF secretion from SKOV-3 cells and IL-6/IL-8 secretion from OVCAR-3 cells. We tried to determine the mechanism by which Hospicells induced VEGF secretion from SKOV-3 cells and IL-6/IL-8 secretion from OVCAR-3 cells. The cell line dependent cooperative interaction between Hospicells and HOAC is not related to common genetic mutations: p53 mutation is evident in SKOV-3 cells (p53 null) and OVCAR-3 cells (mutated p53); no p53 mutation in IGROV-1 cells; no KRAS mutations in any of the 3 HOAC cell lines. As OVCAR-3 cells are progesterone receptor positive (PR+) and estrogen receptor positive (RE+), we evaluated the effect of estrogens on cytokine secretion. Secretion of pro-angiogenic molecules was not induced by estrogens as the steroidal estrogen antagonist, designed to be devoid of estrogen agonist activity in preclinical models, ICI (Faslodex) did not inhibit IL-6 secretion in OVCAR-3 activated by Hospicells (Supplementary Fig. 5). TNF- α or IL-1 β appeared not to be involved, since these molecules were not detected in Hospicells, adenocarcinoma cells or in conditioned media from co-cultured cells (Supplementary Fig. 6). Due to the general effect on tumor progression induced by Hospicells *in vivo*, we investigated another cell partner of these cells. Using Prosens 680 agent we revealed a high cathepsin activity in tumors induced by the co-injection of HOACs with Hospicells; whichever HOAC tested (OVCAR-3, IGROV-1 or SKOV-3 cells). This suggests neutrophil and macrophage recruitment to the tumors. Several reviews report a correlation between the recruitment of M2-polarized macrophages to the tumor loci and bad prognosis for the patients [30,42,43]. Macrophages are involved in virtually every step of tumor progression, from possible eradication of tumors through to invasion and metastatic spread [27–29], therefore we investigated whether Hospicells could have an effect on macrophage activation. We showed that Hospicells induced macrophages to secrete huge amounts of VEGF, IL-6 and IL-8. This effect was observed with macrophages from each cell line tested (U937 and THP1, Supplementary Fig. 4) and from peripheral monocytes (Fig. 5). To our knowledge this is the first evidence of activation of macrophages by TAFs or MSC-like cells. Further performing a protein multiplex assay using the Luminex technology platform to investigate the presence of 42 human cytokines, chemokines and growth factors, Thibault et al. showed that some were markedly up-regulated comparing mono- or co-culture conditions. Most of them belong to a pro-inflammatory background. Most interestingly are the relatively high levels of IL-10, which is actually used *in vitro* to differentiate PBMC derived human Monocytes into M2 macrophages, which possess a kind of tumor associated macrophage (TAM)-like phenotype (Supplementary Fig. 7 and Thibault et al. on preparation).

Our data add to the emerging view that macrophages are critical inducers of angiogenesis in tumors, as previously shown by Brecht et al. [27]. The activation potency of Hospicells could imply different signaling pathways depending on the cells which are activated (VEGF secretion from SKOV-3 cells, IL-6/IL-8 secretion from OVCAR-3 cells, VEGF/IL-6/IL-8 secretion from macrophages). Several signaling pathways are potentially involved and currently under investigation. Takaishi et al. suggested that interactions between macrophages and ovarian cancer cells, through Stat3 activation, are important for the tumor microenvironment in ascites of advanced ovarian cancer patients [30]. Murdoch et al. [44] have described an activation of macrophages (VEGF secretion) via an activation of the hypoxia-HIF-1 α – VEGF pathway. This pathway could be implied in our study as Pasquet et al. have described an involvement of Hospicells in hypoxia [19]. In addition, Brecht et al. recently showed that apoptotic cells could stimulate macrophages

by the production of prostaglandin E2 (PGE2). This PGE2 production required Sphingosine Kinase 2 (SphK2) dependent sphingosine-1-phosphate (S1P) production which up regulates COX-2 [27]. This signaling pathway could be involved in Hospicells activated macrophages' model since Hospicells expressed high levels of COX-2. Also it has recently been shown that MSCs, which are cells related to Hospicells, could exert their immunomodulatory effects through a PGE2-mediated mechanism [45]. However this could only explain the effect of macrophages on endothelial cell migration since it was shown that PGE2, at least *in vitro*, exclusively induced endothelial cell migration without affecting their proliferation. The authors considered that factors secreted by unstimulated macrophages *per se*, were able to enhance endothelial cell proliferation, which was not likely further enhanced by PGE2 production after contact with apoptotic cells [27]. The implication of PGE2 production in the activation of macrophages by Hospicells will be evaluated using PGE2-neutralizing antibody in all models presented (Hospicells activated adenocarcinoma cells and Hospicells activated macrophages).

In this study, we suggested that there is a tri-directional cross-talk between Hospicells, adenocarcinoma cells and macrophages as has previously been suggested for tumor cells and TAFs [46]. This crosstalk is manifested by the fact that Hospicells induce the release of tumor-promoting cytokines from adenocarcinoma cells and macrophages which subsequently cause malignant cells to proliferate, migrate, and invade. The Hospicells-released cytokines also affect the tumor microenvironment, leading to increased angiogenesis and possibly to an elevated presence of cancer-supporting macrophages in tumors. Targeting interactions between Hospicells and macrophages or cancer cells has potential to improve ovarian cancer treatment efficiency.

Acknowledgements

We are grateful to Pr Francis Bayard, Pr Bernard Pipy and Dr. Agnes Coste for helpful discussions. Grant support: The Midi Pyrenees Region, the Groupe de Recherche Institut Claudius Regaud, the ANR (Agence Nationale de la Recherche: National research agency, project Biodendridots) and the RTRS (Reseau thematique de recherche et de soins (thematic network for research and treatments)). We are grateful to Proofreading and editing services were provided by AngloScribe, Clarensac.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.020>.

References

- [1] S. Vaughan, J.L. Coward, R.C. Bast Jr., A. Berchuck, J.S. Berek, J.D. Brenton, G. Coukos, C.C. Crum, R. Drapkin, D. Etemadmoghadam, M. Friedlander, H. Gabra, S.B. Kaye, C.J. Lord, E. Lengyel, D.A. Levine, I.A. McNeish, U. Menon, G.B. Mills, K.P. Nephew, A.M. Oza, A.K. Sood, E.A. Stronach, H. Walczak, D.D. Bowtell, F.R. Balkwill, Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 719–725.
- [2] S.A. Cannistra, Cancer of the ovary, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 2519–2529.
- [3] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, M.J. Thun, Cancer statistics, 2009, *CA, Cancer J. Clin.* 59 (2009) 225–249.
- [4] N. Colombo, T. Van Gorp, G. Parma, F. Amant, G. Gatta, C. Sessa, I. Vergote, Ovarian cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 60 (2006) 159–179.
- [5] R.C. Bast Jr., B. Hennessy, G.B. Mills, The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 415–428.
- [6] S. Zhang, C. Balch, M.W. Chan, H.C. Lai, D. Matei, J.M. Schilder, P.S. Yan, T.H. Huang, K.P. Nephew, Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors, *Cancer Res.* 68 (2008) 4311–4320.
- [7] O. Toutirais, A. Gervais, F. Cabilliac, M. Le Gallo, A. Coudrais, J. Leveque, V. Catros-Quemener, N. Genetet, Effects of CD40 binding on ovarian carcinoma

- cell growth and cytokine production in vitro, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 372–377.
- [8] E. Wang, Y. Ngalame, M.C. Panelli, H. Nguyen-Jackson, M. Deavers, P. Mueller, W. Hu, C.A. Savary, R. Kobayashi, R.S. Freedman, F.M. Marincola, Peritoneal and subperitoneal stroma may facilitate regional spread of ovarian cancer, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 113–122.
- [9] T.H. Wang, Y.H. Chan, C.W. Chen, W.H. Kung, Y.S. Lee, S.T. Wang, T.C. Chang, H.S. Wang, Paclitaxel (Taxol) upregulates expression of functional interleukin-6 in human ovarian cancer cells through multiple signaling pathways, *Oncogene* 25 (2006) 4857–4866.
- [10] T. Hagemann, J. Wilson, F. Burke, H. Kulbe, N.F. Li, A. Pluddemann, K. Charles, S. Gordon, F.R. Balkwill, Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype, *J. Immunol.* 176 (2006) 5023–5032.
- [11] A.E. Karnoub, A.B. Dash, A.P. Vo, A. Sullivan, M.W. Brooks, G.W. Bell, A.L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, R.A. Weinberg, Mesenchymal stem cells within tumor stroma promote breast cancer metastasis, *Nature* 449 (2007) 557–563.
- [12] W. Zhang, P. Huang, Cancer-stromal interactions: role in cell survival, metabolism and drug sensitivity, *Cancer Biol. Ther.* 11 (2011) 150–156.
- [13] O. Tredan, C.M. Galmirani, K. Patel, I.F. Tannock, Drug resistance and the solid tumor microenvironment, *J. Natl. Cancer Inst.* 99 (2007) 1441–1454.
- [14] L.A. Hazlehurst, T.H. Landowski, W.S. Dalton, Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death, *Oncogene* 22 (2003) 7396–7402.
- [15] A. Rafii, P. Mirshahi, M. Poupot, A.M. Faussat, A. Simon, E. Ducros, E. Mery, B. Couderc, R. Lis, J. Capdet, J. Bergalet, D. Querleu, F. Dagonnet, J.J. Fournie, J.P. Marie, E. Pujade-Lauraine, G. Favre, J. Soria, M. Mirshahi, Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours, *PLoS One* 3 (2008) e3894.
- [16] L. Martinet, R. Poupot, P. Mirshahi, A. Rafii, J.J. Fournie, M. Mirshahi, M. Poupot, Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses, *Int. J. Cancer* 126 (2010) 2143–2152.
- [17] R. Lis, J. Capdet, P. Mirshahi, M. Lacroix-Triki, F. Dagonnet, C. Klein, M. Mirshahi, J.J. Fournie, A. Rafii, M. Poupot, Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells, *Int. J. Oncol.* 37 (2010) 1453–1461.
- [18] R. Lis, C. Touboul, P. Mirshahi, F. Ali, S. Mathew, D.J. Nolan, M. Maleldi, S.A. Abdalla, C.M. Raynaud, D. Querleu, E. Al Azwani, J. Malek, M. Mirshahi, A. Rafii, Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12, *Int. J. Cancer* 128 (2011) 715–725.
- [19] M. Pasquet, M. Golzio, E. Mery, A. Rafii, N. Benabbou, P. Mirshahi, I. Hennebelle, P. Bourin, B. Allal, J. Teissie, M. Mirshahi, B. Couderc, Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis, *Int. J. Cancer* 126 (2010) 2090–2101.
- [20] C.H. Lee, B. Shah, E.K. Moiol, J.J. Mao, CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 3340–3349.
- [21] E.L. Spaeth, J.L. Dembinski, A.K. Sasser, K. Watson, A. Klopp, B. Hall, M. Andreeff, F. Marini, Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression, *PLoS One* 4 (2009) e4992.
- [22] P.J. Mishra, P.J. Mishra, R. Humeniuk, D.J. Medina, G. Alexe, J.P. Mesirov, S. Ganesan, J.W. Glod, D. Banerjee, Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells, *Cancer Res.* 68 (2008) 4331–4339.
- [23] K. McLean, Y. Gong, Y. Choi, N. Deng, K. Yang, S. Bai, L. Cabrera, E. Keller, L. McCauley, K.R. Cho, R.J. Buckanovich, Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 3206–3219.
- [24] S. Kidd, E. Spaeth, K. Watson, J. Burks, H. Lu, A. Klopp, M. Andreeff, F.C. Marini, Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma, *PLoS One* 7 (2012) e30563.
- [25] E.S. Jeon, H.J. Moon, M.J. Lee, H.Y. Song, Y.M. Kim, M. Cho, D.S. Suh, M.S. Yoon, C.L. Chang, J.S. Jung, J.H. Kim, Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells, *Stem Cells* 26 (2008) 789–797.
- [26] T. Hagemann, S.C. Robinson, R.G. Thompson, K. Charles, H. Kulbe, F.R. Balkwill, Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression, and angiogenesis, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 1993–2002.
- [27] K. Brecht, A. Weigert, J. Hu, R. Popp, B. Fisslthaler, T. Korff, I. Fleming, G. Geisslinger, B. Brune, Macrophages programmed by apoptotic cells promote angiogenesis via prostaglandin E₂, *FASEB J.* 25 (2011) 2408–2417.
- [28] B. Qian, Y. Deng, J.H. Im, R.J. Muschel, Y. Zou, J. Li, R.A. Lang, J.W. Pollard, A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth, *PLoS One* 4 (2009) e6562.
- [29] B.Z. Qian, J.W. Pollard, Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis, *Cell* 141 (2010) 39–51.
- [30] K. Takaishi, Y. Komohara, H. Tashiro, H. Ohtake, T. Nakagawa, H. Katabuchi, M. Takeya, Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation, *Cancer Sci.* 101 (2010) 2128–2136.
- [31] M. Mirshahi, S. Mirshahi, N. Golestaneh, C. Nicolas, Z. Mishal, K.C. Lounes, C. Hecquet, F. Dagonnet, Y. Poulliquen, M.K. Agarwal, Mineralocorticoid hormone signaling regulates the 'epithelial sodium channel' in fibroblasts from human cornea, *Ophthalm. Res.* 33 (2001) 7–19.
- [32] J. Benard, S.J. Da, M.C. De Blois, P. Boyer, P. DuVillard, E. Chiric, G. Riou, Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice, *Cancer Res.* 45 (1985) 4970–4979.
- [33] M.K. Le, H. Lincet, P. Marcelo, E. Lemoisson, N. Heutte, M. Duval, L. Poulain, J. Vinh, P. Gauduchon, B. Baudin, A proteomic kinetic analysis of IGROV1 ovarian carcinoma cell line response to cisplatin treatment, *Proteomics* 7 (2007) 4090–4101.
- [34] Z. Hou, D.J. Falcone, K. Subbaramaiah, A.J. Dannenberg, Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells: role of IL-1beta autoamplification, *Carcinogenesis* 32 (2011) 695–702.
- [35] B.M. Beckermann, G. Kallifatidis, A. Groth, D. Frommhold, A. Apel, J. Mattern, A.V. Salnikow, G. Moldenhauer, W. Wagner, A. Diehlmann, R. Saffrich, M. Schubert, A.D. Ho, N. Giese, M.W. Buchler, H. Friess, P. Buchler, I. Herr, VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma, *Br. J. Cancer* 99 (2008) 622–631.
- [36] P. Carmeliet, R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature* 407 (2000) 249–257.
- [37] R.H. Adams, K. Alitalo, Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 464–478.
- [38] M. Nahrendorf, D.E. Sosnovik, P. Waterman, F.K. Swirski, A.N. Pande, E. Aikawa, J.L. Figueiredo, M.J. Pitnet, R. Weissleder, Dual channel optical tomographic imaging of leukocyte recruitment and protease activity in the healing myocardial infarct, *Circ. Res.* 100 (2007) 1218–1225.
- [39] K.M. Bratlie, T.T. Dang, S. Lyle, M. Nahrendorf, R. Weissleder, R. Langer, D.G. Anderson, Rapid biocompatibility analysis of materials via in vivo fluorescence imaging of mouse models, *PLoS One* 5 (2010) e10032.
- [40] D. Lane, I. Matte, C. Rancourt, A. Ffche, Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients, *BMC Cancer* 11 (2011) 210.
- [41] Y. Wang, X.L. Niu, Y. Qu, J. Wu, Y.Q. Zhu, W.J. Sun, L.Z. Li, Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells, *Cancer Lett.* 295 (2010) 110–123.
- [42] T.M. Robinson-Smith, I. Isaacsohn, C.A. Mercer, M. Zhou, N. Van Rooijen, N. Hussein, M.M. McFarland-Mancini, A.F. Drew, Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice, *Cancer Res.* 67 (2007) 5708–5716.
- [43] K.A. Charles, H. Kulbe, R. Soper, M. Escorcio-Correia, T. Lawrence, A. Schultzeis, P. Chakravarty, R.G. Thompson, G. Kollias, J.F. Smyth, F.R. Balkwill, T. Hagemann, The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 3011–3023.
- [44] C. Murdoch, M. Muthana, S.B. Coffelt, C.E. Lewis, The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 618–631.
- [45] K. Chen, D. Wang, W.T. Du, Z.B. Han, H. Ren, Y. Chi, S.G. Yang, D. Zhu, F. Bayard, Z.C. Han, Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism, *Clin. Immunol.* 135 (2010) 448–458.
- [46] P. Mishra, D. Banerjee, A. Ben Baruch, Chemokines at the crossroads of tumor-fibroblast interactions that promote malignancy, *J. Leukoc. Biol.* 89 (2011) 31–39.

2.3. Figures supplémentaires

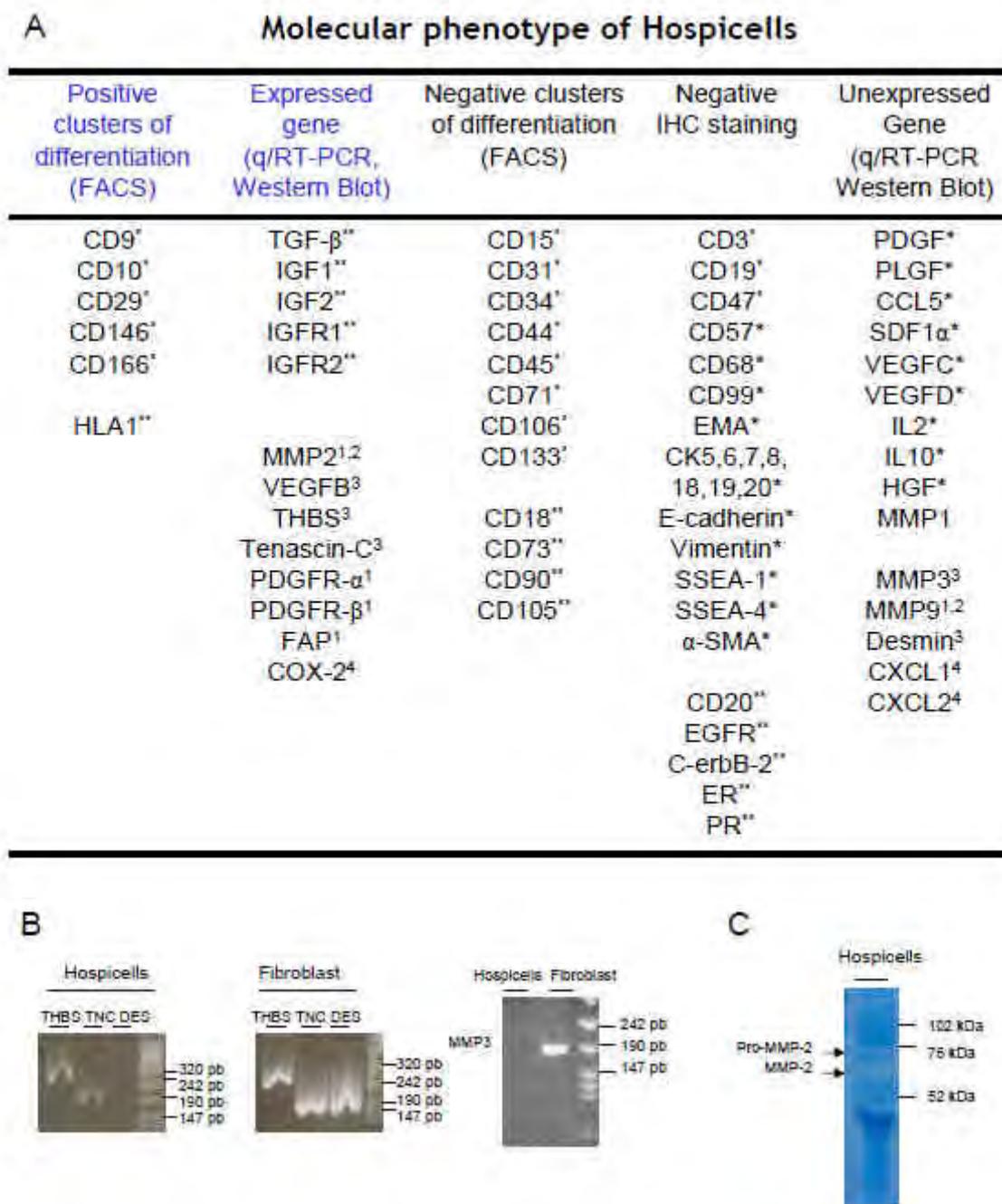


Figure supplémentaire 1 : Détermination du phénotype moléculaire des Hospicells

A : * sont issus de Rafii *et al.* (7), ** sont issus de Pasquet *et al.* (229)

Techniques utilisées pour étudier l'expression des différents facteurs : ¹ = Western Blot, ² = Zymographie, ³ = RT-PCR, ⁴ = qRT-PCR

B : L'expression de Thrombospondin (THBS), Tenascin-C (TNC), Desmin (DES) et Matrix metalloprotease-3 (MMP-3) sont étudiées dans les Hospicells et les fibroblastes par Reverse Transcription PCR et visualisées dans un gel d'agarose 1%. Les tailles attendues des amplicons sont respectivement de 287 pb, 205 pb, 210 pb et 186 pb.

C : Analyse de l'activité gélatinolytique des Hospicells. Les bandes blanches de 72 kDa et 62 kDa révèlent la présence de pro-MMP-2 et MMP-2 active. L'absence de bande blanche de 92 kDa indique que la pro-MMP-9 n'est pas présente.

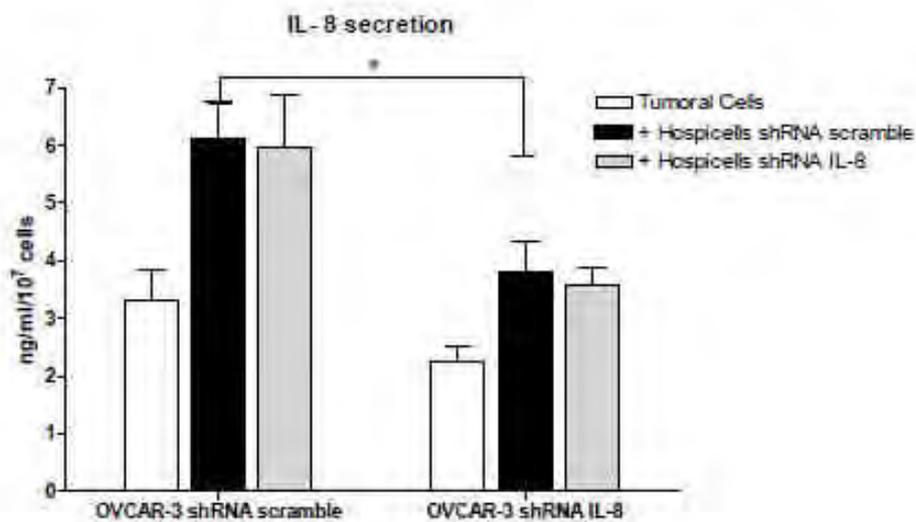


Figure supplémentaire 2 : Détermination du type cellulaire responsable de la sécrétion augmentée d'IL-8 dans le dialogue entre les cellules OVCAR-3 et les Hospicells

Les cellules OVCAR-3 transduites avec le shRNA scramble (OVCAR-3 shRNA scramble) ou les cellules OVCAR-3 transduites avec le shRNA dirigé contre l'IL-8 (OVCAR-3 shRNA IL-8) sont cultivées seules ou en association avec des Hospicells transduites avec le shRNA scramble (Hospicells shRNA scramble) ou des Hospicells transduites avec le shRNA dirigé contre l'IL-8 (Hospicells shRNA IL-8) pendant 48 heures. Les concentrations d'IL-8 sont quantifiées par la technologie ELISA. Les histogrammes représentent les concentrations moyennes de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. (Moyenne +/- Erreur Standard, * p < 0,05)

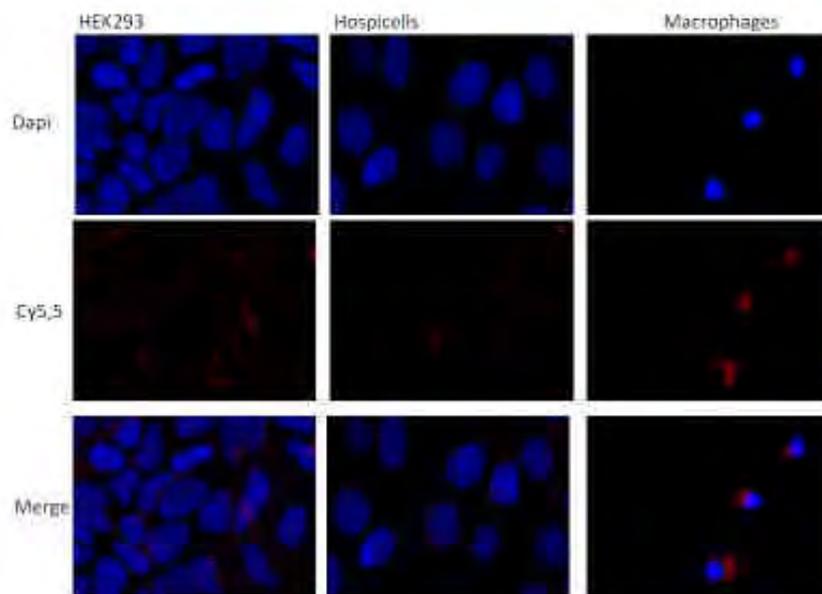


Figure supplémentaire 3 : Marquage ProSense680 *in vitro*

Les cellules contrôles (HEK 293), les Hospicells et les macrophages murins sont ensemencées sur des boîtes de pétri de 3,5 cm de diamètre au jour 1. 18 heures après, 8 µL de ProSense680 (0,16 nmoles) sont ajoutées aux cellules. 7 heures après, les cellules sont fixées puis analysées au microscope à fluorescence. ProSense680 est détecté avec un filtre Cy 5.5. La superposition de chacune des images a été réalisée pour localiser l'activité de la cathepsine.

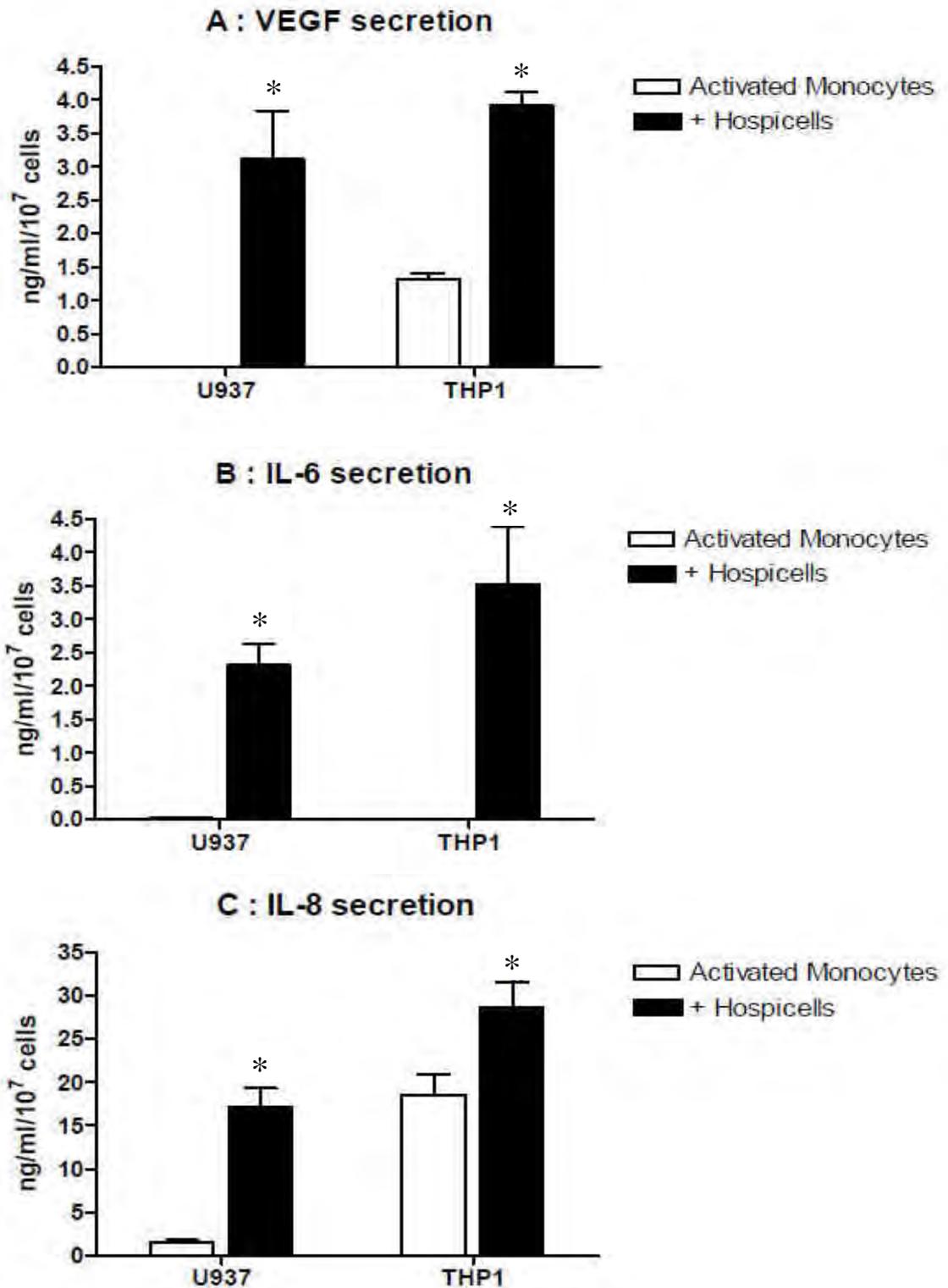


Figure supplémentaire 4 : Dialogue *in vitro* entre les Hospicells et les monocytes leucémiques activés par du PMA (U937 et THP-1)

Les monocytes leucémiques U937 et THP-1 activés par du PMA sont cultivés seules ou en association avec des Hospicells pendant 48 heures. Les concentrations de VEGF (A), d'IL-6 (B) et d'IL-8 (C) sont quantifiées en utilisant respectivement les technologies ELISA VEGF, d'IL-6 et d'IL-8.

Les Histogrammes montrent une expérience représentative de trois expériences. (Moyenne +/- Déviation Standard, * $p < 0,001$ comparé aux monocytes activés)

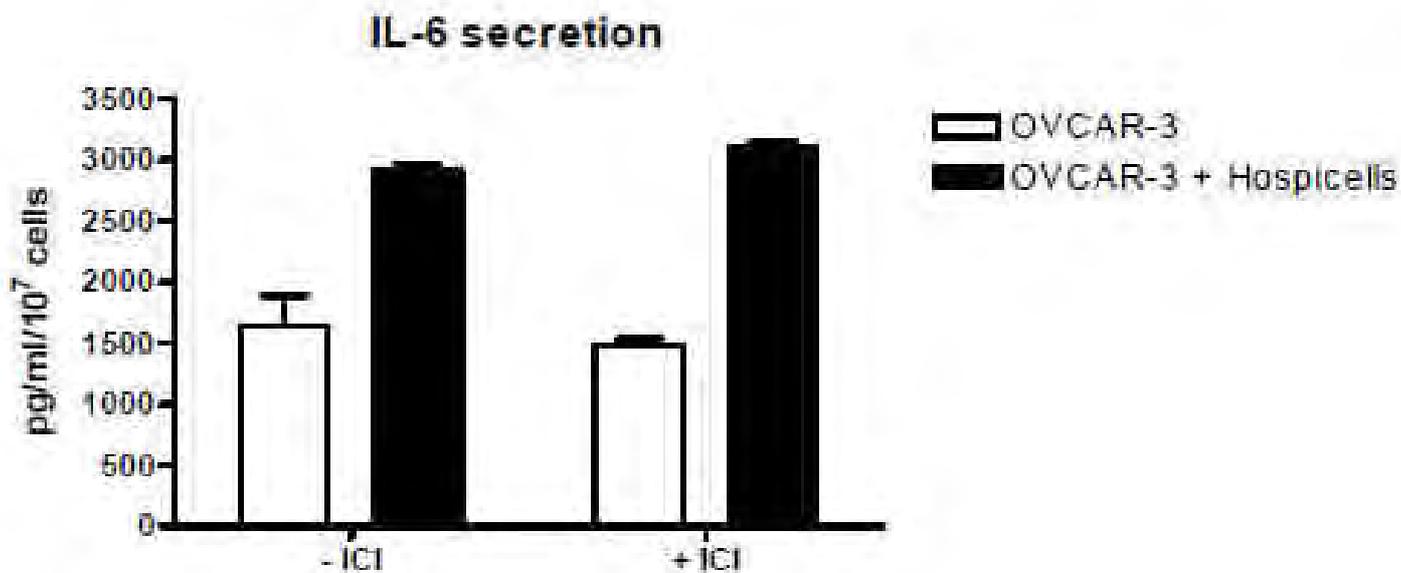


Figure supplémentaire 5 : Implication des œstrogènes dans le dialogue entre les cellules OVCAR-3 et les Hospicells

Les cellules OVCAR-3 sont cultivées seules ou en association avec des Hospicells dans un milieu sans œstrogènes (+ ICI) ou sans (- ICI) Faslodex, inhibiteur de l'expression du récepteur des œstrogènes à une concentration de 10^{-6} M pendant 48 heures. Les concentrations d'IL-6 sont quantifiées par la technologie ELISA. Les histogrammes montrent les concentrations moyennes de trois expériences indépendantes réalisées en triplicats. (Moyenne +/- Déviation Standard, * $p < 0,05$ comparé aux cellules OVCAR-3 cultivées seules)

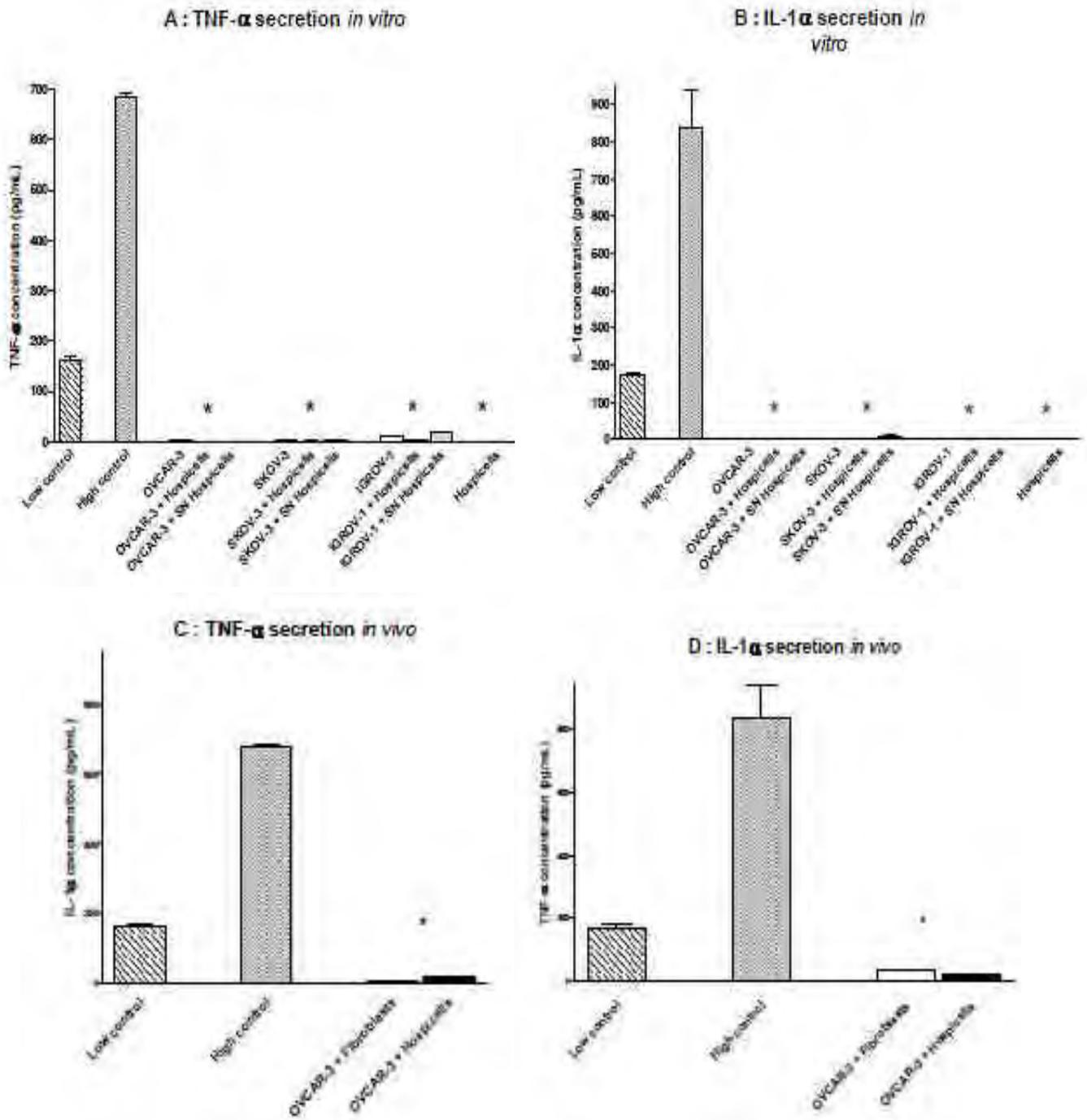


Figure supplémentaire 6 : Sécrétions *in vitro* et *in vivo* de TNF- α et d'IL-1 α dans les interactions entre les cellules tumorales ovariennes et les Hospicells

A et B : les cellules tumorales ovariennes (OVCAR-3, SKOV-3 et IGROV-1) sont cultivées seules ou en association avec les Hospicells (+ Hospicells) ou en présence de milieu conditionné par les Hospicells (+ SN Hospicells) pendant 48 heures. Les concentrations de TNF- α (**A**) et d'IL-1 α (**B**) sont quantifiées par la technologie Luminex. Les contrôles bas (Low control) et hauts (High control) sont deux contrôles internes à la technologie Luminex. Le Low control correspond à la valeur en dessous de laquelle la concentration de cytokine est négligeable. (Moyenne +/- Déviation Standard, * $p < 0,01$ comparé au Low control)

C et D : Les concentrations de TNF- α (**C**) et d'IL-1 α (**D**) dans les ascites de souris récupérées 20 jours après injection intrapéritonéale de cellules OVCAR-3 en association avec des Hospicells ou des fibroblastes sont quantifiées par la technologie Luminex. (Moyenne +/- Déviation Standard, * $p < 0,01$ comparé au Low control)

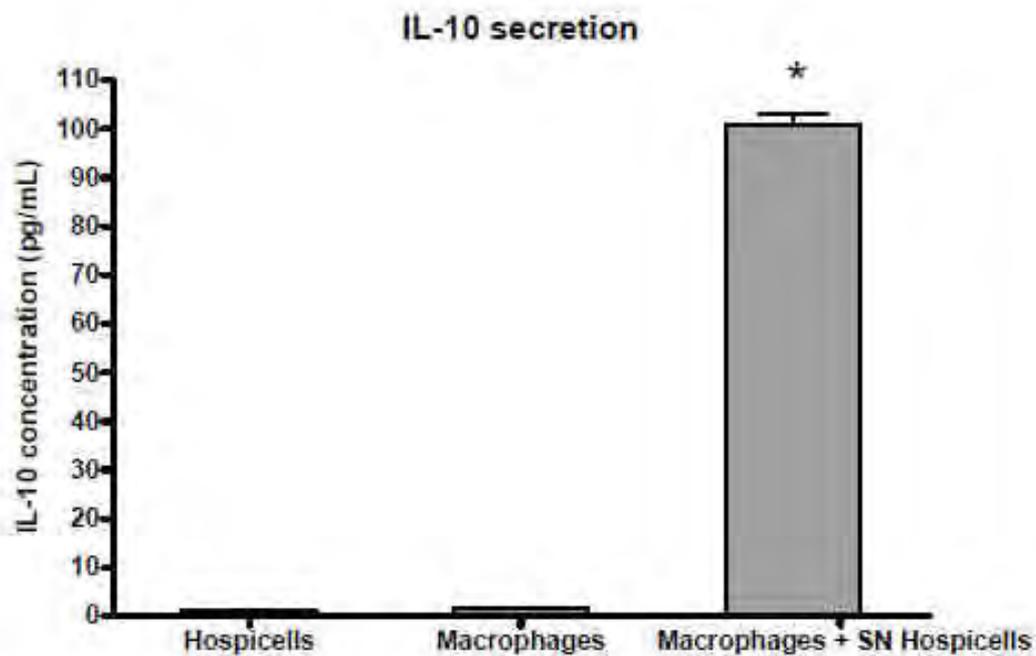


Figure supplémentaire 7 : Sécrétions *in vitro* d'IL-10 dans les interactions entre macrophages humains primaires et Hospicells

Les Hospicells sont cultivées seules (1^{er} histogramme) pendant 24 heures. Les macrophages humains primaires sont cultivés seuls (2^e histogramme) ou en association avec du milieu conditionné par les Hospicells (3^e histogramme) pendant 24 heures. Les concentrations d'IL-10 sont quantifiées par Luminex. (Moyenne +/- Déviation Standard, * $p < 0,01$ comparé aux Hospicells seules ou aux macrophages seules)

2.4. Discussion

Dans les travaux précédemment réalisés au sein de notre équipe, nous avons montré que les Hospicells sont capables de favoriser la croissance tumorale ovarienne. Dans ce travail, nous avons démontré que les Hospicells et les cellules tumorales ovariennes sont capables de chimiotactisme entre elles. Ces résultats permettent ainsi d'expliquer la co-localisation des Hospicells et des cellules tumorales ovariennes au sein des tumeurs et la capacité des Hospicells à rejoindre les cellules tumorales *in vivo* lorsqu'elles sont injectées en intra-péritonéal, chez la souris immunodéprimée, 3 jours après les cellules tumorales (9).

Afin de comprendre le mode d'action des Hospicells sur l'angiogenèse tumorale, nous avons étudié la capacité de ces cellules à activer la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales *in vitro*. Nous avons ainsi montré que les Hospicells seules ne sont pas capables d'induire la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales mais peuvent activer leur migration. Si les effets observés des Hospicells seules sont restreints, nous avons mis en évidence que ces cellules sont capables d'établir un dialogue lignée spécifique avec les cellules tumorales ovariennes. En effet, si les interactions entre les Hospicells et les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 et IGROV-1 sont capables d'entraîner la migration des cellules endothéliales, seule une co-culture entre des Hospicells et des cellules tumorales ovariennes SKOV-3 est capable d'induire la différenciation de ces cellules.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité des Hospicells à induire la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques, le VEGF, l'IL-6 et l'IL-8, par les cellules tumorales ovariennes (71, 77, 82, 83). Il a récemment été montré que l'IL-6 et l'IL-8 sont capables d'induire la résistance des cellules tumorales ovariennes au cisplatine et au paclitaxel, mettant ainsi en évidence l'intérêt d'étudier ces cytokines dans notre modèle (74, 230). Alors que les Hospicells sécrètent des quantités négligeables de ces cytokines, elles peuvent induire, indépendamment de tout contact cellulaire, la sécrétion de VEGF par les cellules SKOV-3 et d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules OVCAR-3 *in vitro*. De même, la quantité d'IL-6 et d'IL-8 est significativement plus importante dans les ascites de souris portant des tumeurs issues d'une co-injection de cellules OVCAR-3 et d'Hospicells comparé à une co-injection de cellules OVCAR-3 et de fibroblastes. La sécrétion de VEGF, induite par les Hospicells dans les cellules SKOV-3, permettrait notamment d'expliquer la capacité de ces deux types cellulaires, cultivés en association, à induire la différenciation des cellules endothéliales.

Nous avons ainsi démontré que les Hospicells sont capables d'induire la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques dans les cellules tumorales ovariennes de manière lignée tumorale spécifique, mettant ainsi en évidence des différences de réponse de ces cellules aux Hospicells. Les mutations génétiques communes telles que celles de p53 ou de KRAS n'ont pas permis d'expliquer ces différences. Etant donné que les cellules OVCAR-3 sont les seules lignées à exprimer le récepteur des

œstrogènes parmi celles étudiées, nous avons testé l'éventuelle implication de cette voie de signalisation cellulaire dans la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 induite par les Hospicells. L'incapacité du Faslodex, antagoniste et inhibiteur de l'expression du récepteur des œstrogènes, à inhiber la sécrétion d'IL-6 dans cellules tumorales OVCAR-3 induite par les Hospicells permet de conclure que cette voie de signalisation cellulaire n'est pas impliquée dans la sécrétion de cette cytokine par les cellules tumorales ovariennes (**Figure supplémentaire 5**). De même, l'absence de TNF- α et d'IL-1 α dans les milieux conditionnés par les cellules tumorales ovariennes, les Hospicells ou la co-culture des deux types cellulaires, permet de conclure que ces deux voies de signalisation cellulaire ne sont pas impliquées dans la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques induite par les Hospicells. Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo* où ces deux cytokines ne sont pas retrouvées dans les ascites de souris portant des tumeurs issues d'une co-injection de cellules OVCAR-3 et d'Hospicells (**Figure supplémentaire 6**). Il est indispensable de déterminer la ou les voies de signalisation cellulaire impliquées dans la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques induite par les Hospicells afin d'envisager une inhibition de ces effets sur la progression tumorale ovarienne. La recherche de ces voies fera l'objet de la quatrième partie de ces résultats de thèse.

Les Hospicells activent *in vitro* les cellules tumorales ovariennes de manière lignée spécifique alors que *in vivo*, la progression tumorale est activée par ces cellules quelle que soit la lignée cellulaire étudiée. Afin d'expliquer cette contradiction, nous avons cherché d'autres partenaires cellulaires potentiels des Hospicells au sein du microenvironnement tumoral. Nous avons ainsi montré que le marqueur Prosens 680 permet de révéler une forte activité cathepsine dans les tumeurs issues d'une co-injection de cellules tumorales ovariennes (lignées OVCAR-3, SKOV-3 et IGROV-1) et d'Hospicells comparé aux tumeurs issues d'une injection de cellules tumorales ovariennes seules. Ces données suggèrent que les Hospicells permettent un recrutement des macrophages et des neutrophiles au sein des tumeurs. Nous avons confirmé ce recrutement de macrophages en montrant que l'expression de F4/80, exprimé par les macrophages de souris, est deux fois plus importante dans les tumeurs issues de co-injection de cellules OVCAR-3 et d'Hospicells comparé aux tumeurs issues d'une injection de cellules OVCAR-3 seules.

Comme nous l'avons décrit précédemment (partie 2.9.8), les macrophages, et notamment le sous-type M2 et les macrophages associés aux tumeurs (TAMs), favorisent la progression tumorale ovarienne. Nous avons ainsi débuté l'étude du profil cytokinique des macrophages activés par les Hospicells. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux cytokines pro-angiogéniques étudiées précédemment. Nous avons montré que les Hospicells sont capables d'induire la sécrétion d'IL-6 et de favoriser la sécrétion d'IL-8 par les monocytes/macrophages humains primaires *via* un facteur sécrété. Les Hospicells induisent la sécrétion de VEGF par les monocytes/macrophages *via* un contact cellulaire. Ces résultats ont été confirmés avec les lignées de monocytes leucémiques U937 et

THP1 (**Figure supplémentaire 4**). Nous avons également mis en évidence que sous l'effet du milieu conditionné par les Hospicells, les monocytes/macrophages humains primaires sécrètent de l'IL-10, cytokine dont l'expression caractérise plutôt des macrophages pro-tumoraux de type M2 (213). Il est cependant nécessaire d'étudier en détail le profil cytokinique des macrophages activés par les Hospicells afin de définir plus précisément leur phénotype (M1, M2, TAM) et de déterminer leurs fonctions associées. En effet, les macrophages ainsi activés pourraient induire l'angiogenèse tumorale ovarienne ou encore le processus métastatique. L'étude du phénotype des macrophages activés par les Hospicells fait l'objet de la quatrième partie de ces résultats de thèse.

Le phénotype et l'origine des Hospicells, malgré des similitudes avec les MSCs ou les CAFs, demeurent encore inconnus. Au cours de ce travail, nous avons étudié l'expression et la sécrétion par les Hospicells de protéines impliquées dans des mécanismes tumoraux. Nous avons montré que les Hospicells expriment des marqueurs spécifiques des CAFs tels que la thrombospondine, FAP, la ténascine C et le PDGFR- α et β . Cependant, elles n'expriment pas la desmine ou α -SMA, communément employés pour décrire les CAFs (231). Les Hospicells sécrètent la MMP-2 sous sa pro-forme et sa forme active, indiquant la capacité potentielle de ces cellules à réguler la composition de la MEC et à moduler l'invasion des cellules tumorales ovariennes (133). Ces cellules expriment également la COX-2, enzyme permettant notamment la synthèse de prostaglandines dont les propriétés inflammatoires pourraient expliquer les effets des Hospicells sur la progression tumorale ovarienne. A l'issue de ces résultats et des données préalablement connues sur les homologies entre les MSCs/CAFs et les Hospicells, nous émettons l'hypothèse que ce type cellulaire constitue un stade de différenciation intermédiaire entre les MSCs et les CAFs.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence l'existence d'un modèle d'interaction tripartite entre les Hospicells, les cellules tumorales ovariennes et les macrophages. Les Hospicells induisent dans ces deux types cellulaires la sécrétion de cytokines pro-tumorales potentiellement responsables d'une augmentation de l'angiogenèse, de la croissance tumorale, du processus métastatique et de la chimiorésistance. Ces résultats indiquent l'importance d'étudier plus précisément le phénotype et l'origine des Hospicells, le profil des macrophages activés par ces cellules et leurs fonctions pro-tumorales potentiellement associées, et les voies de signalisation cellulaires impliquées dans cette activation. Nous avons ainsi mis en évidence un modèle original d'interactions entre deux types cellulaires du microenvironnement tumoral, les Hospicells et les macrophages, qu'il conviendrait de cibler afin d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer des ovaires.

3. Rôle des Hospicells sur l'activation des macrophages

3.1. Introduction

Nous avons montré que les Hospicells sont capables d'activer les macrophages qui sécrètent en retour des cytokines telles que l'IL-10, l'IL-6, l'IL-8 et le VEGF. Cependant, les connaissances sur le profil cytokinique des macrophages ainsi activés demeurent incomplètes et ne permettent pas de déterminer avec certitude l'appartenance de ces cellules à un sous-type M1, M2 ou TAM. Dans cette quatrième partie des résultats, nous étudierons la sécrétion de molécules impliquées dans des processus tumoraux ou dans la définition des macrophages.

3.2. Profil cytokinique des macrophages activés par les Hospicells

Afin de déterminer la nature des monocytes/macrophages humains primaires activés par les Hospicells, nous nous sommes intéressés à leur profil de sécrétion cytokinique après 48 heures de culture en présence de milieu conditionné par les Hospicells. Une analyse à haut débit réalisée par la technique Luminex nous a permis d'étudier l'éventuelle présence de 42 cytokines et chimiokines humaines impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules immunitaires mais aussi dans la définition du sous-type de macrophage.

Nous pouvons observer que les Hospicells entraînent la sécrétion de nombreuses cytokines associées aux macrophages M1 : IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 (forme p40 et p70), TNF- α , IFN- α 2, IFN- γ , MCP-1, IP-10 (IFN- γ -induced protein 10) et RANTES (Regulated and normal T cell expressed and secreted) (**Figure 15A**). Cependant, ces macrophages ainsi activés sécrètent également des cytokines régulièrement associées aux macrophages M2 et aux TAMs : IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, PDGF-AB et BB, TNF- α , TGF- β , MDC, MCP-1, MCP-3, eotaxin et Gro (213, 214, 232, 233) (**Figure 15B**).

Les Hospicells sont donc capables, indépendamment de tout contact cellulaire, de polariser les monocytes/macrophages humains primaires en un sous-type que nous qualifions de TAM-like, partageant des caractéristiques communes avec les macrophages de type M1 et M2. En effet, bien qu'il soit admis que les TAMs correspondent à un sous-type particulier de macrophages M2, des données récentes de la littérature s'accordent à dire qu'ils correspondraient en réalité à un phénotype hétérogène de cellules présentant des propriétés de macrophages M1 et M2 et dont les fonctions seraient pro-tumorales (234). Les TAMs constitueraient ainsi un phénotype hétérogène dont la plasticité serait soumise aux régulations du microenvironnement, permettant une activation de la progression tumorale et du processus métastatique.

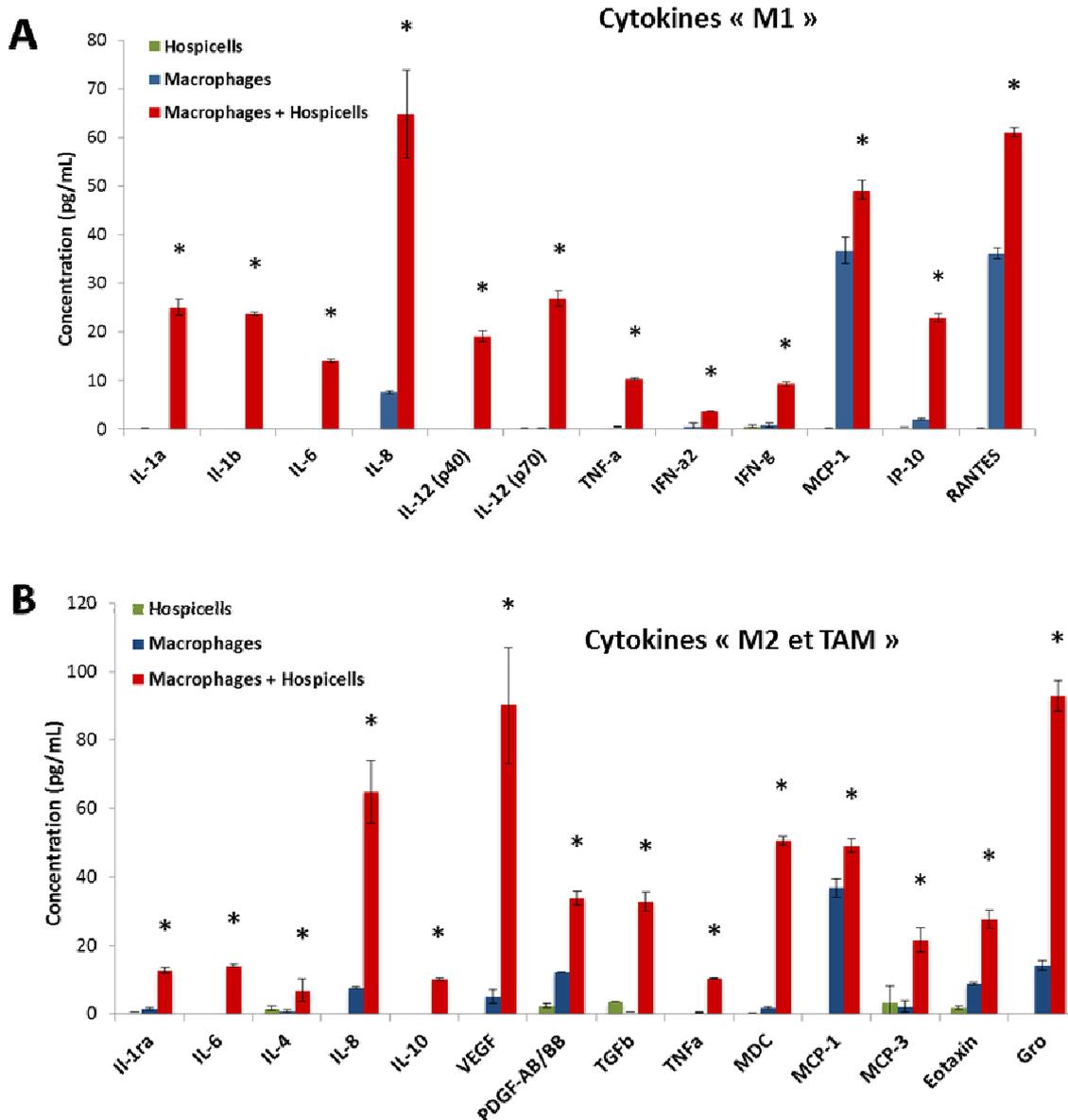


Figure 15 : Profil cytokinique des monocytes/macrophages actifs par les Hospicells

Des monocytes/macrophages humains primaires, des Hospicells ou des monocytes/macrophages humains primaires en présence de milieu conditionné par les Hospicells sont cultivés pendant 48 heures. Les concentrations en 42 cytokines/chimiokines humaines sont déterminées par technologie Luminex et représentées en fonction du sous-type de macrophage correspondant à leur sécrétion : M1 (A) et M2/TAM (B). Pour une homogénéité de représentation, les concentrations des cytokines suivantes ont été divisées par 10 : IL-1 α , IL-12 (p40 et p70), TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IP-10, RANTES, IL-10, PDGF AB/BB, MDC et les concentrations des cytokines suivantes ont été divisées par 100 : IL-1 β , IL-6, IL-8. (Moyenne +/- Déviation Standard, * p < 0,01 comparé aux Hospicells seules ou aux macrophages seuls)

Les macrophages activés par les Hospicells sécrètent de nombreuses chimiokines et cytokines impliquées notamment dans le recrutement des macrophages : MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-3, RANTES, IP-10, IL-10, VEGF et PDGF AB/BB (232, 235-240). Ces données pourraient corroborer les résultats obtenus *in vivo* montrant que les tumeurs ovariennes co-injectées en association avec des

Hospicells chez la souris présentent une infiltration de macrophages significativement plus importante que les tumeurs issues de l'injection de cellules tumorales ovariennes seules (241).

Ces chimiokines ainsi produites, ainsi que les facteurs tels que Gro, eotaxin, MDC, sont également impliquées dans le recrutement d'autres leucocytes tels que les lymphocytes ou les neutrophiles (236). Les Hospicells pourraient ainsi constituer, *via* l'activation des macrophages, un régulateur clé dans la composition du microenvironnement immunitaire dans le cancer ovarien.

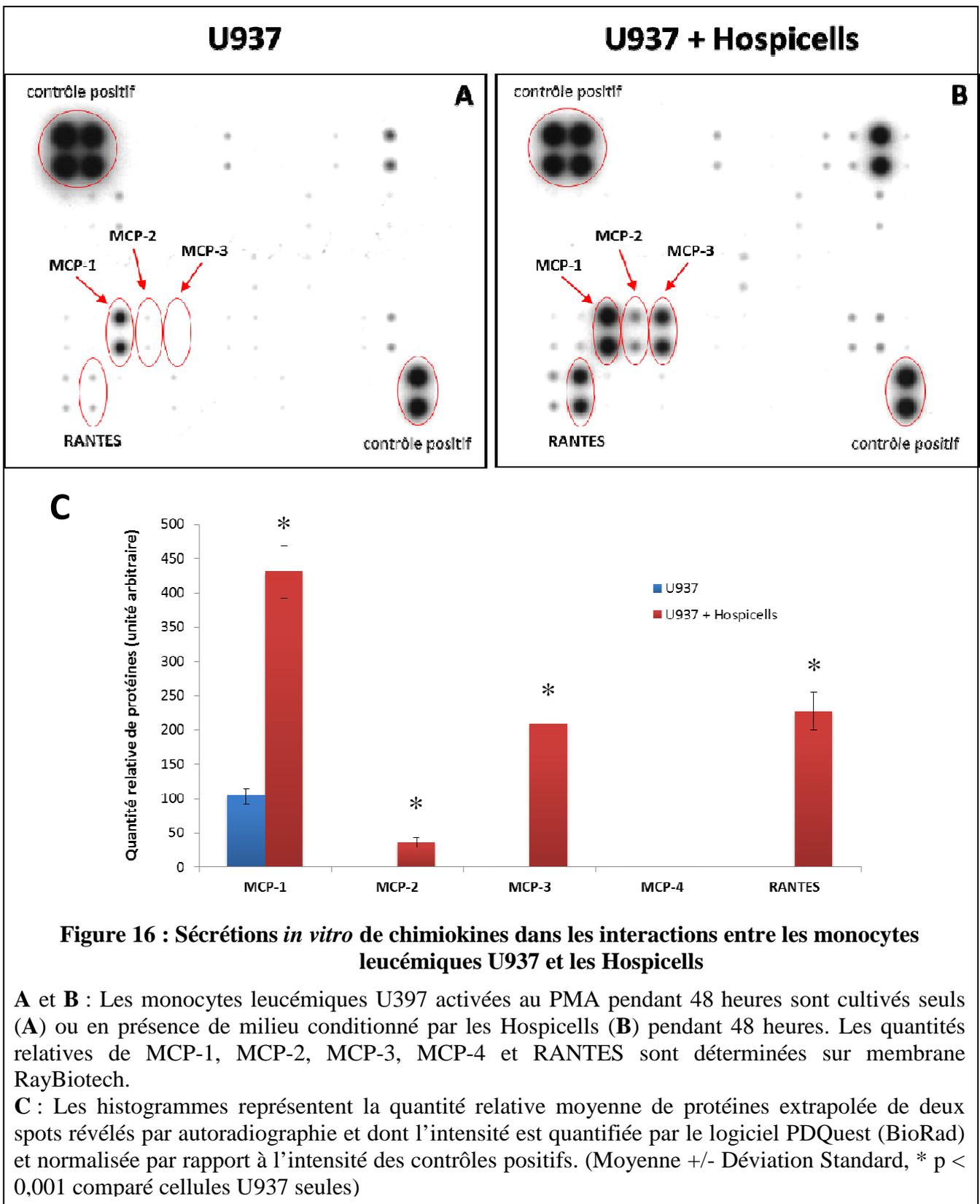
Les macrophages activés par les Hospicells sécrètent des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , le TGF- β et le VEGF, décrites précédemment comme impliquées dans la progression tumorale ovarienne et la chimiorésistance (introduction bibliographique, partie 2.2.2).

Nous émettons ainsi l'hypothèse que les Hospicells sont capables d'activer les macrophages en un phénotype hétérogène TAM-like. Ces macrophages ainsi activés sont capables de sécréter de nombreuses chimiokines permettant ainsi le recrutement de cellules immunitaires, notamment les macrophages, vers le site tumoral et pourraient être responsables des effets pro-tumoraux des Hospicells observés *in vivo*. Ces données corroborent ainsi les résultats obtenus *in vivo* montrant que les tumeurs ovariennes co-injectées en association avec des Hospicells chez la souris présentent une infiltration de macrophages significativement plus importante que les tumeurs issues de l'injection de cellules tumorales ovariennes seules (241).

Nous avons réalisé des expériences complémentaires visant à déterminer la capacité des Hospicells à induire la sécrétion de chimiokines dans les monocytes/macrophages. Pour des facilités de culture, nous avons utilisé des monocytes leucémiques U937 et THP1 activés 48 heures au PMA, cellules communément utilisées pour étudier la différenciation et la fonction des monocytes/macrophages. Par une méthode à haut débit permettant une détermination semi-quantitative de protéines présentes dans un surnageant de culture (membranes RayBiotech), nous avons déterminé le niveau de cytokines sécrétées par les cellules U937 et THP1 cultivées seules ou en présence de milieu conditionné par les Hospicells.

Nous pouvons observer que les Hospicells sont capables de multiplier par quatre la production de MCP-1 et d'entraîner une très forte sécrétion de MCP-2, MCP-3 et RANTES dans les cellules U937 bien que la libération de MCP-4 ne soit pas modifiée (**Figure 16**). Cependant, les cellules THP1 ne produisent pas ces mêmes facteurs en réponse au milieu conditionné par les Hospicells (résultats non montrés). Ces chimiokines sont hautement impliquées dans le recrutement des leucocytes tels que les monocytes/macrophages (239). Il a notamment été montré que MCP-1 pourrait contribuer à l'accumulation des TAMs dans le cancer ovarien (242). Ces chimiokines peuvent également contribuer directement à la régulation de la progression tumorale. En effet, MCP-1 peut activer de façon directe l'angiogenèse tumorale en se liant à son récepteur CXR2 sur les cellules endothéliales (243). De

même, il a été montré que RANTES peut favoriser la migration des cellules cancéreuses de la cavité buccale par l'augmentation de la production de MMP-9 et activer la progression tumorale dans le cancer du sein (244, 245).



De plus, les Hospicells sont capables d'activer la sécrétion, bien que de façon plus minoritaire comparé aux protéines étudiées ci-dessus, d'autres chimiokines telles que le pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC), neutrophil-activating protein-2 (NAP-2) et I-309 impliquées le recrutement de leucocytes (résultats non montrés) (246-248).

Ces résultats confirment le rôle des Hospicells dans la composition du système immunitaire. En effet, si ces cellules ne sont à priori pas capables de sécréter des chimiokines, leur action sur l'activation des monocytes/macrophages permet d'entraîner de façon indirecte le recrutement de macrophages et d'autres leucocytes. De plus, ces effets sur l'activation des macrophages pourraient expliquer les rôles des Hospicells dans la progression tumorale ovarienne.

3.3. Rôle des Hospicells sur le recrutement des macrophages

Nous avons montré que les Hospicells sont capables d'entraîner *in vivo* le recrutement de macrophages au sein des masses tumorales (9). De plus, nous avons mis en évidence que des monocytes/macrophages humains primaires et des monocytes leucémiques U937 activés par les Hospicells sécrètent de nombreuses chimiokines impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires, notamment les macrophages. Nous avons ainsi cherché à déterminer si les interactions établies entre les Hospicells et les monocytes U937 pouvaient entraîner la migration d'autres monocytes.

Nous avons réalisé des tests de migration en chambre de Boyden permettant de tester la capacité des cellules THP1 et U937 activées au PMA à migrer vers ces mêmes cellules cultivées seules ou en présence d'Hospicells. Les Hospicells cultivées seules ne sont pas capables d'entraîner un recrutement de ces monocytes supérieur à notre contrôle négatif (cellules HEK 293T, résultats non montrés). Nous pouvons observer que l'association de cellules THP1 et d'Hospicells ne permet pas d'entraîner une augmentation de la migration de nouvelles cellules THP1 (**Figure 17A**). Au contraire, la co-culture de cellules U937 et d'Hospicells entraîne une augmentation significative du recrutement de cellules U937 par rapport à ces cellules cultivées seules (**Figure 17B**).

Ces résultats peuvent être corrélés aux sécrétions de chimiokines observées précédemment. En effet, nous avons montré que les interactions entre les cellules U937 et les Hospicells permettent la sécrétion de protéines telles que les MCP (1, 2 et 3) et RANTES, impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires. Cette sécrétion de chimiokines pourrait ainsi expliquer la capacité des Hospicells à induire *in vitro* le recrutement de cellules U937. De même, nous pourrions justifier l'incapacité des Hospicells à induire le recrutement de cellules THP1 par leur inaptitude à entraîner la sécrétion de ces mêmes chimiokines dans ces cellules.

Nous pouvons ainsi conclure que les Hospicells pourraient entraîner la sécrétion de chimiokines par certains monocytes/macrophages (cellules U937 activées au PMA), induisant ainsi le recrutement

d'autres cellules immunitaires vers ces deux types cellulaires. Par extension, nous émettons l'hypothèse que *in vivo*, les Hospicells n'auraient pas d'effet direct sur le recrutement de macrophages au sein des masses tumorales. Cependant, elles seraient capables d'activer les macrophages déjà présents dans les tumeurs, permettant la migration de nouvelles cellules immunitaires vers le site tumoral.

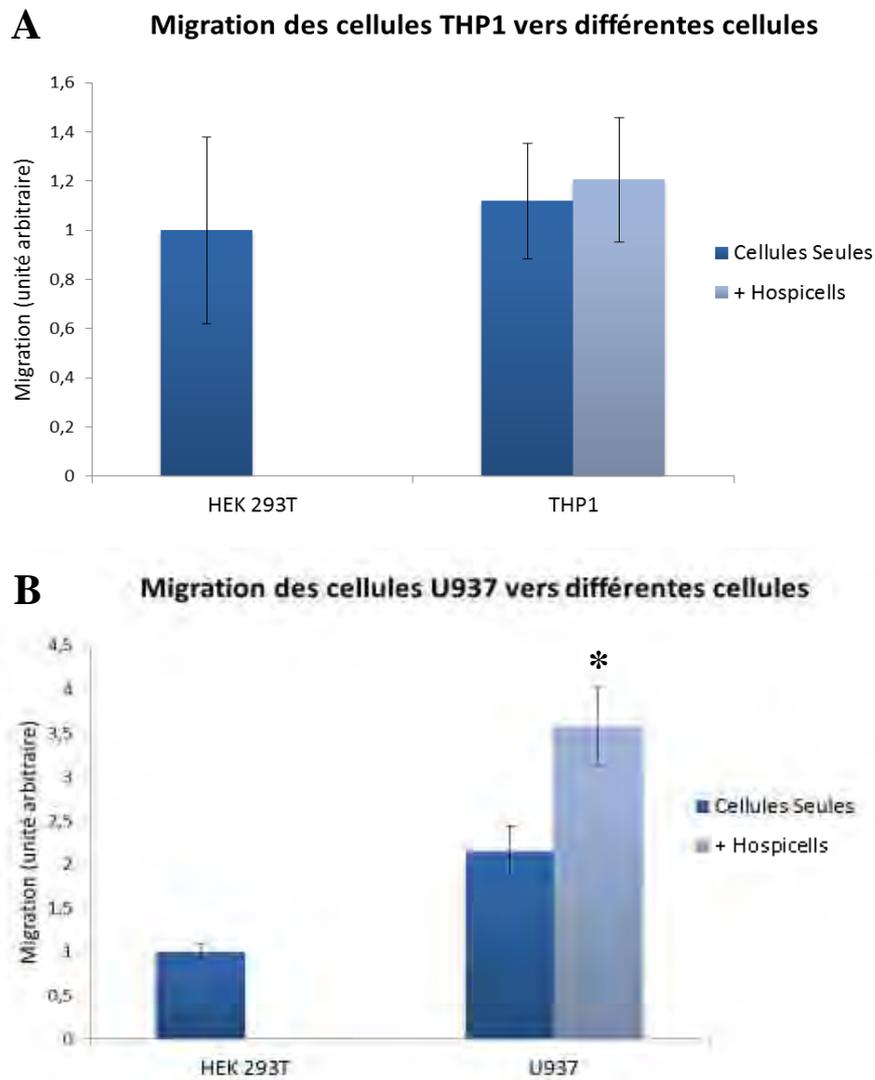


Figure 17 : Test de migration de monocytes leucémiques *in vitro*

La capacité de monocytes leucémiques THP1 et U937 activés par du PMA à migrer vers d'autres cellules est évaluée à l'aide de chambres de Boyden. Des monocytes leucémiques THP1 ou U937 sontensemencés dans l'insert. Des cellules HEK 293T (contrôle négatif), des monocytes leucémiques THP1 (A) ou U937 (B) activés par du PMA sontensemencées seules ou en association avec des Hospicells dans les puits. Chaque condition est réalisée en triplicat. Les cellules ayant migré sont estimées par microscopie optique en comptant 9 champs par condition. Le potentiel de migration est exprimé en valeur arbitraire où le nombre de monocytes leucémiques (THP1 ou U937) ayant migré vers les cellules HEK 293T est fixé à un. (Moyenne +/- Déviation Standard, * $p < 0,001$ comparé à la migration vers les monocytes leucémiques seuls)

4. Voies de signalisation impliquées dans l'activation des cellules tumorales ovariennes et des macrophages par les Hospicells

4.1. Introduction sur les voies de signalisation étudiées

Au cours des études précédentes, nous avons mis en évidence que les Hospicells sont capables d'entraîner la sécrétion de cytokines pro-tumorales par les cellules tumorales ovariennes et de polariser les monocytes/macrophages. Afin de mieux comprendre le mode d'action des Hospicells et d'envisager d'inhiber leurs effets, il est nécessaire de déterminer les voies de signalisation cellulaire impliquées dans les rôles pro-tumoraux de ces cellules.

Pour commencer cette étude, nous nous intéresserons aux voies potentiellement impliquées dans la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF par les cellules tumorales ovariennes et les macrophages. Nous avons d'ores et déjà montré que le TNF- α et l'IL-1 α ne sont pas sécrétés par les Hospicells et ne peuvent donc pas induire la synthèse de ces cytokines. De plus, nous avons démontré que les œstrogènes ne sont pas impliqués dans la synthèse d'IL-6 par les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 (241).

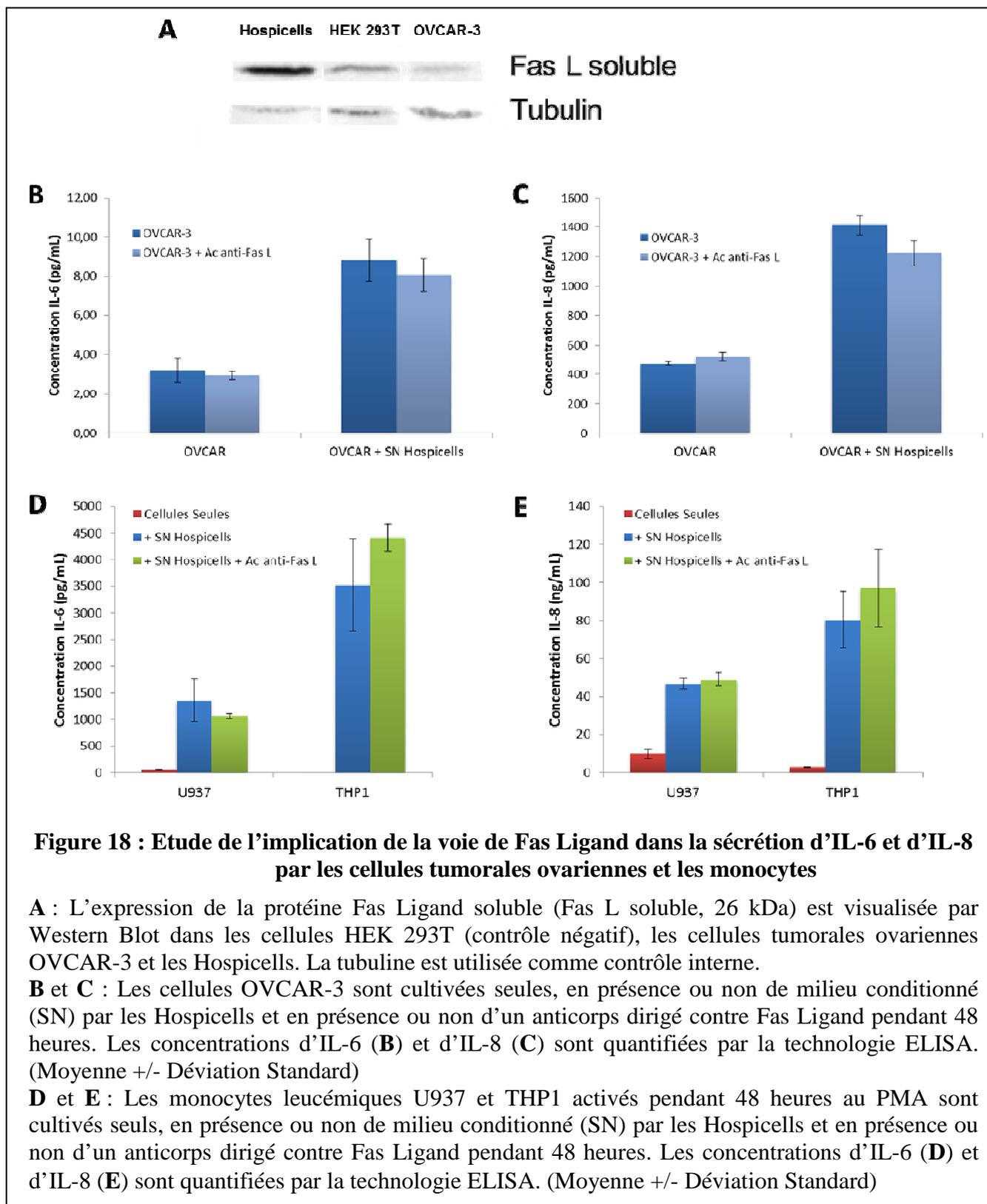
Comme l'avons décrit précédemment (introduction bibliographique, partie 2.2.1), le LPA est un lipide bioactif impliqué à tous les niveaux de la progression tumorale ovarienne. Ce facteur, sécrété par les cellules tumorales et de nombreuses cellules stromales, est impliqué dans la synthèse d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF par les cellules tumorales ovariennes (46, 47, 249). Cependant, nous avons montré que les Hospicells ne produisent pas de LPA et que l'inhibition de ses récepteurs LPA₁ et LPA₃ par un inhibiteur spécifique (Ki16425) dans les cellules tumorales ovariennes ne permet pas d'inhiber la synthèse de cytokines induite par les Hospicells (résultats non montrés).

Nous nous sommes intéressés à d'autres voies de signalisation : Fas Ligand, S1P, NO et COX-2 afin d'étudier leur implication dans les interactions entre les Hospicells, les cellules tumorales et les monocytes/macrophages.

4.2. Voie de Fas Ligand

La liaison de Fas Ligand (ou CD95L), sous sa forme membranaire ou soluble, à son récepteur Fas (ou CD95) a d'abord été décrite comme induisant l'apoptose par la voie extrinsèque (250). Cependant, des données récentes indiquent que cette voie pourrait être responsable d'une activation de la croissance tumorale (251). En effet, bien que les cellules tumorales ovariennes expriment le récepteur Fas, ces dernières sont résistantes à la mort cellulaire induite par la fixation de son ligand (252). De plus, il a été montré que le Fas Ligand est responsable d'une augmentation de la croissance tumorale,

de la production de liquide d'ascite et du potentiel métastatique dans des modèles de cancers ovariens chez la souris (251).



L'effet des Hospicells sur la sécrétion de cytokines dans les cellules tumorales ovariennes et les monocytes/macrophages étant majoritairement dû à un facteur sécrété, nous nous sommes intéressés à

l'implication de la forme soluble de Fas ligand. Nous avons ainsi étudié l'expression de cette protéine dans les Hospicells, dans les cellules embryonnaires HEK 293T et dans les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 dont nous savons qu'elles expriment faiblement Fas ligand soluble. Nous pouvons observer que les Hospicells présentent une forte quantité de Fas ligand soluble comparativement aux cellules HEK 293T et OVCAR-3 (**Figure 18A**).

Nous avons donc étudié la possible implication de cette sécrétion de Fas ligand soluble par les Hospicells dans l'induction de la production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules tumorales OVCAR-3 et les monocytes leucémiques U937 et THP1. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps bloquant Fas Ligand afin d'empêcher sa liaison à son récepteur. Nous pouvons observer que le blocage de Fas Ligand ne modifie pas la capacité des Hospicells à induire la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 dans les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 (**Figure 18B et C**) et dans les monocytes leucémiques U937 et THP1 (**Figure 18D et E**).

Nous pouvons donc conclure que la sécrétion de Fas Ligand par les Hospicells n'est pas responsable de la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 et les monocytes leucémiques U937 et THP1. Cependant, la sécrétion de Fas Ligand, un facteur récemment impliqué dans l'activation de la progression tumorale ovarienne, par les Hospicells soulève la question de l'importance de cette protéine dans les effets pro-tumoraux de ces cellules.

4.1. Voie de la sphingosine-1-phosphate

Nous avons précédemment discuté des capacités de la sphingosine-1-phosphate (S1P) à induire la migration et l'invasion des cellules tumorales ovariennes (introduction bibliographique, partie 2.2.1). Des travaux indiquent que les lysophospholipides, comprenant le LPA et la S1P, pourraient induire la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules dendritiques (253). De plus, il a été montré que la S1P peut activer la sécrétion d'IL-8 dans les cellules épithéliales bronchiques humaines par l'activation de la phospholipase D (254).

Nous avons observé que les Hospicells sont capables de sécréter de la S1P (193 pmol/mg de protéines totales/minute), bien que leur niveau de production soit faible par rapport aux fibroblastes et aux MSCs étudiés (**Figure 19A**). Nous avons donc étudié l'éventuelle implication de cette sécrétion de S1P par les Hospicells dans leur capacité à induire la production d'IL-6 et d'IL-8 dans les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 et les monocytes leucémiques U937. Pour cela, nous avons inhibé de façon stable l'expression de la sphingosine kinase 1 dans les Hospicells.

L'inhibition de la production de S1P dans les Hospicells ne modifie pas leur capacité à induire la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 dans les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 (**Figure 19B et C**) et dans les monocytes leucémiques U937 (**Figure 19D et E**). Il semblerait donc que la synthèse de S1P par les

Hospicells ne soit pas impliquée dans leur capacité à induire la synthèse de ces cytokines dans les cellules tumorales ovariennes et les monocytes U937.

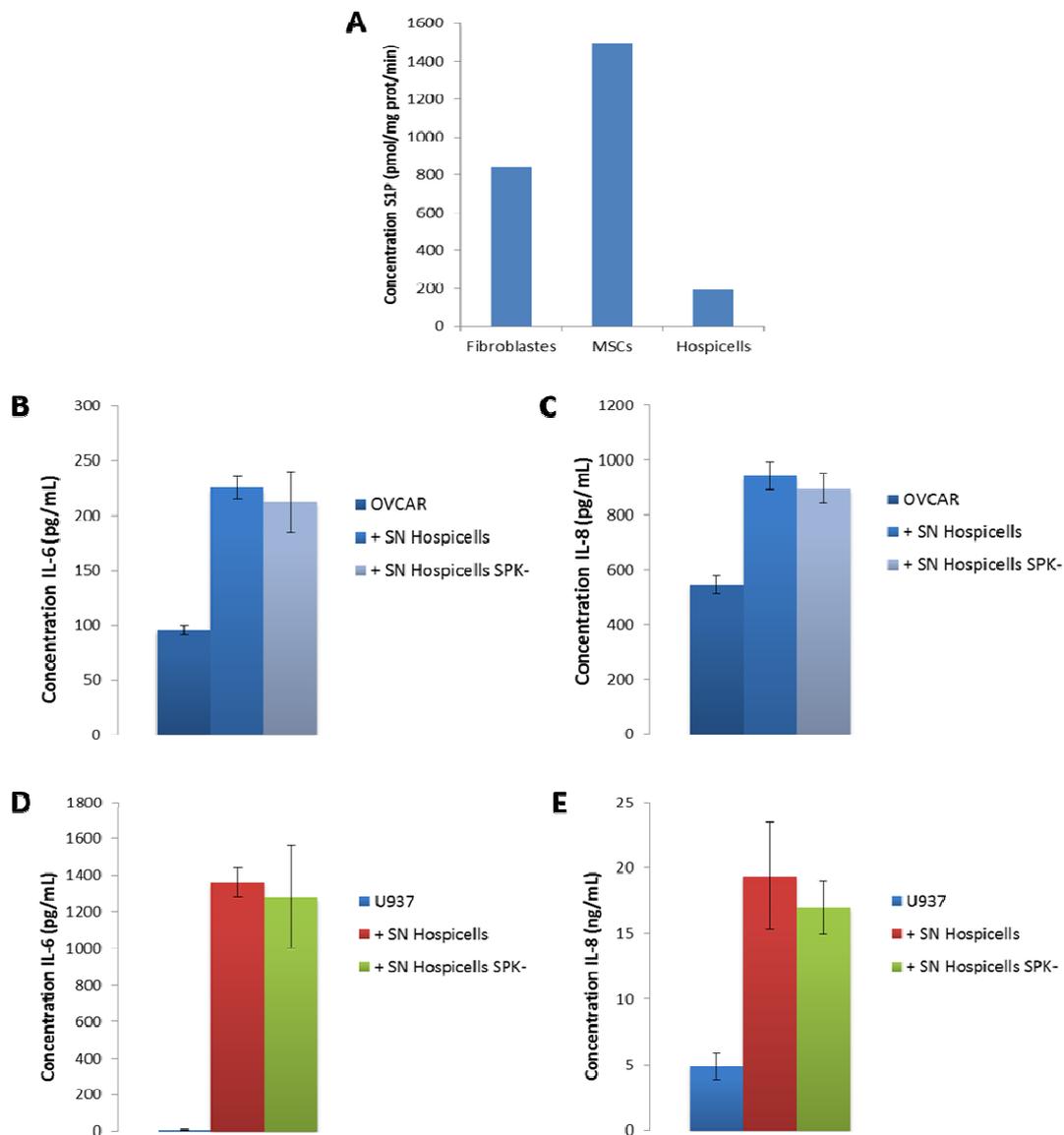


Figure 19 : Etude de l'implication de la voie de la S1P dans la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules tumorales ovariennes et les monocytes

A : La quantité de S1P sécrétée par les fibroblastes, les MSCs et les Hospicells est déterminée par chromatographie sur couche mince et représentée par pmol de S1P produite par mg de protéines totales par minute.

B et C : Les cellules OVCAR-3 sont cultivées seules ou en présence de milieu conditionné (SN) par les Hospicells normales ou dont l'expression de sphingosine kinase 1 est inhibée (SPK-) pendant 48 heures. Les concentrations d'IL-6 (**B**) et d'IL-8 (**C**) sont quantifiées par la technologie ELISA. (Moyenne +/- Déviation Standard)

D et E : Les monocytes leucémiques U937 activés pendant 48 heures au PMA sont cultivés seuls ou en présence de milieu conditionné (SN) par les Hospicells normales ou dont l'expression de sphingosine kinase 1 est inhibée (SPK-) pendant 48 heures. Les concentrations d'IL-6 (**D**) et d'IL-8 (**E**) sont quantifiées par la technologie ELISA. (Moyenne +/- Déviation Standard)

4.2. Voie de l'oxyde nitrique

Poupot *et al.* ont montré que les Hospicells sont capables d'entraîner un effet immunosuppresseur sur les lymphocytes T par la sécrétion d'oxyde nitrique (NO). Cette molécule et les enzymes responsables de sa production, les oxyde nitrique synthases (NOS), sont connues pour présenter des effets anti et pro-tumoraux (255). Il a notamment été montré que le NO est capable d'activer l'angiogenèse *via* la synthèse de VEGF dans de nombreux modèles tumoraux tels que les cellules de glioblastome et de cancer hépatique (255, 256). Des travaux ont également mis en évidence que la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 pouvait être induite par la production de NO (257). Il a par exemple été montré que le NO favorise l'expression d'IL-8 dans les cellules de mélanome (258).

Afin d'étudier l'éventuelle implication de la voie du NO dans l'induction par les Hospicells de la synthèse de cytokines (IL-6, IL-8 et VEGF) par les macrophages, nous avons produit du milieu conditionné par des Hospicells cultivées en présence d'un inhibiteur des NOS, le L-NAME (**Figure 20**). Nous pouvons observer que l'inhibition de la production de NO dans les Hospicells n'entraîne pas de diminution de la synthèse d'IL-6, IL-8 induite par ces cellules dans les macrophages. Cependant, cette même inhibition entraîne une inhibition significative de la synthèse de VEGF dans les macrophages. Nous avons également observé que l'inhibition de la production de NO dans les Hospicells ne modifie pas leur capacité à induire une augmentation de la sécrétion d'IL-6 dans les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 (résultats non montrés).

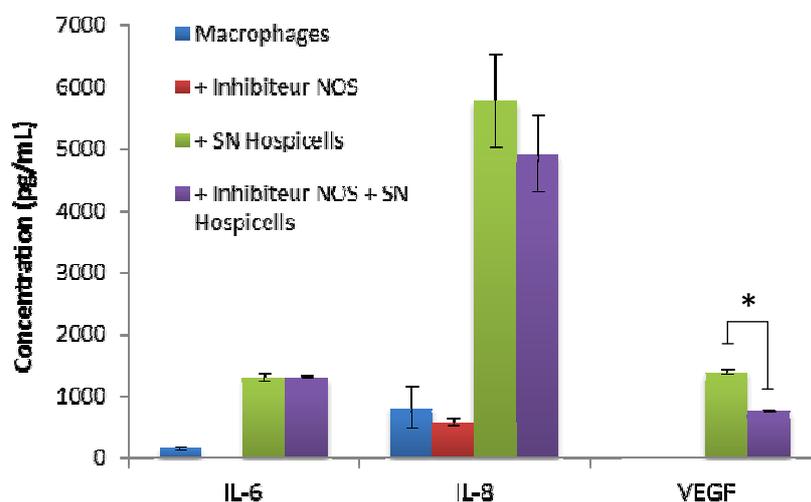


Figure 20 : Etude de l'implication de la voie du NO dans la sécrétion de cytokines par les monocytes/macrophages

Les monocytes/macrophages humains primaires sont cultivés seuls, en présence ou non de milieu conditionné (SN) par les Hospicells et en présence ou non d'un inhibiteur de la NO synthase (NOS), le L-NAME, pendant 48 heures. Les concentrations d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF sont quantifiées par la technologie ELISA. (Moyenne +/- Déviation Standard, * $p < 0,01$)

Ces données semblent donc indiquer que le NO, molécule sécrétée par les Hospicells, est impliqué dans la synthèse de VEGF par les monocytes/macrophages mais pas par les cellules tumorales ovariennes SKOV-3. La synthèse d'IL-6 et d'IL-8 par ces cellules ne semble cependant pas liée à la production de NO. Ces résultats, combinés au rôle immunosuppresseur mis en évidence par Poupot *et al.* montrent l'importance de la sécrétion de NO dans les rôles pro-tumoraux des Hospicells.

4.3. Voie de la cyclo-oxygénase

Comme nous l'avons vu précédemment (introduction bibliographique, partie 2.2.2), la sécrétion de PGE₂ associée à l'activation de COX-2, sont des facteurs de mauvais pronostic dans le cancer ovarien, impliqués dans l'activation de la prolifération, de l'angiogenèse, de la chimiorésistance et l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales ovariennes (59-61). De plus, il a été montré que la PGE₂ est capable d'entraîner la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 dans des fibroblastes et que sa présence est corrélée avec l'expression de VEGF dans les cancers ovariens (259, 260).

Afin d'étudier la possible implication de la voie dépendant de la COX-2 et des PG dans la sécrétion de cytokines (IL-6, IL-8 et VEGF) par les monocytes/macrophages et les cellules tumorales ovariennes induite par les Hospicells, nous avons produit du milieu conditionné par des Hospicells cultivés en présence d'un inhibiteur de la COX-2, le NS-398. L'inhibition de cette enzyme dans les Hospicells ne permet plus à ces cellules d'induire la sécrétion de VEGF dans les monocytes/macrophages humains primaires mais ne modifie pas leur capacité à activer la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 dans ces cellules (**Figure 21A**). Ces résultats suggèrent que l'activité COX-2 dans les Hospicells entraîne la synthèse de PG par ces cellules, permettant ainsi d'activer la sécrétion de VEGF dans les macrophages. De plus, ces résultats montrent l'existence d'autres voies de signalisation cellulaire permettant la synthèse de cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 dans les macrophages.

Etant donné que les cellules SKOV-3 constituent la seule lignée tumorale ovarienne testée capable de sécréter de façon majorée du VEGF sous l'effet des Hospicells, nous avons testé l'implication de la voie COX-2 dans cette interaction cellulaire. Nous pouvons observer que l'inhibition de COX-2 dans les Hospicells ne modifie pas leur capacité à augmenter la sécrétion de VEGF dans les cellules SKOV-3 (**Figure 21B**). Ces données montrent que les Hospicells sont capables d'activer la synthèse de VEGF dans les monocytes/macrophages et certaines lignées tumorales ovariennes par des voies de signalisation différentes.

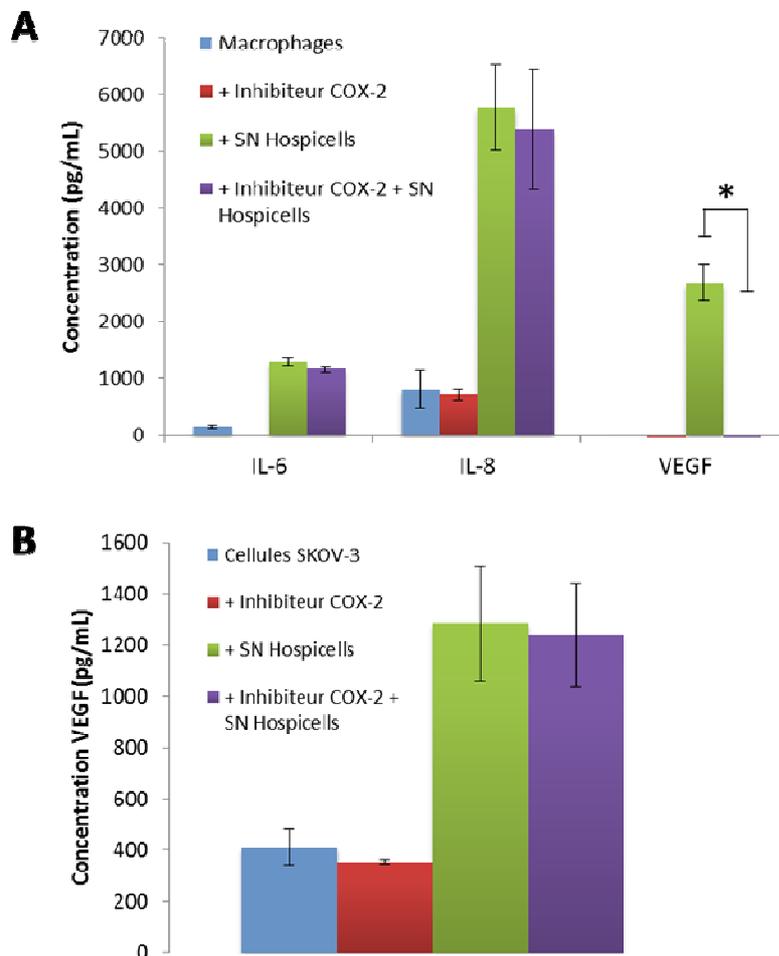


Figure 21 : Etude de l'implication de la voie COX-2 dans la sécrétion de cytokines par les monocytes/macrophages et les cellules tumorales ovariennes

A : Les monocytes/macrophages humains primaires sont cultivés seuls, en présence ou non de milieu conditionné (SN) par les Hospicells et en présence ou non d'un inhibiteur de l'enzyme COX-2 (NS-398) pendant 48 heures. Les concentrations d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF sont quantifiées par la technologie ELISA. (Moyenne +/- Déviation Standard, * $p < 0,001$)

B : Les cellules tumorales ovariennes SKOV-3 sont cultivées seules, en présence ou non de milieu conditionné (SN) par les Hospicells et en présence ou non d'un inhibiteur de l'enzyme COX-2 (NS-398) pendant 48 heures. Les concentrations de VEGF sont quantifiées par la technologie ELISA. (Moyenne +/- Déviation Standard)

Discussion

1. Rôle des Hospicells sur les cellules tumorales ovariennes

Le cancer ovarien constitue la quatrième cause de décès pour les cancers féminins et la première en termes de mortalité des cancers gynécologiques. Cette pathologie est régulièrement détectée à stade avancé et se caractérise le plus fréquemment par une dissémination péritonéale des cellules tumorales, la formation de liquide d'ascite et l'acquisition d'une chimiorésistance, notamment aux sels de platine, à l'issue d'un premier traitement. La compréhension de cette chimiorésistance et des processus permettant l'activation de la progression tumorale ovarienne demeurent les problématiques majeures dans la prise en charge du cancer ovarien. Bien que ces caractéristiques puissent être attribuées à des propriétés intrinsèques des cellules tumorales, il est désormais clairement établi qu'elles sont également hautement régulées par le microenvironnement tumoral (**Annexe 3**). Au sein du stroma ovarien, nous nous intéressons à un type cellulaire original isolé à partir de liquide d'ascite de patientes atteintes d'un cancer ovarien de stade III, les Hospicells.

Des travaux précédents réalisés au sein du laboratoire ont montré que ces cellules sont capables de favoriser la croissance tumorale *in vivo* par, entre autres, une augmentation de l'angiogenèse dans des tumeurs ovariennes injectées chez la souris immunodéprimée (9, 261). Nous nous sommes intéressés aux interactions établies entre les cellules tumorales ovariennes et les Hospicells afin de déterminer si celles-ci sont suffisantes pour activer le processus angiogénique. Nous avons démontré que les Hospicells sont capables, par un facteur sécrété, d'augmenter la libération d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 et de VEGF par les cellules SKOV-3 (241, 261) (**Figure 22**). Nous avons également montré que *in vitro*, les Hospicells, seules ou en association avec les cellules tumorales ovariennes activent l'angiogenèse de façon limitée. Nous avons donc mis en évidence l'existence d'interactions lignées spécifiques *in vitro* alors que les Hospicells sont capables de favoriser la croissance tumorale ovarienne quelle que soit la lignée utilisée *in vivo*. Ces données indiquent que les Hospicells favorisent également la progression tumorale ovarienne en agissant de façon indirecte avec d'autres cellules du microenvironnement.

2. Rôle des Hospicells dans l'activation des macrophages

Nous avons montré que les tumeurs ovariennes co-injectées avec des Hospicells dans les souris immunodéprimées présentent un recrutement de macrophages significativement plus important que les tumeurs issues d'une injection de cellules tumorales seules (241). Les Hospicells sont donc capables d'entraîner la migration des macrophages vers le site tumoral et ainsi de réguler la composition en cellules immunitaires du microenvironnement.

Nous avons également mis en évidence la capacité des Hospicells à induire la polarisation de monocytes/macrophages humains primaires en un phénotype hétérogène partageant des

caractéristiques M1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 p40, IL-12 p70, TNF- α , IFN- α 2, IFN- γ , MCP-1, IP-10 et RANTES) et M2 (IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, PDGF-AB et BB, TNF- α , TGF- β , MDC, MCP-1, MCP-3, eotaxin et Gro) que nous avons caractérisé de « TAM-like » (**Figure 22**). En effet, si la littérature réalise régulièrement la dichotomie entre les macrophages de type M1, anti-tumoraux, et les macrophages de type M2, pro-tumoraux, une quantité croissante de données montre que les TAMs partageraient en réalité des propriétés de ces deux sous-types cellulaires (234, 262). Les monocytes/macrophages activés par les Hospicells présentent également de nombreuses similitudes avec les macrophages M2d isolés par Duluc *et al.* à partir d'ascites tumorales ovariennes ou différenciés au contact de milieu conditionné par des cellules tumorales ovariennes (216). Ces cellules sont en effet caractérisées par l'expression d'IL-6, d'IL-10, TGF- β , mais également pas l'expression de la molécule immunosuppressive B7-H4 (223, 224). Il sera nécessaire de déterminer l'éventuelle expression de cette molécule par les monocytes/macrophages activés par les Hospicells afin de comparer leur phénotype à celui des macrophages M2d.

Nous avons montré que les monocytes/macrophages activés par les Hospicells libèrent des cytokines/chimiokines impliquées dans le recrutement de macrophages : MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-3, RANTES, IP-10, IL-10, VEGF et PDGF AB/BB (232, 235-240). De même, les Hospicells sont capables d'activer la synthèse de chimiokines (MCP-1, MCP-2, MCP-3 et RANTES) dans des monocytes leucémiques U937 et d'entraîner leur recrutement *in vitro*. Devant l'incapacité à montrer la synthèse de chimiokines par les Hospicells, nous émettons l'hypothèse que ces cellules sont capables d'activer la synthèse de telles molécules par les macrophages résidents au niveau du site tumoral, permettant, par effet rebond, le recrutement de nouveaux monocytes/macrophages au sein des tumeurs.

De plus, nous avons mis en évidence la sécrétion par les monocytes/macrophages activés par les Hospicells de cytokines (IL-6, IL-8, VEGF, TNF- α et TGF- β) précédemment décrites comme impliquées dans la progression tumorale ovarienne (introduction bibliographique, partie 2.2.2). Des chimiokines telles que MCP-1 sont également impliquées dans la régulation de la progression tumorale. En effet, cette protéine est capable d'entraîner le recrutement de monocytes inflammatoires permettant d'activer les métastases dans le cancer du sein (263).

Cependant, les monocytes/macrophages cultivés en présence de milieu conditionné par les Hospicells sécrètent également les deux isoformes de l'IL-12 : p70 (hétérodimère de sous-unités p40 et p35) et p40 (homodimère de sous-unités p40). L'expression de l'IL-12 p70 est associée aux macrophages de type M1 et à des effets anti-tumoraux, notamment par l'induction de la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (213, 264). Cette cytokine présente des activités tumoricides et peut entraîner une inhibition de l'angiogenèse (264, 265). En revanche, l'isoforme IL-12 p40 est un inhibiteur spécifique de l'IL-12 p70 et permet ainsi d'empêcher ses fonctions anti-tumorales (266). Les monocytes/macrophages activés par les Hospicells sécrètent ainsi

de l'IL-12 p70 correspondant aux macrophages anti-tumoraux de type M1 et dont les fonctions, bien qu'anti-tumorales, pourraient être inhibées par la sécrétion d'IL-12 p40.

Afin d'en savoir plus sur le phénotype des monocytes/macrophages activés par les Hospicells, il sera nécessaire de déterminer leur profil d'antigènes de surface. En effet, les macrophages de type M1 sont régulièrement associés à l'expression de CD80 alors que les macrophages de type M2 expriment CD163 et CD206 (récepteur au mannose). Pour ce faire, nous avons initié depuis peu à l'Institut Claudius Regaud une étude visant à déterminer le phénotype des macrophages infiltrants les tumeurs dans 30 prélèvements différents de patientes ayant été traitées pour un adénocarcinome ovarien pendant les dix dernières années. Nous espérons corréler un phénotype de macrophages au grade des tumeurs et à leur pronostic en termes d'évolution ou de chimiorésistance.

Nous nous intéresserons aux effets des interactions entre les Hospicells et les monocytes/macrophages sur la progression tumorale ovarienne. En effet, si les Hospicells activent l'angiogenèse *in vitro* de façon limitée, il est possible que leur capacité de recrutement et d'activation des macrophages soit à l'origine de l'augmentation de la vascularisation des tumeurs. Les TAMs ont été largement décrits comme impliqués dans l'activation de l'angiogenèse tumorale, notamment par la production de VEGF-A (4, 217, 218, 267). Dans le cancer ovarien, la présence de ces cellules est corrélée avec la densité vasculaire des tumeurs et la production de liquide d'ascite. Nous étudierons donc la capacité de l'association entre les Hospicells et les monocytes/macrophages à activer l'angiogenèse *in vitro*.

De même, nous pourrions nous intéresser aux effets de ces macrophages ainsi activés et recrutés par les Hospicells sur la chimiorésistance des tumeurs ovariennes. Il a été montré que l'inhibition du recrutement des macrophages à l'aide d'un anticorps bloquant le CSF-1 entraîne une augmentation de la sensibilité des tumeurs mammaires au paclitaxel, corrélée à une augmentation de la survie des lymphocytes T CD8⁺ (268). De plus, les macrophages exprimant la cathepsine sont capables de protéger les cellules tumorales mammaires de la mort cellulaire induite par le taxol, l'étoposide et la doxorubicine (269). La cathepsine est une protéase surexprimée dans de nombreux cancers, impliquée dans la progression tumorale et dont l'inhibition pourrait constituer une nouvelle perspective thérapeutique (270, 271). Les macrophages recrutés et activés par les Hospicells pourraient ainsi induire des effets pro-tumoraux, notamment une induction de la chimiorésistance, par l'expression de ces protéines. Cependant, aucun travail n'a actuellement étudié le rôle des TAMs dans la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes. Nous étudierons ainsi la capacité des monocytes/macrophages activés par les Hospicells à protéger les cellules tumorales ovariennes de l'apoptose induite par le carboplatine et le taxol, représentant les traitements conventionnels dans le cancer ovarien.

Nous avons donc montré que les Hospicells sont capables d'entraîner le recrutement de monocytes/macrophages et d'activer leur polarisation en un phénotype TAM-like. Bien que le rôle de ces cellules dans la progression tumorale ovarienne ne soit pas encore déterminé, ces macrophages ainsi activés sécrètent de nombreuses cytokines qui pourraient être à l'origine des effets pro-tumoraux des Hospicells observés *in vivo*.

3. Voies de signalisations impliquées dans les rôles pro-tumoraux des Hospicells

Nous avons pu observer que la capacité des Hospicells à induire la synthèse de cytokines dans les cellules tumorales ovariennes ou les monocytes/macrophages sont globalement indépendantes de tout contact cellulaire et seraient ainsi dues à un facteur sécrété (241). Nous avons cherché à déterminer la nature de ce ou ces facteurs sécrétés en étudiant les voies de signalisation cellulaire connues dans la littérature pour être impliquées dans la synthèse d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF.

Nous avons dans un premier temps montré que l'IL-1 α et le TNF- α , ne sont pas sécrétés par les Hospicells. Elles ne sont donc pas impliquées dans cette induction de synthèse de cytokines par les Hospicells (241).

Les Hospicells sécrètent une quantité importante de Fas ligand. Bien que cette protéine soit à l'origine impliquée dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose (voie extrinsèque), de nombreux travaux démontrent ses capacités pro-tumorales (251). Nous avons montré que la sécrétion de Fas ligand par les Hospicells n'est pas impliquée dans la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 et les monocytes leucémiques U937 et THP1. Cependant, il faudra s'intéresser aux effets de cette sécrétion afin de déterminer notamment si elle peut entraîner l'apoptose des cellules tumorales ovariennes ou si au contraire elle peut favoriser leur prolifération.

Nous avons également mis en évidence une sécrétion, bien que faible, de S1P par les Hospicells. Bien que cette molécule ne soit pas impliquée dans la synthèse de cytokines induite par les Hospicells dans les cellules tumorales ovariennes et les monocytes/macrophages, il n'est pas à exclure qu'elle puisse présenter des rôles dans la progression tumorale ovarienne. En effet, la S1P active la migration et l'invasion des cellules tumorales ovariennes (56-58). De plus, il a été montré dans d'autres localisations tumorales telles que le cancer du sein que le S1P peut favoriser la progression tumorale ovarienne en activant l'angiogenèse et la lymphangiogenèse (272). L'utilisation des Hospicells inhibées pour l'expression de sphingosine kinase dans des modèles de carcinose péritonéale chez la souris immunodéprimée nous permettront de déterminer l'importance de la S1P sécrétée par ces cellules dans la progression tumorale ovarienne.

Poupot *et al.* ont mis en évidence un rôle immunosuppresseur des Hospicells sur les lymphocytes T *via* la synthèse de NO (8). Etant donné que cette molécule peut également induire la synthèse d'IL-6,

d'IL-8 et de VEGF, nous avons étudié son implication au sein de notre modèle d'interaction entre les Hospicells et les monocytes/macrophages (255-258). Nous avons montré que l'inhibition de la synthèse de NO à l'aide d'un inhibiteur de NOS entraîne une diminution partielle de la production de VEGF induite par les Hospicells dans les macrophages mais ne modifie pas les sécrétions d'IL-6 et d'IL-8. Il serait intéressant de déterminer les autres fonctions de cette production de NO par les Hospicells, notamment sur leur capacité à activer l'angiogenèse tumorale (9). Les données concernant les rôles de la production stromale de NO dans la régulation de la progression tumorale sont controversées. En effet, si certains travaux montrent des capacités tumoricides du NO sur des modèles de fibrosarcomes chez la souris, il a également été mis en évidence que cette molécule peut induire la croissance tumorale dans le mélanome en activant l'expression de VEGF et l'angiogenèse (255, 273, 274). Le NO pourrait donc constituer une molécule clé dans les fonctions pro-tumorales des Hospicells en permettant notamment l'induction de la synthèse de VEGF dans les macrophages et une immunosuppression des lymphocytes T (8).

Nous avons étudié la possible implication de l'axe COX-2/PGE₂ dans l'activation des cellules tumorales ovariennes et des macrophages. En effet, cette voie de signalisation a largement été décrite comme de mauvais pronostic et favorisant la progression tumorale ovarienne (59-62). Nous avons montré que l'inactivation de COX-2 dans les Hospicells supprime leur capacité à induire la synthèse de VEGF dans les monocytes/macrophages humains primaires mais ne modifie pas leurs effets sur la synthèse de cette cytokine dans les cellules tumorales ovariennes SKOV-3. De plus, l'inactivation de cette voie ne modifie pas les sécrétions d'IL-6 et d'IL-8. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus pour le NO, mettent en avant la multiplicité des voies de signalisation cellulaire impliquées dans le rôle des Hospicells sur la synthèse de cytokines pro-angiogéniques. Il sera nécessaire de déterminer si la PGE₂, issue de la dégradation de l'acide arachidonique par la COX-2 et potentiellement produite par les Hospicells, est responsable des effets observés sur la synthèse de VEGF. Des travaux récents indiquent que la PGE₂, en association avec une stimulation bactérienne ou au LPS, permet la sécrétion de MCP-1 et ainsi le recrutement de TAMs au sein de tumeurs gastriques (275). La sécrétion de PGE₂ par les Hospicells pourrait donc être à l'origine de son effet sur l'activation et le recrutement des macrophages. L'expression de COX-2 dans le cancer ovarien est associée à une résistance à la chimiothérapie, notamment au platine (276). Cependant, des travaux contradictoires indiquent que l'inhibition de COX-2 par du NS-398 entraîne une diminution de l'apoptose induite par le paclitaxel (277). Il convient donc de déterminer l'implication de la voie de la COX-2 dans la chimiorésistance induite par les Hospicells. Nous déterminerons donc si l'inhibition de cette enzyme dans les Hospicells diminue leur capacité à protéger les cellules tumorales ovariennes de la mort cellulaire induite par le carboplatine et le taxol.

Nous avons montré que les Hospicells sont capables d'induire la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 dans les cellules tumorales ovariennes OVCAR-3 et de VEGF dans les cellules SKOV-3. Ces résultats mettent en avant des différences moléculaires entre les lignées cellulaires ovariennes étudiées qu'il convient de déterminer afin de mettre en évidence un « critère de réponse » aux Hospicells. Nous savons que les cellules tumorales OVCAR-3 sont la seule lignée parmi celles étudiées à exprimer le récepteur des œstrogènes. Cependant, nous avons mis en évidence que ces molécules ne sont pas impliquées dans les interactions entre les cellules tumorales ovariennes et les Hospicells.

Parmi les voies de signalisations non testées à ce jour, certaines pistes demeurent à explorer. En effet, nous avons pu observer que les Hospicells sont capables de sécréter du PDGF-AA (résultats non montrés). Cet homodimère de deux chaînes polypeptidiques A peut se lier aux récepteurs α et β du PDGF (PDGFR- α et PDGFR- β). Des travaux indiquent que cette protéine est capable d'entraîner la sécrétion d'IL-6 dans des cellules ostéoblastiques, d'IL-8 dans des synoviocytes (cellules de la membrane synoviale) proches des fibroblastes et de VEGF dans des cancers du poumon non à petites cellules (278-280). Il faudra donc déterminer l'implication de la voie du PDGF dans les interactions entre les Hospicells et les cellules tumorales et/ou les monocytes/macrophages. Nous déterminerons si l'inhibition de cette protéine ou de ses récepteurs permet de supprimer la capacité des Hospicells à induire la sécrétion de cytokines dans les cellules tumorales ovariennes et les monocytes/macrophages. Il a également été montré que le PDGF peut entraîner une activation de la progression tumorale en agissant notamment sur l'angiogenèse et le processus métastatique (281, 282). De plus, l'inhibition des PDGFR dans des modèles tumoraux réalisés chez la souris, où l'expression de ces récepteurs est restreinte au stroma, entraîne une sensibilisation des tumeurs à différentes chimiothérapies telles que le taxol ou le 5-fluorouracile (283). Il conviendra donc de déterminer l'importance de la sécrétion de PDGF-AA par les Hospicells dans la progression tumorale ovarienne.

La redondance des voies de signalisation cellulaire est également à prendre en compte dans leur étude. En effet, il n'est pas à exclure que les effets de l'inhibition d'une voie de signalisation soient compensés par une voie parallèle.

Devant cette constatation et les difficultés à déterminer les voies de signalisation cellulaire impliquées dans la synthèse de cytokines induite par les Hospicells, nous réaliserons des stratégies « sans a priori » visant à déterminer la nature protéique ou lipidique des facteurs sécrétés par les Hospicells. En effet, nous traiterons le milieu conditionné par les Hospicells à haute température afin d'en dénaturer les protéines. De plus, nous séparerons les facteurs contenus dans ce milieu en fonction de leur poids moléculaire à l'aide de filtres, permettant ainsi de dissocier les facteurs lipidiques des facteurs protéiques. Les résultats préliminaires obtenus avec ces techniques semblent montrer que les sécrétions d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules tumorales ovariennes ne peuvent être induites que par la

fraction protéique du milieu conditionné par les Hospicells. Bien que ces expériences soient à reproduire, elles nous permettront d'affiner nos connaissances sur le mode d'action des Hospicells.

Il est également nécessaire de déterminer la nature des voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'activation des macrophages. Nous avons mis en évidence des similarités entre les monocytes/macrophages activés par les Hospicells et les macrophages M2d dont la différenciation serait induite par l'IL-6, LIF et l'oncostatin M (OSM) (216). Bien que les Hospicells ne sécrètent pas d'IL-6, il serait intéressant d'étudier leur capacité à produire les facteurs LIF et OSM et de déterminer leur potentielle implication dans la capacité de ces cellules à polariser les macrophages en un phénotype pro-tumoral.

La compréhension du mode d'action des Hospicells permettra d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'inhiber l'effet de ces cellules et ainsi d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer des ovaires. De plus, la découverte de telles voies de signalisation pourrait permettre la mise en évidence de facteurs pronostics de la présence d'Hospicells au sein des masses tumorales ovariennes.

4. Rôle des Hospicells dans la chimiorésistance

Les travaux de Rafii *et al.* ont montré que les Hospicells sont capables de favoriser la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes par un échange membranaire de protéines d'efflux de molécules chimiothérapeutiques (7). Si ces résultats impliquent un contact cellulaire, nous avons récemment montré au laboratoire que les Hospicells sont capables de favoriser la résistance des cellules tumorales ovariennes au carboplatine par un facteur sécrété. En effet, dans une publication actuellement en révision dans *Cell Death and Disease*, nous avons montré que les Hospicells entraînent une diminution de l'activation des caspases effectrices (3 et 7) et une activation d'Akt, protéine clé de la voie de survie cellulaire, et de X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), protéine anti-apoptotique de la famille des inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), dans les cellules tumorales ovariennes traitées au carboplatine (**Annexe 1**).

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur des IAPs permettrait de supprimer la chimiorésistance des cellules tumorales ovariennes au carboplatine induite par les Hospicells. Ces résultats conforteraient nos hypothèses montrant que l'effet chimioprotecteur des Hospicells est dû à l'activation de la protéine anti-apoptotique XIAP.

Les Hospicells sont donc capables d'augmenter la résistance des cellules tumorales ovariennes aux chimiothérapies telles que le carboplatine et pourraient ainsi constituer un microenvironnement propice au développement d'une chimiorésistance dans le cancer ovarien, problématique majeure dans cette pathologie. Nos résultats viennent s'ajouter à la quantité croissante de données montrant

l'importance du microenvironnement tumoral dans la chimiorésistance, comme l'atteste notre revue bibliographique sur le sujet (29) (**Annexe 2**). En effet, bien que les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales, telles que l'existence de cellules souches cancéreuses, sont impliquées dans ce processus, cibler le microenvironnement constitue une cible de choix dans l'amélioration de la prise en charge des cancers ovariens.

Ces observations confortent nos hypothèses concernant les Hospicells et les MSCs. En effet, Roodhart *et al.* ont récemment montré que des MSCs endogènes traités par des analogues du platine sont capables de favoriser la chimiorésistance des cellules tumorales à plusieurs chimiothérapies (dont le cisplatine) par la sécrétion d'acides gras polyinsaturés. La libération de ces acides gras par les MSCs serait contrôlée par les voies de la COX-1 et de la thromboxane synthase (TXAS) (261).

5. Origine et nature des Hospicells

Les Hospicells ont initialement été définies par leur morphologie pseudo-fibroblastique, une forte affinité pour les cellules tumorales et l'expression de CD9, CD10, CD29, CD146 et CD166 (7). Cette combinaison de marqueurs ne correspondant à aucune lignée cellulaire connue, nous avons poursuivi l'exploration du profil d'expression antigénique et cytokinique des Hospicells afin de déterminer leur origine et leur nature.

Nous avons montré que les Hospicells expriment la thrombospondine, FAP, la ténascine C et les PDGFR- α et β , spécifiques des CAFs, mais n'expriment cependant pas la desmine ou α -SMA, régulièrement associés à la définition de ces cellules (9, 231, 241). De même que les fibroblastes « normaux » et les CAFs, les Hospicells sont capables de sécréter la MMP-2 sous sa forme inactive et active (132, 133, 231). Cette protéase de la matrice permet d'activer l'invasion des cellules tumorales ovariennes et pourrait ainsi préfigurer d'un rôle des Hospicells dans la dissémination tumorale au péritoine et, de manière globale, dans la régulation de la composition de la MEC (133). Les Hospicells, outre leur morphologie pseudo-fibroblastique, partagent donc des caractéristiques communes avec les CAFs telles que l'expression de marqueurs caractéristiques de ces cellules et une possible implication dans la régulation de la MEC.

Des travaux précédents ont montré des homologies entre les Hospicells et les MSCs telles que la morphologie, l'expression de CD29 et CD166 ou encore la capacité à se lier aux cellules tumorales (7, 9, 225). Les Hospicells présentent des capacités immunosuppressives induites par la sécrétion de NO, propriétés également mises évidences avec les MSCs (8, 228, 284). Cependant, les Hospicells n'expriment pas les antigènes de surface CD73, CD90 et CD105, et ne possèdent pas la capacité de se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéocytes. Ces caractéristiques définissent classiquement les MSCs et pourraient ainsi indiquer que les Hospicells ne sont pas des cellules « souches » (170). Il a

été montré qu'au sein du microenvironnement tumoral ovarien, les MSCs sont capables de se différencier en CAFs *via* une stimulation par le LPA (175). Ces données mettent en valeur la plasticité de ces cellules souches et leurs capacités à se différencier au contact de signaux provenant du stroma. Nous émettons ainsi l'hypothèse que les Hospicells, cellules retrouvées au sein du microenvironnement péritonéal, constituent un type cellulaire intermédiaire entre les MSCs et les CAFs dont la différenciation aurait été activée par le stroma.

Récemment, des MSCs associées aux tumeurs (CA-MSCs) ont été isolées par McLean *et al* à partir de tumeurs ovariennes. Ces cellules conservent leurs capacités de différenciation mais diffèrent des MSCs « naïfs » par la sécrétion de BMPs (178). Les Hospicells, retrouvées au contact des cellules tumorales ovariennes, présentent des homologies avec les MSCs et pourraient ainsi correspondre à un phénotype de CA-MSCs.

Parmi les types cellulaires auxquels pourraient être apparentés les Hospicells, les cellules mésothéliales ont également été envisagées. En effet, ces cellules tapissant la cavité péritonéale pourraient s'exfolier et ainsi interagir avec les cellules tumorales ovariennes disséminées dans le liquide d'ascite. Cependant, nous avons montré que les Hospicells, contrairement aux cellules mésothéliales, ne sécrètent pas d'IL-6 ou de LPA (186, 187). Afin d'étudier d'éventuelles homologies entre les cellules mésothéliales et les Hospicells, il serait intéressant de déterminer si ces cellules sont capables d'exprimer des molécules d'adhésion cellulaire tel que l'acide hyaluronique (116).

Tout d'abord détectées dans le cancer ovarien, les Hospicells ont également été retrouvées dans certaines tumeurs mammaires où leur présence est corrélée avec le nombre de métastases dans les ganglions lymphatiques (285). Dans ce contexte, les Hospicells sont capables d'interagir avec les cellules tumorales mammaires MDA-MB-231 *via* un phénomène de trogocytose oncologique. Cet échange membranaire induit la sécrétion de facteurs solubles permettant dans les cellules tumorales l'expression de N-cadherin, impliquée dans la TEM et constituant une étape clé du processus métastatique (286). Ces facteurs solubles pourraient être le collagène I, l'EGF, l'HGF ou le TGF- β , et être libérés par les Hospicells ou les cellules tumorales (285).

Les Hospicells ne seraient donc pas restreintes aux seules localisations ovariennes et péritonéales mais pourraient être retrouvées dans de nombreux organes. Au sein d'autres modèles tumoraux, des cellules proches des Hospicells pourraient être présentes dans le microenvironnement tumoral et correspondre à un stade de différenciation intermédiaire entre les MSCs et les CAFs.

6. Les Hospicells au sein du microenvironnement tumoral ovarien

Au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence la capacité des Hospicells à interagir avec les autres cellules du microenvironnement. Nous avons observé une activité cathepsine significativement plus importante dans les tumeurs ovariennes co-injectées avec des Hospicells dans des souris immunodéprimées que dans les tumeurs ovariennes injectées seules (241). Cette activité correspond à une infiltration majorée de macrophages mais aussi de neutrophiles. Si le rôle de ces cellules au sein du microenvironnement tumoral, notamment ovarien, reste peu étudié, de nombreuses études démontrent l'existence de neutrophiles associés aux tumeurs (TAN). Ces cellules possèdent majoritairement des activités pro-tumorales telles qu'une activation de la croissance tumorale, de l'angiogenèse et le développement de métastases (neutrophiles N2) mais peuvent également présenter des activités cytotoxiques et inhiber le développement des tumeurs (neutrophiles N1) (211). De même que pour les macrophages, le contexte tumoral et l'environnement cytokinique définissent le phénotype des neutrophiles et leurs propriétés. Le TGF- β serait notamment impliqué dans la différenciation de ces cellules en un phénotype pro-tumoral N2 (211). Nous avons montré que les monocytes/macrophages activés par les Hospicells sécrètent les chimiokines Gro, TNF- α et IFN- γ impliquées dans le recrutement des neutrophiles et du TGF- β impliqué dans leur différenciation en un phénotype pro-tumoral (211). Ces résultats, combinés à l'activité cathepsine observée dans les tumeurs ovariennes co-injectées avec des Hospicells, indiquent que ces cellules pourraient entraîner le recrutement et l'activation des neutrophiles.

Les Hospicells possèdent des capacités immunosuppressives, activent et entraînent le recrutement des monocytes/macrophages et pourraient également interagir avec les neutrophiles (8, 9). De plus, nous avons montré que les monocytes/macrophages activés par les Hospicells sécrètent de nombreuses chimiokines dont Gro, eotaxin et MDC permettant le recrutement des leucocytes (287). L'ensemble de ces données montre que les Hospicells présentent un rôle clé dans la régulation de la composition du système immunitaire.

Les Hospicells sont des cellules pro-tumorales agissant de façon directe sur les cellules tumorales mais aussi de façon indirecte sur les cellules stromales permettant notamment la création d'un microenvironnement immunitaire pro-tumoral.

De par la difficulté d'isolation (sous brevet) et de mise en culture des Hospicells, ces études ont été réalisées sur des cellules immortalisées par l'antigène T de SV40. Nous avons montré que cette immortalisation ne modifie pas le profil d'expression d'antigènes de surface et les sécrétions de cytokines de ces cellules (9). Cependant, ces cellules ne reflètent pas nécessairement l'hétérogénéité retrouvée au sein du microenvironnement tumoral. Il est donc nécessaire de déterminer si des cellules proches des Hospicells telles que les MSCs, pourraient présenter les mêmes effets pro-tumoraux.

Nous avons notamment montré que le milieu conditionné de MSCs issues de la moelle osseuse (BM-MSCs) permettent de favoriser la résistance des cellules tumorales au carboplatine (Castells *et al.* en révision dans *Cell Death and Disease*) (**Annexe 1**). Nous envisageons désormais de comparer les effets de ces BM-MSCs « naïfs » avec des MSCs issus de tumeurs ovariennes ou de liquide d'ascite. En effet, la disponibilité de tels prélèvements à l'Institut Claudius Regaud nous permettra d'étudier l'hétérogénéité des MSCs retrouvées au sein du microenvironnement tumoral. Nous pourrions ainsi comparer le phénotype de MSCs « naïfs » et de MSCs exposés à la tumeur (CA-MSCs). Nous pourrions également cultiver des MSCs naïfs en présence de milieu conditionné par des cellules tumorales ovariennes ou de liquide d'ascite provenant de patientes atteintes de cancer ovarien. Nous étudierons alors la capacité des MSCs à modifier leur phénotype au contact d'un microenvironnement tumoral et déterminer, par exemple, si celui-ci correspond aux CA-MSCs isolées par McLean *et al* et décrites précédemment.

Ces travaux nous permettront de comparer le rôle des Hospicells, cellules isolées il y a peu, avec des cellules stromales ovariennes largement étudiées et présentant des capacités pro-tumorales.

Nous pourrions également déterminer la capacité des Hospicells à réguler la fonction d'autres cellules stromales ovariennes telles que les adipocytes ou les cellules mésothéliales, dont les rôles dans la progression tumorale sont largement étudiés.

De manière générale, nos travaux mettent en évidence que si les cellules stromales peuvent agir sur les cellules tumorales, elles sont également capables d'interagir entre elles permettant ainsi la formation d'un microenvironnement pro-tumoral.

7. Les Hospicells au sein du cancer ovarien

Nous avons démontré un rôle des Hospicells dans l'activation de la croissance tumorale ovarienne et dans l'induction de la chimiorésistance des cellules tumorales. Si ces composantes de la progression tumorale représentent des problématiques majeures dans le cancer ovarien, la dissémination des cellules tumorales au sein du péritoine constitue également l'une des causes principales du mauvais pronostic de la maladie et de la survenue d'une récurrence.

La chirurgie des cancers de l'ovaire de stade précoce (I et II) consiste en une hystérectomie totale (ablation de l'utérus), une salpingo-oophorectomie bilatérale (ablation des trompes de Fallope et des ovaires) et une omentectomie (ablation du grand épiploon). Cette chirurgie, combinée à une chimiothérapie adjuvante (sels de platine et taxanes), est le plus souvent curative (1). De même, à stade avancé (III et IV), le traitement des tumeurs primaires est très efficace mais c'est la dissémination

péritonéale des cellules tumorales, formant de micro-implants péritonéaux difficiles à traiter et à détecter à l'œil nu, qui sera à l'origine de la récurrence.

Les Hospicells ont été isolées à partir d'agrégats de cellules tumorales, retrouvés dans du liquide d'ascite de patientes atteintes de cancer ovarien à stade avancé, préfigurant d'un rôle de ces cellules stromales dans la dissémination tumorale au sein du péritoine. De plus, nous avons montré que les Hospicells sécrètent la MMP-2 sous sa pro-forme et sa forme active, dont l'expression est corrélée avec un mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer ovarien et une activation de l'invasion des cellules tumorales ovariennes (128, 129, 133, 288). Cette enzyme clive des composants de la matrice tels que la fibronectine et la vitronectine permettant d'activer l'adhésion de cellules tumorales ovariennes OvCa au péritoine *via* les intégrines $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ (289, 290). Ces données indiquent que les Hospicells pourraient présenter un rôle dans l'adhésion des cellules tumorales ovariennes au péritoine. Nous déterminerons dans des modèles murins de carcinose péritonéale si la présence d'Hospicells entraîne une augmentation du nombre d'implants péritonéaux. De plus, nous observerons si en présence d'Hospicells, ces implants se localisent préférentiellement au niveau de certains organes.

Les Hospicells sont capables de favoriser la croissance tumorale *via* une augmentation de l'angiogenèse, de réguler la composition et la nature des cellules immunitaires et d'induire une chimiorésistance par contact cellulaire et la sécrétion de facteurs solubles (7-9, 241). Les Hospicells pourraient également réguler la composition de la MEC, favoriser l'adhésion des cellules tumorales ovariennes et ainsi activer la dissémination tumorale et la formation de micro-implants tumoraux à l'origine de fréquentes récurrences.

Les Hospicells tiennent donc un rôle majeur au sein du microenvironnement tumoral et participent à l'activation de la progression tumorale ovarienne.

8. Conclusion

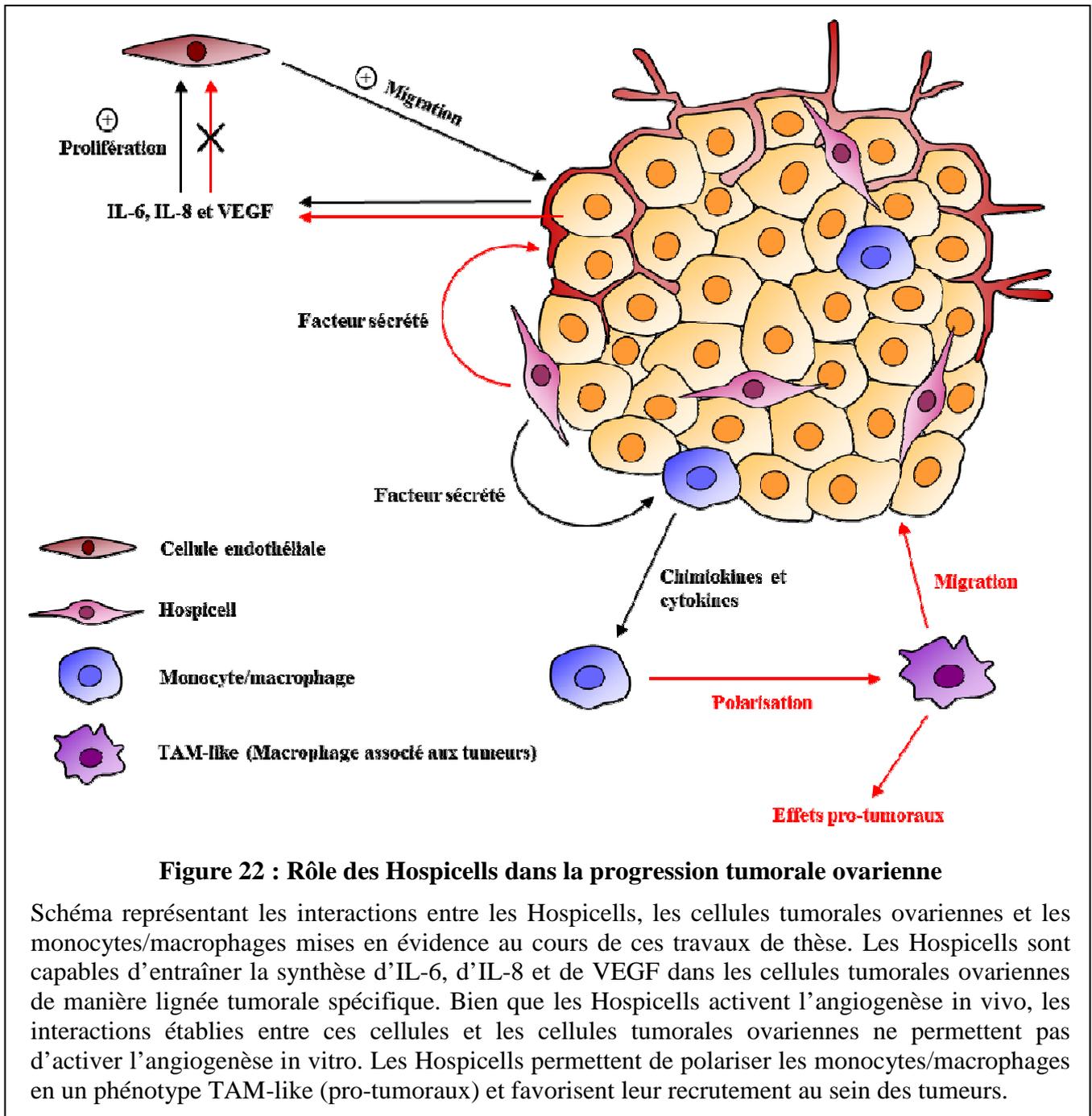
Les Hospicells sont des cellules stromales ovariennes dont le phénotype pourrait correspondre à un état intermédiaire de différenciation entre les MSCs et les CAFs. Les études réalisées au cours de ces dernières années ont montré un rôle de ces cellules dans l'acquisition de la chimiorésistance, l'immunosuppression ou encore l'activation de la croissance tumorale *via* une régulation de l'angiogenèse (7-9).

Nous avons mis en évidence la capacité des Hospicells à activer la synthèse de cytokines pro-tumorales (IL-6, IL-8, VEGF) dans les cellules ovariennes. Nous avons également montré que les Hospicells entraînent le recrutement de monocytes/macrophages au sein des tumeurs ovariennes et

sont capables de polariser ces cellules en un phénotype proche des TAMs (**Figure 22**). Les Hospicells pourraient activer ces macrophages *via* la sécrétion de NO et l'axe pro-inflammatoire COX-2/PGE₂.

Bien que les rôles des Hospicells sur la régulation de la MEC et la composition du système immunitaire demeurent à l'étude, il est clairement établi que ces cellules constituent un acteur clé du microenvironnement tumoral ovarien. Ces travaux indiquent que les Hospicells, au même titre que d'autres cellules stromales telles que les MSCs, les CAFs et les TAMs, pourraient être à l'origine de l'acquisition de la chimiorésistance et de la dissémination tumorale ovarienne, problématiques majeures dans le cancer ovarien.

Les connaissances accumulées sur le mode d'action des Hospicells permettent d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer ovarien.



Bibliographie

1. Colombo, N., Van, Gorp T., Parma, G., Amant, F., Gatta, G. et.al. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2006**, *2*, 159-179.
2. Hennessy, B. T., Coleman, R. L., and Markman, M. Ovarian cancer. *Lancet* **2009**, *9698*, 1371-1382.
3. Romero, I. and Bast, R. C., Jr. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* **2012**, *4*, 1593-1602.
4. Hanahan, D. and Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *3*, 309-322.
5. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *5*, 646-674.
6. Bissell, M. J. and Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* **2001**, *1*, 46-54.
7. Rafii, A., Mirshahi, P., Poupot, M., Faussat, A. M., Simon, A. et.al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours
2. *PLoS.One.* **2008**, *12*, e3894-
8. Martinet, L., Poupot, R., Mirshahi, P., Rafii, A., Fournie, J. J. et.al. Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *Int J Cancer* **2010**, *9*, 2143-2152.
9. Pasquet, M., Golzio, M., Mery, E., Rafii, A., Benabbou, N. et.al. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* **2010**, *9*, 2090-2101.
10. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. et.al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **2011**, *2*, 69-90.
11. Sant, M., Allemani, C., Santaquilani, M., Knijn, A., Marchesi, F. et.al. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* **2009**, *6*, 931-991.
12. Shih, IeM and Kurman, R. J. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* **2004**, *5*, 1511-1518.
13. Vaughan, S., Coward, J. I., Bast, R. C., Jr., Berchuck, A., Berek, J. S. et.al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* **2011**, *10*, 719-725.
14. Baba, T., Convery, P. A., Matsumura, N., Whitaker, R. S., Kondoh, E. et.al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene* **2009**, *2*, 209-218.
15. Ferrandina, G., Bonanno, G., Pierelli, L., Perillo, A., Procoli, A. et.al. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *Int J Gynecol.Cancer* **2008**, *3*, 506-514.
16. Alvero, A. B., Chen, R., Fu, H. H., Montagna, M., Schwartz, P. E. et.al. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle* **2009**, *1*, 158-166.
17. Alvero, A. B., Montagna, M. K., Craveiro, V., Liu, L., and Mor, G. Distinct Subpopulations of Epithelial Ovarian Cancer Cells Can Differentially Induce Macrophages and T Regulatory Cells Toward a Pro-Tumor Phenotype. *Am J Reprod.Immunol.* **2011**,

18. Ma, L., Lai, D., Liu, T., Cheng, W., and Guo, L. Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai)* **2010**, *9*, 593-602.
19. Gubbels, J. A., Claussen, N., Kapur, A. K., Connor, J. P., and Patankar, M. S. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian.Res* **2010**, *8*-
20. Theriault, C., Pinard, M., Comamala, M., Migneault, M., Beaudin, J. et.al. MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis. *Gynecol.Oncol* **2011**, *3*, 434-443.
21. Moore, R. G., Brown, A. K., Miller, M. C., Skates, S., Allard, W. J. et.al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol.Oncol* **2008**, *2*, 402-408.
22. Anderson, G. L., McIntosh, M., Wu, L., Barnett, M., Goodman, G. et.al. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study. *J Natl Cancer Inst* **2010**, *1*, 26-38.
23. Andersen, M. R., Goff, B. A., Lowe, K. A., Scholler, N., Bergan, L. et.al. Combining a symptoms index with CA 125 to improve detection of ovarian cancer. *Cancer* **2008**, *3*, 484-489.
24. Ferron, G., Martinez, A., Mery, E., Querleu, D., Thomas, F. et.al. [Importance of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in ovarian cancer]. *Bull Cancer* **2009**, *12*, 1243-1252.
25. Armstrong, D. K., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H. Q., Baergen, R. et.al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* **2006**, *1*, 34-43.
26. Mery, E., Jouve, E., Guillermet, S., Bourgoignon, M., Castells, M. et.al. Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study. *Gynecol.Oncol* **2011**, *1*, 155-162.
27. Heitz, F., Harter, P., Barinoff, J., Beutel, B., Kannisto, P. et.al. Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer. *Adv.Ther* **2012**, *9*, 723-735.
28. Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I. et.al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med* **2012**, *15*, 1382-1392.
29. Castells, M., Thibault, B., Delord, J. P., and Couderc, B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* **2012**, *8*, 9545-9571.
30. Curtis, H. J. Formal discussion of: somatic mutations and carcinogenesis. *Cancer Res* **1965**, *8*, 1305-1308.
31. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **1989**, *2*, 98-101.
32. Bissell, M. J. and Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* **2001**, *1*, 46-54.
33. Barcellos-Hoff, M. H. The potential influence of radiation-induced microenvironments in neoplastic progression. *J Mammary.Gland.Biol Neoplasia*. **1998**, *2*, 165-175.
34. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *1*, 57-70.

35. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *5*, 646-674.
36. Barbolina, M. V., Moss, N. M., Westfall, S. D., Liu, Y., Burkhalter, R. J. et.al. Microenvironmental regulation of ovarian cancer metastasis. *Cancer Treat.Res* **2009**, 319-334.
37. Xu, Y., Gaudette, D. C., Boynton, J. D., Frankel, A., Fang, X. J. et.al. Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* **1995**, *10*, 1223-1232.
38. Moradi, M. M., Carson, L. F., Weinberg, B., Haney, A. F., Twiggs, L. B. et.al. Serum and ascitic fluid levels of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in patients with ovarian epithelial cancer. *Cancer* **1993**, *8*, 2433-2440.
39. Xu, Y., Gaudette, D. C., Boynton, J. D., Frankel, A., Fang, X. J. et.al. Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients
1. *Clin Cancer Res* **1995**, *10*, 1223-1232.
40. Xu, Y., Shen, Z., Wiper, D. W., Wu, M., Morton, R. E. et.al. Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *JAMA* **1998**, *8*, 719-723.
41. Frankel, A. and Mills, G. B. Peptide and lipid growth factors decrease cis-diamminedichloroplatinum-induced cell death in human ovarian cancer cells
2. *Clin Cancer Res* **1996**, *8*, 1307-1313.
42. Xu, Y., Fang, X. J., Casey, G., and Mills, G. B. Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells
1. *Biochem J* **1995**, 933-940.
43. Yang, K., Zheng, D., Deng, X., Bai, L., Xu, Y. et.al. Lysophosphatidic acid activates telomerase in ovarian cancer cells through hypoxia-inducible factor-1alpha and the PI3K pathway. *J Cell Biochem.* **2008**, *5*, 1194-1201.
44. Li, H., Wang, D., Zhang, H., Kirmani, K., Zhao, Z. et.al. Lysophosphatidic acid stimulates cell migration, invasion, and colony formation as well as tumorigenesis/metastasis of mouse ovarian cancer in immunocompetent mice
1. *Mol.Cancer Ther* **2009**, *6*, 1692-1701.
45. Fang, X., Schummer, M., Mao, M., Yu, S., Tabassam, F. H. et.al. Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer
1. *Biochim.Biophys Acta* **2002**, *1-3*, 257-264.
46. Fang, X., Yu, S., Bast, R. C., Liu, S., Xu, H. J. et.al. Mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* **2004**, *10*, 9653-9661.
47. Schwartz, B. M., Hong, G., Morrison, B. H., Wu, W., Baudhuin, L. M. et.al. Lysophospholipids increase interleukin-8 expression in ovarian cancer cells. *Gynecol.Oncol* **2001**, *2*, 291-300.
48. So, J., Navari, J., Wang, F. Q., and Fishman, D. A. Lysophosphatidic acid enhances epithelial ovarian carcinoma invasion through the increased expression of interleukin-8
1. *Gynecol Oncol* **2004**, *2*, 314-322.
49. Hu, Y. L., Tee, M. K., Goetzl, E. J., Auersperg, N., Mills, G. B. et.al. Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells

12. *J Natl Cancer Inst* **2001**, *10*, 762-768.
50. Fishman, D. A., Liu, Y., Ellerbroek, S. M., and Stack, M. S. Lysophosphatidic acid promotes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-dependent invasion in ovarian cancer cells
11. *Cancer Res* **2001**, *7*, 3194-3199.
51. Said, N. A., Elmarakby, A. A., Imig, J. D., Fulton, D. J., and Motamed, K. SPARC ameliorates ovarian cancer-associated inflammation. *Neoplasia*. **2008**, *10*, 1092-1104.
52. Sengupta, S., Kim, K. S., Berk, M. P., Oates, R., Escobar, P. et.al. Lysophosphatidic acid downregulates tissue inhibitor of metalloproteinases, which are negatively involved in lysophosphatidic acid-induced cell invasion
2. *Oncogene* **2007**, *20*, 2894-2901.
53. Wang, G. L., Wen, Z. Q., Xu, W. P., Wang, Z. Y., Du, X. L. et.al. Inhibition of lysophosphatidic acid receptor-2 expression by RNA interference decreases lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator activation, cell invasion, and migration in ovarian cancer SKOV-3 cells
1. *Croat.Med J* **2008**, *2*, 175-181.
54. Al-Hassan, N. N., Behzadian, A., Caldwell, R., Ivanova, V. S., Syed, V. et.al. Differential roles of uPAR in peritoneal ovarian carcinomatosis. *Neoplasia*. **2012**, *4*, 259-270.
55. Hong, G., Baudhuin, L. M., and Xu, Y. Sphingosine-1-phosphate modulates growth and adhesion of ovarian cancer cells. *FEBS Lett*. **1999**, *3*, 513-518.
56. Devine, K. M., Smicun, Y., Hope, J. M., and Fishman, D. A. S1P induced changes in epithelial ovarian cancer proteolysis, invasion, and attachment are mediated by Gi and Rac. *Gynecol.Oncol* **2008**, *2*, 237-245.
57. Smicun, Y., Reierstad, S., Wang, F. Q., Lee, C., and Fishman, D. A. S1P regulation of ovarian carcinoma invasiveness. *Gynecol.Oncol* **2006**, *3*, 952-959.
58. Park, K. S., Kim, M. K., Lee, H. Y., Kim, S. D., Lee, S. Y. et.al. S1P stimulates chemotactic migration and invasion in OVCAR3 ovarian cancer cells. *Biochem.Biophys.Res Commun*. **2007**, *1*, 239-244.
59. Munkarah, A. R., Morris, R., Baumann, P., Deppe, G., Malone, J. et.al. Effects of prostaglandin E(2) on proliferation and apoptosis of epithelial ovarian cancer cells. *J Soc.Gynecol.Investig*. **2002**, *3*, 168-173.
60. Ali-Fehmi, R., Morris, R. T., Bandyopadhyay, S., Che, M., Schimp, V. et.al. Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival. *Am J Obstet.Gynecol*. **2005**, *3*, 819-825.
61. Ferrandina, G., Lauriola, L., Distefano, M. G., Zannoni, G. F., Gessi, M. et.al. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *J Clin Oncol* **2002**, *4*, 973-981.
62. Obermajer, N., Muthuswamy, R., Odunsi, K., Edwards, R. P., and Kalinski, P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res* **2011**, *24*, 7463-7470.

63. Naka, T., Nishimoto, N., and Kishimoto, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine
7. *Arthritis Res* **2002**, S233-S242.
64. Garg, R., Wollan, M., Galic, V., Garcia, R., Goff, B. A. et.al. Common polymorphism in interleukin 6 influences survival of women with ovarian and peritoneal carcinoma
4. *Gynecol Oncol* **2006**, 3, 793-796.
65. Plante, M., Rubin, S. C., Wong, G. Y., Federici, M. G., Finstad, C. L. et.al. Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer
1. *Cancer* **1994**, 7, 1882-1888.
66. Tempfer, C., Zeisler, H., Sliutz, G., Haeusler, G., Hanzal, E. et.al. Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients
6. *Gynecol Oncol* **1997**, 1, 27-30.
67. Rath, K. S., Funk, H. M., Bowling, M. C., Richards, W. E., and Drew, A. F. Expression of soluble interleukin-6 receptor in malignant ovarian tissue
1. *Am J Obstet.Gynecol* **2010**, 3, 230-238.
68. Syed, V., Ulinski, G., Mok, S. C., and Ho, S. M. Reproductive hormone-induced, STAT3-mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells
1. *J Natl Cancer Inst* **2002**, 8, 617-629.
69. Obata, N. H., Tamakoshi, K., Shibata, K., Kikkawa, F., and Tomoda, Y. Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma
5. *Anticancer Res* **1997**, 1A, 337-342.
70. Nash, M. A., Ferrandina, G., Gordinier, M., Loercher, A., and Freedman, R. S. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary
1. *Endocr Relat.Cancer* **1999**, 1, 93-107.
71. Nilsson, M. B., Langley, R. R., and Fidler, I. J. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine
2. *Cancer Res* **2005**, 23, 10794-10800.
72. Penson, R. T., Kronish, K., Duan, Z., Feller, A. J., Stark, P. et.al. Cytokines IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel
11. *Int J Gynecol Cancer* **2000**, 1, 33-41.
73. Scambia, G., Testa, U., Benedetti, Panici P., Foti, E., Martucci, R. et.al. Prognostic significance of interleukin 6 serum levels in patients with ovarian cancer
1. *Br J Cancer* **1995**, 2, 354-356.
74. Wang, Y., Niu, X. L., Qu, Y., Wu, J., Zhu, Y. Q. et.al. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells
1. *Cancer Lett.* **2010**, 1, 110-123.
75. Waugh, D. J. and Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer
1. *Clin Cancer Res* **2008**, 21, 6735-6741.

76. Kassim, S. K., El Salahy, E. M., Fayed, S. T., Helal, S. A., Helal, T. et.al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients
1. *Clin Biochem* **2004**, *5*, 363-369.
77. Merritt, W. M., Lin, Y. G., Spannuth, W. A., Fletcher, M. S., Kamat, A. A. et.al. Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth
1. *J Natl Cancer Inst* **2008**, *5*, 359-372.
78. Shahzad, M. M., Arevalo, J. M., Armaiz Pena, G. N., Lu, C., Stone, R. L. et.al. Stress effects on FOSB and interleukin-8 (IL8) driven ovarian cancer growth and metastasis
1. *J Biol Chem* **2010**,
79. Xu, L. and Fidler, I. J. Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer
4. *Oncol Res* **2000**, *2*, 97-106.
80. Lee, L. F., Hellendall, R. P., Wang, Y., Haskill, J. S., Mukaida, N. et.al. IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *J Immunol.* **2000**, *5*, 2769-2775.
81. Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **2003**, *6*, 669-676.
82. Mesiano, S., Ferrara, N., and Jaffe, R. B. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization
2. *Am J Pathol.* **1998**, *4*, 1249-1256.
83. Huang, S., Robinson, J. B., Deguzman, A., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8
2. *Cancer Res* **2000**, *19*, 5334-5339.
84. Hu, L., Hofmann, J., Zaloudek, C., Ferrara, N., Hamilton, T. et.al. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer
2. *Am J Pathol.* **2002**, *5*, 1917-1924.
85. Hu, L., Hofmann, J., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Sood, A. K. et.al. Vascular endothelial growth factor trap combined with paclitaxel strikingly inhibits tumor and ascites, prolonging survival in a human ovarian cancer model
1. *Clin Cancer Res* **2005**, *19 Pt 1*, 6966-6971.
86. Psyrris, A., Kassar, M., Yu, Z., Bamias, A., Weinberger, P. M. et.al. Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **2005**, *24 Pt 1*, 8637-8643.
87. Schilder, R. J., Pathak, H. B., Lokshin, A. E., Holloway, R. W., Alvarez, R. D. et.al. Phase II trial of single agent cetuximab in patients with persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma with the potential for dose escalation to rash. *Gynecol.Oncol* **2009**, *1*, 21-27.

88. Ahmed, N., Maines-Bandiera, S., Quinn, M. A., Unger, W. G., Dedhar, S. et.al. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* **2006**, *6*, C1532-C1542.
89. Colomiere, M., Ward, A. C., Riley, C., Trenerry, M. K., Cameron-Smith, D. et.al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer* **2009**, *1*, 134-144.
90. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* **2009**, *5*, 361-371.
91. Naylor, M. S., Stamp, G. W., Foulkes, W. D., Eccles, D., and Balkwill, F. R. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* **1993**, *5*, 2194-2206.
92. Kulbe, H., Thompson, R., Wilson, J. L., Robinson, S., Hagemann, T. et.al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* **2007**, *2*, 585-592.
93. Charles, K. A., Kulbe, H., Soper, R., Escorcio-Correia, M., Lawrence, T. et.al. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest* **2009**, *10*, 3011-3023.
94. Elliott, R. L. and Blobe, G. C. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* **2005**, *9*, 2078-2093.
95. Rodriguez, G. C., Haisley, C., Hurteau, J., Moser, T. L., Whitaker, R. et.al. Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor-beta. *Gynecol.Oncol* **2001**, *2*, 245-253.
96. Nakanishi, Y., Kodama, J., Yoshinouchi, M., Tokumo, K., Kamimura, S. et.al. The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol.Pathol* **1997**, *3*, 256-262.
97. Lu, P., Weaver, V. M., and Werb, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* **2012**, *4*, 395-406.
98. Elmasri, W. M., Casagrande, G., Hoskins, E., Kimm, D., and Kohn, E. C. Cell adhesion in ovarian cancer. *Cancer Treat.Res* **2009**, 297-318.
99. Yoshida, Y., Kurokawa, T., Nishikawa, Y., Orisa, M., Kleinman, H. K. et.al. Laminin-1-derived scrambled peptide AG73T disaggregates laminin-1-induced ovarian cancer cell spheroids and improves the efficacy of cisplatin. *Int J Oncol* **2008**, *3*, 673-681.
100. Boylan, K. L., Misemer, B., Derycke, M. S., Andersen, J. D., Harrington, K. M. et.al. Claudin 4 Is Differentially Expressed between Ovarian Cancer Subtypes and Plays a Role in Spheroid Formation. *Int J Mol Sci* **2011**, *2*, 1334-1358.
101. Li, J., Chigurupati, S., Agarwal, R., Mughal, M. R., Mattson, M. P. et.al. Possible angiogenic roles for claudin-4 in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* **2009**, *19*, 1806-1814.
102. Yang, Z. and Zhao, X. A 3D model of ovarian cancer cell lines on peptide nanofiber scaffold to explore the cell-scaffold interaction and chemotherapeutic resistance of anticancer drugs. *Int J Nanomedicine*. **2011**, 303-310.

103. Chang, M. C., Chen, C. A., Chen, P. J., Chiang, Y. C., Chen, Y. L. et.al. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. *Biochem.J* **2012**, 2, 293-302.
104. Zecchini, S., Bombardelli, L., Decio, A., Bianchi, M., Mazzarol, G. et.al. The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signalling. *EMBO Mol Med* **2011**, 8, 480-494.
105. Colombo, N. and Cavallaro, U. The interplay between NCAM and FGFR signalling underlies ovarian cancer progression. *Ecancermedicalscience*. **2011**, 226-
106. Fogel, M., Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A. et.al. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* **2003**, 9387, 869-875.
107. Bondong, S., Kiefel, H., Hielscher, T., Zeimet, A. G., Zeillinger, R. et.al. Prognostic significance of L1CAM in ovarian cancer and its role in constitutive NF-kappaB activation. *Ann Oncol* **2012**, 7, 1795-1802.
108. Stoeck, A., Gast, D., Sanderson, M. P., Issa, Y., Gutwein, P. et.al. L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol.Oncol* **2007**, 2, 461-469.
109. Mok, S. C., Chan, W. Y., Wong, K. K., Muto, M. G., and Berkowitz, R. S. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells
4. *Oncogene* **1996**, 9, 1895-1901.
110. Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, S. W., Chan, P. S., Cheung, K. K. et.al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells
3. *Am J Pathol.* **2001**, 2, 609-622.
111. Said, N. and Motamed, K. Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis
7. *Am J Pathol.* **2005**, 6, 1739-1752.
112. Said, N. A., Najwer, I., Socha, M. J., Fulton, D. J., Mok, S. C. et.al. SPARC inhibits LPA-mediated mesothelial-ovarian cancer cell crosstalk
5. *Neoplasia.* **2007**, 1, 23-35.
113. Said, N., Socha, M. J., Olearczyk, J. J., Elmarakby, A. A., Imig, J. D. et.al. Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC
4. *Mol.Cancer Res* **2007**, 10, 1015-1030.
114. Anttila, M. A., Tammi, R. H., Tammi, M. I., Syrjanen, K. J., Saarikoski, S. V. et.al. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **2000**, 1, 150-155.
115. Cannistra, S. A., Kansas, G. S., Niloff, J., DeFranzo, B., Kim, Y. et.al. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Res* **1993**, 16, 3830-3838.
116. Lessan, K., Aguiar, D. J., Oegema, T., Siebenson, L., and Skubitz, A. P. CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol.* **1999**, 5, 1525-1537.

117. Niedbala, M. J., Crickard, K., and Bernacki, R. J. Interactions of human ovarian tumor cells with human mesothelial cells grown on extracellular matrix. An in vitro model system for studying tumor cell adhesion and invasion. *Exp Cell Res* **1985**, 2, 499-513.
118. Strobel, T., Swanson, L., and Cannistra, S. A. 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**, 7, 1228-1232.
119. Yeo, T. K., Nagy, J. A., Yeo, K. T., Dvorak, H. F., and Toole, B. P. Increased hyaluronan at sites of attachment to mesentery by CD44-positive mouse ovarian and breast tumor cells. *Am J Pathol* **1996**, 6, 1733-1740.
120. Tzuman, Y. C., Sapoznik, S., Granot, D., Nevo, N., and Neeman, M. Peritoneal adhesion and angiogenesis in ovarian carcinoma are inversely regulated by hyaluronan: the role of gonadotropins. *Neoplasia*. **2010**, 1, 51-60.
121. Voutilainen, K., Anttila, M., Sillanpaa, S., Tammi, R., Tammi, M. et.al. Versican in epithelial ovarian cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors and prognosis. *Int J Cancer* **2003**, 3, 359-364.
122. Ween, M. P., Oehler, M. K., and Ricciardelli, C. Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* **2011**, 2, 1009-1029.
123. Zhu, M., Fejzo, M. S., Anderson, L., Dering, J., Ginther, C. et.al. Periostin promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis. *Gynecol.Oncol* **2010**, 2, 337-344.
124. Zhu, M., Saxton, R. E., Ramos, L., Chang, D. D., Karlan, B. Y. et.al. Neutralizing monoclonal antibody to periostin inhibits ovarian tumor growth and metastasis. *Mol Cancer Ther* **2011**, 8, 1500-1508.
125. Hapke, S., Kessler, H., Lubber, B., Bengel, A., Hutzler, P. et.al. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem*. **2003**, 7, 1073-1083.
126. Sodek, K. L., Ringuette, M. J., and Brown, T. J. MT1-MMP is the critical determinant of matrix degradation and invasion by ovarian cancer cells. *Br J Cancer* **2007**, 3, 358-367.
127. Moss, N. M., Barbolina, M. V., Liu, Y., Sun, L., Munshi, H. G. et.al. 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* **2009**, 17, 7121-7129.
128. Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Ben Baruch, G. et.al. High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. **1999**, 10, 799-808.
129. Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Ben Baruch, G. et.al. The prognostic value of metalloproteinases and angiogenic factors in ovarian carcinoma. *Mol.Cell Endocrinol*. **2002**, 1-2, 39-45.
130. Kamat, A. A., Fletcher, M., Gruman, L. M., Mueller, P., Lopez, A. et.al. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer
2. *Clin Cancer Res* **2006**, 6, 1707-1714.

131. Noskova, V., Ahmadi, S., Asander, E., and Casslen, B. Ovarian cancer cells stimulate uPA gene expression in fibroblastic stromal cells via multiple paracrine and autocrine mechanisms. *Gynecol Oncol* **2009**, *1*, 121-126.
132. Boyd, R. S. and Balkwill, F. R. MMP-2 release and activation in ovarian carcinoma: the role of fibroblasts. *Br J Cancer* **1999**, *3-4*, 315-321.
133. Westerlund, A., Hujanen, E., Puistola, U., and Turpeenniemi-Hujanen, T. Fibroblasts stimulate human ovarian cancer cell invasion and expression of 72-kDa gelatinase A (MMP-2). *Gynecol Oncol* **1997**, *1*, 76-82.
134. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A* **2001**, *21*, 12072-12077.
135. Yang, G., Rosen, D. G., Zhang, Z., Bast, R. C., Jr., Mills, G. B. et.al. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *44*, 16472-16477.
136. Lawrenson, K., Grun, B., Benjamin, E., Jacobs, I. J., Dafou, D. et.al. Senescent fibroblasts promote neoplastic transformation of partially transformed ovarian epithelial cells in a three-dimensional model of early stage ovarian cancer. *Neoplasia*. **2010**, *4*, 317-325.
137. Xing, F., Saidou, J., and Watabe, K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci*. **2010**, 166-179.
138. Ostman, A. and Augsten, M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr.Opin.Genet Dev*. **2009**, *1*, 67-73.
139. Zhang, Y., Tang, H., Cai, J., Zhang, T., Guo, J. et.al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett*. **2011**, *1*, 47-55.
140. Schauer, I. G., Sood, A. K., Mok, S., and Liu, J. Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*. **2011**, *5*, 393-405.
141. Cho, J. A., Park, H., Lim, E. H., Kim, K. H., Choi, J. S. et.al. Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol.Oncol* **2011**, *2*, 379-386.
142. Yao, Q., Qu, X., Yang, Q., Wei, M., and Kong, B. CLIC4 mediates TGF-beta1-induced fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in ovarian cancer. *Oncol Rep*. **2009**, *3*, 541-548.
143. Cai, J., Tang, H., Xu, L., Wang, X., Yang, C. et.al. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis* **2012**, *1*, 20-29.
144. Lai, D., Ma, L., and Wang, F. Fibroblast activation protein regulates tumor-associated fibroblasts and epithelial ovarian cancer cells. *Int J Oncol* **2012**, *2*, 541-550.
145. Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **2003**, *6*, 422-433.
146. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **2003**, *6*, 653-660.

147. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **2005**, 7070, 932-936.
148. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **1971**, 21, 1182-1186.
149. Carmeliet, P. and Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, 6801, 249-257.
150. Hollingsworth, H. C., Kohn, E. C., Steinberg, S. M., Rothenberg, M. L., and Merino, M. J. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* **1995**, 1, 33-41.
151. Su, Y., Zheng, L., Wang, Q., Li, W., Cai, Z. et.al. Quantity and clinical relevance of circulating endothelial progenitor cells in human ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **2010**, 27-
152. Collino, F., Revelli, A., Massobrio, M., Katsaros, D., Schmitt-Ney, M. et.al. Epithelial-mesenchymal transition of ovarian tumor cells induces an angiogenic monocyte cell population. *Exp Cell Res* **2009**, 17, 2982-2994.
153. Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J. et.al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* **2000**, 3, 952-958.
154. Alvero, A. B., Fu, H. H., Holmberg, J., Visintin, I., Mor, L. et.al. Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors. *Stem Cells* **2009**, 10, 2405-2413.
155. Kusumbe, A. P., Mali, A. M., and Bapat, S. A. CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells* **2009**, 3, 498-508.
156. Liby, T. A., Spyropoulos, P., Buff, Lindner H., Eldridge, J., Beeson, C. et.al. Akt3 controls vascular endothelial growth factor secretion and angiogenesis in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* **2012**, 3, 532-543.
157. Su, Y., Zheng, L., Wang, Q., Bao, J., Cai, Z. et.al. The PI3K/Akt pathway upregulates Id1 and integrin alpha4 to enhance recruitment of human ovarian cancer endothelial progenitor cells. *BMC Cancer* **2010**, 459-
158. Duncan, T. J., Al-Attar, A., Rolland, P., Scott, I. V., Deen, S. et.al. Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? *Clin Cancer Res* **2008**, 10, 3030-3035.
159. Li, L., Wang, L., Zhang, W., Tang, B., Zhang, J. et.al. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. *Anticancer Res* **2004**, 3b, 1973-1979.
160. Byrne, A. T., Ross, L., Holash, J., Nakanishi, M., Hu, L. et.al. Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* **2003**, 15, 5721-5728.
161. Nascimento, I., Schaer, R., Lemaire, D., Freire, S., Paule, B. et.al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels as a tool to discriminate between malignant and nonmalignant ascites. *APMIS* **2004**, 9, 585-587.
162. Spannuth, W. A., Nick, A. M., Jennings, N. B., Armaiz-Pena, G. N., Mangala, L. S. et.al. Functional significance of VEGFR-2 on ovarian cancer cells. *Int J Cancer* **2009**, 5, 1045-1053.

163. Hagemann, T., Robinson, S. C., Thompson, R. G., Charles, K., Kulbe, H. et.al. Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression, and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* **2007**, 7, 1993-2002.
164. Lin, Y. G., Han, L. Y., Kamat, A. A., Merritt, W. M., Landen, C. N. et.al. EphA2 overexpression is associated with angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer* **2007**, 2, 332-340.
165. Yabushita, H., Shimazu, M., Noguchi, M., Kishida, T., Narumiya, H. et.al. Vascular endothelial growth factor activating matrix metalloproteinase in ascitic fluid during peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Oncol Rep*. **2003**, 1, 89-95.
166. Belotti, D., Calcagno, C., Garofalo, A., Caronia, D., Riccardi, E. et.al. Vascular endothelial growth factor stimulates organ-specific host matrix metalloproteinase-9 expression and ovarian cancer invasion. *Mol Cancer Res* **2008**, 4, 525-534.
167. Agarwal, A., Tressel, S. L., Kaimal, R., Balla, M., Lam, F. H. et.al. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Res* **2010**, 14, 5880-5890.
168. Sonoda, T., Kobayashi, H., Kaku, T., Hirakawa, T., and Nakano, H. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett*. **2003**, 2, 229-237.
169. Keyes, K. A., Mann, L., Teicher, B., and Alvarez, E. Site-dependent angiogenic cytokine production in human tumor xenografts. *Cytokine* **2003**, 2, 98-104.
170. Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. **2008**, 9, 726-736.
171. Jiang, J., Chen, W., Zhuang, R., Song, T., and Li, P. The effect of endostatin mediated by human mesenchymal stem cells on ovarian cancer cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* **2010**, 6, 873-881.
172. Zheng, L., Zhang, D., Chen, X., Yang, L., Wei, Y. et.al. Antitumor activities of human placenta-derived mesenchymal stem cells expressing endostatin on ovarian cancer. *PLoS.One*. **2012**, 7, e39119-
173. Klopp, A. H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M., and Marini, F., III. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* **2011**, 1, 11-19.
174. Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W. et.al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **2007**, 7162, 557-563.
175. Jeon, E. S., Moon, H. J., Lee, M. J., Song, H. Y., Kim, Y. M. et.al. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* **2008**, 3, 789-797.
176. Lis, R., Touboul, C., Mirshahi, P., Ali, F., Mathew, S. et.al. Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12
1. *Int J Cancer* **2010**,

177. Touboul, C., Lis, R., Al, Farsi H., Raynaud, C. M., Warfa, M. et.al. Mesenchymal stem cells enhance ovarian cancer cell infiltration through IL6 secretion in an amniochorionic membrane based 3D model. *J.Transl.Med.* **2013**, *1*, 28-
178. McLean, K., Gong, Y., Choi, Y., Deng, N., Yang, K. et.al. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* **2011**, *8*, 3206-3219.
179. Subramanian, A., Shu-Uin, G., Kae-Siang, N., Gauthaman, K., Biswas, A. et.al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells do not transform to tumor-associated fibroblasts in the presence of breast and ovarian cancer cells unlike bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* **2012**, *6*, 1886-1895.
180. Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R. et.al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* **2011**, *11*, 1498-1503.
181. Protani, M. M., Nagle, C. M., and Webb, P. M. Obesity and ovarian cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev.Res (Phila)* **2012**, *7*, 901-910.
182. Cannistra, S. A. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* **2004**, *24*, 2519-2529.
183. Rieppi, M., Vergani, V., Gatto, C., Zanetta, G., Allavena, P. et.al. Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells
1. *Int J Cancer* **1999**, *2*, 303-307.
184. Burleson, K. M., Casey, R. C., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Oegema, T. R., Jr. et.al. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers
4. *Gynecol Oncol* **2004**, *1*, 170-181.
185. Kenny, H. A., Krausz, T., Yamada, S. D., and 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**, *7*, 1463-1472.
186. Offner, F. A., Obrist, P., Stadlmann, S., Feichtinger, H., Klingler, P. et.al. IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells
4. *Cytokine.* **1995**, *6*, 542-547.
187. Ren, J., Xiao, Y. J., Singh, L. S., Zhao, X., Zhao, Z. et.al. Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells
3. *Cancer Res* **2006**, *6*, 3006-3014.
188. Cronauer, M. V., Stadlmann, S., Klocker, H., Abendstein, B., Eder, I. E. et.al. Basic fibroblast growth factor synthesis by human peritoneal mesothelial cells: induction by interleukin-1
1. *Am J Pathol.* **1999**, *6*, 1977-1984.
189. Stadlmann, S., Amberger, A., Pollheimer, J., Gastl, G., Offner, F. A. et.al. Ovarian carcinoma cells and IL-1beta-activated human peritoneal mesothelial cells are possible sources of vascular endothelial growth factor in inflammatory and malignant peritoneal effusions
6. *Gynecol Oncol* **2005**, *3*, 784-789.

190. Grivennikov, S. I., Greten, F. R., and Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, 6, 883-899.
191. Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M. et.al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* **2003**, 3, 203-213.
192. Fialova, A., Partlova, S., Sojka, L., Hromadkova, H., Brtnicky, T. et.al. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: The gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *Int J Cancer* **2012**,
193. Milne, K., Alexander, C., Webb, J. R., Sun, W., Dillon, K. et.al. Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Transl.Med* **2012**, 33-
194. Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y. et.al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A* **2007**, 9, 3360-3365.
195. Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H. et.al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A* **2005**, 51, 18538-18543.
196. Weng, D., Song, B., Durfee, J., Sugiyama, V., Wu, Z. et.al. Induction of cytotoxic T lymphocytes against ovarian cancer-initiating cells. *Int J Cancer* **2011**, 8, 1990-2001.
197. Peng, D. J., Liu, R., and Zou, W. Regulatory T cells in human ovarian cancer. *J Oncol* **2012**, 345164-
198. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P. et.al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **2004**, 9, 942-949.
199. DeNardo, D. G., Barreto, J. B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D. et.al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* **2009**, 2, 91-102.
200. Gavalas, N. G., Karadimou, A., Dimopoulos, M. A., and Bamias, A. Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization. *Clin Dev.Immunol.* **2010**, 791603-
201. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **2008**, 7198, 1051-1057.
202. Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J. et.al. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A* **2008**, 40, 15505-15510.
203. Leveque, L., Deknuydt, F., Bioley, G., Old, L. J., Matsuzaki, J. et.al. Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4+ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *J Immunother.* **2009**, 2, 101-108.
204. Lan, C., Huang, X., Lin, S., Huang, H., Cai, Q. et.al. High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Cell Tissue Res.* **2013**,

205. Lai, D., Wang, F., Chen, Y., Wang, C., Liu, S. et.al. Human ovarian cancer stem-like cells can be efficiently killed by gammadelta T lymphocytes. *Cancer Immunol.Immunother.* **2011**,
206. Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P. et.al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* **2005**, *12*, 5020-5026.
207. Curiel, T. J., Cheng, P., Mottram, P., Alvarez, X., Moons, L. et.al. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* **2004**, *16*, 5535-5538.
208. Huarte, E., Cubillos-Ruiz, J. R., Nesbeth, Y. C., Scarlett, U. K., Martinez, D. G. et.al. Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity. *Cancer Res* **2008**, *18*, 7684-7691.
209. Labidi-Galy, S. I., Sisirak, V., Meeus, P., Gobert, M., Treilleux, I. et.al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* **2011**, *16*, 5423-5434.
210. Labidi-Galy, S. I., Treilleux, I., Goddard-Leon, S., Combes, J. D., Blay, J. Y. et.al. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *Oncoimmunology.* **2012**, *3*, 380-382.
211. Fridlender, Z. G. and Albelda, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **2012**, *5*, 949-955.
212. Piccard, H., Muschel, R. J., and Opdenakker, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2012**, *3*, 296-309.
213. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. et.al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **2004**, *12*, 677-686.
214. Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., and Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* **2013**, *2*, 176-185.
215. Mosser, D. M. and Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* **2008**, *12*, 958-969.
216. Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M. P., Grimaud, L. et.al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **2007**, *13*, 4319-4330.
217. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **2004**, *1*, 71-78.
218. Condeelis, J. and Pollard, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **2006**, *2*, 263-266.
219. Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N. F. et.al. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol.* **2006**, *8*, 5023-5032.
220. Hagemann, T., Wilson, J., Kulbe, H., Li, N. F., Leinster, D. A. et.al. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol.* **2005**, *2*, 1197-1205.

221. Takaishi, K., Komohara, Y., Tashiro, H., Ohtake, H., Nakagawa, T. et.al. Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. *Cancer Sci* **2010**, *10*, 2128-2136.
222. Robinson-Smith, T. M., Isaacsohn, I., Mercer, C. A., Zhou, M., Van, Rooijen N. et.al. Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res* **2007**, *12*, 5708-5716.
223. Kryczek, I., Zou, L., Rodriguez, P., Zhu, G., Wei, S. et.al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* **2006**, *4*, 871-881.
224. Kryczek, I., Wei, S., Zhu, G., Myers, L., Mottram, P. et.al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* **2007**, *18*, 8900-8905.
225. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **2007**, *11*, 2739-2749.
226. Cui, Y., Konig, J., Buchholz, J. K., Spring, H., Leier, I. et.al. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* **1999**, *5*, 929-937.
227. Rabik, C. A. and Dolan, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat.Rev* **2007**, *1*, 9-23.
228. Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* **2006**, *10*, 2566-2573.
229. Pasquet, M., Golzio, M., Mery, E., Rafii, A., Benabbou, N. et.al. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis
1. *Int J Cancer* **2010**, *9*, 2090-2101.
230. Wang, Y., Qu, Y., Niu, X. L., Sun, W. J., Zhang, X. L. et.al. Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine* **2011**, *2*, 365-375.
231. Kalluri, R. and Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat.Rev.Cancer* **2006**, *5*, 392-401.
232. Hao, N. B., Lu, M. H., Fan, Y. H., Cao, Y. L., Zhang, Z. R. et.al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev.Immunol.* **2012**, 948098-
233. Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C. et.al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* **2008**, *5*, 349-355.
234. Qian, B. Z. and Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **2010**, *1*, 39-51.
235. Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., and Mantovani, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2008**, *1*, 1-9.
236. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* **2004**, *7*, 540-550.
237. Coussens, L. M. and Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **2002**, *6917*, 860-867.

238. Graves, D. T., Jiang, Y. L., Williamson, M. J., and Valente, A. J. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science* **1989**, 4925, 1490-1493.
239. Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C. E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* **2004**, 8, 2224-2234.
240. Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc.Biol* **2009**, 5, 1065-1073.
241. Castells, M., Thibault, B., Mery, E., Golzio, M., Pasquet, M. et.al. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* **2012**, 1, 59-68.
242. Negus, R. P., Stamp, G. W., Relf, M. G., Burke, F., Malik, S. T. et.al. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *J Clin Invest* **1995**, 5, 2391-2396.
243. Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M. et.al. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* **2000**, 1, 34-40.
244. Chuang, J. Y., Yang, W. H., Chen, H. T., Huang, C. Y., Tan, T. W. et.al. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells. *J Cell Physiol* **2009**, 2, 418-426.
245. Azenshtein, E., Luboshits, G., Shina, S., Neumark, E., Shahbazian, D. et.al. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res* **2002**, 4, 1093-1102.
246. Miller, M. D. and Krangel, M. S. The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A* **1992**, 7, 2950-2954.
247. Hieshima, K., Imai, T., Baba, M., Shoudai, K., Ishizuka, K. et.al. A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes. *J Immunol.* **1997**, 3, 1140-1149.
248. Zlotnik, A. and Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* **2000**, 2, 121-127.
249. Jeon, E. S., Heo, S. C., Lee, I. H., Choi, Y. J., Park, J. H. et.al. Ovarian cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates secretion of VEGF and stromal cell-derived factor-1 alpha from human mesenchymal stem cells. *Exp Mol.Med* **2010**, 4, 280-293.
250. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **1997**, 3, 355-365.
251. Chen, L., Park, S. M., Tumanov, A. V., Hau, A., Sawada, K. et.al. CD95 promotes tumour growth. *Nature* **2010**, 7297, 492-496.
252. Baldwin, R. L., Tran, H., and Karlan, B. Y. Primary ovarian cancer cultures are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Gynecol.Oncol* **1999**, 2, 265-271.
253. Oz-Arslan, D., Ruscher, W., Myrtek, D., Ziemer, M., Jin, Y. et.al. IL-6 and IL-8 release is mediated via multiple signaling pathways after stimulating dendritic cells with lysophospholipids. *J Leukoc.Biol* **2006**, 2, 287-297.

254. Cummings, R. J., Parinandi, N. L., Zaiman, A., Wang, L., Usatyuk, P. V. et.al. Phospholipase D activation by sphingosine 1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem.* **2002**, 33, 30227-30235.
255. Fukumura, D., Kashiwagi, S., and Jain, R. K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2006**, 7, 521-534.
256. Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., Tajiri, H., Yoshida, S. et.al. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* **1997**, 4, 437-442.
257. Villarete, L. H. and Remick, D. G. Nitric oxide regulation of interleukin-8 gene expression. *Shock* **1997**, 1, 29-35.
258. Andrew, P. J., Harant, H., and Lindley, I. J. Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **1995**, 3, 949-956.
259. Agro, A., Langdon, C., Smith, F., and Richards, C. D. Prostaglandin E2 enhances interleukin 8 (IL-8) and IL-6 but inhibits GM-CSF production by IL-1 stimulated human synovial fibroblasts in vitro. *J Rheumatol.* **1996**, 5, 862-868.
260. Raspollini, M. R., Amunni, G., Villanucci, A., Boddi, V., Baroni, G. et.al. COX-2 status in relation to tumor microvessel density and VEGF expression: analysis in ovarian carcinoma patients with low versus high survival rates. *Oncol Rep.* **2004**, 2, 309-313.
261. Roodhart, J. M., Daenen, L. G., Stigter, E. C., Prins, H. J., Gerrits, J. et.al. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* **2011**, 3, 370-383.
262. Mantovani, A., Germano, G., Marchesi, F., Locatelli, M., and Biswas, S. K. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur.J.Immunol.* **2011**, 9, 2522-2525.
263. Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J. et.al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **2011**, 7355, 222-225.
264. Nastala, C. L., Edington, H. D., McKinney, T. G., Tahara, H., Nalesnik, M. A. et.al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J.Immunol.* **1994**, 4, 1697-1706.
265. Yu, W. G., Ogawa, M., Mu, J., Umehara, K., Tsujimura, T. et.al. IL-12-induced tumor regression correlates with in situ activity of IFN-gamma produced by tumor-infiltrating cells and its secondary induction of anti-tumor pathways. *J.Leukoc.Biol.* **1997**, 4, 450-457.
266. Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H. et.al. The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur.J.Immunol.* **1993**, 9, 2202-2208.
267. Squadrito, M. L. and De, Palma M. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *Mol.Aspects Med.* **2011**, 2, 123-145.
268. DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L. et.al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* **2011**, 1, 54-67.

269. Shree, T., Olson, O. C., Elie, B. T., Kester, J. C., Garfall, A. L. et.al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* **2011**, *23*, 2465-2479.
270. Palermo, C. and Joyce, J. A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* **2008**, *1*, 22-28.
271. Mohamed, M. M. and Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**, *10*, 764-775.
272. Nagahashi, M., Ramachandran, S., Kim, E. Y., Allegood, J. C., Rashid, O. M. et.al. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cancer Res.* **2012**, *3*, 726-735.
273. Wei, D., Richardson, E. L., Zhu, K., Wang, L., Le, X. et.al. Direct demonstration of negative regulation of tumor growth and metastasis by host-inducible nitric oxide synthase. *Cancer Res.* **2003**, *14*, 3855-3859.
274. Konopka, T. E., Barker, J. E., Bamford, T. L., Guida, E., Anderson, R. L. et.al. Nitric oxide synthase II gene disruption: implications for tumor growth and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res.* **2001**, *7*, 3182-3187.
275. Oshima, H., Hioki, K., Popivanova, B. K., Oguma, K., Van, Rooijen N. et.al. Prostaglandin E(2) signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. *Gastroenterology* **2011**, *2*, 596-607.
276. Ferrandina, G., Lauriola, L., Zannoni, G. F., Fagotti, A., Fanfani, F. et.al. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients. *Ann.Oncol.* **2002**, *8*, 1205-1211.
277. Munkarah, A. R., Genhai, Z., Morris, R., Baker, V. V., Deppe, G. et.al. Inhibition of paclitaxel-induced apoptosis by the specific COX-2 inhibitor, NS398, in epithelial ovarian cancer cells. *Gynecol.Oncol.* **2003**, *3*, 429-433.
278. Franchimont, N., Durant, D., Rydzziel, S., and Canalis, E. Platelet-derived growth factor induces interleukin-6 transcription in osteoblasts through the activator protein-1 complex and activating transcription factor-2. *J.Biol.Chem.* **1999**, *10*, 6783-6789.
279. Cheon, H., Sun, Y. K., Yu, S. J., Lee, Y. H., Ji, J. D. et.al. Platelet-derived growth factor-AA increases IL-1beta and IL-8 expression and activates NF-kappaB in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Scand.J.Immunol.* **2004**, *5*, 455-462.
280. Shikada, Y., Yonemitsu, Y., Koga, T., Onimaru, M., Nakano, T. et.al. Platelet-derived growth factor-AA is an essential and autocrine regulator of vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* **2005**, *16*, 7241-7248.
281. Plate, K. H., Breier, G., and Risau, W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol.* **1994**, *3*, 207-218.
282. Yu, J., Ustach, C., and Kim, H. R. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J.Biochem.Mol.Biol.* **2003**, *1*, 49-59.
283. Pietras, K., Rubin, K., Sjoblom, T., Buchdunger, E., Sjoquist, M. et.al. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res.* **2002**, *19*, 5476-5484.

284. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y. et.al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2008**, 2, 141-150.
285. Lis, R., Capdet, J., Mirshahi, P., Lacroix-Triki, M., Dagonnet, F. et.al. Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells. *Int.J.Oncol.* **2010**, 6, 1453-1461.
286. Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G. et.al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* **2008**, 4, 989-997.
287. Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* **2004**, 2, 75-84.
288. Zhang, A., Meng, L., Wang, Q., Xi, L., Chen, G. et.al. Enhanced in vitro invasiveness of ovarian cancer cells through up-regulation of VEGF and induction of MMP-2. *Oncol.Rep.* **2006**, 4, 831-836.
289. Kenny, H. A., Kaur, S., Coussens, L. M., and Lengyel, E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J.Clin.Invest* **2008**, 4, 1367-1379.
290. Kenny, H. A. and Lengyel, E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell Cycle* **2009**, 5, 683-688.

Annexes

1. Article 2 : Microenvironment cells protect ovarian cancer from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation

Microenvironment cells protect ovarian cancer from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation

Magali Castells 1, Delphine Milhas 1,# , Cecile Gandy1,# , Benoit Thibault1, Arash Rafii1, Jean-Pierre Delord 1, Bettina Couderc 1,*

¹ EA4553, Institut Claudius Regaud, F-31062 Toulouse, France and University of Toulouse III, F-31052 Toulouse, France.

These authors contributed equally to the work

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: couderc.bettina@claudiusregaud.fr ; Tel.: +33-5-61-42-46-44; Fax: +33-5-61-42-46-31.

Abstract

Epithelial Ovarian Carcinoma is characterized by high frequency of recurrence (70% of patients) and carboplatin resistance acquisition. Carcinoma-Associated-Mesenchymal Stem Cells CA-MSC has been shown to induce ovarian cancer chemoresistance through trogocytosis. Here we examined CA-MSC properties to protect ovarian cancer cells from carboplatin-induced apoptosis. Apoptosis was determined by Propidium Iodure and Annexin-V-FITC labelling and PARP cleavage analysis. We showed a significant increase of IC50 (Inhibitory Concentration 50) and a 30% decrease of carboplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells incubated in the presence of CA-MSC conditioned medium.

A molecular analysis of apoptosis signaling pathway in response to carboplatin revealed that the presence of CA-MSC CM induced a 30% decrease of effector caspases 3 and 7 activation and proteolysis activity. CA-MSC secretions promoted Akt and XIAP (caspase inhibitor from IAP family) phosphorylation. XIAP depletion by siRNA strategy permitted to restore apoptosis in ovarian cancer cells stimulated by CA-MSC CM.

Factors secreted by CA-MSC are able to confer chemoresistance to carboplatin in ovarian cancer cells through the inhibition of effector caspases activation and apoptosis blockade. The activation of PI3K/Akt signaling pathway and the phosphorylation of its downstream target XIAP underlined the implication of this signaling pathway in ovarian cancer chemoresistance. This study reveals the potentialities of targeting XIAP in ovarian cancer therapy.

Introduction

Ovarian cancer is the most lethal gynaecological cancer due to late diagnosis and high level of recurrence (70% of patients). Patients initially respond to standard treatments which is a cytoreductive surgery and subsequent platinum-based chemotherapy. However recurrence is characterized by chemoresistance leading to 5 years survival less than 30% [1, 2]. More and more evidence pointed the involvement of non-tumoral cells in chemoresistance acquisition. Indeed, this microenvironment has become recognized as a major factor influencing the growth of cancer and impacting the outcome of therapy. While the niche cells are not malignant per se, their role in supporting cancer growth is so vital for the survival of the tumor that they have become an attractive target for chemotherapeutic agents [3]. Meads et al. have shown that environment-mediated drug resistance is rapidly induced by signaling events from the tumor microenvironment and is likely to be reversible because removal of the microenvironment restores the drug sensitivity [4].

Inside the microenvironment we focused on the potential role of mesenchymal stem cells (bone marrow derived mesenchymal stem cells (BM-MSC) or carcinoma associated mesenchymal stem cells (CA-MSC) on the chemoresistance acquisition. MSCs are multipotent cells capable of differentiating into numerous cell types including adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, fibroblasts, perivascular and vascular structures [5]. MSCs are recruited in large numbers to the stroma of developing tumors as they constantly produce paracrine and endocrine signals mobilizing it from the bone marrow [6]. They are defined as CA-MSCs and present some characteristic markers of Carcinoma Associated Fibroblasts (CAFs) (expression of PDGFR, FAP...) [7]. Such MSCs are found to stimulate tumor growth, enhance angiogenesis and promote metastasis formation through the release of a large spectrum of growth factors and cytokines [6, 8, 9]. Little is known on the mechanism leading to the transformation of a BM-MSC to a CA-MSC. Roodhart et al. [10], Xu et al. [11], Hao et al. [12], Jin et al. [13] and our group [14], have recently shown that MSCs are involved in the development of chemoresistance to multiple types of chemotherapies.

Among the several mechanisms involved in drug resistance, efflux pumps such as ABC proteins play an important role in the uptake and distribution of therapeutic drugs and their expression in the target tissue has been associated with resistance to treatment [15]. Rafii et al. have shown that CA-MSC (called Hospicells in their study) are able to confer chemoresistance to ovarian and breast cancer cells by direct cell-cell contact and exchange of membrane patches (oncologic trogocytosis) and notably efflux pumps [16].

A recent study showed the protective effect and cell-cell dependent of MSC on drug induced apoptosis in leukaemia cells [17]. Others studies indicated a role of MSCs secreted factors in chemoresistance. Roodhart and Hao showed that MSC could induce chemoresistance through the release of multiple

factors such as polyunsaturated fatty acids, IL-6, and VEGF in the neighbourhood of tumors cells (for review [18]).

Chemoresistance apparition can result from the inability of the cells to undergo apoptosis in response to chemotherapeutic agent caused by intracellular survival factors [19]. Apoptosis is a well regulated mechanism controlled by pro- and anti-apoptotic proteins and triggered by extracellular or intracellular signals such as TNF α , FasL, DNA damaging agents or mitochondria activation. The activation of caspases is essential for propagating the apoptotic signal and for cellular protein degradation. The initiator caspases (caspase-8 and -10) are first activated upon extracellular stimuli whereas the caspase-9 is activated by the mitochondrial pathway. Once activated by autoproteolytic cleavage, the initiator caspases cleave and activate the effector caspases (caspase-3, -6 and -7) which are responsible for the degradation of essential cellular substrates such as PARP (Poly-ADP-ribose polymerase) (For review [20]).

The activation of caspases represents an etiological factor in the resistance of cancer cells to cytotoxic agents [21]. Indeed potent caspases inhibitors such as IAP (Inhibitor of apoptosis protein) family proteins or FLIP (FLICE-like inhibitory protein) but also the anti-apoptotic PI3K/Akt signaling are involved in ovarian cancers chemoresistance (for review [22]). Platinum salts, reference treatment for ovarian cancer, activate DNA damage response triggering intrinsic and extrinsic apoptosis. For example, cisplatin has been shown to upregulate the expression of a number of apoptosis inducers including p53 [23], Fas and FasL [24], and to downregulate anti-apoptotic proteins such as protein kinase B/Akt [25] or XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) [26]. XIAP also known as inhibitor of apoptosis inhibitor 3 (IAP3) or baculoviral IAP repeat-containing protein 4 (BIRC) is an inhibitor of caspases that belongs to the IAPs family protein [27]. High expression of XIAP has been noticed in ovarian cancer cells and could be involved in cisplatin chemoresistance. Indeed overexpression of XIAP or Akt rendered chemosensitive ovarian cancer cells resistant to cisplatin and downregulation of these proteins in chemoresistant counterparts by antisense or dominant-negative expression facilitated cisplatin-induced apoptosis [23, 25, 26].

In the present study, we examined the possible role of conditioned medium of CA-MSC or BM-MSC in carboplatin resistance in chemosensitive and chemoresistant ovarian adenocarcinoma cells. We showed that this conditioned medium contains factors that protect adenocarcinoma cells from carboplatin- induced apoptosis. CA-MSC secretions inhibited the activity of effector caspases and induced the activation of PI3K/Akt pathway signaling and the phosphorylation of the downstream target XIAP.

Materials and Methods

Cell culture

Hospicells (CA-MSc) [28-30] and CHN cells (human corneal fibroblasts [31]) were obtained from M. Mirshahi (INSERM UMR 736). Human ovarian adenocarcinoma cell (HOAC) lines OVCAR-3 and SKOV-3 cells (ATCC® Numbers HTB-161 and HTB-77) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). HOAC line IGROV-1 was a gift from the Institut Gustave Roussy, Villejuif [32, 33]. HEK293 cells were from qBiogen (France). BM-MSc were from bone marrow of healthy donors and were obtained from Etablissement Français du Sang. MSc were immortalized by SV40 large T antigen. All cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS), penicillin/streptomycin (100 IU/mL/100µg/mL) and 2 mM L-Glutamine (Cambrex biosciences). Cell lines were routinely checked for mycoplasma.

Conditioned media

0.5x10⁶ CA-MSc or BM-MSc were seeded in 100 mm diameter Petri dishes (Falcon, Becton Dickinson) in RPMI with 10% of FCS for 72 hours. Conditioned media (CM) were then collected, 0.22 µm filtered and used to seed HOAC for experiments.

Concentration Inhibitory 50 Assay

HOAC were seeded in 96 wells plate (5000 cells per well) in the presence or absence of CA-MSc or MSc conditioned medium and treated 24 hours after with the indicated concentrations of carboplatin. 48 hours after, cell viability was measured using MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma) assay. Untreated cells were used as 100% of viability.

Annexin V-FITC and Propidium Iodide staining

HOAC were seeded in 6 wells plate (1x10⁵ cells per well) in the presence or absence of CA-MSc or MSc CM. 24 hours after cells were treated with 250 µM carboplatin for 48 hours and then harvested for co-staining with FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) following instructions of the manufacturer. Analyses were performed on a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) and CellQuest software (BD Bioscience).

Western-blotting analysis

50 µg of proteins were separated by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel. Proteins were transferred on a methanol activated PVDF membrane. Membranes were saturated 1 hour in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl) / 0,1% Tween 20/ 5% milk or 5% Bovin Serum Albumin (BSA) for

phosphorylated proteins analysis and incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal primary antibody directed against Caspase 8 (1:1000, Santa Cruz clone H-134), phospho-Xiap (Ser87) (1:1000, Abcam), phospho-Caspase 9 (Ser96) (1:100, Abgent clone RB6898) ; Bcl-x1 (clone Ab-62), phospho-Bcl-x1 (Ser62), Bcl-2 (clone Ab-56), phospho-Bcl-2 (Thr56) (1:1000, Genscript) ; PARP, Caspase 9, Caspase 3, Caspase 7, phospho-Akt (Ser473) (clone D9E), Akt (clone C67E7), XIAP (clone 3B6), C-IAP1, livin (clone D61D1), survivin (clone 6E4) (1:1000, Cell Signaling Technology) or a monoclonal primary antibody directed against actin (1:1000, Cell Signaling Technology). Membranes were washed 3 times with TBS/ 0,1% Tween 20 (TT) then incubated 1.5 hours with a secondary antibody (1:4000 anti-rabbit or anti-mouse Cell Signaling Technology) coupled with HRP (Horse Raddish Peroxydase). Membranes were washed 3 times with TT. Immunocomplexes were revealed by ECL (Pierce).

Caspase activation assay

OVCAR-3 cells were seeded in 96 wells plate (5000 cells per well) in the presence or absence of CA-MSC or MSC CM. 24 hours after, cells were treated with 250 µM carboplatin for 48 hours and caspase activation was monitored using luminescence-based caspase-Glo kit (Promega) following instructions of the manufacturer. Luminescence from cleaved caspase substrate was quantified using a luminometer (Berthold).

Transfection

Cells incubated in the presence or absence of CA-MSC CM were transfected with lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) and the following siRNA against XIAP (Qiagen): 5'-GUGCUUUCACUGUGGAGGATT-3', according to the manufacturer's protocols. siRNA allStars Negative control siRNA (Qiagen) were used as negative controls.

12 hours after transfection, cells were treated with 250 µM carboplatin for 36 hours and further analysed by flow cytometry or western-blot.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean +/- s.e.m. Student's two-sided t test was used to compare values of test and control samples. * p<0.05 and ** p< 0.01 indicated a significant difference.

Results

Conditioned medium from CA-MSC as well as BM-MSC confer chemoresistance to ovarian cancer cells

We previously showed that the recruitment of CA-MSC (Hospicells) is proportional to the chemoresistance status of the tumors [16], we evaluated here if the factors released by CA-MSC could be associated to chemoresistance in ovarian cancer cells.

Platinum salts are known to induce cell growth inhibition of ovarian cancer cells [34]. We analysed if carboplatin-mediated growth inhibition of ovarian cancer cells could be modified by secreted factors from MSC. First we determined the drug concentrations to inhibit 50% cell growth (IC₅₀) in response to carboplatin in three different human ovarian adenocarcinoma cells (OVCAR-3, IGROV-1 and SKOV-3 cells) as well as in CA-MSC and BM-MSC. Both CA-MSC and BM-MSC were highly sensitive to carboplatin treatment with a dose dependant decrease of cell viability (IC₅₀ = 40.5±12.5 μM for CA-MSC and 40±10 μM for BM-MSC) (Figure 1d and Supplementary figure 1a). OVCAR-3 and IGROV-1 cells were also chemosensitive but with higher IC₅₀ (IC₅₀= 136±20 μM and 145±25 μM respectively). SKOV-3 cells were chemoresistant with a maximum of about 50% inhibition of cell growth and with an IC₅₀ of 350±18 μM (Figure 1a, 1b, 1c). Incubation of ovarian cancer cells in the presence of CA-MSC or BM-MSC conditioned medium (CM) during 24 hours prior to treatment with carboplatin for 48 hours significantly increased cell viability and IC₅₀ in OVCAR-3 and IGROV-1 cells (IC₅₀= 245±17 μM and 235±26 μM respectively for CA-MSC CM and IC₅₀ = 262±25 μM and 250±38 μM respectively for BM-MSC CM). We also observed an increase of IC₅₀ in SKOV-3 cells cultured in the presence of MSCs CM (IC₅₀ = 350±18 μM without CM and IC₅₀ = 601±48 μM and 611±32 μM with CA-MSC and BM-MSC CM respectively), but the overall cell viability was not significantly affected (Fig. 1a, 1b, 1c and supplementary fig 1a). Of note, we also observed taxane chemoresistance acquisition through MSCs CM in the three ovarian cancer cells lines but with a lesser extend (data not shown).

These results indicated that both CA-MSC and BM-MSC enhance ovarian cancer cells chemoresistance through the molecules they secrete.

CA-MSC and BM-MSC (secretions) protect ovarian cancer cells from carboplatin-induced apoptosis.

Apoptosis deregulation is a key factor in the development of chemoresistance and in particular molecular mechanism of cisplatin resistance involved apoptosis dysregulation [35]. To test the role of CA-MSC and BM-MSC secretions in the protection of ovarian cancer cells from carboplatin-induced apoptosis, we evaluated the proportion of apoptotic cells in response to carboplatin by analysing: (i) phosphatidyl serine externalization and membrane permeability by flow cytometry after Annexin-V-FITC /Propidium iodide labelling and PARP cleavage by Western Blot. Incubation of chemosensitive

cells, ie OVCAR-3 cells, with carboplatin for 48 hours induced 57 +/-5% of apoptosis evaluated by the proportion of Annexin-V-FITC and propidium iodide positive cells. Culturing OVCAR-3 cells in the presence of CA-MSC or BM-MSC CM prior to treatment with carboplatin resulted in respectively 43+/-4% and 45.5+/-6 % of apoptosis versus 9+/-3% and 9+/-4% in untreated condition (Fig. 2a and 2b and supplementary Figure 1b). Of note cells in early apoptosis (Annexin-V positive only) represented 22%+/-3% versus 37% +/-4% in the control condition. Thus, carboplatin-induced early apoptosis in OVCAR-3 cells was significantly decreased in the presence of CA-MSC (Figure 2a and 2b). This observation was further validated by the decreased amount of PARP cleavage in response to carboplatin in the presence of CA-MSC or BM-MSC CM (Fig. 2c and supplementary Figure 1c). Of note, none cancerous and none mesenchymal cells such as HEK293 or fibroblast (CHN cells) CM did not affect carboplatin-induced apoptosis (supplementary Figure 2). Using IGROV-1 cells, we also observed a decrease of carboplatin-mediated apoptosis in the cells cultured for 48 hours in the presence of CA-MSC CM (supplementary Figure 3), whereas apoptosis was not modified in SKOV-3 cells (data not shown). These data suggested that CA-MSC and BM-MSC secreted factors could interfere with the apoptotic signaling pathway to promote ovarian cancer cell death resistance in response of carboplatin.

CA-MSC promote effector caspases activation defect.

Caspases are key actors in apoptosis signalling and a defect in their activation could be in part responsible for chemoresistance [36]. To understand how CA-MSC secreted factors could act on ovarian cancer cells to protect them from cell death, we investigated the molecular mechanisms of apoptosis and in particular the caspase activation cascade.

Carboplatin treatment decreased pro-caspase-8 and -9 expressions but enhanced their cleavage and catalytic activity in OVCAR-3 cells (Fig. 3a and 3b). Incubation of the cells in the presence of CA-MSC CM did not affect carboplatin-induced caspase-8 and -9 decreased expression, cleavage and activation (Fig. 3a and 3b). Concerning the effector caspases, carboplatin treatment decreased caspase-3 and -7 expressions but enhance their cleavage and catalytic activity in OVCAR-3 cells (Fig. 4a and 4b). In contrast to the effect observed for the initiator caspases, CA-MSC CM prevented carboplatin-induced cleavage and catalytic activity of caspase-3 and -7 (Fig. 4a and 4b). Interestingly, the expression of pro-caspase-3 and -7 was significantly decreased in the presence of CA-MSC CM without treatment (Fig. 4a).

These results indicate that CA-MSC secreted molecules perturb the executionary phase of apoptosis by inhibiting effector caspase activation upon carboplatin treatment.

CA-MSC secretions induce Akt and XIAP phosphorylation

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signal transduction plays a critical role in the resistance to cisplatin through suppression of apoptosis in various types of human cancers including ovarian cancer [23]. We hypothesized that Akt activation and phosphorylation of its downstream targets could be involved in CA-MSC-induced apoptosis resistance in response to carboplatin. We tested the effect of CA-MSC CM on Akt phosphorylation in OVCAR-3 cells. Incubation of the cells during 24 hours in the presence of CA-MSC CM conditioned for 48 or 72 hours promoted Akt phosphorylation on Ser473 (Fig.5a). We observed that the phosphorylation level increased with increasing conditioning time. Of note, whereas PTEN level did not change, the level of total Akt decreased in the presence of CA-MSC CM (Fig.5a).

The inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) are a family of proteins that inhibit caspases and thereby regulate apoptosis [37]. XIAP binds to and inhibits the effector caspases, ie caspase-3, -7 and the initiator caspase-9. Dan et al. showed that phosphorylation of XIAP on Ser87 by Akt stabilizes and protects XIAP from cisplatin-induced degradation [38].

We hypothesized that XIAP may be a target for phospho-Akt in our model. Thus we evaluated the effect of CA-MSC CM on XIAP expression and phosphorylation in carboplatin-treated OVCAR-3 cells. Carboplatin treatment induced a decrease in XIAP expression but in OVCAR-3 cells exposed to CA-MSC CM prior to carboplatin treatment we noticed a stabilization of XIAP (Fig. 5b). XIAP stabilization could be associated with XIAP phosphorylation as we observed an increase in the ratio of phosphorylated XIAP to total XIAP when the cells were cultured in the presence of CA-MSC CM (Fig. 5b). We also evaluated the effect of CA-MSC CM on the expression of others IAPs family members (cIAP1, Livin and survivin). Whereas survivin expression did not change in the presence of CA-MSC CM, we observed a decrease in the expression of cIAP1 and Livin (Supplementary Figure 4).

These data show the phosphorylation of Akt as well as one of its downstream targets XIAP by CA-MSC secreted factors. This suggests that CA-MSC secretion could activate the anti-apoptotic PI3K/Akt signaling.

CA-MSC secreted factors protect ovarian cancer cells from carboplatin-induced apoptosis through XIAP phosphorylation and stabilization.

The modulation of XIAP expression regulating cisplatin sensibility in ovarian cancer cells [23, 25, 26] and XIAP being a specific inhibitor of caspase-3 and -7 [39], we investigated the role of XIAP in the anti-apoptotic effect of CA-MSC CM.

We evaluated the effect of XIAP downregulation by siRNA on carboplatin-induced apoptosis in the presence or absence of CA-MSC CM. siRNA against XIAP totally inhibited XIAP expression evaluated by Western Blot (Fig. 6a). In response to carboplatin, the inhibition of XIAP expression completely overcame cell death resistance induced by CA-MSC CM. Carboplatin-induced apoptosis and PARP cleavage were totally restored (Fig. 6b and 6c).

These results indicate the involvement of XIAP in CA-MSC-induced carboplatin resistance in ovarian cancer cells.

Discussion

Chemoresistance is one of the most challenging problems in ovarian cancer as 70 % of patients treated for ovarian cancer will relapse within 18 months after treatment with chemoresistant pathology. Despite the fact that the cancer cells are instable and could acquire mutations that will confer a chemoresistant phenotype, microenvironment could be involved in this phenomenon (for review [18]). Among the microenvironment cells we focused on MSC which are known to be recruited to tumour site and to be activated by cancer cells. It has been shown recently that they could either become CA-MSC or TAFs [40], both of them having some pro tumoral properties. As there is no evidence on how MSC could be activated and become CA-MSC we choose to study the role of both BM-MSC and CA-MSC in carboplatin resistance acquisition by ovarian tumor cells. Here, we determined that both BM-MSC and CA-MSC demonstrated abilities to promote ovarian cancer cells chemoresistance. Our results indicate that this property does not seem to be induced by cancer cells contact or influence and that naïve MSC as well as activated MSC are able to confer chemoresistance to ovarian cancer cells.

As we already described that MSC per se are not able to increase tumor cells proliferation in vitro [14], we focused our study on their effect on apoptosis.

We demonstrated that both CA-MSC and BM-MSC increased ovarian cancer cells viability and prevented apoptosis in response to carboplatin treatment. The effects of MSC on chemoresistance acquisition have been already described by between others Rafii et al. [16] who claimed that the anti-apoptotic effect of the MSCs was mediated through direct interactions between the MSC and the tumor cells. Here, we showed that the effect of the MSC could be mediated through the secretions of factors in the culture medium. Indeed, all the experiments have been performed using CA-MCS or BM-MSC conditioned medium. The identification of secreted factors responsible for the pro-tumoral effect of MSC is under investigation and will be discuss later. The factors involved in the phenomenon could be either a protein as a fatty acid as Roodhart et al. recently published that fatty acids could be

unregulated on MSC treated with carboplatin and that these fatty acids could be involved in the acquisition of chemoresistance by cancer cells [10].

Regarding to molecular mechanism of apoptotic, we determined that CA-MSC CM inhibited caspase activation, and in particular, blocked effector caspase-3 and -7 proteolysis and subsequent activation as well as their catalytic activity. We could reasonably relay the apoptosis inhibition effect of the MSC CM to the fact that caspase-3 activation is abrogated. As caspase-3 and -7 are activated by the initiator caspases, we checked the effect of CA-MSC CM on caspase-8 and -9 expression and activation, but we didn't notice any effect. However, in OVCAR-3 cells incubated in the presence of BM-MSC CM caspase-9 proteolysis and activation was affected whereas CA-MSC CM did not affect this caspase. This suggests that CA-MSC do not have the same properties as BM-MSC concerning the released factors that could perturb the initiator caspases activation. Then, we checked for a regulator of apoptosis that could be involved in caspase-3 and -7 inhibition and subsequently apoptosis blockade.

The PI3K/Akt pathway activates survival and anti-apoptotic signalling. In ovarian tumors, activation of PI3K/Akt pathway has been associated with aggressiveness of the tumor behaviour and increased survival (for review [41]). In our model we showed an activation of Akt : whereas PTEN expression was not affected, CA-MSC CM promotes Akt phosphorylation on Ser473. We observed that the increase in the phosphorylated form of Akt increased as the conditioning time of CA-MSC medium increased (Fig. 5a) suggesting the accumulation of secreted factors in CA-MSC CM acting on PI3K/Akt signalling. Preliminary results also indicated that CA-MSC stimulated Akt phosphorylation within a very short time (5 minutes) (data not shown) indicating that CA-MSC may secrete growth factor able to bind to tyrosine kinase receptor. For instance, the PDGF-AA (platelet-derived growth factor), S1P or PGE2 (Prostaglandin E2) found in CA-MSC secretions (data not shown) could bind rapidly on theirs receptors at the surface of ovarian cancer cells and activate the PI3K/Akt signalling pathway [42-45]. Moreover, a recent study from our group showed that CA-MSC promote IL-6 and IL-8 secretion in OVCAR-3 cells ([7]). IL-6 and IL-8 are known to activate survival signaling pathway and were recently involved in cisplatin resistance in ovarian cancer cells [46, 47]. Thus secreted IL-6 and IL-8 could act in an autocrine manner on ovarian cancer cells surface receptors and also activate PI3K. Because OVCAR-3 cells do not secrete these cytokines, another factor in CA-MSC CM may activate IL-6 and IL-8 synthesis and secretion in these cells, delaying the activation of PI3K/Akt signalling. Thus, we can speculate that growth factors secreted by CA-MSC are responsible for the early activation of Akt and later CA-MSC-induced IL-6 and IL-8 secretion by ovarian cancer cells sustain the activation of PI3K. Among the downstream target of Akt, we observed the phosphorylation and stabilization of XIAP after carboplatin treatment in OVAR-3 cells priory incubated in the presence of CA-MSC CM. XIAP is able to bind and inhibit the initiator caspase-9 and the effector caspase-3

and-7. Thus, the inhibition of effector caspases in the presence of CA-MSC CM could be attributed to XIAP through its phosphorylation by Akt. However, caspase-9 expression and activation were not affected by CA-MSC CM. This could be explained by the fact that binding domains of XIAP are different for initiator and effector caspases. Indeed, the BIR2 domain of XIAP inhibits caspase-3 and-7, while BIR3 binds to and inhibits caspase-9 [48].

We cannot exclude the potential phosphorylation of other molecules by Akt in our model. So far, we did not observed any difference in the phosphorylation of caspase-9, Bcl-xL and Bcl-2 in the presence of CA-MSC CM (supplementary figure 5) suggesting that the mitochondrial targets of Akt are not involved in apoptosis resistance in our model. However, to confirm the involvement of Akt, we are currently investigating the effect of the inhibition of Akt phosphorylation on CA-MSC-induced carboplatin resistance in OVCAR-3 cells.

Interestingly, we found a downregulating effect of CA-MSC CM on the expression of apoptotic (procaspase-3 and -7) and anti-apoptotic proteins (total Akt, cIAP and Livin) in OVCAR-3 cells (Fig. 3a, 5b and supplementary Fig. 4). For all of them, the observed decrease in the protein level was detected after the incubation of OVCAR-3 cells in the presence of CA-MSC CM during 24 hours. These observations suggested a genetic regulation of the expression of these proteins by CA-MSC secreted factors.

As XIAP is a current target for the treatment of chemoresistant cancer such as colon cancer [48] we verified if XIAP was involved in the apoptosis resistance observed in ovarian cancer cells exposed to CA-MSC CM. XIAP depletion by siRNA in OVCAR-3 cells exposed to CA-MSC CM completely restored the sensitivity of the cells to carboplatin. These results indicate a key role of XIAP in CA-MSC mediated apoptosis resistance in ovarian cancer cells but its precise role in our model remains to be investigated.

To conclude, our study underlines the role of XIAP in apoptosis protection induced by CA-MSC secretions in ovarian cancer cells. The potential use of XIAP inhibitors could overcome cancer cells resistance to chemotherapy mediated by the microenvironment. Molecules secreted by CA-MSC deserve a full characterization and will bring a better understanding of both microenvironment cancer cells cross talk and mechanism leading to chemoresistance acquisition in ovarian cancer model.

References

- [1] S. Vaughan, J.I. Coward, R.C. Bast, Jr., A. Berchuck, J.S. Berek, J.D. Brenton, G. Coukos, C.C. Crum, R. Drapkin, D. Etemadmoghadam, M. Friedlander, H. Gabra, S.B. Kaye, C.J. Lord, E. Lengyel, D.A. Levine, I.A. McNeish, U. Menon, G.B. Mills, K.P. Nephew, A.M. Oza, A.K. Sood, E.A. Stronach, H. Walczak, D.D. Bowtell, and F.R. Balkwill, Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 11 (2011) 719-725.
- [2] R. Agarwal and S.B. Kaye, Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 502-516.
- [3] G.W. Basak, A.S. Srivastava, R. Malhotra, and E. Carrier, Multiple myeloma bone marrow niche. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10 (2009) 345-346.
- [4] M.B. Meads, R.A. Gatenby, and W.S. Dalton, Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 9 (2009) 665-674.
- [5] J. Ringe, S. Strassburg, K. Neumann, M. Endres, M. Notter, G.R. Burmester, C. Kaps, and M. Sittinger, Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 101 (2007) 135-146.
- [6] J.M. Roodhart, L.G. Daenen, E.C. Stigter, H.J. Prins, J. Gerrits, J.M. Houthuijzen, M.G. Gerritsen, H.S. Schipper, M.J. Backer, A.M. van, J.S. Vermaat, P. Moerer, K. Ishihara, E. Kalkhoven, J.H. Beijnen, P.W. Derksen, R.H. Medema, A.C. Martens, A.B. Brenkman, and E.E. Voest, Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* 20 (2011) 370-383.
- [7] M. Castells, B. Thibault, E. Mery, M. Golzio, M. Pasquet, I. Hennebelle, P. Bourin, M. Mirshahi, J.P. Delord, D. Querleu, and B. Couderc, Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* 2012).
- [8] L.V. Rhodes, S.E. Muir, S. Elliott, L.M. Guillot, J.W. Antoon, P. Penfornis, S.L. Tilghman, V.A. Salvo, J.P. Fonseca, M.R. Lacey, B.S. Beckman, J.A. McLachlan, B.G. Rowan, R. Pochampally, and M.E. Burow, Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res Treat.* 121 (2010) 293-300.
- [9] A.E. Karnoub, A.B. Dash, A.P. Vo, A. Sullivan, M.W. Brooks, G.W. Bell, A.L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, and R.A. Weinberg, Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449 (2007) 557-563.
- [10] J.M. Roodhart, L.G. Daenen, E.C. Stigter, H.J. Prins, J. Gerrits, J.M. Houthuijzen, M.G. Gerritsen, H.S. Schipper, M.J. Backer, A.M. van, J.S. Vermaat, P. Moerer, K. Ishihara, E. Kalkhoven, J.H. Beijnen, P.W. Derksen, R.H. Medema, A.C. Martens, A.B. Brenkman, and E.E. Voest, Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* 20 (2011) 370-383.
- [11] Y. Xu, Y. Tabe, L. Jin, J. Watt, T. McQueen, A. Ohsaka, M. Andreeff, and M. Konopleva, TGF-beta receptor kinase inhibitor LY2109761 reverses the anti-apoptotic effects of TGF-beta1 in myelo-monocytic leukaemic cells co-cultured with stromal cells. *Br J Haematol.* 142 (2008) 192-201.

- [12] M. Hao, L. Zhang, G. An, H. Meng, Y. Han, Z. Xie, Y. Xu, C. Li, Z. Yu, H. Chang, and L. Qiu, Bone marrow stromal cells protect myeloma cells from bortezomib induced apoptosis by suppressing microRNA-15a expression. *Leuk. Lymphoma* 52 (2011) 1787-1794.
- [13] L. Jin, Y. Tabe, S. Konoplev, Y. Xu, C.E. Leysath, H. Lu, S. Kimura, A. Ohsaka, M.B. Rios, L. Calvert, H. Kantarjian, M. Andreeff, and M. Konopleva, CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther* 7 (2008) 48-58.
- [14] M. Pasquet, M. Golzio, E. Mery, A. Rafii, N. Benabbou, P. Mirshahi, I. Hennebelle, P. Bourin, B. Allal, J. Teissie, M. Mirshahi, and B. Couderc, Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 126 (2010) 2090-2101.
- [15] Z.S. Chen and A.K. Tiwari, Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J* 278 (2011) 3226-3245.
- [16] A. Rafii, P. Mirshahi, M. Poupot, A.M. Faussat, A. Simon, E. Ducros, E. Mery, B. Couderc, R. Lis, J. Capdet, J. Bergalet, D. Querleu, F. Dagonnet, J.J. Fournie, J.P. Marie, E. Pujade-Lauraine, G. Favre, J. Soria, and M. Mirshahi, Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS. One.* 3 (2008) e3894.
- [17] A.V. Kurtova, K. Balakrishnan, R. Chen, W. Ding, S. Schnabl, M.P. Quiroga, M. Sivina, W.G. Wierda, Z. Estrov, M.J. Keating, M. Shehata, U. Jager, V. Gandhi, N.E. Kay, W. Plunkett, and J.A. Burger, Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 114 (2009) 4441-4450.
- [18] M. Castells, B. Thibault, J.P. Delord, and B. Couderc, Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 13 (2012) 9545-9571.
- [19] D.M. O'Gorman and T.G. Cotter, Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways. *Leukemia* 15 (2001) 21-34.
- [20] J.E. Chipuk and D.R. Green, Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 268-275.
- [21] Z. Ding, X. Yang, A. Pater, and S.C. Tang, Resistance to apoptosis is correlated with the reduced caspase-3 activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 270 (2000) 415-420.
- [22] M. Fraser, B. Leung, A. Jahani-Asl, X. Yan, W.E. Thompson, and B.K. Tsang, Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reprod. Biol Endocrinol* 1 (2003) 66.
- [23] M. Fraser, B.M. Leung, X. Yan, H.C. Dan, J.Q. Cheng, and B.K. Tsang, p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63 (2003) 7081-7088.
- [24] D. Schneiderman, J.M. Kim, M. Senterman, and B.K. Tsang, Sustained suppression of Fas ligand expression in cisplatin-resistant human ovarian surface epithelial cancer cells. *Apoptosis.* 4 (1999) 271-281.

- [25] E. Asselin, G.B. Mills, and B.K. Tsang, XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 61 (2001) 1862-1868.
- [26] J. Li, Q. Feng, J.M. Kim, D. Schneiderman, P. Liston, M. Li, B. Vanderhyden, W. Faught, M.F. Fung, M. Senterman, R.G. Korneluk, and B.K. Tsang, Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology* 142 (2001) 370-380.
- [27] S.M. Srinivasula and J.D. Ashwell, IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 30 (2008) 123-135.
- [28] M. Pasquet, M. Golzio, E. Mery, A. Rafii, N. Benabbou, P. Mirshahi, I. Hennebelle, P. Bourin, B. Allal, J. Teissie, M. Mirshahi, and B. Couderc, Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 126 (2010) 2090-2101.
- [29] A. Rafii, P. Mirshahi, M. Poupot, A.M. Faussat, A. Simon, E. Ducros, E. Mery, B. Couderc, R. Lis, J. Capdet, J. Bergalet, D. Querleu, F. Dagonnet, J.J. Fournie, J.P. Marie, E. Pujade-Lauraine, G. Favre, J. Soria, and M. Mirshahi, Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS. ONE*. 3 (2008) e3894.
- [30] R. Lis, J. Capdet, P. Mirshahi, M. Lacroix-Triki, F. Dagonnet, C. Klein, M. Mirshahi, J.J. Fournie, A. Rafii, and M. Poupot, Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells. *Int J Oncol* 37 (2010) 1453-1461.
- [31] M. Mirshahi, S. Mirshahi, N. Golestaneh, C. Nicolas, Z. Mishal, K.C. Lounes, C. Hecquet, F. Dagonet, Y. Pouliquen, and M.K. Agarwal, Mineralocorticoid hormone signaling regulates the 'epithelial sodium channel' in fibroblasts from human cornea. *Ophthalmic Res* 33 (2001) 7-19.
- [32] J. Benard, S.J. Da, M.C. De Blois, P. Boyer, P. Duvillard, E. Chiric, and G. Riou, Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 45 (1985) 4970-4979.
- [33] M.K. Le, H. Lincet, P. Marcelo, E. Lemoisson, N. Heutte, M. Duval, L. Poulain, J. Vinh, P. Gauduchon, and B. Baudin, A proteomic kinetic analysis of IGROV1 ovarian carcinoma cell line response to cisplatin treatment. *Proteomics*. 7 (2007) 4090-4101.
- [34] J. Fanning, W.C. Biddle, M. Goldrosen, K. Crickard, U. Crickard, M.S. Piver, and K.A. Foon, Comparison of cisplatin and carboplatin cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines using the MTT assay. *Gynecol. Oncol* 39 (1990) 119-122.
- [35] L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo, and G. Kroemer, Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31 (2012) 1869-1883.
- [36] G.S. Wu and Z. Ding, Caspase 9 is required for p53-dependent apoptosis and chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene* 21 (2002) 1-8.
- [37] M. Gyrd-Hansen and P. Meier, IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 10 (2010) 561-574.
- [38] H.C. Dan, M. Sun, S. Kaneko, R.I. Feldman, S.V. Nicosia, H.G. Wang, B.K. Tsang, and J.Q. Cheng, Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem*. 279 (2004) 5405-5412.

- [39] Q.L. Deveraux, R. Takahashi, G.S. Salvesen, and J.C. Reed, X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388 (1997) 300-304.
- [40] E.S. Jeon, H.J. Moon, M.J. Lee, H.Y. Song, Y.M. Kim, M. Cho, D.S. Suh, M.S. Yoon, C.L. Chang, J.S. Jung, and J.H. Kim, Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 26 (2008) 789-797.
- [41] P. Dent, S. Grant, P.B. Fisher, and D.T. Curiel, PI3K: A rational target for ovarian cancer therapy? *Cancer Biol Ther* 8 (2009) 27-30.
- [42] H.S. Kuehn, M.Y. Jung, M.A. Beaven, D.D. Metcalfe, and A.M. Gilfillan, Prostaglandin E2 activates and utilizes mTORC2 as a central signaling locus for the regulation of mast cell chemotaxis and mediator release. *J Biol Chem.* 286 (2011) 391-402.
- [43] V. Leone, P.A. di, P. Ricchi, F. Acquaviva, M. Giannouli, A.M. Di Prisco, F. Iuliano, and A.M. Acquaviva, PGE2 inhibits apoptosis in human adenocarcinoma Caco-2 cell line through Ras-PI3K association and cAMP-dependent kinase A activation. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 293 (2007) G673-G681.
- [44] A. Grey, Q. Chen, K. Callon, X. Xu, I.R. Reid, and J. Cornish, The phospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid prevent apoptosis in osteoblastic cells via a signaling pathway involving G(i) proteins and phosphatidylinositol-3 kinase. *Endocrinology* 143 (2002) 4755-4763.
- [45] M. Morales-Ruiz, M.J. Lee, S. Zollner, J.P. Gratton, R. Scotland, I. Shiojima, K. Walsh, T. Hla, and W.C. Sessa, Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J Biol Chem.* 276 (2001) 19672-19677.
- [46] Y. Wang, X.L. Niu, Y. Qu, J. Wu, Y.Q. Zhu, W.J. Sun, and L.Z. Li, Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 295 (2010) 110-123.
- [47] Y. Wang, Y. Qu, X.L. Niu, W.J. Sun, X.L. Zhang, and L.Z. Li, Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine* 56 (2011) 365-375.
- [48] A.D. Schimmer, S. Dalili, R.A. Batey, and S.J. Riedl, Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death. Differ.* 13 (2006) 179-188.

Figures Legend

Figure 1: CA-MSC protect ovarian cancer cells from carboplatin-induced growth inhibition. Ovarian cancer cells cultured alone or in the presence of CA-MSC conditioned medium (CA-MSC CM) were treated with increasing concentrations of carboplatin for 48 hours. Cell viability was reported for OVCAR-3 (a), IGROV-1 (b), SKOV-3 (c) and CA-MSC (d). Dotted line corresponded to 50% viability.

Figure 2: CA-MSC protect OVCAR-3 cells from carboplatin-induced apoptosis.

OVCAR-3 cultured alone or in the presence of CA-MSC CM were treated with (+) or without (-) or (NT) 250 μ M carboplatin for 48 hours.

(a, b) Apoptosis was measured by flow cytometry analysis after propidium iodide and Annexin-V-FITC labelling. Flow cytometry dot plot from a representative experiment (a). Histogram representing the apoptotic cells population (Annexin-V positive cells+ Annexin-V/Propidium Iodide positive cells) for each condition (b) Hatched histogram represent Annexin-V positive cells only (Mean \pm s.e.m. n=3) * p<0.05 versus OVCAR-3 + carboplatin

(c) PARP cleavage was analysed by western-blot. Cleaved PARP level was normalized to total PARP (mean \pm s.e.m, n=3) * p<0.05 versus OVCAR-3 + carboplatin

Figure 3: CA-MSC do not affect initiator caspase-8 and -9 activation.

OVCAR-3 cells cultured alone or in the presence of CA-MSC CM were treated with (+) or without (-) or (NT) 250 μ M carboplatin for 48 hours. (a) Expression of caspase-8 and -9 was assayed by western-blot (+ indicate non-specific bands). Pro-caspase-8 and -9 expression was normalized to β -actin expression (mean \pm s.e.m, n=3) (b) Catalytic activity of caspase-8 and -9 was assayed by measuring the luminescence emitted by caspase-8 or caspase-9 luminogenic specific substrates, (RLU: relative lights units). (mean \pm s.e.m, n=2) (* p<0.05 versus not treated).

Figure 4: CA-MSC induce a down-regulation of effector caspase-3 and -7 expression and inhibit their catalytic activation.

OVCAR-3 cells cultured alone or in the presence of CA-MSC CM were treated with (+) or without (-) or (NT) 250 μ M carboplatin for 48 hours. (a) Expression of caspases-3 and -7 was assayed by western-blot. Pro-caspase-3 and -7 expression was normalized to β -actin expression (mean \pm s.e.m, n=3) (* p<0.05 versus not treated)

(b) Catalytic activity of caspase-3 and -7 was assayed by measuring the luminescence emitted by caspase-3 or caspase-7 luminogenic specific substrates, (RLU : relative lights units). (mean \pm s.e.m, n=3) (* p<0.05 versus not treated)

Figure 5: CA-MSC promote Akt phosphorylation and protect XIAP from cleavage upon carboplatin treatment

(a) OVCAR-3 cells were cultured with or without (0) CA-MSC CM conditioned for the indicated times. PTEN, Akt and phospho-Akt (Ser 473) expression was assayed by western-blot. Phospho-Akt expression was normalized to total Akt expression (mean \pm s.e.m, n=3)

* p<0.05 ** p<0.01 versus 0.

(b) OVCAR-3 cells cultured alone or in the presence of CA-MSC CM were treated with (+) or without (-) or (NT) 250 μ M carboplatin for 48 hours.

XIAP expression and phosphorylation were analysed by western-blot. Phospho-XIAP expression was normalized to XIAP expression (mean \pm s.e.m, n=3)

* p<0.05 versus OVCAR-3.

Figure 6: XIAP depletion restore carboplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells stimulated by CA-MSC

(a) OVCAR-3 cells were transfected or not (NT) with 20 nM of siRNA scramble (si ctrl) or XIAP-targeting siRNA (si XIAP) and 48 hours after XIAP expression was analysed by western-blot.

(b, c) OVCAR-3 cells were transfected or not (NT) with 20 nM of siRNA scramble (si ctrl) or XIAP-targeting siRNA (si XIAP) in presence (+ CA-MSC CM) or absence of CA-MSC CM. 12h after cells were treated with or without carboplatin for 36 hours. Apoptosis was measured by flow cytometry analysis after propidium iodide and Annexin-V-FITC labelling (b) and PARP cleavage (c).

(b) Histogram representing the apoptotic cells population (Annexin-V positive cells + Annexin-V/Propidium Iodide positive cells) for each condition (Mean \pm s.e.m. n= 3) * p<0.05

(c) PARP cleavage was analysed by western-blot. Cleaved PARP level was normalized to total PARP level (mean \pm s.e.m, n=3) * p<0.05

Figure 7: CA-MSC protect ovarian cancer cells from carboplatin-induced apoptosis through XIAP stabilization :

Carboplatin triggers apoptosis in ovarian cancer cells via the activation of caspase-9,-3 and -7 and leads to the degradation of XIAP, an inhibitor of caspases. CA-MSC secreted factor(s) activate Akt phosphorylation in ovarian cancer cells and permits XIAP phosphorylation promoting its stabilization. XIAP blocks apoptosis probably by inhibiting caspases-3 and-7 activation.

Supplementary figure 1: BM-MSC enhance ovarian cancer chemoresistance to carboplatin by inhibiting apoptosis

(a) Ovarian cancer cells cultured alone or in the presence of BM-MSC conditioned medium (BM-MSC CM) were treated with increasing concentrations of carboplatin for 48 hours.

(b, c, d) OVCAR-3 cells cultured alone or in the presence of BM-MSC BM-MSC CM were treated with (+) or without (-) or (NT) 250 μ M carboplatin for 48 hours.

(b) Apoptosis was measured by flow cytometry analysis after propidium iodide and Annexin-V-FITC labelling. Flow cytometry dot plot from a representative experiment (left). Histogram representing the apoptotic cells population (Annexin-V positive cells+ Annexin-V/Propidium Iodide positive cells) for each condition (right) (Mean \pm s.e.m. n= 3) * p<0.05 versus OVCAR-3 + carboplatin

(c) PARP cleavage was analysed by western-blot.

(d) Expression and cleavage of caspase-9,-3 and-7 were assayed by western-blot.

Supplementary figure 2: The effect of MSCs CM on apoptosis protection in ovarian cancer cells is specific

OVCAR-3 cells cultured alone or in the presence of conditioned medium from HEK293T (HEK CM) or CHN (CHN CM) were treated with (+) or without (NT) 250 μ M carboplatin for 48 hours. Apoptosis was measured by flow cytometry analysis after propidium iodide and Annexin-V-FITC labelling. Flow cytometry dot plot of a representative experiment (n=1).

Supplementary figure 3: CA-MSC protect IGROV-1 cells from carboplatin-induced apoptosis

IGROV-1 cultured alone or in the presence of CA-MSC CA-MSC CM were treated with (+) or without (-) 250 μ M carboplatin for 48 hours. PARP cleavage was analysed by western-blot (n=1)

Supplementary figure 4: CA-MSC promote Akt phosphorylation after 5 minutes

OVCAR-3 cells were cultured with or without (0) CA-MSC CM for the indicated times. Akt and phospho-Akt (Ser 473) expression was assayed by western-blot (n=1)

Supplementary figure 5: IAPs expression in the presence of CA-MSC

OVCAR-3 cells cultured alone or in the presence of CA-MSC CM were treated with (+) or without (-) 250 μ M carboplatin for 48 hours. cIAP1, Livin and survivin expression was analysed by western-blot (n=1)

Supplementary figure 6: CA-MSC supernatant does not affect caspase-9, Bcl-2 and Bcl-xL phosphorylation

OVCAR-3 cells were cultured during 24 hours with or without (0) CA-MSC CM Caspase-9, phosho-Caspase-9, Bcl-xL, phosho- Bcl-xL, Bcl-2, phosho-Bcl-2 expression was assayed by western blot. Phosho-Caspase-9, Phosho-Bcl-xL and phosho-Bcl-2 expression was normalized to total Caspase-9, total Bcl-xL and total Bcl-2 expression respectively (mean \pm /s.e.m, n=2 for Caspase-9 , n=3 for Bcl-xL and Bcl-2)

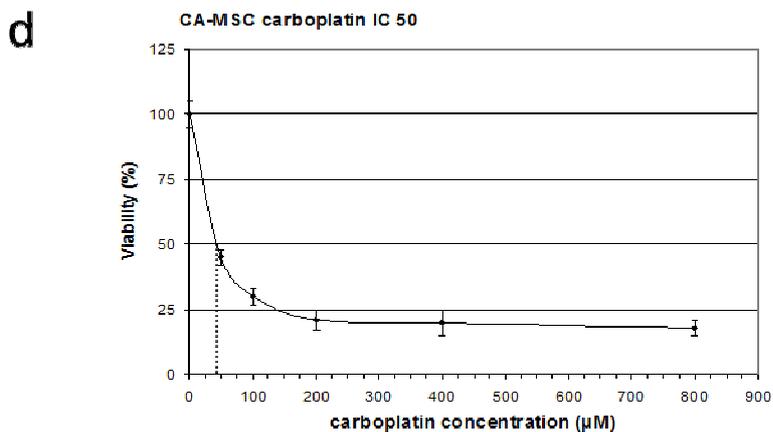
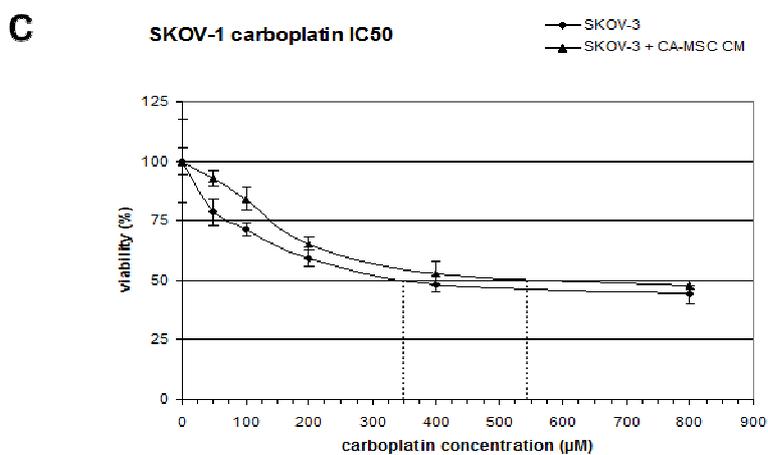
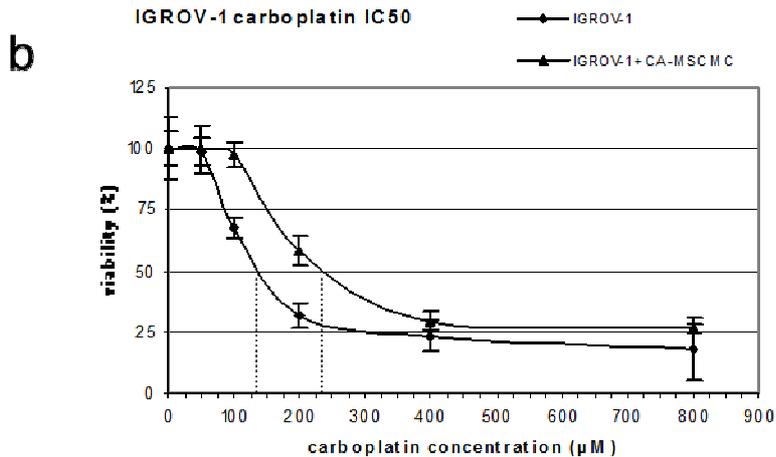
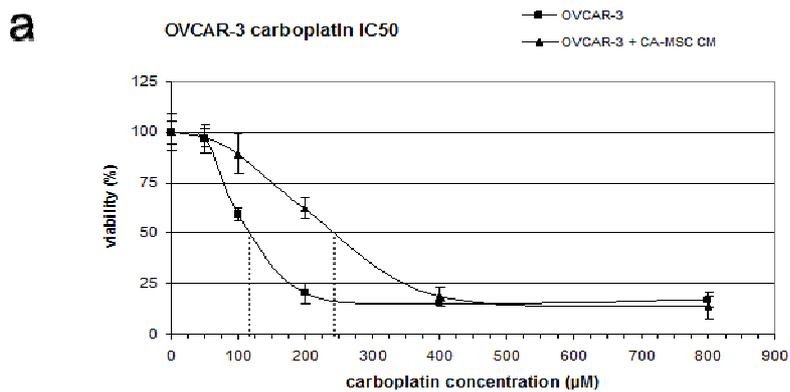


Figure 1

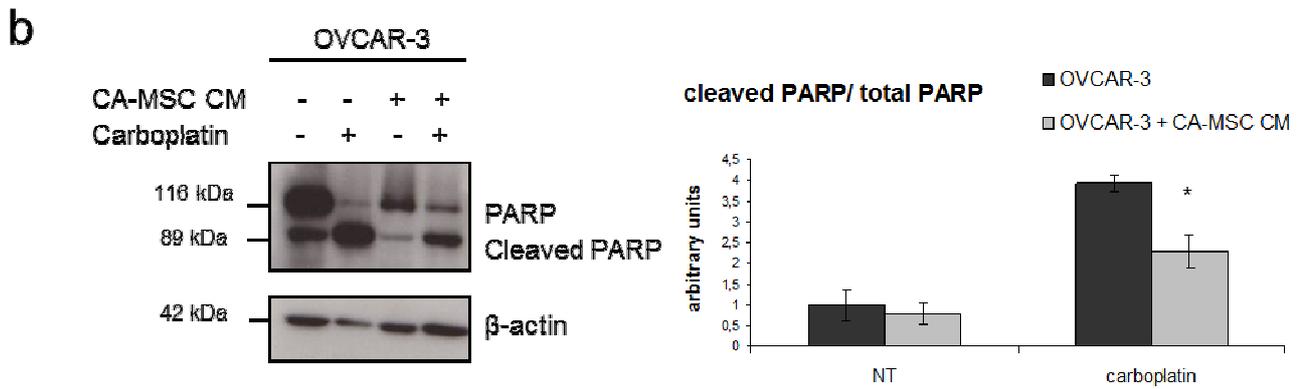
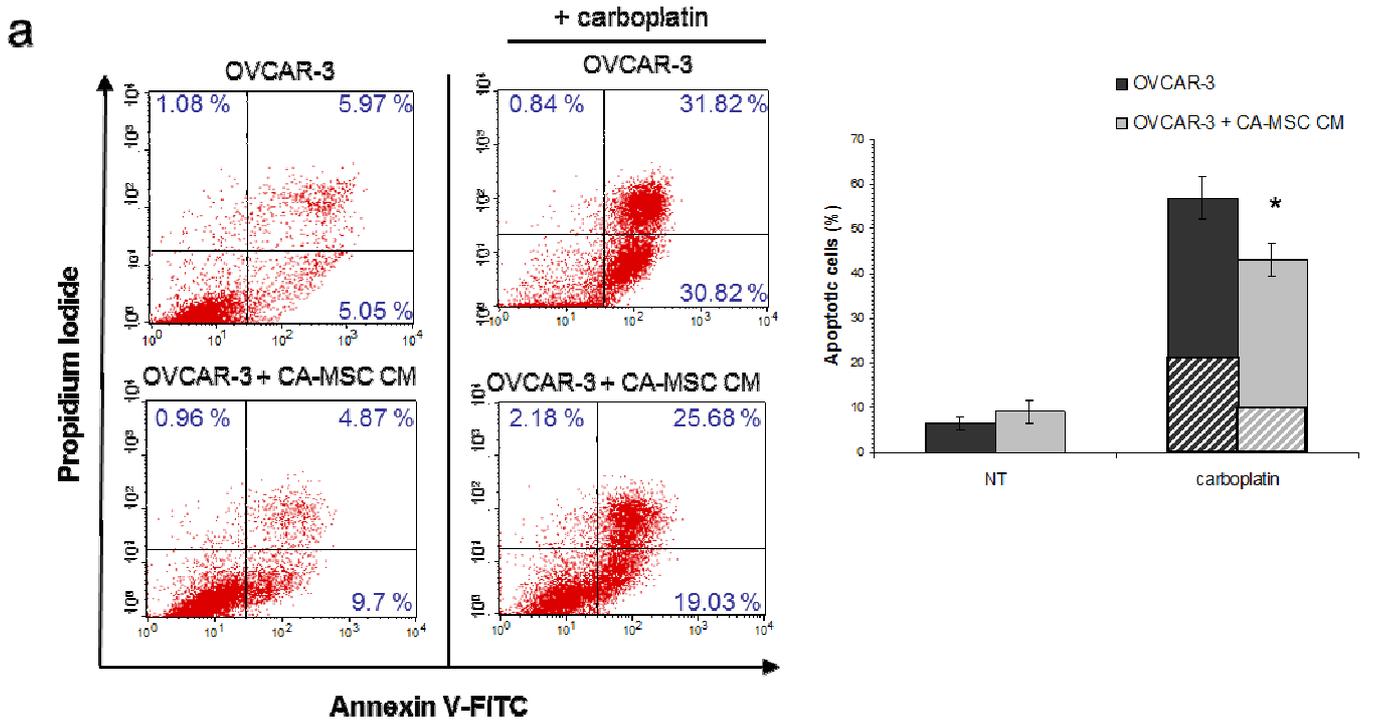


Figure 2

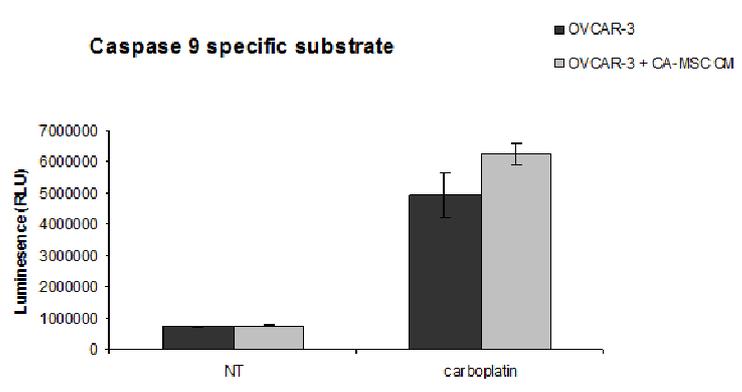
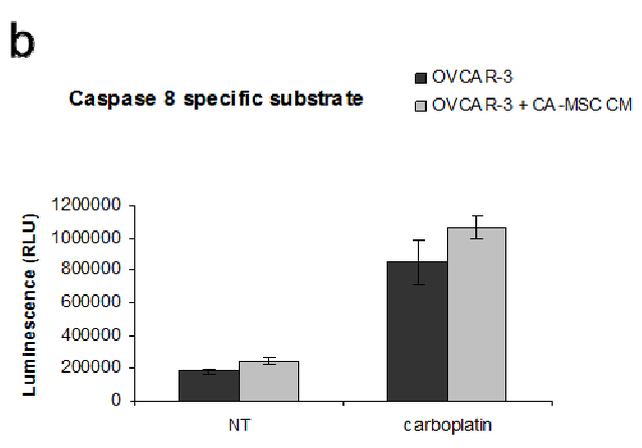
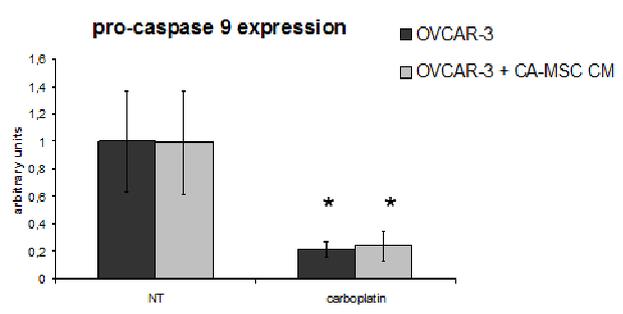
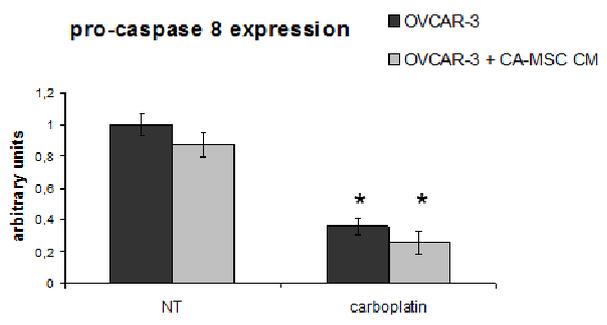
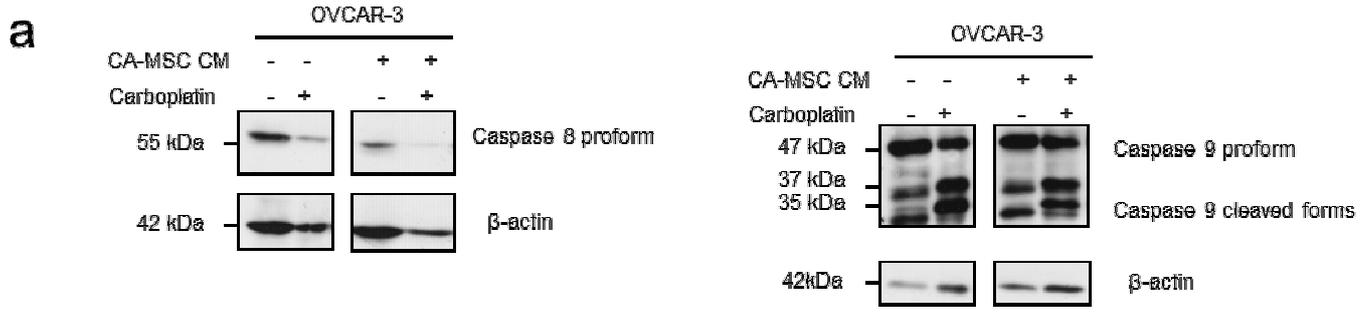
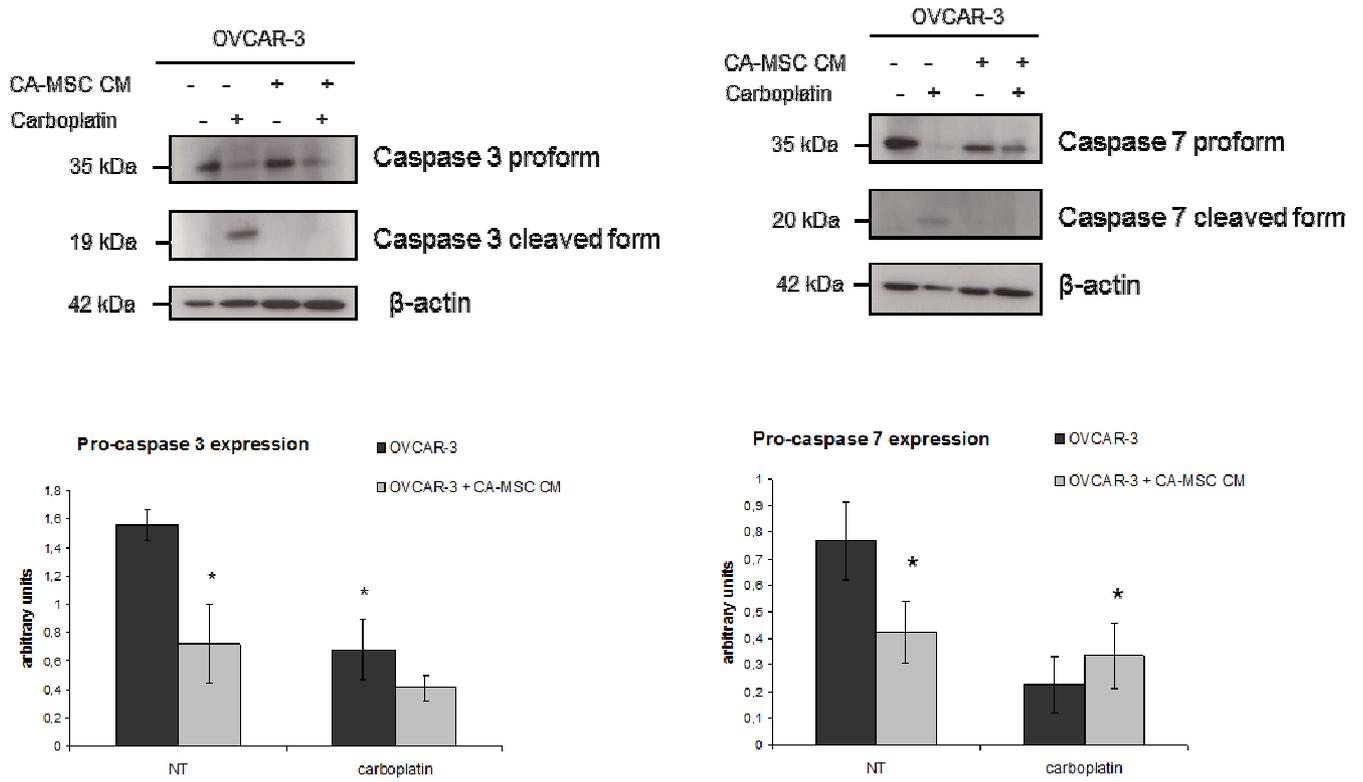
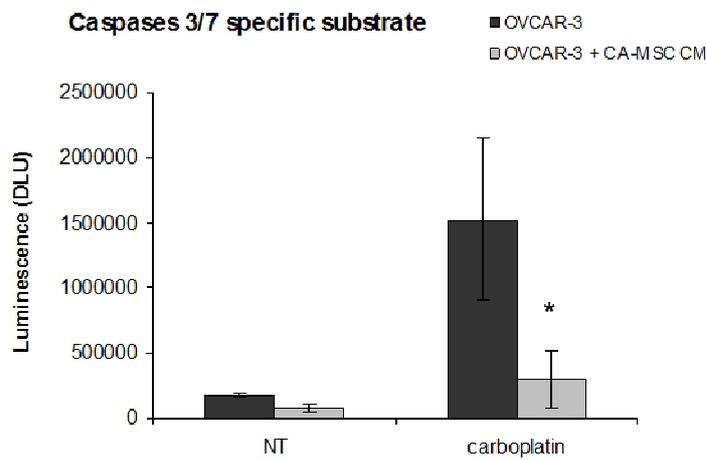
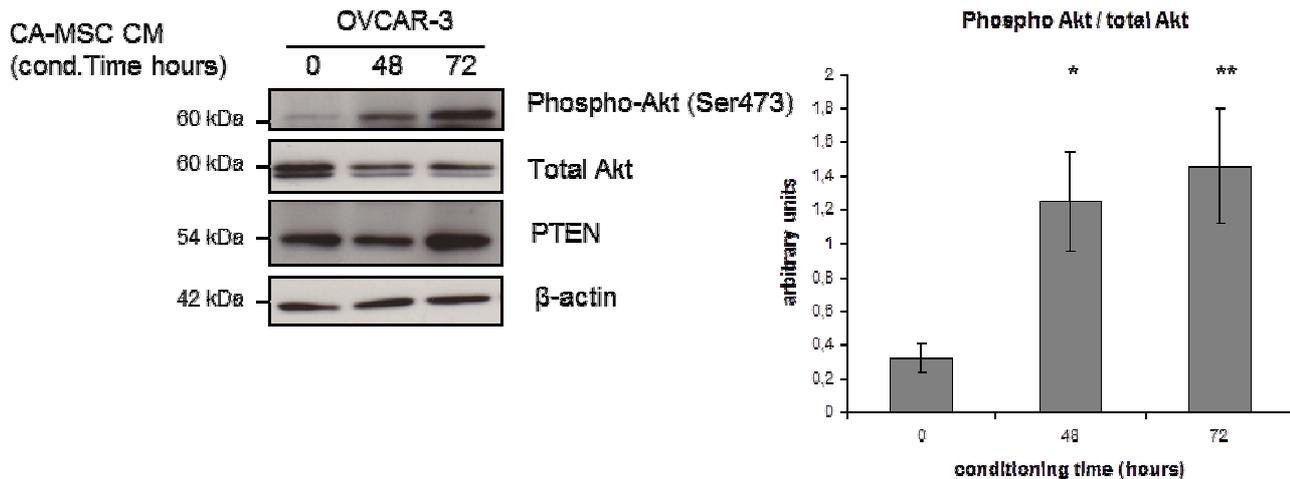


Figure 3

a**b****Figure 4**

a



b

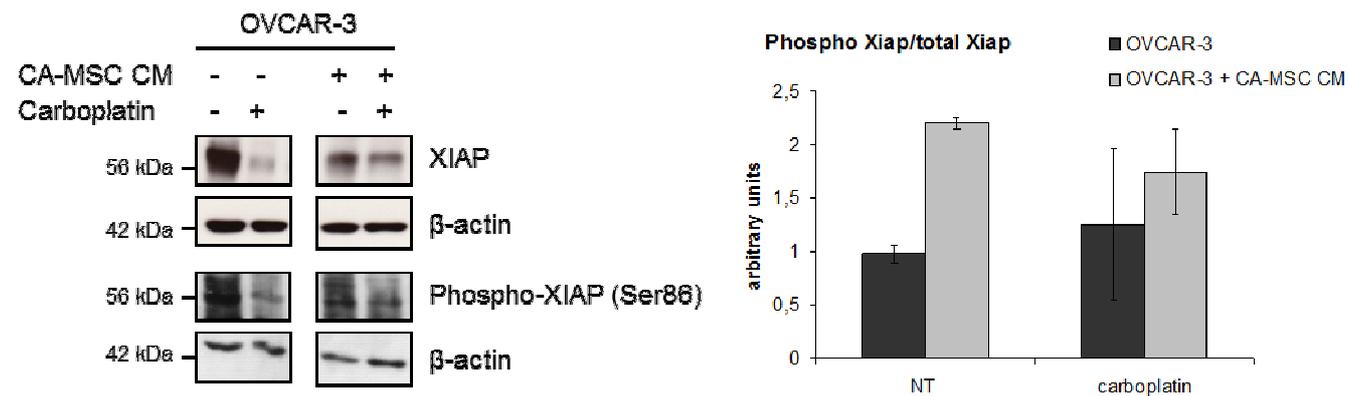


Figure 5

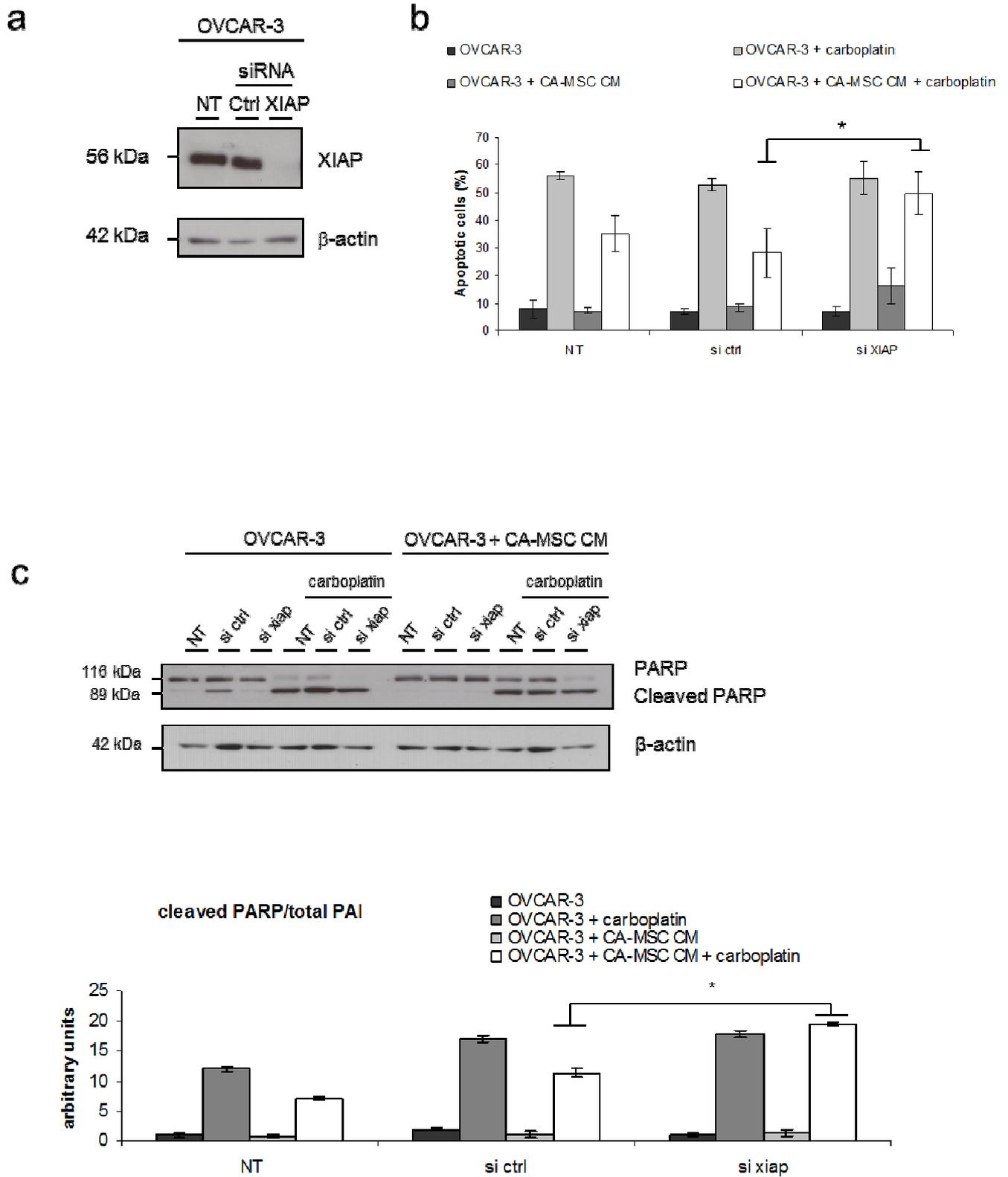


Figure 6

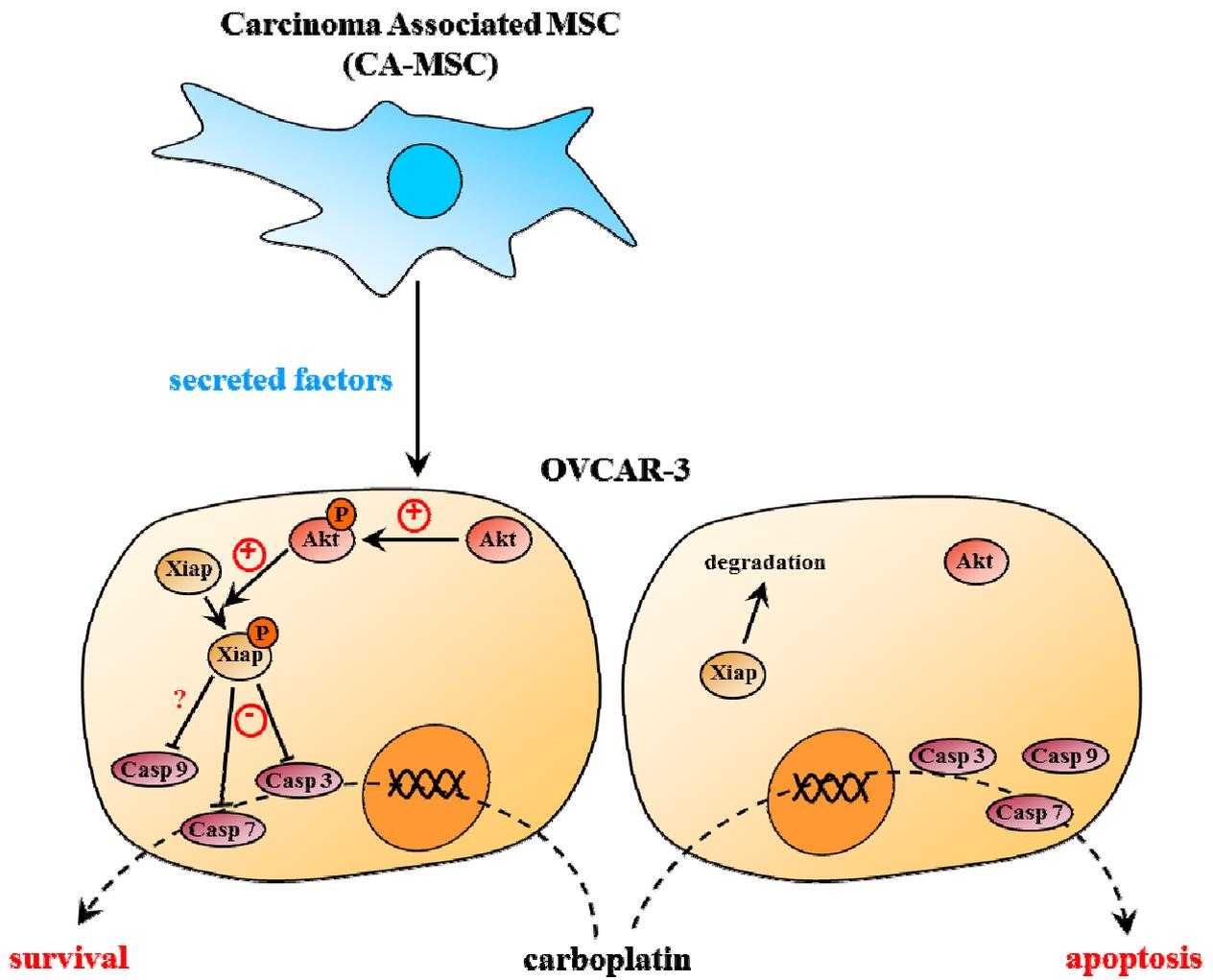
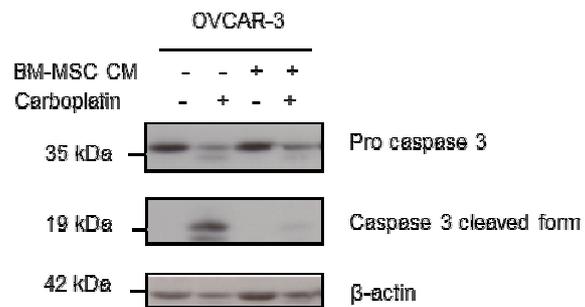
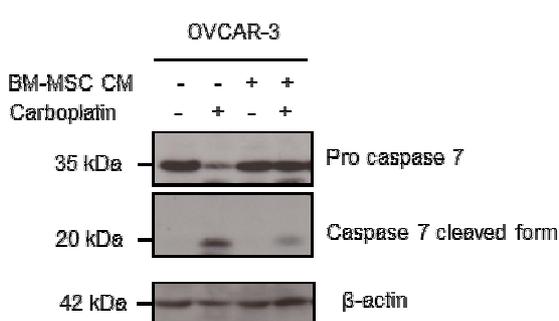
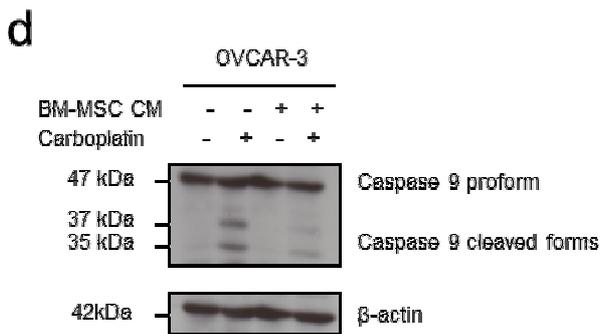
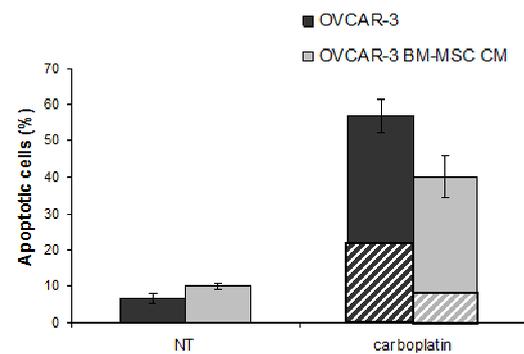
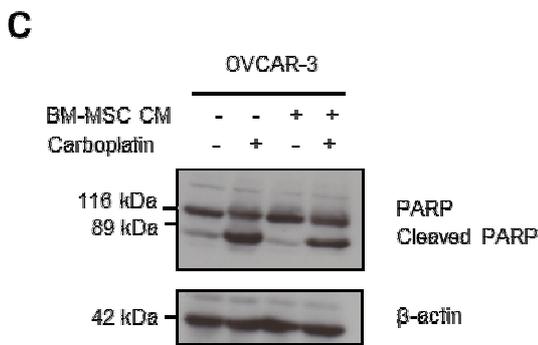
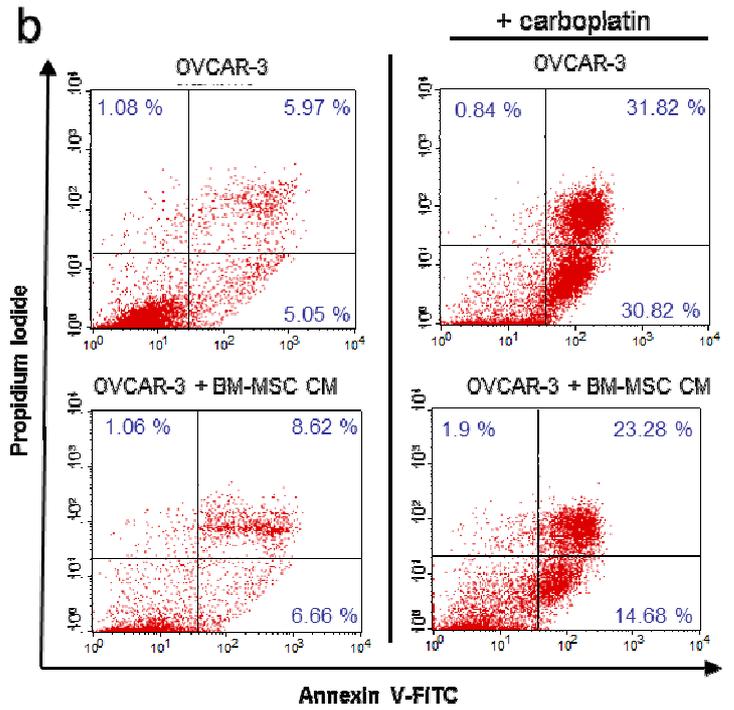


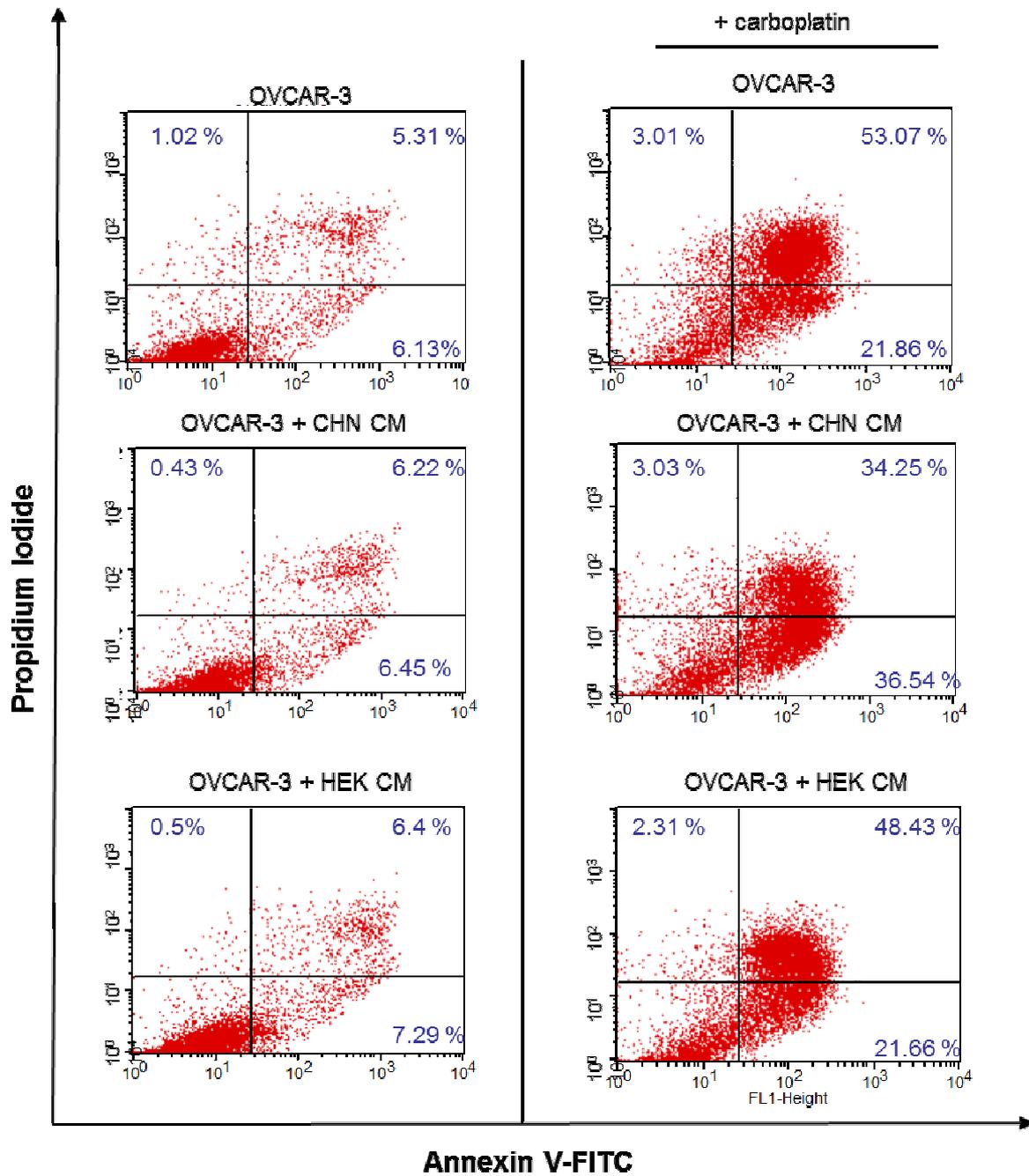
Figure 7

a

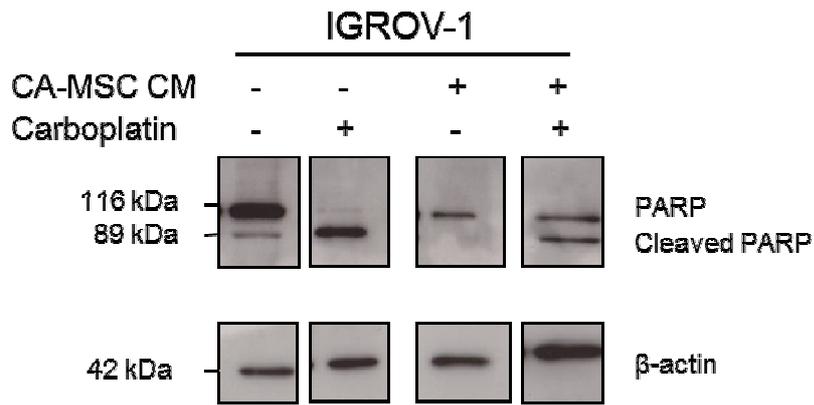
Conditions	Carboplatin IC50 (μM)
BM-MSC	40 +/- 10
OVCAR-3	136 +/- 20
OVCAR-3 + BM-MSC CM	282 +/- 25
IGROV-1	145 +/- 25
IGROV-1 + BM-MSC CM	250 +/- 38
SKOV-1	350 +/- 18
SKOV-1+ BM-MSC CM	511 +/- 32



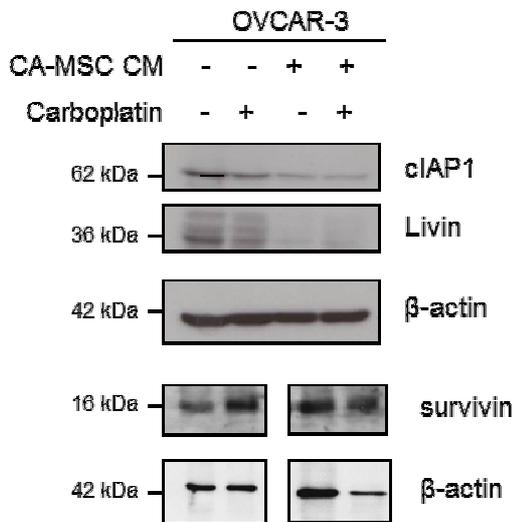
Supplementary Figure 1



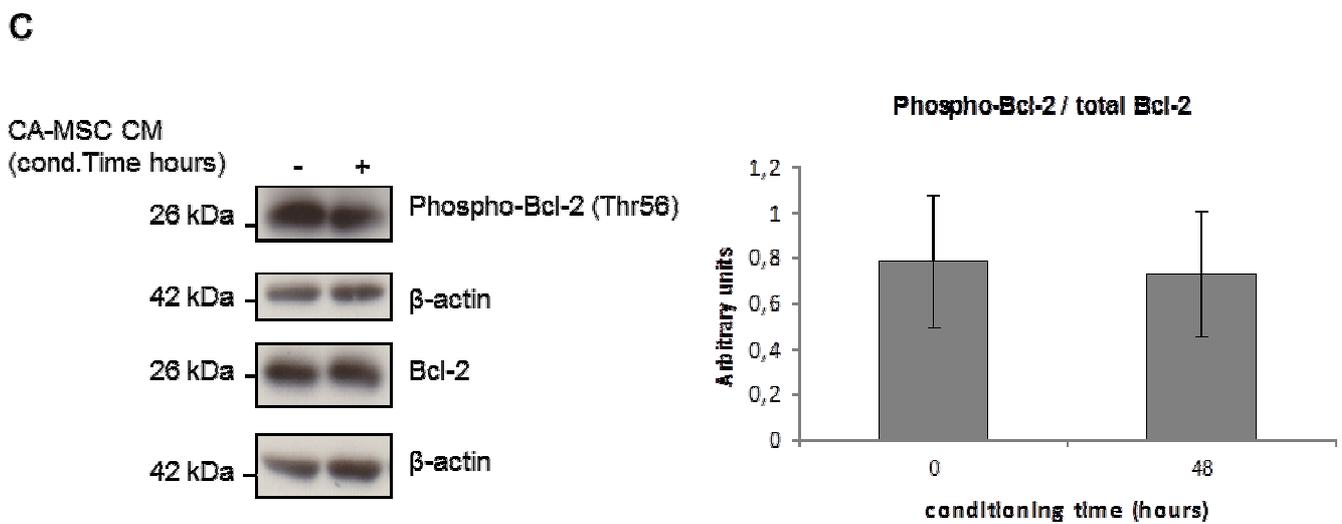
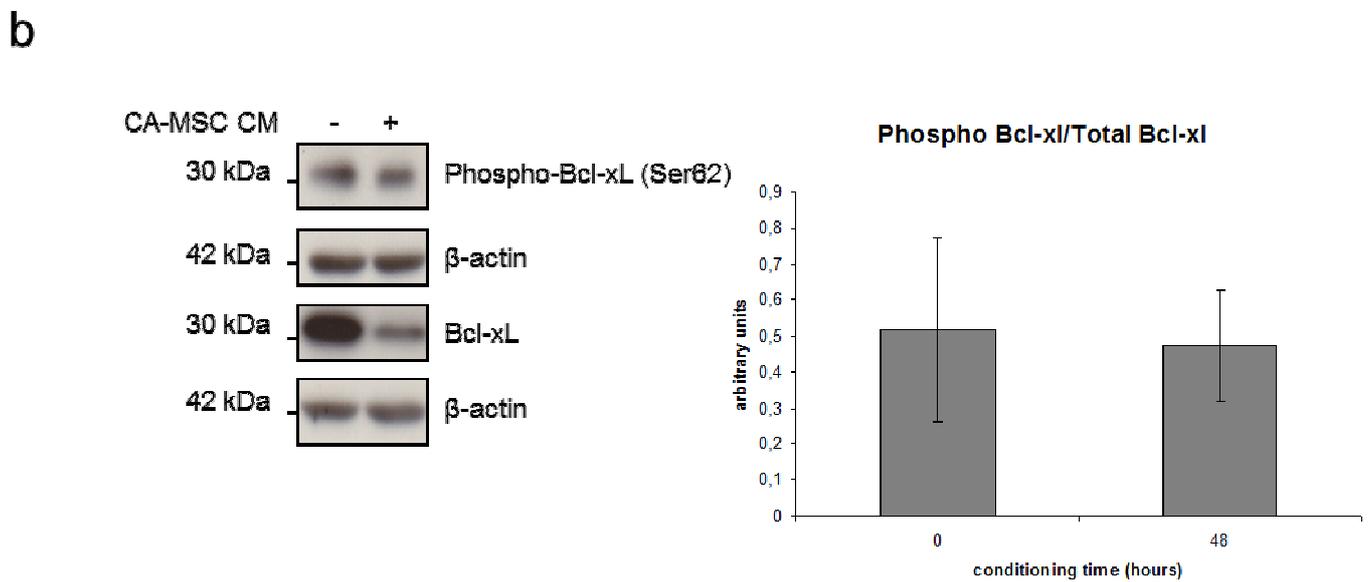
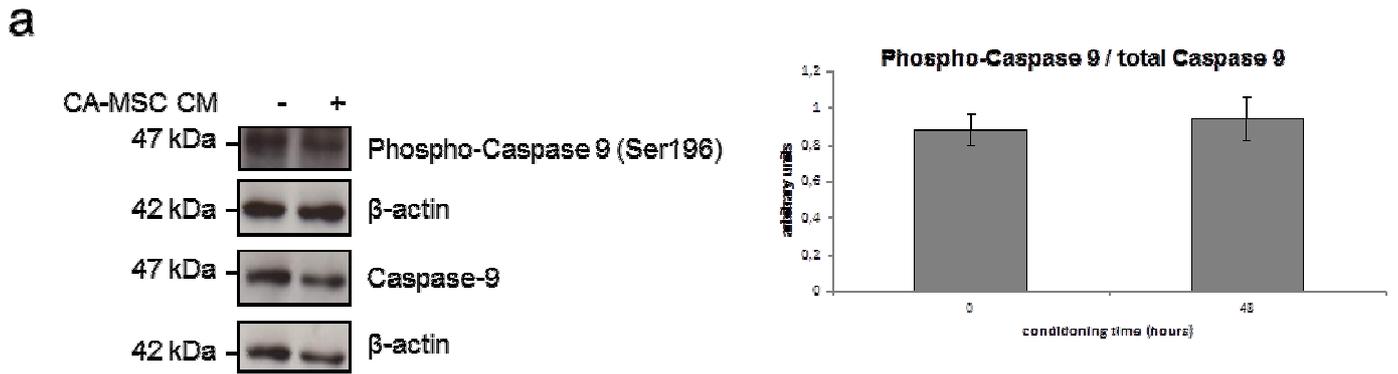
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

2. Revue 1 : Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance : Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death

Int. J. Mol. Sci. **2012**, *13*, 9545-9571; doi:10.3390/ijms13089545

OPEN ACCESS

International Journal of
Molecular Sciences
ISSN 1422-0067
www.mdpi.com/journal/ijms

Review

Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death

Magali Castells [†], Benoît Thibault [†], Jean-Pierre Delord and Bettina Couderc ^{*}

EA4553, Institut Claudius Regaud, F-31062 Toulouse, France and University of Toulouse III, Toulouse F-31052, France. E-Mails: castells.magali@claudiusregaud.fr (M.C.), thibault.benoit@claudiusregaud.fr (B.T.), delord.jean-pierre@claudiusregaud.fr (J.-P.D.)

[†] These authors equally contributed to this work.

^{*} Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: couderc.bettina@claudiusregaud.fr; Tel.: +33-5-61-42-46-44; Fax: +33-5-61-42-46-31.

Received: 8 June 2012; in revised form: 13 July 2012 / Accepted: 17 July 2012

Published: 30 July 2012

Abstract: Tumor development principally occurs following the accumulation of genetic and epigenetic alterations in tumor cells. These changes pave the way for the transformation of chemosensitive cells to chemoresistant ones by influencing the uptake, metabolism, or export of drugs at the cellular level. Numerous reports have revealed the complexity of tumors and their microenvironment with tumor cells located within a heterogeneous population of stromal cells. These stromal cells (fibroblasts, endothelial or mesothelial cells, adipocytes or adipose tissue-derived stromal cells, immune cells and bone marrow-derived stem cells) could be involved in the chemoresistance that is acquired by tumor cells via several mechanisms: (i) cell–cell and cell–matrix interactions influencing the cancer cell sensitivity to apoptosis; (ii) local release of soluble factors promoting survival and tumor growth (crosstalk between stromal and tumor cells); (iii) direct cell–cell interactions with tumor cells (crosstalk or oncologic trophobiosis); (iv) generation of specific niches within the tumor microenvironment that facilitate the acquisition of drug resistance; or (v) conversion of the cancer cells to cancer-initiating cells or cancer stem cells. This review will focus on the implication of each member of the heterogeneous population of stromal cells in conferring resistance to cytotoxins and physiological mediators of cell death.

Keywords: microenvironment; cancer; chemoresistance; apoptosis

1. Introduction

Most current treatments for peritoneal adenocarcinoma consist of chemotherapy associated with surgery. For example, the standard treatment of ovarian adenocarcinoma is cytoreductive surgery pre and post chemotherapy. Most patients are chemosensitive and cancer free immediately after the treatment. However, depending on the quality of the surgery, 50% to 70% of patients will relapse within one year. When such relapse occurs, in most cases the adenocarcinoma cells have acquired a chemoresistant phenotype. This chemoresistance can be associated with genetic alterations within the cancer cells but recent studies have proposed that it could also be associated with the tumor microenvironment [1]. Indeed, this microenvironment has become recognized as a major factor influencing the growth of cancer and impacting the outcome of therapy. While the niche cells are not malignant per se, their role in supporting cancer growth is so vital for the survival of the tumor that they have become an attractive target for chemotherapeutic agents [2]. Meads *et al.* have shown that environment-mediated drug resistance is rapidly induced by signaling events from the tumor microenvironment and is likely to be reversible because removal of the microenvironment restores the drug sensitivity [1,3].

The microenvironment (stroma) is made up of endothelial cells, carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), adipocytes, mesenchymal cells, mesenchymal stem cells (MSCs; bone marrow derived, BM-MSCs, or carcinoma associated, CA-MSCs), and cells from the immune and inflammatory systems (tumor-associated macrophages, TAM, regulatory T cells, *etc.*). The stromal cells crosstalk not only with tumor cells but also with each other [4]. Microenvironment cells could potentially induce chemoresistance acquisition in tumor cells by: (i) cell–cell and cell–matrix interactions influencing the cancer cell sensitivity to apoptosis and thereby affecting drug resistance; (ii) local release of soluble factors such as interleukin-6 (IL-6) that promote survival and tumor growth (crosstalk between stromal cells and tumor cells through paracrine factors secreted by the two cell populations) [1,5,6]; (iii) direct cell–cell interactions with tumor cells (crosstalk or oncologic trogocytosis) [7]; (iv) the generation of specific niches within the tumor microenvironment comprising subpopulations of tumor cells that may afford a survival advantage following initial drug exposure and/or enhance hypoxia leading to the up-regulation of growth factors such as platelet-derived growth factor B (PDGF-B), transforming growth factor β (TGF- β), insulin-like growth factor 2 (IGF-2), epidermal growth factor (EGF) by the stromal cells and allowing a paradoxal increase in cell chemoresistance [8,9]; (v) the conversion of the cancer cells into cancer-initiating cells or cancer stem cells [10].

2. Cell Adhesion and Chemoresistance

There are “dynamic and reciprocal” exchanges of information between tumor cells and their surrounding. A permissive microenvironment could affect the sensitivity of tumor cells to drug treatment. The composition and organization of the ECM (extracellular matrix) and stromal components contribute to marked gradients in drug concentration, increasing interstitial fluid pressure

and metabolic changes, all of which can strongly enhance the resistance of tumor cells to drug agents [11]. The importance of the microenvironment and the structural organization of cells in a 3D context have been recognized for decades. Indeed, in 1979, Sutherland *et al.* showed that the resistance of mammary tumor cells to adriamycin was higher when the cells were organized spheroidally compared to in a monolayer [12]. This increased chemoresistance is not due to reduced drug internalization but to the interaction between cells and the extracellular matrix. Over the past decade, a number of studies have demonstrated the increased survival of several tumor models induced by the adhesion of cancer cells, via CAMs and integrins, to extracellular matrix components like fibronectin or laminin [11]. As an example, L1-cell adhesion molecule (L1-CAM) can prevent cisplatin-induced apoptosis in the ovarian carcinoma cell line OVMz [13]. Concordantly, the association of an L1-CAM blocking antibody with cytostatic drugs reduces tumor growth *in vivo* in pancreatic and ovarian carcinoma models in relation to an increased number of apoptotic cells, shown by an increased expression of procaspase-8, and to caspase-3 activation [14]. Erbele *et al.* showed that a cisplatin treatment can trigger the proliferation of oral carcinoma cells adherent to a carcinoma matrix through integrin $\beta 1$ and NF- κ B dependent pathways [15]. In the same way, integrin binding to ECM and stromal cells can also control cell cycle progression in both haematological and epithelial malignancies. Correa *et al.* described in their review works made by Hazlehurst *et al.* who reported that G1 arrest of myeloma cells induced by $\beta 1$ integrin adhesion to fibronectin correlates with upregulated levels of cells regulator p27, and enhanced resistance to etoposide [11,16]. At last aside from determining cell and tissue architecture, the way cell surface adhesion molecules perceive ECM also affect nuclear structure and chromatin organization. This chromatin reorganization can affect resistance to drugs which bind or disrupt DNA [11].

Together, these data show that a “malignant” tissue architectural phenotype is responsible for increased survival of tumors against chemotherapies (Figure 1).

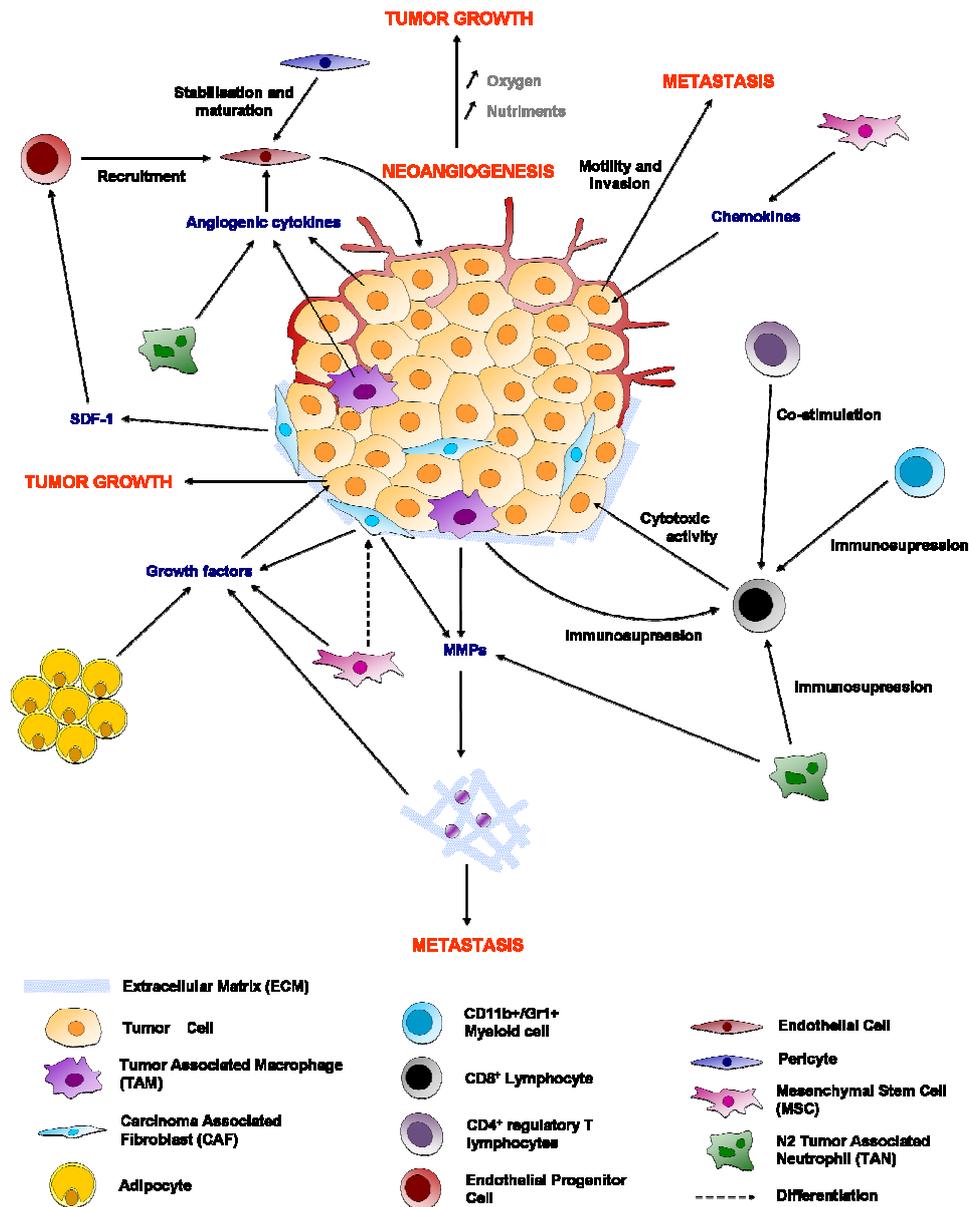
3. Endothelial Cells

Blood vessels are an essential part of the tumor since they transport the nutrients and oxygen required for tumor survival and growth. Tumor vascularization, a process enabled by the “angiogenic switch”, induces a decrease in tumor cell apoptosis [17]. The angiogenesis mechanism is thus also responsible for tumor chemoresistance by promoting resistance to apoptosis.

3.1. Growth Factors Involved in Angiogenesis Are Pro Survival

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most potent angiogenesis inducer. It stimulates endothelial cell proliferation, migration, differentiation and also vessel branching (reviewed recently in [18]). During the angiogenesis process, VEGF is secreted by several cells including endothelial cells and tumor cells [19].

Figure 1. Non-exhaustive interactions between cancer and its microenvironment. The recruitment of endothelial cells and pericytes by the tumor leads to the formation of new vessels and an increased supply of oxygen and nutrients. Within the tumor site, immune cells usually acquire a tumor-associated immunosuppressive phenotype, except for cytotoxic CD8⁺ lymphocytes which kill cancer cells. Pro-tumoral effects of adipocytes, carcinoma associated fibroblasts (CAFs) or mesenchymal stem cells (MSCs) include the secretion of growth factors enhancing tumor growth and the secretion of matrix metalloproteases (MMPs) which degrade the extracellular matrix and potentialize metastasis.



Some cancer cells express one of the two VEGF receptors, VEGFR-1 or VEGFR-2 (Flk/KDR), and can be stimulated by VEGF signaling [20-22]. VEGF is not only a mitogen but also a survival factor [23] the overexpression of which can induce resistance to chemotherapeutic drugs in soft tissue

sarcoma [24]. VEGFR-2 expression was correlated with chemoresistance in non-small-cell lung carcinoma [25] whereas the loss of VEGF expression in colorectal cancer cells caused an increase in apoptosis (spontaneous and chemotherapy induced) [26]. VEGF modifies the apoptotic signaling pathway in endothelial cells by inducing the expression of anti-apoptotic proteins including survivin and Bcl-2 [27–29], and the activation of the PI3K/Akt survival pathway [30]. Bcl-2 expression or phosphorylation can also be up-regulated by VEGF in VEGFR⁺ primary and/or immortalized cancer cells from different sources, leukemia [31,32] or in breast cancer [33]. In chronic lymphocytic leukemia B cells, VEGF interacts directly with STAT1 and STAT3 leading to the up-regulation of other anti-apoptotic proteins, Mcl-1 and XIAP, and protection from cell death [34]. Pericytes, specialized in the stabilization and maturation of vessels, can promote endothelial cell survival [35]. They act on endothelial cells by stimulating the expression of VEGF via NF- κ B signaling. By secreting vitronectin, the pericytes induce the activation of endothelial cell integrin α_v leading to the increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-w [36]. Interestingly, such prosurvival signaling induced by VEGF can be converted into pro-cell death signals by TGF β 1, a regulator of tissue morphogenesis, during an apoptosis step required for angiogenesis [37].

Chemoresistance acquisition and angiogenesis are two linked processes. Indeed one study showed that chemoresistance acquisition by continuous treatment in neuroblastoma cells was related to transcriptome modifications in angiogenic genes and correlated with a positive influence on angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [38]. In breast cancer cell lines, hypoxia-stimulated VEGF expression was increased by overexpression of Bcl-2 [39]. In contrast, down-regulation of anti-apoptotic proteins Bcl-2 or survivin by different approaches improved the sensitivity to treatment (radiotherapy or chemotherapy) and inhibited VEGF expression and angiogenesis in two different tumor xenograft models (prostate and colon) [40,41].

3.2. Endothelial Cell Protection against Apoptosis

In addition to the tumor cells, endothelial cells also need to be eradicated by any cancer treatment to minimize the risk of recurrence. These cells develop their own specific apoptosis resistance pathways depending on the model studied and death inducer. FGF-2, which is also an angiogenic factor, promotes apoptosis resistance in endothelial cells after radiation treatment [42] or growth factor deprivation [43]. It has the same prosurvival effects as VEGF, upregulating Bcl-2 and survivin expression [44] and activating the protein kinase Akt [45,46].

Both FGF-2 and VEGF protect endothelial cells from apoptosis after exposure to different chemotherapies, and have an additive effect due to activation of PI3K/Akt signaling pathway [26]. Cancer cells can act on endothelial cells and protect them from apoptosis after radiation through their secretion of VEGF and the subsequent activation of pro-survival gene expression [47]. Moreover, in different cancer models, tumor-associated endothelial cells have been shown to differ from those derived from normal organs or cells. For example, the tumor-associated endothelial cells showed increased chemoresistance compared to normal endothelial cells through the expression of PAX2 in renal carcinoma [48], the overexpression of survivin in a glioma model [49], and the activation of an NF- κ B dependent pathway promoting Akt and VEGF expression and cell survival in

hepatocellular carcinoma [50]. These molecular pathways are also associated with the stimulation of angiogenesis [48–50].

3.3. Treatments

Specific anti-angiogenic drugs have been developed over the last few years most of which target VEGF signaling (VEGF or VEGFR).

Anti-angiogenic therapies used as a single agent have been shown since the first preclinical studies to inhibit angiogenesis and diminish tumor growth [51] and also permit an increase in tumor cell apoptosis [52]. They are used in combination with conventional therapies for their ability to improve delivery [53] by reducing interstitial fluid pressure [54]. Moreover, the use of two angiogenic inhibitors together has shown very promising results in a glioma model where a VEGFR2 inhibitor alone did not permit blood vessel regression. A combination with an inhibitor of PDGFR- β overcame the survival mechanism by targeting pericytes, mediators of endothelial cell survival mechanisms, thus demonstrating that in blood vessels, resistant processes work cooperatively [55]. In clinical trials, anti-angiogenic therapies have been shown to improve the response to chemotherapy in different types of cancer [56,57] however when administered alone, they do not permit an improvement of long term benefit [58].

The paradox between anti-angiogenic therapy expectations and clinical observations is explained by the recent concept developing the idea that anti-angiogenic treatments provide the best results when they provoke “vessel normalization”. These drugs do not abrogate tumor angiogenesis but rather turn transiently anarchic tumor blood vessels, caused by overexpression of angiogenic factors, into normal ones. Not only does this allow a better delivery of chemotherapy and increase the sensitivity to radiotherapy but it also decreases tumor cell extravasation and migration in the blood circulation by reestablishing the endothelial cell barrier [55,59]. As with every therapy, resistance to an anti-angiogenic drug can occur mostly due to its mechanism of action. Indeed their aim is to suppress angiogenesis causing hypoxia [60].

3.4. From Hypoxia to Angiogenesis

To survive, tumor cells develop several adaptive mechanisms including metabolic shift (oxidative metabolism to glycolysis) and apoptosis resistance [61]. The microenvironment can positively influence tumor apoptosis resistance via the activation of resistance signaling pathways. Extreme conditions imposed by the microenvironment can also influence cancer cells by obliging them to modify their phenotype in order to overcome the hypoxia and survive. One of the major ways for tumors to survive in hypoxic conditions is to escape from the local area, thus explaining the high migration and invasion potential of these cells [60]. Hypoxia is drastic for cancer cells but leads to genetic instability and the selection of the most malignant cells with the highest metastatic abilities [62]. The key molecule acting during hypoxia is hypoxia-inducible transcription factor 1 (HIF-1) which transactivates hundreds of genes including angiogenic and autocrine growth factors and α receptors, glycolytic enzymes and extracellular proteases [63]. Hypoxia particularly induces VEGF expression in tumor cells thereby activating anti-apoptotic pathways described in point 3.3. [64].

Hypoxia can also induce an inflammatory state through HIF1 and NF- κ B activation leading to the secretion of chemokines and cytokines able to recruit inflammatory cells which also release VEGF [65].

Anti-angiogenic therapies, through the hypoxic response they cause in cancer cells, could be responsible for an enhancement of metastasis and invasion [66] and may bring about a more aggressive behavior. This point is controversial and still under investigation. Indeed, while some preclinical studies have shown that local invasiveness and metastasis are triggered by anti-VEGF treatments [67,68] others found no effect on metastasis [69,70].

4. Fibroblasts

4.1. Non Activated Fibroblasts

In the particular case of multiple myeloma (MM), a plasma cell cancer, the adhesion between MM cells and bone marrow fibroblasts leads to the secretion of IL-6 by the latter [71]. This pleiotropic cytokine has demonstrated the capacity to induce the resistance of MM cells to apoptotic stimuli and chemotherapeutic drugs via the Jak/STAT pathway and the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL [72].

4.2. Myofibroblasts or Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs)

Myofibroblasts or carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) are the most abundant cell type in the tumor microenvironment. While their tumor-promoting effects are well known, their origin and a clearly characterized phenotype have not been well established. They can be distinguished from normal fibroblasts by their expression of certain markers like alpha smooth muscle actin (α SMA), fibroblast activation protein (FAP), tenascin-C or desmin [73].

Both cancer cells and CAFs are able to secrete prostaglandin E₂ (generated by COX-2 activation) and sphingosine-1-phosphate (S1P), that can act in an autocrine or paracrine fashion to mediate cell survival and chemoresistance via PI3K-Akt/PKB pathway activation [74]. In cholangiocarcinoma, CAFs also secrete platelet growth factor BB (PDGF-BB) which protects the cholangiocarcinoma cells from TRAIL cytotoxicity thus implying involvement of the Hedgehog (Hh) pathway [75].

CAFs can regulate extracellular matrix composition by secreting periostin, a ligand of α v β 3 and α v β 5 integrins, which allows cancer cell adhesion and migration but also apoptosis resistance by PI3K-Akt/PKB activation in breast cancer models [76]. Thanks to their expression of the serine protease FAP, CAFs allow collagen I cleavage and thus extracellular matrix remodeling [77]. By interacting with collagen fibers in an integrin-dependent manner, these cells exert an increased tension between the fibers and ultimately increase the interstitial pressure which diminishes drug uptake and efficacy [78]. Concordantly, fibroblast-derived 3D matrix has been shown to promote resistance of the PANC-1 line (pancreatic cancer cells) to taxol [79].

Myofibroblasts have been shown to enhance chemoresistance in a pancreatic carcinoma model via an epigenetic inhibition of STAT1 and a reduced expression of caspases (8, 9, 7 and 3). They achieve this by inducing the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and CpG DNA-hypermethylation [80].

Their abundance in the tumor stroma and various effects on tumor progression and apoptosis resistance has made CAFs a new target in anticancer therapy. The desire to target CAFs instead of normal fibroblasts drove the development of, among others, anti-tenascin-C or anti-FAP molecules. Results from a phase II trial of the anti-tenascin monoclonal antibody 81C6 followed by chemotherapy in malignant glioma were promising compared to the control group [81].

Stromal fibroblasts are genetically stable compared to tumor cells and constitute a reliable target for immunotherapy. Loeffler *et al.* developed a DNA vaccine which targets FAP by activating CD8⁺ T cells in order to specifically kill the CAFs and thereby decrease collagen I expression and enhance drug uptake. The combination of such an anti-FAP vaccine with doxorubicin brought about an inhibition of tumor growth and complete tumor rejection in half of the tested mice whereas there was no survival with doxorubicin treatment alone [82].

5. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) or MSC-Like Cells (CA-MSCs)

MSCs are multipotent cells capable of differentiating into numerous cell types including adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, fibroblasts, perivascular and vascular structures [3,83]. MSCs are recruited in large numbers to the stroma of developing tumors the growth of which induces a continuous production of paracrine and endocrine signals that mobilize the MSCs from the bone marrow (BM) [3]. In some peritoneal cancers such as in ovarian cancer, MSCs have been described as being located around the tumor cells and in the ascitic fluid. These MSCs can no longer be defined as multipotent as they are unable to differentiate in different cell lineages. They are defined as being carcinoma-associated (CA-MSCs) and present some characteristic markers of CAFs (expression of PDGFR, FAP, ...) [84]. Such MSCs are found to stimulate tumor growth, enhance angiogenesis and promote metastasis formation through the release of a large spectrum of growth factors and cytokines [3,85,86]. Roodhart *et al.* [3], Xu *et al.* [87], Hao *et al.* [88], Jin *et al.* [89] and our groups [4,7] have recently shown that MSCs are also involved in the development of chemoresistance to multiple types of chemotherapies (Figures 1 and 2).

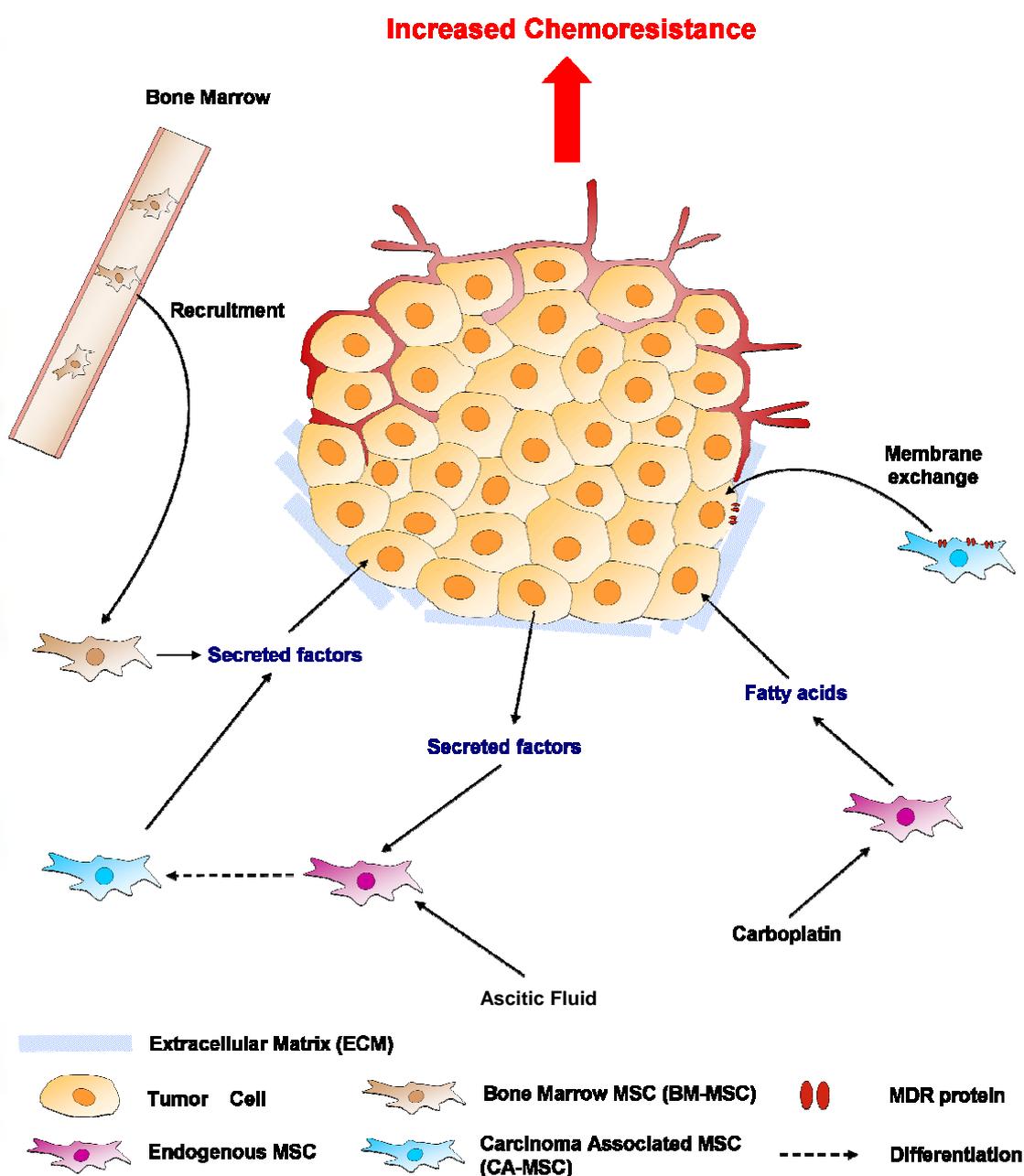
5.1. Cell-Cell Contact

MSCs could promote such chemoresistance by direct cell-cell contact. Firstly Xu *et al.* proposed that TGF- β 1 produced by BM stromal cells promotes the survival and chemoresistance of leukemia cells via direct cell-to-cell interactions [87]. They showed that the blockade of TGF- β signaling by LY2109761, which effectively inhibited the pro-survival signaling, could enhance the efficacy of chemotherapy against myelo-monocytic leukemic cells in the BM microenvironment. Rafii *et al.* demonstrated the capacity of CA-MSCs (called Hospicells in their study) to confer chemoresistance to ovarian and breast cancer cells by direct cell-cell contact and the exchange of membrane patches and MDR proteins (oncologic trogocytosis) [5,7].

Jin *et al.* showed that MSC cocultured with KBM-5 leukemia cells protected the latter from imatinib-induced cell death. As these anti-apoptotic effects were abrogated by the CXCR4 antagonist AMD3465 or by the inhibitor of integrin-linked kinase QLT0267, they suggested that the upregulation of CXCR4 by imatinib promotes migration of chronic myelogenous leukemia (CML) cells to bone

marrow stroma, causing G0-G1 cell cycle arrest and hence ensuring the survival of quiescent CML progenitor cells [89].

Figure 2. Chemoprotective effects of mesenchymal stem cells (MSCs) in ovarian cancer. In the ovarian stroma, MSCs present multiple phenotypes: they could be recruited from the bone marrow (BM-MSCs), established within the peritoneum (endogenous MSCs) or differentiated into a carcinoma-associated phenotype (CA-MSCs) via ovarian cancer cell secreted factors or molecules contained in the ascites. All these cells promote ovarian cancer cell resistance to carboplatin by several mechanisms including the secretion of unsaturated fatty acids (for endogenous MSCs activated by a carboplatin treatment) or that of factors with the exchange of MDR efflux pumps (for CA-MSCs).



5.2. Soluble Factors Released Locally

Roodhart, Hao and Castells showed that MSCs could induce chemoresistance through the release of factors in the neighbourhood of tumors. Castells *et al.* showed that supernatants of CA-MSCs as well as BM-MSCs were able to induce development of chemoresistance by reducing apoptosis. They observed that CA-MSC secretions were able to confer carboplatin resistance to ovarian cancer cells by inhibiting the activation of effector caspases and apoptosis blockade. The activation of PI3K/Akt pathway signaling and phosphorylation of the downstream target Xiap underlined their implication in ovarian cancer chemoresistance.

The factors released in the tumor microenvironment have yet to be identified. Using activated MSCs, Roodhart *et al.* also showed that MSCs are potent mediators of resistance to chemotherapy and revealed targets to enhance chemotherapy efficacy in patients. They claimed that MSCs per se do not induce chemoresistance, rather endogenous MSCs become activated during treatment with platinum analogs and then secrete factors that protect tumor cells against a range of chemotherapeutic drugs. Through a metabolomic approach, they identified two distinct platinum-induced polyunsaturated fatty acids (PIFAs), 12-oxo-5,8,10-heptadecatrienoic acid (KHT) and hexadeca-4,7,10,13-tetraenoic acid (16:4(n-3)), that in minute quantities induce resistance to a broad spectrum of chemotherapeutic agents. Blocking central enzymes involved in the production of these PIFAs (cyclooxygenase-1 and thromboxane synthase) prevents such MSC-induced resistance [3]. Hao *et al.* demonstrated in myeloma that the secretion of IL-6, VEGF and cell-to-cell contact with microenvironment-derived stromal cells from patients with multiple myeloma (MM-BMSCs) significantly decreased the sensitivity of myeloma cells to bortezomib treatment. Mechanistically, they associated the chemoresistance to the suppression of miRNA-15a expression by the BM-MSCs [88].

5.3. Hypoxia

Pasquet *et al.* showed that CA-MSCs could induce the formation of hypoxic niches around tumors associated with a high expression of HIF1- α [84]. Benito *et al.* indicated that interactions between leukemia cells and the BM microenvironment promote leukemia cell survival and confer resistance to anti-leukemic drugs [90]. They correlated the hypoxic areas within the BM microenvironment with a survival advantage to hematopoietic cells and showed that hypoxia promotes chemoresistance in various ALL derived cell lines.

5.4. Conversion of Mesenchymal Cells to Cancer-Initiating Cells

In their study, Teng *et al.* have shown that DNA hypermethylation within a specific tumor suppressor gene is sufficient to fully transform a somatic mesenchymal stem cell. MSCs harboring targeted promoter methylations of HIC1/RassF1A displayed several features of cancer stem/initiating cells including loss of anchorage dependence, increased colony formation capability, drug resistance, and pluripotency. Moreover, the cells retained sensitivity to neuron- and osteocyte-induction and displayed both lineage-specific markers and stem cell markers in xenografts. Teng *et al.* proposed that under the influence of different environmental niches, these transformed stem cells could give rise to tissue-specific cancers [10].

6. Immune System

The immune system monitors and eliminates pathogens as well as developing tumors. However, tumor cells can escape from immunity and modify the phenotype of immune cells which become pro-tumor cells enhancing the tumor growth, angiogenesis or metastasis process [91]. Several mechanisms by which tumors escape from cell death induced by the immune system have already been described [92]. A few studies have been carried out on the effects of the immune system itself on the tumor resistance to chemotherapy and apoptosis.

Some recent studies reported the capacity of myeloid cells to mediate resistance to anti-angiogenic drugs. Shojaei *et al.* showed that CD11b⁺Gr1⁺ cells (which could be dendritic cells, monocytes or neutrophils) could be primed and recruited in tumors where they could mediate anti-VEGF treatment refractoriness. They also showed that combining anti-VEGF treatment and a monoclonal antibody targeting myeloid cells allowed a better growth inhibition than anti-VEGF alone in refractory tumors [93]. Targeting placental growth factor (PlGF), a pro-angiogenic cytokine, reduces tumor growth, angiogenesis and metastasis and enhances chemotherapy (gemcitabine or cyclophosphamide) and anti-VEGF therapy efficacy in melanoma or pancreatic tumor models. Fischer *et al.* showed that inhibition of the PlGF pathway was responsible for a reduced VEGFR-1⁺ macrophage recruitment leading to an improved response to anti-VEGF therapy [94].

6.1. Macrophages

Monocytes and macrophages derive from myeloid cells, which are located in the bone marrow. After maturation, monocytes circulate in the bloodstream and can migrate into tissues where they differentiate into macrophages. Depending on the environmental context and the tumor development stage, activated macrophages can be separated into two distinct phenotypes: M1 (classical activated), which inhibit tumor growth and M2 (alternative activated), which are pro-tumoral. While the exact definition is still controversial, it is clear that tumor-associated macrophages (TAMs) consistently present a highly immunosuppressive M2 profile [95].

Within developed tumors, there is a balance in favor of tumor progression and the chemoprotective effects of TAMs being closely associated with reduced cytotoxic CD8⁺ T-lymphocyte activity. Indeed, hypoxic TAMs suppress CD8⁺ T-lymphocytes activity by the activation of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and arginase I (ArgI, liver-type) in a HIF1 α -dependant manner. Moreover, the inhibition of TAM recruitment by a CSF1 neutralizing antibody in mammary tumors leads to a better chemosensitivity to paclitaxel, reduced tumor progression and metastasis that was associated with an increased survival of CD8⁺ T-cells. [96].

Shree *et al.* showed that cathepsin-expressing macrophages protect breast cancer cells from cell death induced by the following chemotherapeutic drugs: taxol, etoposide and doxorubicin. They highlighted the growing importance of combining anti-microenvironment drugs with classic chemotherapy. Indeed, the combination of anti-cathepsin with taxol treatment enhances the anti-tumor efficacy, the late-stage survival and decreases the metastatic burden compared to taxol alone in a breast cancer mouse model [97]. Mononuclear cells (monocyte-like cell line U937) prevent pancreatic cancer

cells from camptothecin and genistein induced apoptosis *in vitro* by interleukin-1 β -mediated expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and the production of prostaglandins [98].

6.2. Cytotoxic CD8⁺ T Lymphocytes

While TAMs are pro-tumoral and enhance chemoresistance, the presence of cytotoxic CD8⁺ lymphocytes (CTLs) is usually associated with a good prognosis and a better response to chemotherapy. Indeed, CTLs have an anti-tumor activity in secreting perforin or granzyme which induce apoptosis in tumoral cells. A high density of CD8⁺ cells has been correlated with a better response to chemotherapies in primary colorectal cancer or liver metastases [99,100]. Denkert *et al.* showed that the presence of lymphocytes infiltrates in breast cancer is correlated with an increased efficacy of anthracycline and taxane neoadjuvant chemotherapy [101] (Figure 1, Figure 3(A,B)).

Figure 3. Effects of the stromal immune cell composition on the resistance to chemotherapy. (A) The sensitivity of non-small-cell lung cancer to platinum chemotherapy is determined by the balance between regulatory CD4⁺/Fox3p⁺ lymphocytes and cytotoxic CD8⁺ lymphocytes. (B) Tumor associated macrophages (TAMs) are recruited into the tumor by secretion of colony stimulating factor 1 (CSF1) from tumor cells. TAMs inhibit the survival of CD8⁺ lymphocytes and lead to a reduced sensitivity to paclitaxel. Blocking CSF1 receptor (CSF1R) by a monoclonal antibody inhibits TAMs recruitment and allows a better cytotoxic activity and chemotherapy efficiency.

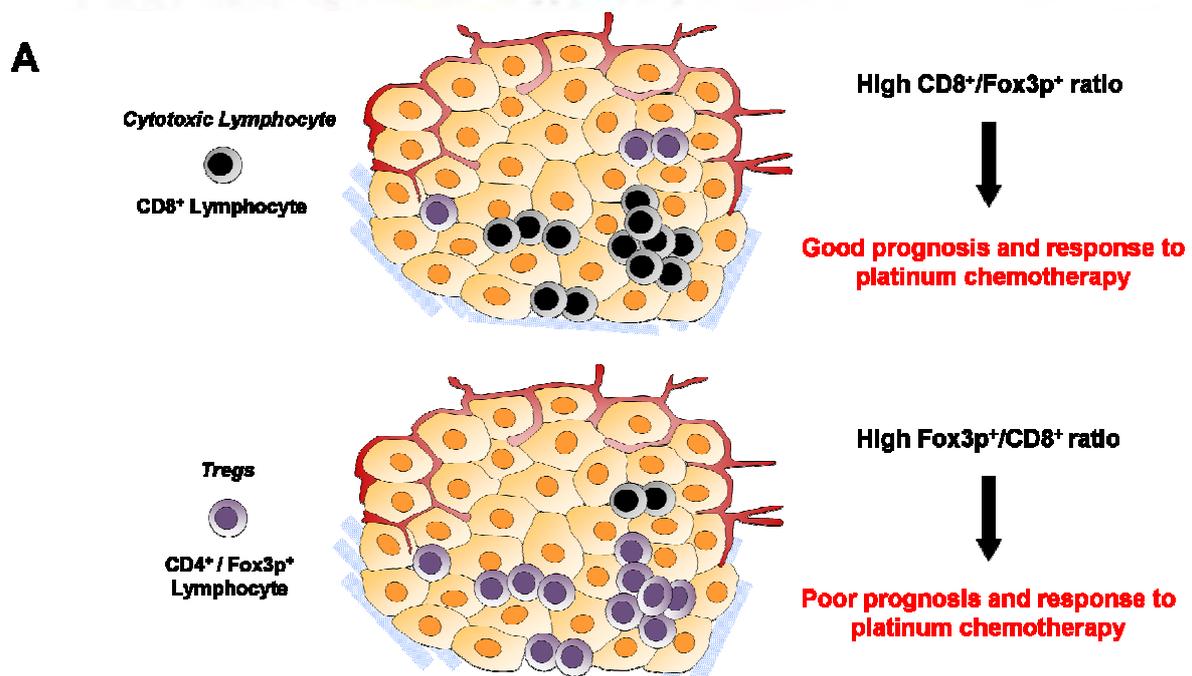
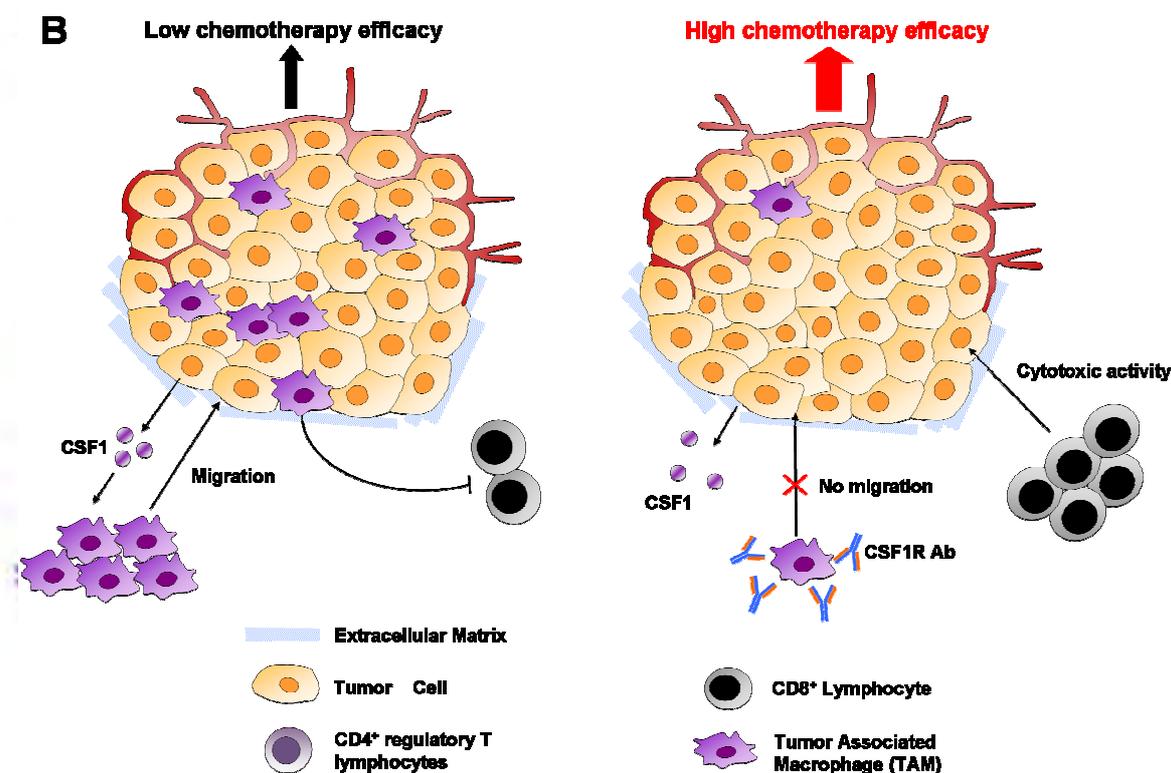


Figure 3. Cont.



Interactions between chemotherapy and CTLs are very tight and the efficacy of the latter can be increased after a first treatment. Indeed, a cyclophosphamide treatment in a mouse model of mesothelioma sensitizes tumor cells to the TRAIL-mediated death induced by CTLs [102]. Moreover, a chemotherapy treatment (based on paclitaxel, cisplatin or doxorubicin) leads to an up-regulation of mannose-6-phosphate receptors which increases the permeability of tumor cells to granzyme B released by CTLs [103]. Mattarollo *et al.* showed, in a mouse model of breast adenocarcinoma, that a doxorubicin treatment enhances the proliferation of IFN- γ and IL-17 producing CD8⁺ T cells. In return, they demonstrated a positive correlation between the CD8 α , CD8 β and IFN- γ expression and the efficacy of doxorubicin treatment in patients with breast cancer [104]. Chemotherapy and CTLs thus present a synergical effect. The association between a classical chemotherapy treatment and immunotherapy present a very interesting way of therapeutic development.

6.3. $\gamma\delta$ T Lymphocytes

$\gamma\delta$ T lymphocytes are CD3⁺ cells expressing a TCR with γ and δ chains. They represent a small population of T lymphocytes (5%) and show anti-tumor properties. Recently, the team of Zitvogel demonstrated that IL-17-producing $\gamma\delta$ T lymphocytes were implied in the efficacy of chemotherapy. Indeed, in a mouse model lacking these $\gamma\delta$ T cells, there is no IL-17 production and CTLs fail to invade tumor. The chemotherapy efficacy is thus impaired [105].

6.4. Regulatory T Cells (Treg)

Regulatory T cells, a Fox3p⁺ subpopulation of CD4⁺ T lymphocytes, are also implied in response to chemotherapy with controversial conclusions. Their presence is associated with a better survival exclusively in chemotherapy treated patients with an early breast cancer [106]. However, some other studies shown that the recruitment of Tregs in breast cancer can be associated with a bad clinical outcome and a higher risk of relapse [107,108]. In a recent work, Liu *et al.* demonstrated that the equilibrium between CTLs and Tregs in tumors is primordial to predict their response to chemotherapies. In an advanced non-small cell lung cancer context, a high Fox3p⁺/CD8⁺ ratio is associated with a poor response to platinum-based chemotherapy [106].

6.5. T Helpers (Th) Cells

CD4⁺ naïve T lymphocytes can, after the activation by antigen-presenting cells (APCs), differentiate into effector cells: T helpers (Th). The interactions with APCs and the nature of cytokine environment will define the subtype obtained: Th1, Th2 and Th17. These cells are implied in the activation of the immune system but differ in their cytokine production and biological functions.

Th1 cells are characterized by IFN- γ and TNF- α secretion and are responsible for the activation of CTLs or anti-tumoral macrophages. Tosilini *et al.* recently showed that the presence of Th1 cells was correlated with a prolonged disease-free survival in patients with colorectal cancer [109].

On the contrary, Th2 cells secrete IL-4 and enhance tumor progression in activating, for example, tumor-associated macrophages [110]. A few data directly links Th1 and Th2 cells with chemotherapy efficacy. However, the production of IL-4 (Th2 cytokine) is associated with resistance to chemotherapy and thyroid cancer [111].

Th17 secrete the pro-inflammatory cytokine IL-17 and present both anti-tumor and pro-tumor activities. The microenvironmental context is highly important in the interactions between Th17 cells and the tumor. However, many data link the IL-17 production, as previously cited for $\gamma\delta$ lymphocytes, with the establishment of CTLs in the tumor bed and thus the anticancer efficacy [112].

As reviewed here and by Ding and Zhou, targeting CD4⁺ T cells constitutes a new way of immunotherapy in order to increase the chemotherapy efficacy [113].

6.6. Mast Cells

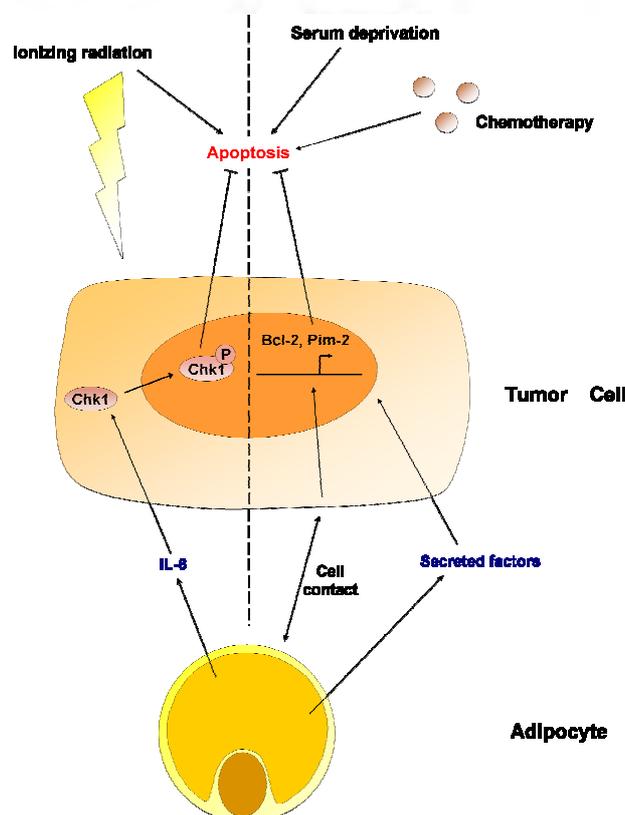
Among stromal cells of immune origin, mast cells (MCs) have been observed to infiltrate tumor masses. Indeed in lymphoid malignancies infiltrating MCs have been demonstrated to support clone survival and proliferation, and to negatively affect prognosis [114]. Mechanisms of tumor promotion involve the release of proangiogenic factor such as FGF-2 [115] or VEGF and matrix metalloproteinases (MMP9) but also of immunosuppressive cytokines like interleukin-10 [116]. As described before those molecules are also implicated in chemoresistance acquisition by tumor cells and MCs could be potential targets for chemotherapy treatment. They have been shown to be a prototypical off-target cell for imatinib therapy in cancer, due to their constitutively high expression of c-Kit, strong reliance on c-Kit signal for development and activation, and aforementioned tumor promoting activities [114].

7. Adipocytes

Although representing one of the most abundant parts of the breast cancer stroma, little is known about the cells that make up adipose tissue, adipocytes. What is certain is that they are active endocrine cells able to secrete growth factors and enhance tumor progression. Iyengar *et al.* showed that conditioned media from adipocytes could enhance the survival of breast cancer cells MCF-7 in serum starved media [117]. Results from a recent study supported the capacity of adipocytes to enhance chemoresistance in leukemia-bearing mice. In another study, 3L3-L1 adipocytes were shown to protect human leukemia cell lines from vincristine, nilotinib, daunorubicin and dexamethasone, an effect which was independent of cell contact and associated with the increased expression of anti-apoptotic factors Pim-2 and Bcl-2 [118]. Bochet *et al.* demonstrated that cancer-associated adipocytes can also promote radioresistance and proposed that this effect could be due to a secretion of IL-6 and the phosphorylation of Chk1 [119].

Considering the worldwide increase in the incidence of obesity, studying the interactions between adipocytes and cancer cells and their effects on chemotherapy and radiotherapy resistance is crucial in the discovery and development of new therapies (Figure 4).

Figure 4. Effects of adipocytes on cancer cell resistance to apoptosis. The secretion of interleukin-6 (IL-6) by adipocytes activates Chk1 protein in breast cancer cells, which results in an enhanced resistance to radiotherapy. Adipocyte-secreted molecules enhance breast cancer cell resistance to serum deprivation via the activation of a pro-survival program. A cell-cell contact between adipocytes and leukemia cells is responsible for the transcription of anti-apoptotic proteins (Bcl-2 and Pim-2), which enhance the resistance to chemotherapy.



8. miRNAs

More and more genes expression appears to be regulated by microRNAs (miRNAs). These small (approximately 22 bp) non-coding RNAs target specifically mRNA for cleavage, destabilization or inhibit their translation [120].

Expression of some miRNAs is deregulated in cancer and can be involved in chemoresistance through known or unknown mechanisms. MiR-Let-7e, miR-150a are among others associated with both cisplatin and taxol resistance in ovarian cancer [121]. Some miRNAs, like circulating miR-125b or miR-221 are found to be predictive markers of chemoresistance in breast cancer [122,123]. Other miRNAs are known to be implicated in chemoresistance by regulating genes involved in survival or cellular death. In mantle cell lymphoma cluster miR-17-92 allow reexpression of survival pathway PI3K/Akt by targeting negative regulators of this signaling pathway (protein phosphatase PHLPP2 and PTEN) [124]. This signaling pathway can also be activated via down-regulation of PPP2R1B (a subunit of protein phosphatase 2A) by miR-200c in esophageal cancers [125]. miR-155 is determinant in breast cancer chemoresistance by inhibiting specifically FOXO3a, which can induce cell death by up-regulation of apoptotic proteins, (BIM, p27, ...) and repression of antiapoptotic molecule such as FLIP and Bcl-xL [126].

Moreover, miRNAs can be overexpressed in cancer cells leading to chemoresistance in response to microenvironment stimuli. Bourguignon and colleagues showed in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) that miR-21 is up-regulated through the binding of hyaluronic acid to its receptor CD44 and promotion of Nanog-Stat 3 complex formation which allow transcriptional activation and expression of this miRNA. miR-21 up-regulation results in a decrease of a tumor suppressor protein (PDCD4), and an up-regulation of inhibitors of the apoptosis family of proteins (IAPs) as well as chemoresistance [127]. Stress conditions such as hypoxia lead to profound gene expression modifications and deregulations of several miRNAs [128]. For instance in HNSCC, miR-98 is up-regulated under hypoxia and leads to down-regulation of, at least, High mobility group A2 protein HMGA2 and potentiates chemoresistance to cisplatin and doxorubicin [129].

9. Conclusions

This review highlights the importance of simultaneously targeting both compartments of the tumor microenvironment (stromal and malignant cells) in cancer therapy. A number of targeted therapeutics is currently under development targeting not only cancer cells but also cells from the microenvironment such as fibroblasts, endothelial cells or mesenchymal stem cells. For example a tri-therapy currently under trial targets PDGFR (expressed by cancer cells, MSCs and fibroblasts), VEGFR (expressed by endothelial cells as well as cancer cells) and FGFR (expressed by fibroblasts and cancer cells). Two thirds of these novel targeted anticancer agents inhibit kinases, including EGFR, Src, and mammalian target of rapamycin (mTOR) activated in cancer cells as well as in microenvironment cells and now several V-ATPases inhibitors are under trial. Although these therapeutic approaches seem convincing they are associated with a lot of side effects associated with the elimination of cells not involved in cancer progression or in chemoresistance. Nevertheless, hope remains as many authors have described cells from the microenvironment which display several

differences with their physiological parent cells. Indeed, when we compared some cancer stromal cells with the same cell from another organ and identified several genetic alterations. This enables distinguishing tumor associated fibroblasts (TAFs) from fibroblasts, carcinoma-associated MSCs from BM-MSCs (or ADSCs), and M1 macrophages from tumor-associated macrophages (TAMs). Differences can also be found between cells of the same origin but which have evolved differently depending on the organ and on the evolution of the associated pathologies e.g. Hospicells/CA-MSCs, myofibroblasts/TAFs. This highlights the broad versatility and plasticity of microenvironment cells. Parental cells (such as macrophages, neutrophils or MSCs) can mostly be found with anti tumoral properties. They can however polarize into different states depending on the tumor and acquire pro-tumoral functions when they may also influence chemoresistance acquisition and act on the apoptosis pathways of tumor cells. However, what actually causes this switch of a microenvironment cell from being tumor inhibiting to tumor-promoting remains a mystery. It is feasible that microenvironment cells (such as MSCs) could be activated during chemotherapy treatment (platinum analog) and secrete factors that protect tumor cells against a range of chemotherapeutics. The future goal will be to characterize phenotypic differences between cancer-activated stromal cells and their physiological counterparts in order to define therapies which will specifically target activated stromal cells. Studying the impact of defined genetic alterations on therapeutic response in native tumor microenvironments will be critical for effective drug development, personalized cancer regimens, and the rational design of combination therapies.

Although the manner in which stroma cells activate cancer cells to promote cancer progression and chemoresistance are described, little is known about the mechanisms by which stromal cells are first activated to induce these effects. There is a cross-talk between cancer cells and stromal cells but factors produced by the stromal cells and the cancer cells vary depending on the context and on the microenvironment compartment. As an example, Roodhardt *et al.* described an induction of cancer cell chemoresistance by the MSCs through the release of a fatty acid while Castells *et al.* propose that chemoresistance could be acquired by cancer cells through release of IL-6 and IL-8 by macrophages which were activated by an unidentified secreted factor produced by MSCs in human ovarian cancers [4]. Therefore, given the mounting evidence supporting the diversity of mechanisms by which microenvironment cells enhance tumor chemoresistance, inhibiting the factors released by stroma cells in a clinical setting will be challenging.

Finally, the implication of fatty acids in cell signaling and cross-talk between cancer cells and their microenvironment and thus their importance in chemotherapy resistance has been demonstrated in several recent studies. Their potential as key modulators of treatment response warrants further fundamental and translational investigation, which could result in them becoming a promising target for therapy.

The mechanisms behind chemosensitivity and chemoresistance are being unraveled however managing patients who have primary chemorefractory disease or relapse after the most aggressive salvage therapies remains a challenge. Conventional anticancer drug screening is typically performed in the absence of accessory cells of the tumor microenvironment, which can profoundly alter antitumor drug activity. Preclinical drug testing in the absence of relevant tumor microenvironment interactions may overestimate potential clinical activity, thus explaining at least in part the gap between preclinical and clinical efficacy in cancers [130,131].

The screening of candidate anticancer agents to enrich preclinical pipelines with potential therapeutics able to overcome stroma-mediated drug resistance and act in a synthetically lethal manner must be performed in the context of tumor-stroma interactions.

Acknowledgments

The manuscript was revised by AngloScribe, Nîmes for English language editing. We are grateful to Melanie White-Koning for the careful reading of the manuscript.

References

1. Meads, M.B.; Gatenby, R.A.; Dalton, W.S. Environment-mediated drug resistance: A major contributor to minimal residual disease. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 665–674.
2. Basak, G.W.; Srivastava, A.S.; Malhotra, R.; Carter, E. Multiple myeloma bone marrow niche. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *3*, 345–346.
3. Roodhart, J.M.; Daenen, L.G.; Stigter, E.C.; Prius, H.J.; Gerrits, J.; Houthuijzen, J.M.; Gerritsen, M.G.; Schipper, H.S.; Backer, M.J.; van Amersfoort, M. *et al.* Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* **2011**, *3*, 370–383.
4. Castells, M.; Thibault, B.; Mery, E.; Golzio, M.; Pasquer, M.; Hennebelle, I.; Bourin, P.; Mirshahi, M.; Delord, J.P.; Querleu, D. *et al.* Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* **2012**, in press.
5. Lis, R.; Touboul, C.; Mirshahi, P.; Ali, F.; Mathew, S.; Nolan, D.J.; Maleki, M.; Abdalla, S.A.; Raymond, C.M.; Querleu, D. *et al.* Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *Int. J. Cancer* **2011**, *3*, 715–725.
6. Scherzed, A.; Hackenberg, S.; Froelich, K.; Kessler, M.; Koehler, C.; Hagen, R.; Radloff, A.; Friehs, G.; Kleinsasser, N. BMSC enhance the survival of paclitaxel treated squamous cell carcinoma cells in vitro. *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *3*, 349–357.
7. Rafii, A.; Mirshahi, P.; Poupot, M.; Famsat, A.M.; Simon, A.; Ducros, E.; Mery, E.; Couderc, B.; Lis, R.; Capdet, J. *et al.* Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One* **2008**, *12*, e3894.
8. Rohwer, N.; Cramer, T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist. Updat.* **2011**, *3*, 191–201.
9. Tredan, O.; Galvani, C.M.; Patel, K.; Tannock, I.F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *19*, 1441–1454.
10. Teng, I.W.; Hou, P.C.; Lee, K.D.; Chu, P.Y.; Yeh, K.T.; Jm, V.X.; Tseng, M.J.; Tsal, S.J.; Chang, Y.S.; Wu, C.S. *et al.* Targeted methylation of two tumor suppressor genes is sufficient to transform mesenchymal stem cells into cancer stem/initiating cells. *Cancer Res.* **2011**, *13*, 4653–4663.
11. Correia, A.L.; Bissell, M.J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist. Updat.* **2012**, *15*, 39–49.
12. Sutherland, R.M.; Eddy, H.A.; Bareham, B.; Reich, K.; Vanantwerp, D. Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1979**, *8*, 1225–1230.

13. Stoeckl, A.; Gast, D.; Sander, M.P.; Issa, Y.; Gurwein, P.; Altevogt, P. LI-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* **2007**, *7*, 461–469.
14. Schafer, H.; Dieckmann, C.; Komijenko, O.; Moldenhauer, G.; Kiefel, H.; Salnikow, A.; Kruger, A.; Altevogt, P.; Sebens, S. Combined treatment of LICAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma. *Cancer Lett.* **2012**, *1*, 66–82.
15. Eberle, K.E.; Sansing, H.A.; Szamszlo, P.; Resto, V.A.; Berrier, A.L. Carcinoma matrix controls resistance to cisplatin through talin regulation of NF- κ B. *PLoS One* **2011**, *6*, e21496.
16. Hazlehurst, L.A.; Enkemann, S.A.; Beam, C.A.; Argilagos, R.F.; Painter, J.; Shain, K.H.; Saporta, S.; Boulware, D.; Moscinski, L.; Alsina, M.; et al. Genotypic and phenotypic comparisons of de novo and acquired melphalan resistance in an isogenic multiple myeloma cell line model. *Cancer Res.* **2003**, *22*, 7900–7906.
17. Holmgren, L.; O'Reilly, M.S.; Folkman, J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* **1995**, *2*, 149–153.
18. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **2011**, *7347*, 298–307.
19. Ferrara, N.; Gerber, H.P.; Lecouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **2003**, *6*, 669–676.
20. Hicklin, D.J.; Ellis, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *5*, 1011–1027.
21. Schwartz, J.D.; Rowinsky, E.K.; Youssoufian, H.; Pytowski, B.; Wu, Y. Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: Concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor receptor-1). *Cancer* **2010**, *4*, S1027–S1032.
22. Dias, S.; Hattori, K.; Zhu, Z.; Heissig, B.; Choy, M.; Lane, W.; Wu, Y.; Chadburn, A.; Hyjek, E.; Gill, M.; et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J. Clin. Invest.* **2000**, *4*, 511–521.
23. Hamney, J.H.; Boucher-Hayes, D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumor cells: Implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays* **2002**, *3*, 280–283.
24. Zhang, L.; Hamay, J.A.; Liu, J.; Das, P.; Zhu, M.; Nguyen, T.; Hicklin, D.J.; Yu, D.; Pollock, R.E.; Lev, D. Vascular endothelial growth factor overexpression by soft tissue sarcoma cells: Implications for tumor growth, metastasis, and chemoresistance. *Cancer Res.* **2006**, *77*, 8770–8778.
25. Yang, F.; Tang, X.; Riquelme, E.; Behrens, C.; Nilsson, M.B.; Giri, U.; Varela-Garcia, M.; Byers, L.A.; Lin, H.Y.; Wang, J.; et al. Increased VEGFR-2 gene copy is associated with chemoresistance and shorter survival in patients with non-small-cell lung carcinoma who receive adjuvant chemotherapy. *Cancer Res.* **2011**, *16*, 5512–5521.
26. Tran, J.; Master, Z.; Yu, J.L.; Rak, J.; Dumont, D.J.; Kerbel, R.S. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *7*, 4349–4354.

27. Fukuda, S.; Pelus, L.M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1087–1098.
28. Nor, J.E.; Christensen, J.; Mooney, D.J.; Polverini, P.J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am. J. Pathol.* **1999**, *2*, 375–384.
29. Samuel, S.; Fan, F.; Dang, L.H.; Xia, L.; Gaur, P.; Ellis, L.M. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. *Oncogene* **2011**, *10*, 1205–1212.
30. Dias, S.; Shmelkov, S.V.; Lau, G.; Rafii, S. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood* **2002**, *7*, 2532–2540.
31. Fujio, Y.; Walsh, K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **1999**, *23*, 16349–16354.
32. Wang, L.; Chen, L.; Benincosa, J.; Formey, J.; Gibson, L.F. VEGF-induced phosphorylation of Bcl-2 influences B lineage leukemic cell response to apoptotic stimuli. *Leukemia* **2005**, *5*, 344–353.
33. Pidgeon, G.P.; Barr, M.P.; Harney, J.H.; Foley, D.A.; Bouchier-Hayes, D.J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br. J. Cancer* **2001**, *2*, 273–278.
34. Lee, Y.K.; Shanfelt, T.D.; Bone, N.D.; Strega, A.K.; Jelinek, D.F.; Kay, N.E. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: Implication for apoptosis resistance. *Leukemia* **2005**, *4*, 513–523.
35. Gerhardt, H.; Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **2003**, *1*, 15–23.
36. Franco, M.; Roswall, P.; Cortez, E.; Hamahan, D.; Pietras, K. Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood* **2011**, *10*, 2906–2917.
37. Ferrati, G.; Pinucci, G.; Seghezzi, G.; Hyman, K.; Galloway, A.C.; Mignatti, P. VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *46*, 17260–17265.
38. Michaelis, M.; Klassert, D.; Barth, S.; Sulhan, T.; Breitling, R.; Mayer, B.; Hirsch, N.; Doerr, H.W.; Cuat, J.; Cuat, J., Jr. Chemoresistance acquisition induces a global shift of expression of angiogenesis-associated genes and increased pro-angiogenic activity in neuroblastoma cells. *Mol. Cancer* **2009**, doi:10.1186/1476-4598-8-80.
39. Biroccio, A.; Candiloro, A.; Mottolese, M.; Saporita, O.; Albini, A.; Zupi, G.; del Bufalo, D. Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and in vivo angiogenesis in a breast carcinoma line. *FASEB J.* **2000**, *5*, 652–660.
40. Anai, S.; Goodison, S.; Shiverick, K.; Hirao, Y.; Brown, B.D.; Rosser, C.J. Knock-down of Bcl-2 by antisense oligodeoxynucleotides induces radiosensitization and inhibition of angiogenesis in human PC-3 prostate tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *1*, 101–111.

41. Tu, S.P.; Cui, J.T.; Liston, P.; Huajiang, X.; Xu, R.; Liu, M.C.; Zhu, Y.B.; Zou, B.; Ng, S.S.; Jung, S.H.; *et al.* Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. *Gastroenterology* **2005**, *2*, 361–375.
42. Fuks, Z.; Persaud, R.S.; Alfieri, A.; McLoughlin, M.; Ehlester, D.; Schwartz, J.L.; Seddon, A.P.; Cordon-Cardo, C.; Haimovitz-Friedman, A. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **1994**, *10*, 2582–2590.
43. Karsan, A.; Yee, E.; Peirier, G.G.; Zhou, P.; Craig, R.; Harlan, J.M. Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by Bcl-2-dependent and independent mechanisms. *Am. J. Pathol.* **1997**, *6*, 1775–1784.
44. O'Connor, D.S.; Schechner, J.S.; Adida, C.; Mesri, M.; Rothmell, A.L.; Li, F.; Nath, A.K.; Pober, J.S.; Altieri, D.C. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **2000**, *2*, 393–398.
45. Cappelletti, P.; Lampugnani, M.G.; Moons, L.; Breviario, F.; Campornolle, V.; Bono, F.; Balconi, G.; Spagnuolo, R.; Oosthuysen, B.; Dewerchin, M.; *et al.* Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **1999**, *2*, 147–157.
46. Clavakis, E.; Dimmeler, S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **2002**, *6*, 887–893.
47. Brown, C.K.; Khodarev, N.N.; Yu, J.; Moo-Young, T.; Labay, E.; Darga, T.E.; Posner, M.C.; Weichselbaum, R.R.; Mauceri, H.J. Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells. *FEBS Lett.* **2004**, *1–3*, 167–170.
48. Fossato, V.; Buttiglieri, S.; Deregibus, M.C.; Puntorieri, V.; Bussolati, B.; Camussi, G. Expression of Pax2 in human renal tumor-derived endothelial cells sustains apoptosis resistance and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **2006**, *2*, 706–713.
49. Virrey, J.J.; Guan, S.; Li, W.; Schonthal, A.H.; Chen, T.C.; Hofman, F.M. Increased survivin expression confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **2008**, *2*, 575–585.
50. Meng, F.; Henson, R.; Patel, T. Chemotherapeutic stress selectively activates NF-kappa B-dependent AKT and VEGF expression in liver cancer-derived endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2007**, *2*, C749–C760.
51. Kim, K.J.; Li, B.; Wimer, J.; Armanni, M.; Gillett, N.; Phillips, H.S.; Ferrara, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **1993**, *6423*, 841–844.
52. Lee, C.G.; Heijn, M.; di Tomaso, E.; Griffon-Etienne, G.; Ancukiewicz, M.; Koike, C.; Park, K.R.; Ferrara, N.; Jain, R.K.; Suit, H.D.; Boucher, Y. Anti-Vascular-endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res.* **2000**, *19*, 5565–5570.
53. Tong, R.T.; Boucher, Y.; Kozin, S.V.; Winkler, F.; Hicklin, D.J.; Jain, R.K. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* **2004**, *11*, 3731–3736.

54. O'Reilly, M.S.; Holmgren, L.; Chen, C.; Folkman, J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* **1996**, *6*, 689–692.
55. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *6*, 417–427.
56. Willett, C.G.; Boucher, Y.; di Tomaso, E.; Duda, D.G.; Munn, L.L.; Tong, R.T.; Chung, D.C.; Sahani, D.V.; Kalva, S.P.; Kozim, S.V.; et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat. Med.* **2004**, *2*, 145–147.
57. Xu, T.; Chen, J.; Lu, Y.; Wolff, J.E. Effects of bevacizumab plus irinotecan on response and survival in patients with recurrent malignant glioma: A systematic review and survival-gain analysis. *BMC Cancer* **2010**, doi:10.1186/1471-2407-10-252.
58. Mayer, R.J. Two steps forward in the treatment of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *23*, 2406–2408.
59. Jain, R.K. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **2005**, *306*, 58–62.
60. De Bock, K.; Mazzone, M.; Carmeliet, P. Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: Risky liaisons, or not? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *7*, 393–404.
61. Brahimi-Horn, M.C.; Bellot, G.; Pouyssegur, J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2011**, *1*, 67–72.
62. Bottaro, D.P.; Liotta, L.A. Cancer: Out of air is not out of action. *Nature* **2003**, *6940*, 593–595.
63. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *10*, 721–732.
64. Liu, Y.; Cox, S.R.; Morita, T.; Kourembanas, S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* **1995**, *3*, 638–643.
65. Eltzschig, H.K.; Carmeliet, P. Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *7*, 656–665.
66. Blagosklonny, M.V. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell* **2004**, *1*, 13–17.
67. Ebos, J.M.; Lee, C.R.; Cruz-Munoz, W.; Bjarnason, G.A.; Christensen, J.G.; Kerbel, R.S. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **2009**, *3*, 232–239.
68. Paez-Ribes, M.; Allen, E.; Hudock, J.; Takeda, T.; Okuyama, H.; Vinals, F.; Inoue, M.; Bergers, G.; Hanahan, D.; Casanovas, O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* **2009**, *3*, 220–231.
69. Miles, D.W.; Chan, A.; Dirix, L.Y.; Cortes, J.; Pivot, X.; Tomczak, P.; Delozier, T.; Solin, J.H.; Provencher, L.; Puglisi, F.; et al. Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *20*, 3239–3247.
70. Padera, T.P.; Kuo, A.H.; Hoshida, T.; Liao, S.; Lobo, J.; Kozak, K.R.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Differential response of primary tumor versus lymphatic metastasis to VEGFR-2 and VEGFR-3 kinase inhibitors cediranib and vandetanib. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *8*, 2272–2279.
71. Thomas, X.; Anglaret, B.; Magaud, J.P.; Epstein, J.; Archimbaud, E. Interdependence between cytokines and cell adhesion molecules to induce interleukin-6 production by stromal cells in myeloma. *Leuk. Lymphoma* **1998**, *32*, 107–119.

72. Shain, K.H.; Landowski, T.H.; Dalton, W.S. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: A possible mechanism for de novo drug resistance. *Curr. Opin. Oncol.* **2000**, *6*, 557–563.
73. Xing, F.; Saidou, J.; Watabe, K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front. Biosci.* **2010**, *15*, 166–179.
74. Sirica, A.E. The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *1*, 44–54.
75. Fingas, C.D.; Bronk, S.F.; Wernberg, N.W.; Mott, J.L.; Gucciardi, M.E.; Cazanave, S.C.; Mertens, J.C.; Sirica, A.E.; Gores, G.J. Myfibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* **2011**, *6*, 2076–2088.
76. Ruan, K.; Bao, S.; Ouyang, G. The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol. Life Sci* **2009**, *14*, 2219–2230.
77. Park, J.E.; Lenter, M.C.; Zimmermann, R.N.; Garin-Chesa, P.; Old, L.J.; Rettig, W.J. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **1999**, *51*, 36505–36512.
78. Heldin, C.H.; Rubin, K.; Pietras, K.; Ostman, A. High interstitial fluid pressure—an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *10*, 806–813.
79. Serebriiskii, I.; Castello-Cros, R.; Lamb, A.; Golemis, E.A.; Cukierman, E. Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growth and drug-responsiveness of human cancer cells. *Matrix. Biol.* **2008**, *6*, 573–585.
80. Muzikoster, S.S.; Werbng, V.; Koch, D.; Sipos, B.; Ammerpohl, O.; Kalthoff, H.; Tsoo, M.S.; Folsch, U.R.; Schafer, H. Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma—epigenetic downregulation of caspases. *Int. J. Cancer* **2008**, *8*, 1751–1760.
81. Reardon, D.A.; Akabani, G.; Coleman, R.E.; Friedman, A.H.; Friedman, H.S.; Herndon, J.E.; McLendon, R.E.; Pegram, C.N.; Provenzale, J.M.; Quinn, J.A., *et al.* Salvage radiomimic therapy with murine iodine-131-labeled anti-tenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: Phase II study results. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *1*, 115–122.
82. Loeffler, M.; Kruger, J.A.; Niethammer, A.G.; Reitsfeld, R.A. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J. Clin. Invest* **2006**, *7*, 1955–1962.
83. Runge, J.; Strassburg, S.; Neumann, K.; Endres, M.; Notter, M.; Burmester, G.R.; Kaps, C.; Sittinger, M. Towards in situ tissue repair: Human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J. Cell Biochem.* **2007**, *1*, 135–146.
84. Pasquet, M.; Golzio, M.; Mery, E.; Rafii, A.; Benabbou, N.; Mirshahi, P.; Hennebelle, I.; Bourin, P.; Allal, B.; Teissie, J., *et al.* Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int. J. Cancer* **2010**, *9*, 2090–2101.
85. Rhodes, L.V.; Muir, S.E.; Elliott, S.; Guillot, L.M.; Antoon, J.W.; Penforis, P.; Tilghman, S.L.; Salvo, V.A.; Fonseca, J.P.; Lacey, M.R., *et al.* Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res. Treat.* **2010**, *2*, 293–300.

86. Karnoub, A.E.; Dash, A.B.; Vo, A.P.; Sullivan, A.; Brooks, M.W.; Bell, G.W.; Richardson, A.L.; Polyak, K.; Tubo, R.; Weinberg, R.A. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **2007**, *448*, 557–563.
87. Xu, Y.; Tabe, Y.; Jin, L.; Watt, J.; McQueen, T.; Ohsaka, A.; Andreeff, M.; Konopleva, M. TGF-beta receptor kinase inhibitor LY2109761 reverses the anti-apoptotic effects of TGF-beta1 in myelo-monocytic leukaemic cells co-cultured with stromal cells. *Br. J. Haematol.* **2008**, *122*, 192–201.
88. Hao, M.; Zhang, L.; An, G.; Meng, H.; Han, Y.; Xie, Z.; Xu, Y.; Li, C.; Yu, Z.; Chang, H.; Qiu, L. Bone marrow stromal cells protect myeloma cells from bortezomib induced apoptosis by suppressing microRNA-15a expression. *Leuk. Lymphoma* **2011**, *52*, 1787–1794.
89. Jin, L.; Tabe, Y.; Konoplev, S.; Xu, Y.; Leysath, C.E.; Lu, H.; Kimura, S.; Ohsaka, A.; Rios, M.B.; Calvert, L., et al. CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 48–58.
90. Benito, J.; Shi, Y.; Szymanska, B.; Carol, H.; Boehm, I.; Lu, H.; Konoplev, S.; Fung, W.; Zweidler-McKay, P.A.; Campana, D., et al. Pronounced hypoxia in models of murine and human leukemia: High efficacy of hypoxia-activated prodrug PR-104. *PLoS One* **2011**, *6*, e23108.
91. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *146*, 646–674.
92. Igney, F.H.; Krammer, P.H. Immune escape of tumors: Apoptosis resistance and tumor counterattack. *J. Leukoc. Biol.* **2002**, *72*, 907–920.
93. Shojaei, F.; Wu, X.; Malik, A.K.; Zhong, C.; Baldwin, M.E.; Schanz, S.; Fuh, G.; Gerber, H.P.; Ferrara, N. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 911–920.
94. Fischer, C.; Jonckx, B.; Mazzone, M.; Zecchigna, S.; Loges, S.; Pattarini, L.; Chorianopoulos, E.; Liesenborghs, L.; Koch, M.; de Mol, M., et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* **2007**, *130*, 463–475.
95. Biswas, S.K.; Sica, A.; Lewis, C.E. Plasticity of macrophage function during tumor progression: Regulation by distinct molecular mechanisms. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 2011–2017.
96. Denardo, D.G.; Brennan, D.J.; Rexhepaj, E.; Ruffell, B.; Shiao, S.L.; Madden, S.F.; Gallagher, W.M.; Wadhvani, N.; Keil, S.D.; Jha, S.A., et al. Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy. *Cancer Discov.* **2011**. doi:10.1158/2159-8274.
97. Shree, T.; Olson, O.C.; Elie, B.T.; Kester, J.C.; Garfall, A.L.; Simpson, K.; Bell-McGinn, K.M.; Zabor, E.C.; Brogi, E.; Joyce, J.A. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2465–2479.
98. Angst, E.; Reber, H.A.; Hines, O.J.; Eibl, G. Mononuclear cell-derived interleukin-1 beta confers chemoresistance in pancreatic cancer cells by upregulation of cyclooxygenase-2. *Surgery* **2008**, *144*, 57–65.
99. Halama, N.; Michel, S.; Kloor, M.; Zoernig, I.; Pommerenke, T.; von Knebel Doeberitz, M.; Schirmacher, P.; Weitz, J.; Grabe, N.; Jager, D. The localization and density of immune cells in primary tumors of human metastatic colorectal cancer shows an association with response to chemotherapy. *Cancer Immun.* **2009**, *9*, 1.

100. Halama, N.; Michel, S.; Kloor, M.; Zoernig, I.; Benner, A.; Spille, A.; Pommerencke, T.; von Knebel, D.M.; Folprecht, G.; Luber, B.; *et al.* Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 5670–5677.
101. Denkert, C.; Loibl, S.; Noske, A.; Roller, M.; Müller, B.M.; Komer, M.; Budezies, J.; Darb-Esfahani, S.; Kronenwett, R.; Hamusch, C.; *et al.* Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 105–113.
102. Van der Mast, R.G.; Currie, A.J.; Cleaver, A.L.; Salmon, J.; Nowak, A.K.; Mahendran, S.; Larra, I.; Prosser, A.; Robinson, B.W.; Smyth, M.J.; *et al.* Cyclophosphamide chemotherapy sensitizes tumor cells to TRAIL-dependent CD8 T cell-mediated immune attack resulting in suppression of tumor growth. *PLoS One* **2009**, *4*, e6982.
103. Ramakrishnan, R.; Assudani, D.; Nagaraj, S.; Hunter, T.; Cho, H.I.; Antonia, S.; Altıok, S.; Celis, E.; Gabrilovich, D.I. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 1111–1124.
104. Mattarollo, S.R.; Loi, S.; Duret, H.; Ma, Y.; Zitvogel, L.; Smyth, M.J. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 4809–4820.
105. Ma, Y.; Aymeric, L.; Locher, C.; Mattarollo, S.R.; Delahaye, N.F.; Pereira, P.; Boucontet, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Casares, N.; *et al.* Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J. Exp. Med.* **2011**, *203*, 491–503.
106. Liu, H.; Zhang, T.; Ye, J.; Li, H.; Huang, J.; Li, X.; Wu, B.; Huang, X.; Hou, J. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**. doi:10.1007/s00262-012-1231-7.
107. Gobert, M.; Treilleux, L.; Bendriss-Vermeire, N.; Bachelot, T.; Goddard-Leon, S.; Arfi, V.; Biota, C.; Doffin, A.C.; Durand, I.; Olive, D.; *et al.* Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 2000–2009.
108. Bates, G.J.; Fox, S.B.; Han, C.; Leek, R.D.; Garcia, J.F.; Harris, A.L.; Banham, A.H. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 5373–5380.
109. Tosolini, M.; Kirilovsky, A.; Mlecnik, B.; Fridriksen, T.; Mangu, S.; Bindea, G.; Berger, A.; Bruneval, P.; Fridman, W.H.; Pages, F.; *et al.* Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1263–1271.
110. Denardo, D.G.; Barreto, J.B.; Andreu, P.; Vasquez, L.; Tawfik, D.; Kohlsaat, N.; Coussens, L.M. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 91–102.
111. Stassi, G.; Todaro, M.; Zerilli, M.; Ricci-Vitiani, L.; di Liberto, D.; Patti, M.; Fiorena, A.; di Gaudio, F.; di Gesu, G.; de Maria, R. Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6784–6790.

112. Zou, W.; Restifo, N.P. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *4*, 248–256.
113. Ding, Z.C.; Zhou, G. Cytotoxic chemotherapy and CD4⁺ effector T cells: An emerging alliance for durable antitumor effects. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, doi:10.1155/2012/890178.
114. Pittoni, P.; Piconese, S.; Tripodo, C.; Colombo, M.P. Tumor-intrinsic and -extrinsic roles of c-Kit: Mast cells as the primary off-target of tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* **2011**, *7*, 757–769.
115. Johansson, A.; Rudolfsson, S.; Hammarsten, P.; Halim, S.; Pietras, K.; Jones, J.; Stattin, P.; Egevad, L.; Graufors, T.; Wikstrom, P.; *et al.* Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *Am. J. Pathol.* **2010**, *2*, 1031–1041.
116. Pittoni, P.; Colombo, M.P. The dark side of mast cell-targeted therapy in prostate cancer. *Cancer Res.* **2012**, *4*, 831–835.
117. Iyengar, P.; Combs, T.P.; Shah, S.J.; Gouon-Evans, V.; Pollard, J.W.; Albanese, C.; Flanagan, L.; Tenniswood, M.P.; Guha, C.; Lisanti, M.P.; *et al.* Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* **2003**, *21*, 6408–6423.
118. Behan, J.W.; Yun, J.P.; Proektor, M.P.; Elisanipour, E.A.; Arutyunyan, A.; Moses, A.S.; Avramis, V.I.; Louie, S.G.; Butturini, A.; Heisterkamp, N.; *et al.* Adipocytes impair leukemia treatment in mice. *Cancer Res.* **2009**, *19*, 7867–7874.
119. Bochet, L.; Meulle, A.; Imbert, S.; Salles, B.; Valet, P.; Muller, C. Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *1*, 102–106.
120. Ma, J.; Dong, C.; Ji, C. MicroRNA and drug resistance. *Cancer Gene Ther.* **2010**, *8*, 523–531.
121. Sorrentino, A.; Liu, C.G.; Addario, A.; Peschle, C.; Scambia, G.; Ferlini, C. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **2008**, *3*, 478–486.
122. Wang, H.; Tan, G.; Dong, L.; Cheng, L.; Li, K.; Wang, Z.; Luo, H. Circulating miR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One* **2012**, *4*, e34210.
123. Zhao, R.; Wu, J.; Jia, W.; Gong, C.; Yu, F.; Ren, Z.; Chen, K.; He, J.; Su, F. Plasma miR-221 as a predictive biomarker for chemoresistance in breast cancer patients who previously received neoadjuvant chemotherapy. *Onkologie* **2011**, *12*, 675–680.
124. Rao, E.; Jiang, C.; Ji, M.; Huang, X.; Iqbal, J.; Lenz, G.; Wright, G.; Staudt, L.M.; Zhao, Y.; McKeithan, T.W.; *et al.* The miRNA-17 approximately 92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. *Leukemia* **2012**, *5*, 1064–1072.
125. Hamano, R.; Miyata, H.; Yamasaki, M.; Kurokawa, Y.; Hara, J.; Moon, J.H.; Nakajima, K.; Takiguchi, S.; Fujiwara, Y.; Mori, M.; *et al.* Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *9*, 3029–3038.
126. Kong, W.; He, L.; Coppola, M.; Guo, J.; Esposito, N.N.; Coppola, D.; Cheng, J.Q. MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **2010**, *23*, 17869–17879.

127. Bourguignon, L.Y.; Earle, C.; Wong, G.; Spevak, C.C.; Krueger, K. Stem cell marker (Nanog) and Stat-3 signaling promote MicroRNA-21 expression and chemoresistance in hyaluronan/CD44-activated head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oncogene* **2012**, *2*, 149–160.
128. Loscalzo, J. The cellular response to hypoxia: Tuning the system with microRNAs. *J. Clin. Invest.* **2010**, *11*, 3815–3817.
129. Hebert, C.; Norris, K.; Schepet, M.A.; Nikitakis, N.; Sauk, J.J. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer* **2007**, *6*, doi:10.1186/1476-4598-6-5.
130. Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *3*, 309–322.
131. Margolin, D.A.; Silinsky, J.; Grimes, C.; Spencer, N.; Aycock, M.; Green, H.; Cordova, J.; Davis, N.K.; Discoll, T.; Li, L. Lymph node stromal cells enhance drug-resistant colon cancer cell tumor formation through SDF-1alpha/CXCR4 paracrine signaling. *Neoplasia* **2011**, *9*, 874–886.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

3. Revue 2 : Ovarian cancer microenvironment : implications on cancer dissemination and chemoresistance acquisition

Ovarian cancer microenvironment: implications on cancer dissemination and chemoresistance acquisition

Benoît Thibault, Magali Castells, Jean-Pierre Delord, Bettina Couderc*

EA4553, Institut Claudius Regaud, F-31062 Toulouse, France and University of Toulouse III, F-31052 Toulouse, France.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: couderc.bettina@claudiusregaud.fr ; Tel.: +33-5-61-42-46-44; Fax: +33-5-61-42-46-31.

Soon submitted in Gynecologic Oncology

1. Introduction

Ovarian adenocarcinoma represent the sixth most common cancer in term of mortality in European and north American women, and the leading cause of death from gynaecological malignancies. This is due to 1) the late detection of the cancer development (75% of women present with advance disease at diagnosis) which means that when the disease is detected, ovarian cancer cells are already disseminated into the whole peritoneum 2) the fact that even with an efficient surgery and chemotherapy, which associate platinum salts and taxanes, ovarian cancer cells persist in the peritoneum and can acquire chemoresistance properties which could be responsible for a recurrence after the treatment (up to 18 months after) (1-3).

Beside the other human tumor malignancies, ovarian cancers present some others particularities. Between others a) the origin of the primary tumors can be discuss. Some clinicians showed that cancer cells called ovarian adenocarcinoma cells can be originated from the ovarian epithelium, but also from the Fallopian tubes, the endometrial or the peritoneum. b) the fact that ovarian adenocarcinoma cells can disseminate by exfoliation from the ovaries (or the tubes) and that cancer cells do not migrate hazardously through the whole peritoneum. c) the fact that secondary tumors (disseminated tumors, chemoresistant tumors, etc...) do not present additional genetic mutations than the primary tumors (4).

An increasing amount of studies show that these particularities could be attributed to intrinsic properties of tumors but also to their microenvironment (5-7). Indeed, ovarian tumors comprise not only malignant cells, but also many other non-malignant cell types (adipocytes, fibroblasts, endothelial

cells, migratory haematopoietic cells, stem cells, etc...). This produces a unique stroma that can modify the neoplastic properties of tumor cells.

One of the characteristics of ovarian adenocarcinoma cells is to disseminate in peritoneal sites such as the hepatic hile, the omentum, the spleen, the uterus, etc.... Stromal cells, such as mesothelial cells or mesenchymal stem cells, can regulate the extracellular matrix composition and produce molecules which could able to attract ovarian carcinoma cells to these specific sites (8-10).

Ovarian tumors are most of the time highly vascularized, which is correlated with a poor prognosis (11). The importance of the angiogenic process in this disease could be due the fact that endothelial cells could be activated by cancer cells but also stromal cells, which contribute to the tumor development (6, 12, 13).

Concerning the chemoresistance, most of the time, ovarian cancer cells are sensitive to the chemotherapy treatment when the treatment is initiated. They can become chemoresistant during the treatment or at various time following it (up to several months after the primary treatment) (3). There has been an almost exclusive experimental focus on the malignant chemoresistant cells that make up tumors. This is probably because of the success of studies that defined the requirement for several mutational events in epithelial cells for the formation of chemoresistant tumors. Nevertheless recent studies performed on paired analysis of primary tumors and their metastatic lesions in ovarian cancer revealed that the metastatic lesions remain closer to normal tissue in their gene expression patterns than the primary tumor. There are genetic differences between primary (mostly chemosensitive) tumours cells and metastatic lesions. These genetic differences could not explain the prognosis for the tumor development as there was a significant level of good prognosis genes being more highly expressed and poor prognosis genes being lower expressed in the peritoneal metastasis versus matched primary tumors (14). The outcome of oncogenic events in epithelial cells can be so significantly modified by the nature of the surrounding non-malignant cells Stromal cells could be implicated in the acquisition of a chemoresistant phenotype by the secretion of cytokines allowing an activation of anti-apoptotic pathways and the exchange of drug efflux proteins allowing a better drug metabolism (5).

This review will focus on the microenvironment involvement in all the processes of ovarian cancer progression: initiation, development and relapse. The goal is to list all the cells that could be implicated far or less with all the processes and the associated secreted molecules. Indeed, it is becoming apparent that the microenvironment has an important role in allowing the tumor to express its full neoplastic phenotype and that non-malignant cells can be used as therapeutics targets.

2. Secreted Molecules

At early stages of the disease (stage I and II), ovarian cancer is restricted to the ovary. At higher stages (III and IV), the ovarian cancer disseminates into the peritoneal cavity. This phenomenon is often responsible for an inflammatory process that induces the accumulation of a large quantity of liquid called “ascite”. The ascite contains, between others, molecules secreted by ovarian cancer cells and the peritoneal microenvironment that can influence the proliferation, the angiogenesis and the dissemination or metastasis potential of cancer cells (15, 16). The following part constitutes a non exhaustive description of the molecules, proteins or bioactive lipids, found in ovarian ascites that could be involved in tumor progression. The activated metabolic pathways of the cells could also favour the implantation of tumor cells as well as their proliferation and chemoresistance acquisition. The studies of the secreted factors that could be found in the ascitic fluid could allow the identification of the ways cells communicate together. Those factors could be potential therapeutic targets as well as they could help indirectly to the identification of the cells involved in oncogenesis and chemoresistance.

2.1. Bioactive lipids

2.1.1. Lysophosphatidic acid (LPA)

Among these molecules, lysophosphatidic acid (LPA), a small bioactive phospholipid, is present in ascitic fluid and sera of patients and its presence is correlated with poor prognosis of the disease (16, 17). This molecule is produced by multiple cells as mesothelial cells (which form a monolayer lining the peritoneal cavity), macrophages or ovarian cancer cells. It is involved in several steps of tumor progression: proliferation, invasion and chemoresistance.

LPA enhances the proliferation of ovarian cancer cells (16, 18) and allow a long-term proliferation of these cells. Indeed, this phospholipid up-regulates Telomerase expression and activity in ovarian cancer cells *via* Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) and Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase (PI3K) pathways (19). The telomerase prevents replicative senescence, allows long-term proliferation and increase tumor progression.

LPA is also able to promote ovarian cancer cell invasion in acting indirectly on cytokine production or in directly modifying the matrix metalloprotease (MMP) secretion and activity. Indeed, LPA enhances the expression of interleukin-8 (IL-8) (20-23) and other inflammatory cytokines like IL-6 (22, 23) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (24). LPA stimulates proMMP-2 activation (25), increasing the level of active MMP-9 in some ovarian cell lines (26) and downregulating tissue inhibitor of metalloproteases (TIMPs) (27). These effects on extracellular matrix regulators lead to an increased invasion of ovarian cancer cells. Moreover, in an immunocompetent mouse model of ovarian cancer, LPA stimulates proliferation, migration, invasion and the metastasis potential (28). Finally,

LPA, *via* its receptor LPA₂, is a major stimulus of urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression (29). This protease converts plasminogen to plasmin, which degrades some components of the extracellular matrix (ECM) and activates members of the metalloproteinase family.

Said *et al.* demonstrated the implication of LPA in NF- κ B activation, prostaglandin E₂ (PGE₂) and isoprostane-8 (an indicator of the production of oxygen reactive species) production in ovarian cancer cells (26). LPA also enhances Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1 (OCIAD1) expression and activation (30). OCIAD1 is overexpressed in ovarian metastatic tumors compared to primary tumors. It has been shown that this protein promotes paclitaxel resistance against cell detachment in a LPA-dependant manner (31).

Past studies demonstrated the implication of LPA in protecting ovarian cancer cell line HEY from programmed cell death induced by cisplatin which represents one of the conventional therapies in ovarian cancer treatment (32).

2.1.2. Sphingosine-1-phosphate (S1P)

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive phospholipid implied in inflammation process and tumor progression. Past studies of Hong *et al.* demonstrated the presence of S1P at micrometric concentration in ascitic fluid of patients with ovarian cancer. Hong *et al.* then showed that S1P was responsible for cell death of cells in suspension and cell growth of adherent cells (33). S1P induces the expression of IL-8 which has been previously described as pro-tumoral in ovarian cancer (34). Moreover, S1P is also implied in invasiveness of ovarian cancer cells with a dual effect depending on the biolipid concentration. Indeed, low concentration of S1P (0.5 μ M) is responsible for an invasion inhibition of ovarian cancer cell line Dov13 and a high concentration (20 μ M) induces an invasion enhancement. This antagonism could be explained by a differential representation of S1P receptors depending on the S1P concentration (35, 36). These data have been confirmed on the OVCAR-3 cell line with an additional positive effect on cell migration (37).

2.1.3. Cyclooxygenase (COX) and prostaglandin (PG) axis

Cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1 and COX-2) are responsible for the biosynthesis of prostaglandins (PG) from arachidonic acid. Data obtained from ovarian cancer bearing patients showed a positive correlation between the COX-2 expression and tumor proliferation and angiogenesis parameters (38). The expression of this enzyme is also associated with chemoresistance and a poor prognosis in patients with an ovarian adenocarcinoma (39).

Among the produced metabolites, the PGE₂ is frequently linked to tumoral processes. Indeed, PGE₂ stimulates the proliferation and reduces the apoptosis of some ovarian cancer cell lines in

activating the COX-2 expression (40). Rask *et al.* showed an increased expression of COX-1, COX-2, microsomal prostaglandin E synthase (mPGES-1) and prostaglandin receptor 1 and 2 (EP₁₋₂) in ovarian adenocarcinoma compared to normal ovary, supporting the hypothesis of the PGE₂ roles in tumor progression (41).

Obermajer *et al.* showed that PGE₂ in ascites activate the stromal derived factor-1 α /CXCR4 (SDF-1 α /CXCR4) pathway in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) which migrate into ovarian ascites. Moreover, PGE₂ enhances the COX-2 expression in MDSCs and then creates a positive feedback allowing a constant activity of the SDF-1 α /CXCR4 axis in these cells and their local retention (42).

2.2. Cytokines and growth factors

2.2.1. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 is a pleiotropic cytokine that have both anti and pro-inflammatory roles (43). It is a potent proangiogenic cytokine (44, 45), secreted by ovarian cancer cells, mesothelial cells fibroblasts or macrophages, those expression is correlated with a poor prognosis in ovarian carcinoma (46-48). IL-6 is associated with chemoresistance. Indeed, the expression of this cytokine is elevated in ascites and serum of women with ovarian cancer receiving paclitaxel chemotherapy (49, 50). Moreover, the autocrine IL-6 production leads to the resistance of ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel (51). This cytokine promotes tumor cell proliferation and metastasis of ovarian cancer cells lines and prevent their apoptosis (52, 53). The IL-6 receptor (IL-6R) is overexpressed in ovarian cancer cells compared to normal ovarian cells (52, 54). IL-6R could be a new target for ovarian cancer therapy.

2.2.2. Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 (IL-8), also known as CXCL8, is a proinflammatory chemokine secreted by multiple cell types like monocytes, mesothelial cells, endothelial cells or tumor cells (55). The expression of this cytokine and its receptor by ovarian cancer cells correlates with cell proliferation *in vitro* and *in vivo* (56). In ovarian cancer, high expression of IL-8 is associated with advanced tumor stage, increased ovarian cancer mortality and poor disease-free survival (57-59). The inhibition of the expression of this cytokine in the mouse leads to a diminution of tumor growth by a decreased angiogenesis, and a diminution in metastatic dissemination by a decreased synthesis of metalloproteases MMP-2 and MMP-9 (57). The nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway seems to be responsible for the IL-8 and VEGF expression, which leads to an increased angiogenesis and tumorigenicity (60). In contrast,

Lee *et al.* showed that IL-8 expression in ovarian cancer cells could reduce tumour growth by enhancing the infiltration of neutrophils and macrophages (61).

2.2.3. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF is a proangiogenic cytokine that could be synthesized by a large variety of cells (endothelial cells, macrophages, mesenchymal stem cells, tumor cells, etc...). It enhances the proliferation and migration of endothelial cells and the permeability of existing vessels (62). The expression of VEGF in ovarian cancer is associated with poor prognosis (59). VEGF acts in a synergy way with CXCL-12 (also called SDF-1 α) to induce angiogenesis *in vivo* and *in vitro* (63). In an *in vivo* model of ovarian adenocarcinoma, treatment with A4.6.1, a monoclonal antibody directed against human VEGF, significantly inhibits the growth of subcutaneous SKOV-3 tumours. The inhibition of VEGF completely suppresses ascite formation but partially inhibits tumour growth in intraperitoneal SKOV-3 tumours (64). Moreover, combination therapy with inhibitors of VEGF plus paclitaxel markedly reduces tumour growth and ascite development in ovarian carcinoma compared to a paclitaxel treatment alone (65, 66).

In the past decade, targeting the angiogenesis has become a promising way to treat cancer. The utilization of bevacizumab (Avastin), a monoclonal antibody targeted the VEGF, showed an improvement of survival in numerous types of cancer and has been tested in ovarian cancer. Indeed, some phase III studies showed that this angiogenesis inhibitor, in combination with conventional chemotherapy, induces an increased progression free survival but showed no effect on overall survival. These results have been observed of patients with an advanced ovarian cancer, with a platin chemosensitivity or chemoresistance, in case of primary treatment or recurrence (67).

2.2.4. Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)

Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) is a CXC chemokine which receptor is CXCR4. It was originally known for its function on haematopoietic cells trafficking but has been recently implied in ovarian tumor progression and dissemination (68). Kajiyama *et al.* showed an involvement of the SDF-1 α /CXCR4 axis in the peritoneal metastasis of ovarian cancer (69). Indeed, SDF-1 α promotes the adhesion of epithelial ovarian cells to ECM components and to human peritoneal mesothelial cells.

2.2.5. Epidermal growth factor (EGF)

Epidermal growth factor (EGF) has been implied in tumorigenesis of various cancers, especially in ovarian cancer. Indeed, an elevated level of EGF receptor (EGFR) expression on ovarian cancer cells has been correlated with a poor outcome (70) and EGFR has become a new target for ovarian

cancer therapy (71). However, the inhibition of EGFR by a monoclonal antibody (cetuximab and erlotinib) did not show a survival improvement in patients with an ovarian cancer (72). EGF, as LPA, stimulates chemoresistance of ovarian cancer cell line HEY to cisplatin (32). This growth factor can induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) of ovarian surface epithelium (73, 74).

2.2.6. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a key cytokine in inflammatory processes, originally considered as anti-tumoral. However, studies carried out during the past 25 years highlighted roles of this cytokine in immunosuppression and its capacity to enhance tumor growth (75). In the ovarian cancer, it was notably shown that the expression of TNF- α is correlated with the tumor grade (76). Moreover, the autocrine production of this cytokine by ovarian tumor cells allows an increased synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), SDF-1, IL-6, macrophage inhibitory factor (MIF) and VEGF, enhancing the tumor angiogenesis and the peritoneal dissemination (77). Recent studies also showed that the production of TNF- α potentiates the IL-17 synthesis, thus allowing the recruitment of myeloid cells and the activation of ovarian tumor progression (78). We can conclude that the TNF- α is a key cytokine allowing the formation of a pro-tumoral cytokinic microenvironment.

2.2.7. Transforming growth factor- β (TGF- β)

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a cytokine presenting anti and pro-tumoral effects, especially implied in the EMT (79). This cytokine, whose expression is correlated with an increased angiogenesis in ovarian cancer, promotes the tumor cell invasion *via* the activation of MMPs (80, 81).

The complexity of the cytokinic network (number of molecules and their mutual interactions) present in the ascitic fluid constitutes a very large field to investigate in order to define new ways of diagnosis, prognosis factors combination and new treatments.

Until now there were no global analysis of the ascitic fluid of the patient to identify a correlation between the composition of the ascitic fluid and the prognosis for the patients. There is no equation between the composition of the fluid, the chemoresistance acquisition and the aggressivity of tumors. VEGF and IL-6 have been defined as good targets to stop tumor progression and to prevent relapse. Anti-VEGF treatment is now combined with the basal treatment combining platinum salt and taxanes. This targeted treatment allows the improvement of progression free survival but does not influence the overall survival of the patients (67). A treatment with an IL-6 inhibitor could be considered in association with the VEGF targeted treatment to overcome the resistance.

Lipids are not targeted molecules for treatments until now on ovarian cancer as there is only one trial which shows a correlation between obesity and ovarian cancer as it has been noticed for breast cancers. But their consideration in literature tends to increase.

Molecule	Producing cells	Roles in ovarian cancer
LPA	Mesothelial cells, fibroblasts, adipocytes, ovarian tumor cells	Poor prognosis. Protection from cisplatin. Activation of tumor cell proliferation, telomere expression, tumor growth, cell migration, invasion and metastatic process
S1P	Found in ovarian ascites	Regulation of ovarian tumor cell migration and invasion
COX and PGE₂ axis	Ovarian tumor cells	Poor prognosis. Activation of tumor cell proliferation, inhibition of apoptosis. Activation of SDF-1 secretion. Expression correlated with angiogenesis and chemoresistance.
IL-6	Mesothelial cells, fibroblasts, macrophages, ovarian tumor cells	Poor prognosis. Activation of tumor cell proliferation, migration, invasion. Activation of angiogenesis. Protection against cisplatin and paclitaxel
IL-8	Mesothelial cells, endothelial cells, monocytes, ovarian tumor cells	Poor prognosis. Activation of tumor cell proliferation and invasion, tumor growth, angiogenesis. Protection against cisplatin and paclitaxel. Recruitment of macrophages and neutrophils
VEGF	Endothelial cells, ovarian tumor cells	Poor prognosis. Activation of angiogenesis and ascitic fluid production
EGF	Ovarian tumor cells	Poor prognosis. Activation of epithelial-mesenchymal transition. Protection against cisplatin
TNF-α	Ovarian tumor cells, macrophages	Poor prognosis. Activation of MCP-1, SDF-1, IL-6, MIF, VEGF and d'IL-17 synthesis. Activation of angiogenesis and metastatic process
TGF-β	Ovarian tumor cells, macrophages	Activation of angiogenesis and tumor invasion

Table 1: Soluble factors contained in ovarian tumor ascites

Non exhaustive table of principal factors, proteins and bioactive lipids, contained in ovarian tumor ascitic fluids, their role and some cells responsible for their production

3. Extracellular Matrix (ECM)

Extracellular matrix and adhesion molecules constitute a great part of the tumor microenvironment, especially in ovarian cancer. Indeed ovarian cancer cells disseminate in the whole peritoneum but have favourite sites to induce cancer nodules. These particular sites are the omentum (small and big epiploon), the fallopian tubes, the spleen, the uterus, the hepatic hile, etc.... The potential of ovarian cancer cells to disseminate and metastasis into the peritoneal cavity is ruled,

among others, by the extracellular matrix composition (82). Variations in its composition can explain the fact that cells disseminate in specific sites.

Some ovarian carcinoma lines (Hey, OVCAR429, ES-2 and HOC-7) express membrane type 1 MMP (MT1-MMP) that degrade collagen and allow invasion. Controversially, SKOV-3 and OVCAR-3 cells do not express MT1 and are not able to invade polymerised collagen I matrices in vitro (83). Moreover, the expression of MT1-MMP (as well as MMP-2, MMP-9 and TIMP-2) in ovarian cancer is correlated with poor survival (84-86).

SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) are proteins transiently secreted to the ECM that interact with growth factors and ECM components and regulates MMP expression and cell cytoskeleton (87). SPARC have controversially effects on cancer. It is regarded as a pro-tumoral protein for breast or melanoma cancer, but in other models, as the ovarian cancer, the SPARC expression is correlated with a good prognosis. SPARC is downregulated in ovarian carcinoma cells compared to normal epithelial ovarian cells and the restoration of its expression leads to a reduced growth and tumorigenicity in inducing apoptosis of ovarian cancer cells (88, 89). Moreover, SPARC reduces the adhesion of ovarian cancer cells (mediated by $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins) to ECM, in particular to fibronectin and vitronectin (90, 91). However, SPARC is not restricted to adhesion processes and can interact with other molecules like cytokines. Indeed, this protein antagonizes the mitogenic effect of VEGF in ovarian cancer cells (92) and inhibits proliferation, chemotaxis and invasion induced by IL-6 (90). SPARC inhibits the LPA-induced chemotactic and proinvasive effects (90) and the LPA-induced secretion of IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 of SKOV-3 cells (90). In some ovarian cancer cells, the overexpression of SPARC abrogate the proliferative and proinvasive effects of MCP-1 (which was added to the culture medium) (26). SPARC has a pivotal role in the regulation of the microenvironmental interactions. Indeed, it inhibits the crosstalk established between ovarian cancer cells and macrophages or mesothelial cells that result in a production of IL-6, uPA, PGE₂ and isoprostane-8, and in an activation of NF- κ B (93).

Mesothelin (MSLN) is a differentiation antigen found on the surface of mesothelial cells and overexpressed in ovarian cancer. This protein is attached to the cell membrane by a glycoposphatidyl inositol linkage and enhance invasion of ovarian cancer cells by inducing the MMP-7 secretion through MAPK/ERK and JNK dependant pathways (94).

It has been shown that an high level of stromal hyaluronan, an extracellular polysaccharide, is correlated with tumor progression and a poor prognosis in ovarian cancer (95). Versican, a proteoglycan, is increased in ovarian tumor and its surrounding malignant stroma and is associated with a poor outcome, probably in acting with hyaluronan (96). Ween *et al.* reviewed the capacities of versican and hyaluronan to promote ovarian cancer cell motility and invasion and the actual therapies developed against these extracellular components (97).

The adhesion of ovarian cancer cells to extracellular matrix *via* the integrin system is of a great importance for cancer progression. As an example, Hapke *et al.* showed that the ovarian cancer cell line OV-MZ-6 express integrin $\alpha v \beta 3$ which, when associated to vitronectin, enhances cell proliferation and motility (98).

The expression of L1-Cell Adhesion Molecule (L1-CAM) is correlated with a poor outcome in ovarian cancer (99) which could be explained by a better cell migration and tumour dissemination. Moreover, L1-CAM can prevent cisplatin-induced apoptosis in ovarian carcinoma cell line OVMz (100).

Even if it has not been proposed until now, it could be of interest to evaluate the proteins secreted by the matrix in order to predict the overcome of the patients.

4. Endothelial cells and angiogenesis

Vessels arrival is a limiting step for tumour growth as for diameter bigger than 100 to 200 μm diffusion of nutrients and oxygen is not sufficient to reach all the cells (101) (for review see (102)). The mechanism by which new vessels are created from pre-existent ones is called “neoangiogenesis” and is stimulated by the secretion of proangiogenic factors by tumor cells and their microenvironment (103).

4.1 Ovarian cancer cells and endothelial cells activation

Ovarian cancer cells stimulate neoangiogenesis through differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs). Indeed, the number of circulating EPCs is higher in the blood of ovarian cancer patients than in healthy ones (104). These cells are bone marrow derived cells which can migrate toward tumoral site *via* peripheral blood

In vitro, ovarian cancer cells from primary tumors or metastasis and cancer cell lines with mesenchymal properties can induce differentiation of blood monocytes into $\text{CD14}^+/\text{KDR}^+$ cells through, at least, their secretion of VEGF and Pleiotrophin. $\text{CD14}^+/\text{KDR}^+$ subpopulation of cells was described as endothelial progenitors and exhibits angiogenic abilities like differentiation with the formation of tubular structure on matrigel (105, 106). Alvero *et al.* studied ovarian cancer stem cells population expressing CD44 marker. Injection of these cells in immunosuppressed mice leads to highly vascular tumors. *In vitro*, CD44^+ cells are able to form vessel-like structure on matrigel and to acquire endothelial cells markers VE-cadherin and CD34. These ovarian cancer stem-like cells can serve as vascular progenitors able to differentiate in a VEGF independent, but in a $\text{IKK}\beta$ dependant way (107). The contribution of ovarian cancer stem cells in tumor vasculature are corroborated by another study where ascitic ovarian cancer cells expressing CD133, a stem cell marker, do not exhibit

tumorigenic abilities but contribute to endothelial vasculature (108).

The study of signalling pathways activated in ovarian cancers cells and potentially implied in tumor angiogenesis reveals the implication of the PI3K/Akt axis. Indeed, an Akt3 dependent VEGF secretion (109) contributes to the recruitment of endothelial progenitor cells (EPC) by at least an increase of Id-1 expression, an EPC mobilizing factor (110).

4.2. VEGF and other proangiogenic factors

Production of proangiogenic growth factors is dependent of the tumour implantation site. Indeed, mice bearing ovarian intraperitoneal xenograft demonstrate higher levels of plasmatic VEGF and basic fibroblast growth factor (bFGF) than mice bearing subcutaneous one. These data support the significant role of the tumour microenvironment in tumour implantation and development (111).

Among these proangiogenic factors, the key molecule VEGF has been extensively analysed and is previously described in part 2.6. In ovarian cancer, VEGF is expressed in 70% of cases. In advanced stages, VEGF levels in serum and ascitic fluid correlate with the progression of the disease and the response to chemotherapy (112, 113). VEGF production is associated with ascite formation and tumour burden and VEGF level is a marker of ascite malignancy (114, 115). Ovarian cancer cells express VEGFR, (VEGFR1 or VEGFR2 or both depending on cell lines) and 85% tumours tested exhibit strong expression of VEGFR2. The activation of this receptor is linked to the angiogenesis mechanism but also with ovarian cancer cell activation. Indeed, the inhibition of VEGFR2 decreases ovarian cancer cell migration and invasion *in vitro* and also decreases tumor growth *in vivo* which can be explained by a decreased tumor vascularization and tumor cell proliferation and an increase of apoptosis (116).

However, many other factors such as the Versican, EphA2, MIF and the previously described (part 2.) TNF- α , IL-6 and IL-8 have been implied in angiogenesis regulation.

Versican (a chondroitin sulphate proteoglycan) is overexpressed by both ovarian cancer cells and peritumoral stroma from human tumour fragments in advanced stages. The expression of this molecule is correlated with microvessel density and endothelial cells ability to invade *in vitro*. Moreover, patients with high Versican expression have a lower overall and a progression-free survival than patients with low Versican rates (117).

A positive correlation between the expression of EphA2 and CD31 (an endothelial cell marker), MMP2, MMP9 and MT1-MMP was revealed by the analysis of patient samples. EphA2 is a tyrosine kinase receptor overexpressed in 75% of ovarian cancer and potentially involved in oncogenesis through its role in angiogenesis. Moreover EphA2 overexpression by endothelial cells is correlated with a lower patients overall survival (118).

MIF is overexpressed in ovarian cancer cell lines, in ovarian carcinomas and in malignant ascites. The depletion of this chemokine leads to less vascularised tumors and in a decrease in endothelial cell proportion in ascite. MIF promotion of angiogenesis may be due to the stimulation of pro-angiogenic factor VEGF and inflammatory chemokines TNF- α and IL-6 (119).

4.3. Matrix metalloproteases (MMPs)

There are several evidences of relations between MMPs and angiogenesis. In a model of peritoneal dissemination, VEGF activates MMP2 in ascitic fluid (120). The VEGF secretion by ovarian cancer cells leads to the synthesis of MMP9 by microenvironment cells such as endothelial cells (121). MMP1, whose expression is correlated with a poor prognostic (122, 123), induce angiogenesis through the activation of protease activated receptor-1 (PAR-1) and an increase of IL-8 and GRO- α secretion (124).

4.4. Microenvironment and angiogenesis

The production of pro-angiogenic factor is regulated by the tridimensional organization of ovarian tumor cells and their microenvironment. Indeed, the production of IL-8 and VEGF is increased in ovarian tumor cells lines when they are organized in spheroid compared to a monolayer culture (125). Moreover, the level of VEGF and FGF-2 is significantly higher in the plasma of intraperitoneal tumor bearing mice compared to subcutaneous bearing mice, showing the importance of the peritoneal microenvironment in the ovarian tumor vascularization (126).

Neoangiogenesis is consecutive to proangiogenic factor secretion's, such as cytokines and growth factors, by tumor cells and by microenvironment cells such as carcinoma associated fibroblasts (CAFs) and mesenchymal stem cells (MSCs) (127). Indeed, these cells participate to angiogenesis by promoting endothelial cells migration (128, 129). Moreover, ovarian tumor cells can stimulate human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells *via* LPA to secrete proangiogenic factors such as SDF-1 α and VEGF leading to the stimulation of endothelial cells *in vitro* (130).

The pro-angiogenic effects of stromal cells will be described in the following parts.

4.5. Anti-angiogenic treatment

Targeting angiogenesis is more and more promising in the treatment of ovarian cancer, as previously described (part 2.). For a recent review of anti-angiogenic assay in ovarian cancer see (131). Two recent phase III clinical trials using bevacizumab (Avastin), a monoclonal antibody blocking VEGF, in combination with carboplatin and paclitaxel showed an increase of the progression-free

survival but not of the overall survival (132, 133). These very encouraging results with targeted therapies could open the door to new ways of treatment in ovarian cancer.

5. Fibroblasts

Ovarian cancer is an aging disease characterized, among others, by the transformation of microenvironment fibroblasts into senescent fibroblasts. This transformation could be initiated by growth-regulated oncogene 1 (GRO-1) whose expression is activated in Ras-transformed human ovarian epithelial cells and ovarian cancer cells (134).

Senescent fibroblasts are able to trigger the neoplastic transformation of partially transformed ovarian epithelial cells (overexpressing C-myc) *via* a secreted factor (135). In this work, Lawrenson *et al.* discussed about the potential candidates secreted by senescent fibroblasts: osteopontin, SDF-1, VEGF, amphiregulin, HGF, IL-6. Although all of these molecules have been identified as regulators of presenescent or senescent fibroblasts, nothing is known about the secretory factor responsible for the epithelial cell transformation.

Ovarian cancer cells, by releasing FGF-2, HB-EGF, HGF, IGF-1 and IL-1 α stimulate the secretion of uPA in fibroblasts (136). These cells can also synthesize FGF-2 which act in an autocrine way. Ovarian cancer cells enhance the releasing of proMMP-2 and TIMP-2 by tumor fibroblasts. The proMMP-2 is then processed by a membrane bound metalloproteinase (MT-MMP) to form an active MMP-2 which degrades the extracellular matrix and allows the invasion of ovarian cancer cells (137, 138). On the contrary, TIMP-2 produced by fibroblasts acts as a regulator that inhibit the activation of proMMP-2 in MMP-2. Fibroblasts are a key regulator of the ECM composition and dynamic.

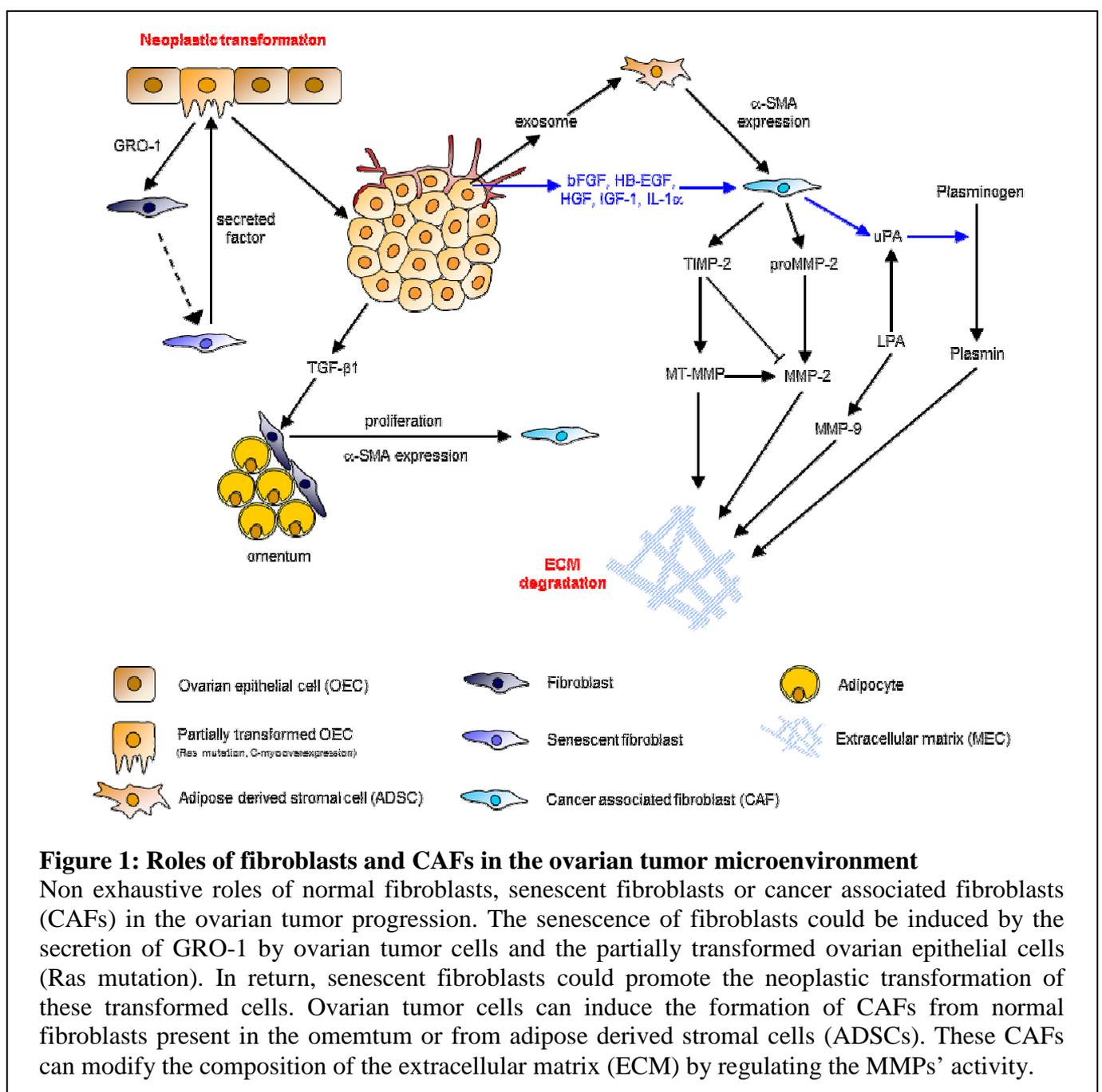
A particularity of ovarian cancer cells is their capacity to exfoliate and disseminate into the peritoneum and the omentum. Fibroblasts in the omentum are able to enhance ovarian cancer cells adhesion and invasion by a cell-cell contact way (139). Recently, Cai *et al.* described more precisely the interactions between omentum fibroblasts and ovarian cancer cells. They secrete TGF- β 1 and then activate normal fibroblasts which proliferate and express α -SMA. In return, activated fibroblasts secrete MMP-2 and regulate the expression of HGF in epithelial ovarian cancer cells. This crosstalk results in an increased adhesion and invasion of ovarian cancer cells into the omentum (140) (Figure 1).

6. Myofibroblasts or Carcinoma Associated Fibroblasts (CAFs)

Among the tumor microenvironment cells, myofibroblasts or carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) are the most abundant. Their origin and their precise phenotype have been discussed at length but most of studies demonstrate pro-tumoral effects of these cells (141).

Some ovarian cancer cell types (SKOV-3 and OVCAR-3) are able to secrete exosomes which induce expression of α -SMA, a myofibroblast marker, in adipose derived stromal cells (ADSCs) (142). Conditioned medium by ovarian cancer cell can increase the quantity of cellular reactive oxygen species (ROS) in fibroblasts which resulting in a CLIC4 up-expression that allows a myofibroblast conversion (143).

Although CAFs are absent in normal ovary, they are present in benign and borderline ovarian cancer and abundant in epithelial ovarian carcinoma. As the expression of α -SMA is higher in cases of lymph node and omentum metastasis than in cases without metastasis, Zhang *et al.* hypothesized that CAFs can contribute to metastasis by enhancing angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell migration and invasion (144).



Lai *et al.* showed that silencing FAP expression, a specific CAF marker, in these cells reduces their growth and their stem cell gene expression. Paradoxically, they also showed that silencing FAP in ovarian cancer cell line SKOV-3, although they do not express this protein, induces ovarian tumors and significantly reduces tumor growth in xenograft mouse model (145). These data show that targeting CAFs in cancer are a promising way for developing new therapies (Figure 1).

7. Mesothelial Cells

The peritoneal cavity and its organs are lined by a mesothelial cell monolayer (146). Mesothelial cells express several ECM proteins and adhesion molecules, including hyaluronan, which promote ovarian carcinoma cell adhesion *via* CD44 (95, 147-151). In a mouse model, the inhibition of CD44 by an antibody reduces the adhesion of ovarian cancer cells to the peritoneum and their spreading capacities (150). Into the peritoneal cavity, ovarian carcinoma cells form multicellular aggregates called spheroids that can adhere to ECM components and mesothelial cell monolayers (152). Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells (9).

On the contrary, the omentum mesothelial cells are able to inhibit the adhesion and invasion of some ovarian cancer cells in a cell-cell contact way (139) and can act like a protective barrier in order to protect the underlying tissue from cancer cells.

Mesothelial cells are also able to secrete several proteins implied in tumor progression. Indeed, these cells secrete a huge quantity IL-6 previously described as pro-tumoral in ovarian cancer (153) (part 2.). Under the effect of IL-1, mesothelial cells secrete bFGF, a protein implicated in mitosis, angiogenesis and chemotactism (154). Moreover, mesothelial cells activated by IL-1 β , potentially secreted by resident macrophages or inflammatory cells are a source of VEGF present in ascitic fluid (155). Finally, mesothelial cells constitutively produce LPA that enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells (156).

These cells are able to establish a crosstalk with ovarian cancer cells. Indeed, a coculture of peritoneal mesothelial cells with ovarian cancer cells enhances the production of MCP-1 (in a time-dependant manner), uPA, PGE₂ and isoprostane-8 (26).

8. Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

MSCs have a long-term viability, a self-renewal capacity, the capacity to adhere on plastic, the expression of antigenic markers (CD73, CD90, CD105) and can differentiate into multiple cell types like adipocytes, chondrocytes or osteocytes (157). MSCs derived from bone marrow, can inhibit the proliferation and enhance the early apoptosis of ovarian cancer cell line SKOV-3 (158). On the opposite, SKOV-3 cells can induce the migration of MSCs.

While a few data present an anti-tumoral effect of MSCs in some types of cancer, most of studies focus on the pro-tumoral properties of these cells. Ovarian carcinoma cells are able to modify their own microenvironment, notably in secreting LPA. LPA secretion of ovarian carcinoma lines SKOV-3 and OVCAR-3 can activate the expression of α -Smooth Active Muscle (α -SMA) and SDF-1 in human adipose tissue-derived MSCs (hASCs) that differentiate into CAFs (159).

MSCs can also be implied in the resistance to treatment in ovarian cancer. Indeed, MSCs secrete CXCL12, also known as SDF-1, which enhances the resistance of ovarian cancer cells to hyperthermia (42°C) (160). Recent studies showed, in tridimensional model of amniotic membranes, that MSCs activate the ovarian tumor cell migration and invasion by the IL-6 (8).

McLean *et al.* isolated carcinoma-associated MSCs (CA-MSCs) from ovarian tumors. These cells present a normal morphology and keep their differentiation capacities. However, they present molecular differences like an increased expression of BPM2, BPM4 and BPM6 which is responsible for an increased tumor growth compared to “normal” MSCs (161).

Rafii *et al.* showed that CA-MSCs (called Hospicells in their study) are able to confer chemoresistance to ovarian cancer cells by direct cell-cell contact and “oncologic trogocytosis”, the exchange of membrane fragments containing MDR proteins (162). These CA-MSCs are also implied in ovarian oncogenesis. Indeed, Pasquet *et al.* demonstrated that they can promote tumorigenicity *in vivo* in enhancing angiogenesis. This effect was explained by an induction of VEGF and HIF-1 α expression in ovarian cancer cells (163). Castells *et al.* studied further these interactions between ovarian cancer cells and CA-MSCs. They showed that they are able to enhance the secretion of pro-tumoral cytokines IL-6, IL-8 and VEGF in ovarian cancer cells. Moreover, they discovered interactions between CA-MSCs and macrophages. Indeed, CA-MSCs can attract macrophages to tumor site and trigger their differentiation into a pro-tumoral M2 phenotype *via* a secreted factor (164). Hospicells also present immunosuppressive properties in inhibiting T-cell response (165).

Castells *et al.* showed that supernatants of CA-MSCs as well as BM-MSCs were able to induce development of chemoresistance by reducing apoptosis. They observed that CA-MSC secretions were able to confer carboplatin resistance to ovarian cancer cells by inhibiting the activation of effector caspases and apoptosis blockade. The activation of PI3K/Akt pathway signaling and phosphorylation of the downstream target X-linked inhibitor of apoptosis (Xiap) underlined their implication in ovarian cancer chemoresistance (Figure 2).

9. Adipocytes

Adipocytes are cells composing the adipose tissue, specialized in the energy storage but also known for secreting growth factors. The role of these cells in the tumoral microenvironment is poorly studied, especially in the ovarian cancer.

The omentum is a peritoneal structure principally composed by adipocytes and is the main site of metastasis dissemination of advanced ovarian cancer. Adipocytes can induce the homing of ovarian cancer cells by the secretion of cytokines as IL-6, IL-8, MCP-1, TIMP-1 and adiponectin. These cells can also enhance ovarian tumour growth in providing them fatty acids *via* FABP4 (166).

Although adipocytes have been originally considered as simple lipid storage cells, their implication in tumor microenvironment is now evident and the study of these cells constitute a very promising field.

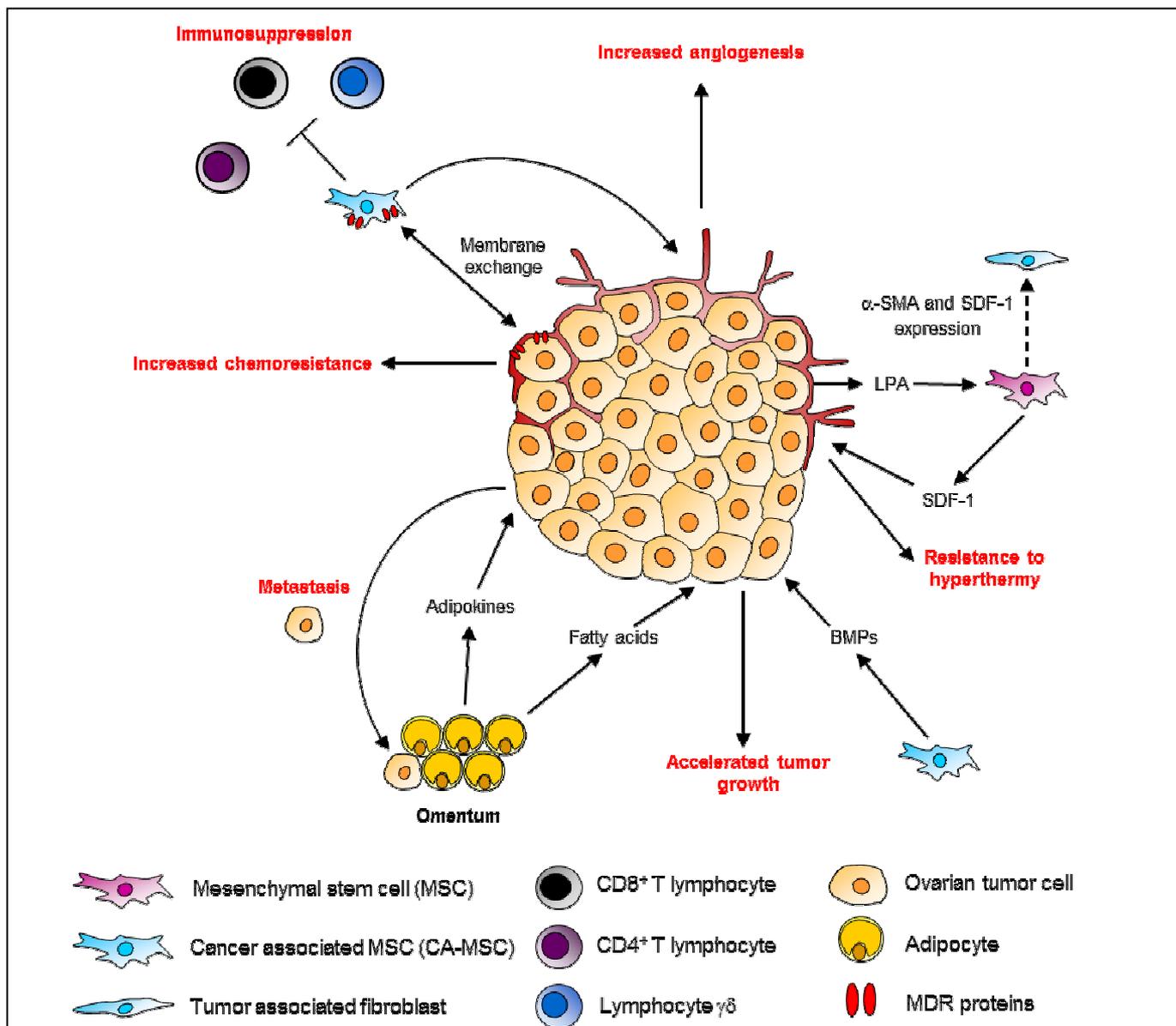


Figure 2 : Roles of MSCs and adipocytes in the ovarian tumor microenvironment

Non exhaustive roles of mesenchymal stem cells (MSCs) and adipocytes in the ovarian tumor microenvironment. MSCs can promote the resistance of ovarian tumor cells to hyperthermia by the secretion of SDF-1. Under the effect of LPA, MSCs can be differentiated into cancer associated fibroblasts (CAFs). Moreover, cancer associated MSCs (CA-MSCs) can be found in the ovarian stroma and promote tumor growth by the secretion of BMPs and the regulation of angiogenesis, enhance the chemoresistance by the transfer of drug efflux proteins and immunosuppress T lymphocytes by the secretion of nitric oxide. The omental adipocytes are able to promote tumor growth by the secretion of fatty acids and potent the metastatic process by the secretion of adipokines.

10. Immune System

The immune system, firstly characterized as able to eradicate pathogens and tumors, can be hijacked by tumor cells and become a tumor promoting environment. It is composed by dendritic cells, CD8⁺ lymphocytes (cytotoxic T lymphocytes), $\gamma\delta$ lymphocytes, CD4⁺ lymphocytes (regulatory T cells (Tregs) and T helper cells), monocytes/macrophages, neutrophils, etc... The equilibrium between these cells defines the immunosuppressive and pro-tumoral properties of this microenvironment.

In 2003, Zhang *et al.* showed that the presence of CD3⁺ T lymphocytes is correlated with a better survival in patients with ovarian cancer (167). More recently, Fialova *et al.* studied the composition of tumor-infiltrating immune cells in patients with ovarian cancer at different stages. They showed that early stages were characterized by a strong Th17 immune response followed by Th1 recruitment for stage II. In advanced stages III and IV, they detected Helio+ (an hematopoietic-specific transcription factor involved in the regulation of lymphocyte development) activated T regulatory cells and a high quantity of myeloid dendritic cells and monocytes/macrophages (168). Finally, Milne *et al.* showed in 2012 that absolute lymphocyte count (number of circulating lymphocytes in peripheral blood) recorded at the time of prognosis were strongly associated with disease burden and prognosis but not with the number of CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes (169).

10.1. Dendritic Cells (DCs)

DCs are antigen presenting cells responsible for the T lymphocyte activation during adaptive immunity and can be divided in two different subtypes: myeloid (mDCs) and plasmacytoid (pDCs).

Wei *et al.* highlighted that tumor-associated pDCs (TApDCs) are able to modify the ovarian tumor immunity in inducing immunosuppressive CD8⁺ T lymphocytes (170).

A lot of studies are focusing on the effects of DCs in tumor immunity. However, some recent data showed a role of DCs in ovarian tumor vascularisation with opposite roles according to the dendritic subtype. Indeed, Curiel *et al.* hypothesized that ovarian tumors can exclude mDCs, which have angiogenesis inhibition properties, and attract pDCs which enhance angiogenesis *via* TNF- α and IL-8 secretion (171). In ovarian cancer, some tumor-infiltrating DCs (CD11⁺ and DEC205⁺) acquire endothelial and pericyte characteristics like SMA or VEGF-A expression and participate to the maintenance of tumor vasculature. Indeed, the depletion of these cells results in a vascular apoptosis, tumor necrosis, an enhanced effect of chemotherapies and a boost of antitumor immunity (172).

Labidi-Galy *et al.* showed phenotypic and functional differences between tumor-infiltrating pDCs (TApDCs) and ascites pDCs in advanced ovarian cancer. Ascites pDCs present pro-inflammatory properties whereas TApDCs have great immunosuppressive characteristics and are correlated with early relapse and a poor outcome (173, 174).

10.2. CD8⁺ T Lymphocytes

CD8⁺ T lymphocytes, also known as cytotoxic T lymphocytes (CTLs), are specialized in killing virus-infected cells or tumor cells. They secrete perforin which create pore in the plasma membrane of target cell and granzyme, a serine protease, which activates caspases and leads to apoptosis.

Sato *et al.* put on evidence that intraepithelial CD8⁺ tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and a high CD8⁺/Treg ratio are correlated with a good outcome in ovarian cancer (175, 176). The utilization of these cytotoxic cells could be a way to improve the prognosis of patients with an ovarian cancer.

10.3. $\gamma\delta$ T lymphocytes

$\gamma\delta$ T lymphocytes are CD3⁺ cells expressing a TCR with γ and δ chains. They constitute a small percentage of T lymphocytes and show anti-tumor properties. Indeed, these cells are able to reduce the proliferation potential of ovarian cancer stem cells and to enhance their apoptosis and sensitivity to chemotherapeutic drugs *via* the production of IL-17 (177).

10.4. Regulatory T cells (Tregs)

Regulatory T cells (Tregs) are a suppressor T population responsible for the immune tolerance to self-antigens and the inactivation of the immune system. In 2012, Peng *et al.* reviewed the different populations of Tregs in ovarian cancer and the potential clinical applications of these cells (178). As they are strongly subjected to microenvironmental regulation, strategies consisting in reprogramming Tregs could be a new way to treat cancer.

Ovarian cancer cells can also modify the phenotype of immune cells. Alvero *et al.* (179) showed the existence of two subpopulations of ovarian cancer cells with different cytokine profiles : cancer stem cells (type I) and differentiated cancer cells (type II). The type II subpopulation is able to enhance the production of regulatory T cells (T regs) which create a tolerant microenvironment and prevent an immune response.

Curiel *et al.* showed that a higher number of tumor Treg cells is correlated with an increased risk of death and a poor survival in ovarian cancer. These cells, characterized by the expression of CD4, CD25 and FoxP3, can be recruited by the chemokine CCL12 secreted by ovarian cancer cells and microenvironment macrophages (180).

10.5. T Helper (Th) cells

T helpers (Th) cells are CD4⁺ naïve T lymphocytes activated by antigen-presenting cells (APCs). The subtype obtained: Th1, Th2 or Th17, is defined by the cytokinic environment and the interactions with APCs. These different subtypes are activator of the immune system but differ in their cytokine production and their target cells.

Th1 cells secrete IFN- γ and TNF- α and are responsible for the activation of CTLs or anti-tumoral macrophages. On the contrary, Th2 cells are characterized by IL-4 secretion, tumor-associated macrophages' activation and so tumor progression (181). Even if no direct link between these cells and the ovarian cancer has been established, some of the cytokines they produce are present in ascites and have been correlated with prognosis in ovarian cancer (182).

Th17 cells secrete the cytokine IL-17, are known to have both anti-tumor and pro-tumor effects and present great interactions with Tregs (183). Miyahara *et al.* showed the presence of Th17 cells at sites of ovarian cancer. Ovarian cancer cells and tumor-associated APCs secrete cytokines that could be responsible for the expansion of Th17 cells (184). Moreover, Leveque *et al.* demonstrated that IL-2 can trigger the conversion of ovarian cancer-associated CD4⁺ T regs into Th17 cells (185). On the contrary, Fialova *et al.*, as described above, showed a high Th17 immune response only in early stages of ovarian cancer (168). Recent data show that an high density of IL-17 producing cells is correlated with the presence of tumor associated macrophages and a good prognosis in ovarian cancer (186).

Although the Th17 cells presence has been confirmed in ovarian cancer, the specific effects of these cells in tumor progression remain to be established.

10.6. Macrophages

Monocytes and macrophages derive from myeloid cells which are located in the bone marrow. After maturation, monocytes circulate in the bloodstream and can migrate into tissues where they differentiate into macrophages. Depending on the environmental context and the tumor development stage, activated macrophages can be separated into two distinct phenotypes: M1 (classical activated) which inhibit tumor growth and M2 (alternative activated) which are pro-tumoral. While the exact definition is still controversial, it is clear that tumor-associated macrophages (TAMs) consistently present a highly immunosuppressive M2 profile (187).

Hagemann *et al.* describe the capacities of ovarian cancer cells to regulate the macrophage phenotype. Indeed, cancer cells are able to differentiate macrophages into a tumor-associated macrophage (TAM) phenotype (188). These interactions are bidirectional because macrophages are able to increase cancer cells invasion potential *via* TNF- α and NF- κ B pathways. Moreover, macrophages, potentially with VEGF, proteases and growth factors secretion, facilitate ovarian cancer

dissemination into the mouse peritoneum (189). They are also key signalling cells that help to organize the responses of others cells (as an example mast cells and neutrophils).

In return, ovarian cancer cells or its peritoneal microenvironment can also regulate macrophage phenotype. Duluc *et al.* showed that ovarian cancer ascites, *via* an action of Leukemia Inhibitory Factor (LIF), IL-6 and M-SCF switch monocytes differentiation into TAM-like cells (190). The two subpopulations of ovarian cancer cells identified by Alvero *et al.* (179) and described previously (cancer stem cells and differentiated cancer cells) are able to differentiate macrophage neither into a tumor repair profile nor into an immunosuppressive profile. In the two cases, ovarian cancer cells were creating a pro-tumoral microenvironment.

Finally, macrophages can also regulate the tumoral immunity. Indeed, macrophages, as ovarian cancer cells, secrete macrophage-derived chemokine (MDC = CCL22) which attract Tregs to the tumor, suppress T cell immunity and enhance tumour growth (180). A subpopulation of ovarian cancer stroma's macrophages expresses B7-H4, a costimulatory molecule which reduces the proliferation and cytokine production of T cells. These macrophages act as a negative regulator of T cell immunity and their presence is correlated with the number of tumor-infiltrating Tregs and a poor outcome in ovarian carcinoma (191, 192). Because there is a clear correlation between an abundance of TAMs and a better tumor progression, TAMs could be a markers of poor prognosis.

10.7. Neutrophils

Neutrophils are leukocytes specialized in phagocytosis and defence against invading microorganisms. While their antibacterial functions are well described, there is a growing interest in their role in the context of the tumor. Indeed, neutrophils, as macrophages, can be separated in two populations: N1, which are pro-inflammatory and antitumorigenic, and N2, which have pro-tumoral and immunosuppressive properties. Tumor-associated neutrophils (TANs) have a distinct phenotype and can present N1 or N2 characteristics depending on the tumoral context (193, 194).

No studies have been carried out on the direct role of TANs in ovarian cancer progression. However, we previously described that Lee *et al.* showed that the IL-8 production by ovarian cancer cells was responsible for a reduced tumor growth which could be due, in part, to the recruitment of neutrophils (61). Neutrophils remain a very exploring field to explore in order to develop new therapies against ovarian cancer.

11. Conclusion

Ovarian cancer is the most lethal gynecological malignancy. It is often diagnosed in advanced stages and, despite therapy, 70% of patients relapse within 2 years with incurable disease (1).

Epithelial ovarian cancer is recognized as a heterogeneous disease and is divided according to histological subtypes: high grade serous, low grade serous, clear cell, endometrioid and mucinous. Each histological subtype is associated with a distinct clinical behaviour (response to chemotherapy, pattern of metastasis, survival) but has historically been treated as one entity.

Regimens with clinical benefit and minimal toxicity are urgently needed to take into account not only the ovarian subtype but also the surrounding microenvironment. Indeed, the ovarian cancer is characterized by a peritoneal dissemination in advanced stages. This peritoneum constitutes a wide and rich microenvironment, composed by numerous factors contained in ascitic fluid (proteins and bioactive lipids), a dynamic ECM and a large panel of stromal cells: inflammatory cells (macrophages, lymphocytes, etc...), mesothelial cells, adipocytes, CAFs, MSCs, etc...

Ovarian cancer cells thus disseminate into an open pro-tumoral stroma, involved in cancer progression, dissemination and chemoresistance through cellular interactions and the secretion of cytokines and growth factors (Figure 3).

11.1. Therapeutic opportunities

During the last ten years, ovarian cancer treatment improvement concerned only the schedule of administration of platinum salts and taxans (intraperitoneal chemo-hyperthermia, liposomal cisplatin...) and the improvement of surgery procedures. The other cancer malignancies, such as breast or colon cancers, benefited, during the same period of time, with a lot of improvement based on targeted therapies. Based on this review, several targets could be envisaged.

Firstly, the VEGF is a well-recognized target in the ovarian cancer treatment and most of countries proposed combined treatment with platinum salts and bevacizumab. The addition of bevacizumab to the front-line therapy of ovarian cancer has produced a benefit in progression-free survival in several phase III trials. However, several questions remain to be clarified in the future, specially the optimal patient selection based on predictive biomarkers and the duration of therapy (195). It could be so envisaged to combine a treatment targeting the VEGF as well as the IL-6 and IL-8, also involved in angiogenesis by different pathways.

Several tyrosine kinase inhibitors (TKIs) that target VEGF receptors as well as other receptors are under investigation in various trials in ovarian cancer. We can mention nintedanib (FGFR), pazopanib (PDGFR) and cabozantinib (c-Met). These antibodies will target not only the ovarian tumor cells but also the stromal cells, allowing a regulation of the microenvironment dynamic.

At last, the Trebananib (AMG 386) is a peptide-Fc fusion protein which prevents interactions between angiopoetin-1 and angiopoetin-2, expressed on vascular endothelial cells with the Tie2 receptor, and thereby inhibits vascular maturation and reduces the impact of VEGF stimulation. In clinical trials so far, trebananib is administered weekly in combination with chemotherapy and as

maintenance therapy. Efficacy seems to be dose-dependent and the toxicity profile appears to differ from bevacizumab (196).

Since 30 years and the introduction of cisplatin in the treatment of ovarian cancer, the overall survival curves of patients have been poorly modified (4). Considering the major importance of the stroma in the ovarian cancer dissemination, developing new treatments by targeting the microenvironment remains the best way to improve the clinical outcome of patients.

11.2. Immunomonitoring and prognostic relevance of stromal cells in clinical trials

The prognostic role of tumor-infiltrating neutrophils, macrophages, dendritic cells, mesenchymal stem cells has been separately associated with poor clinical outcome in ovarian cancer. In order to depicted the real engagement of each of the stromal cells in each step of the tumor development, an immunomonitoring of stromal cells, both in the tumor biopsies and on the peripheral blood could be proposed for each patient. On the same way ovarian cyst fluid is a rich proteome resource for detection of new tumor biomarkers (proteins and lipids) that could be used as prognosis markers.

Depending on the evolution of the patients, this analysis could allow the determination of cells and molecules implicated in the tumor development, tumor dissemination and chemoresistance acquisition. Thus, a modeling (multivariate logistic regression) of all these parameters could be envisaged and could constitute, in addition to the stage of the disease, the histological subtype and the molecular profile of tumors, a way to develop individual treatment for ovarian adenocarcinoma.

The ovarian cancer is characterized by a strong heterogeneity among patients (origin, mutations), a peritoneal dissemination and the acquisition of a chemoresistance by ovarian tumor cells. We reviewed the multiple interactions between the ovarian stroma (stromal cells and ascitic factors) and tumors. Ovarian tumor cells can modify the composition of their stroma by inducing the differentiation of normal cells into a pro-tumoral phenotype. In return, stromal cells can improve the ovarian cancer progression in regulating the tumor growth and dissemination, angiogenesis, immunosuppression and chemoresistance. It is now evident that targeting the microenvironment constitutes the most promising way to adapt the treatment to its patient and to improve its prognosis.

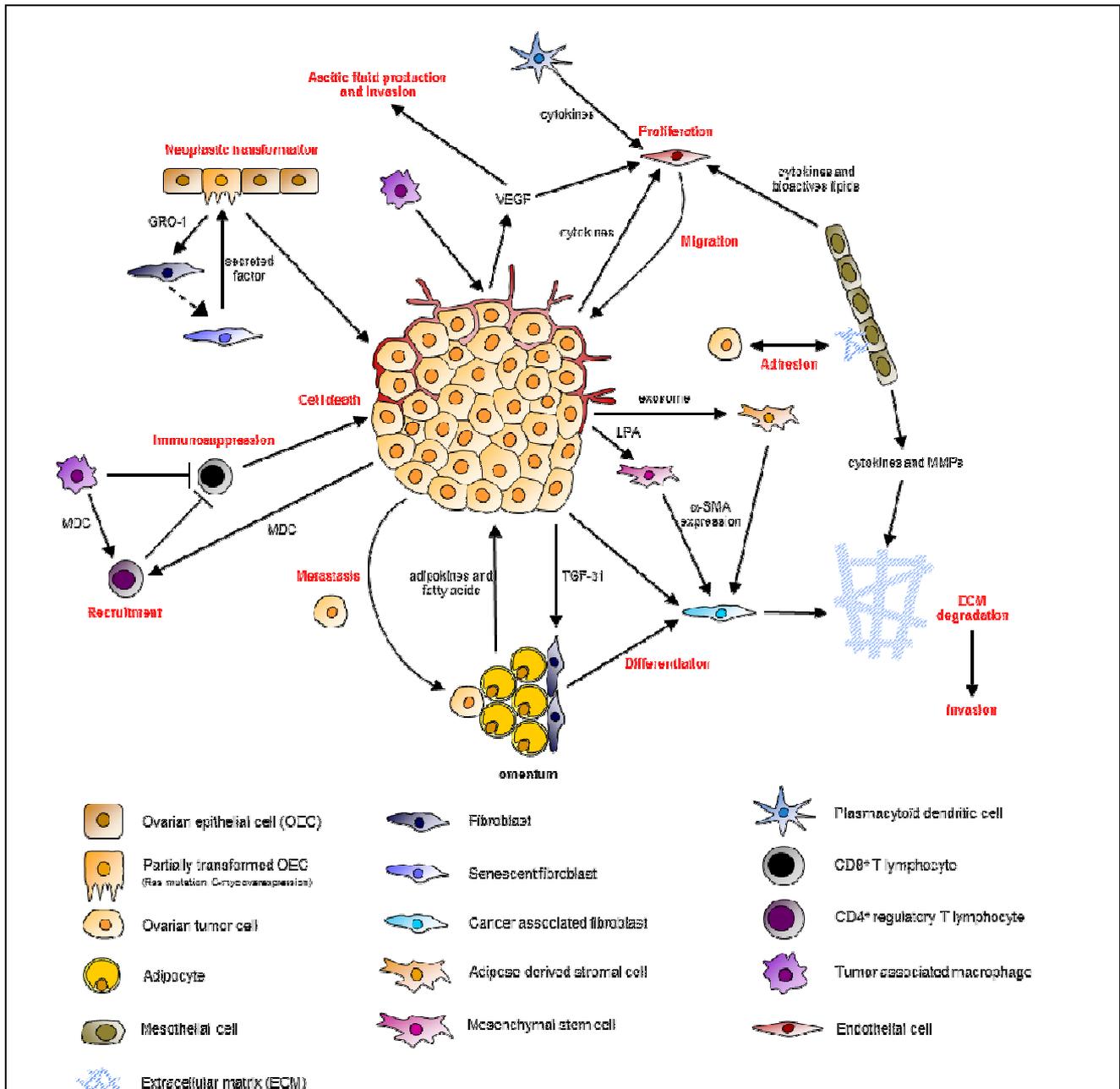


Figure 3: The ovarian tumor microenvironment

Non exhaustive representation of the different ovarian tumor microenvironment actors. The ovarian tumor cells are able to regulate the composition of their microenvironment by, especially, promoting the differentiation of fibroblasts, mesenchymal stem cells and adipose derived stromal cells into cancer associated fibroblasts. These cells, as mesothelial cells, can degrade the extracellular matrix and then potent the invasion of tumor cells. The mesothelial cells are also able to promote angiogenesis and regulate the adhesion of tumor cells. Tumor associated macrophages can regulate angiogenesis, enhance the production of ascitic fluid, activate the recruitment of T regulator lymphocytes and inhibit cytotoxic T lymphocytes. The omental adipocytes promote tumor growth and the metastatic process by the secretion of adipokines and fatty acids.

12. References

1. Colombo, N., Van, Gorp T., Parma, G., Amant, F., Gatta, G. et.al. Ovarian cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2006, 2, 159-179.
2. Hennessy, B. T., Coleman, R. L., and Markman, M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009, 9698, 1371-1382.
3. Romero, I. and Bast, R. C., Jr. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* 2012, 4, 1593-1602.
4. Vaughan, S., Coward, J. I., Bast, R. C., Jr., Berchuck, A., Berek, J. S. et.al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer* 2011, 10, 719-725.
5. Castells, M., Thibault, B., Delord, J. P., and Couderc, B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 2012, 8, 9545-9571.
6. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 5, 646-674.
7. Hanahan, D. and Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2012, 3, 309-322.
8. Touboul, C., Lis, R., Al, Farsi H., Raynaud, C. M., Warfa, M. et.al. Mesenchymal stem cells enhance ovarian cancer cell infiltration through IL6 secretion in an amniochorionic membrane based 3D model. *J.Transl.Med.* 2013, 1, 28-
9. Rieppi, M., Vergani, V., Gatto, C., Zanetta, G., Allavena, P. et.al. Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells 1. *Int J Cancer* 1999, 2, 303-307.
10. Wang, E., Ngalame, Y., Panelli, M. C., Nguyen-Jackson, H., Deavers, M. et.al. Peritoneal and subperitoneal stroma may facilitate regional spread of ovarian cancer. *Clin.Cancer Res.* 2005, 1, 113-122.
12. Hollingsworth, H. C., Kohn, E. C., Steinberg, S. M., Rothenberg, M. L., and Merino, M. J. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995, 1, 33-41.
12. Duncan, T. J., Al-Attar, A., Rolland, P., Scott, I. V., Deen, S. et.al. Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? *Clin Cancer Res* 2008, 10, 3030-3035.
13. Byrne, A. T., Ross, L., Holash, J., Nakanishi, M., Hu, L. et.al. Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* 2003, 15, 5721-5728.
14. Malek, J. A., Martinez, A., Mery, E., Ferron, G., Huang, R. et.al. Gene expression analysis of matched ovarian primary tumors and peritoneal metastasis. *J.Transl.Med.* 2012, 121-
15. Moradi, M. M., Carson, L. F., Weinberg, B., Haney, A. F., Twiggs, L. B. et.al. Serum and ascitic fluid levels of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in patients with ovarian epithelial cancer. *Cancer* 1993, 8, 2433-2440.

16. Xu, Y., Gaudette, D. C., Boynton, J. D., Frankel, A., Fang, X. J. et.al. Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients 1. *Clin Cancer Res* 1995, 10, 1223-1232.
17. Xu, Y., Shen, Z., Wiper, D. W., Wu, M., Morton, R. E. et.al. Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *JAMA* 1998, 8, 719-723.
18. Xu, Y., Fang, X. J., Casey, G., and Mills, G. B. Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells 1. *Biochem J* 1995, 933-940.
19. Yang, K., Zheng, D., Deng, X., Bai, L., Xu, Y. et.al. Lysophosphatidic acid activates telomerase in ovarian cancer cells through hypoxia-inducible factor-1alpha and the PI3K pathway. *J Cell Biochem.* 2008, 5, 1194-1201.
20. So, J., Navari, J., Wang, F. Q., and Fishman, D. A. Lysophosphatidic acid enhances epithelial ovarian carcinoma invasion through the increased expression of interleukin-8 1. *Gynecol Oncol* 2004, 2, 314-322.
21. Schwartz, B. M., Hong, G., Morrison, B. H., Wu, W., Baudhuin, L. M. et.al. Lysophospholipids increase interleukin-8 expression in ovarian cancer cells 1. *Gynecol Oncol* 2001, 2, 291-300.
22. Fang, X., Schummer, M., Mao, M., Yu, S., Tabassam, F. H. et.al. Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer 1. *Biochim.Biophys Acta* 2002, 1-3, 257-264.
23. Fang, X., Yu, S., Bast, R. C., Liu, S., Xu, H. J. et.al. Mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 2004, 10, 9653-9661.
24. Hu, Y. L., Tee, M. K., Goetzl, E. J., Auersperg, N., Mills, G. B. et.al. Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells 12. *J Natl Cancer Inst* 2001, 10, 762-768.
25. Fishman, D. A., Liu, Y., Ellerbroek, S. M., and Stack, M. S. Lysophosphatidic acid promotes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-dependent invasion in ovarian cancer cells 11. *Cancer Res* 2001, 7, 3194-3199.
26. Said, N. A., Elmarakby, A. A., Imig, J. D., Fulton, D. J., and Motamed, K. SPARC ameliorates ovarian cancer-associated inflammation 1. *Neoplasia.* 2008, 10, 1092-1104.
27. Sengupta, S., Kim, K. S., Berk, M. P., Oates, R., Escobar, P. et.al. Lysophosphatidic acid downregulates tissue inhibitor of metalloproteinases, which are negatively involved in lysophosphatidic acid-induced cell invasion 2. *Oncogene* 2007, 20, 2894-2901.
28. Li, H., Wang, D., Zhang, H., Kirmani, K., Zhao, Z. et.al. Lysophosphatidic acid stimulates cell migration, invasion, and colony formation as well as tumorigenesis/metastasis of mouse ovarian cancer in immunocompetent mice 1. *Mol.Cancer Ther* 2009, 6, 1692-1701.
29. Wang, G. L., Wen, Z. Q., Xu, W. P., Wang, Z. Y., Du, X. L. et.al. Inhibition of lysophosphatidic acid receptor-2 expression by RNA interference decreases lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator activation, cell invasion, and migration in ovarian cancer SKOV-3 cells 1. *Croat.Med J* 2008, 2, 175-181.

30. Wang, C., Michener, C. M., Belinson, J. L., Vaziri, S., Ganapathi, R. et.al. Role of the 18:1 lysophosphatidic acid-ovarian cancer immunoreactive antigen domain containing 1 (OCIAD1)-integrin axis in generating late-stage ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2010, 6, 1709-1718.
31. Sengupta, S., Michener, C. M., Escobar, P., Belinson, J., and Ganapathi, R. Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1 (OCIAD1), a key player in ovarian cancer cell adhesion. *Gynecol.Oncol* 2008, 2, 226-233.
32. Frankel, A. and Mills, G. B. Peptide and lipid growth factors decrease cis-diamminedichloroplatinum-induced cell death in human ovarian cancer cells 2. *Clin Cancer Res* 1996, 8, 1307-1313.
33. Hong, G., Baudhuin, L. M., and Xu, Y. Sphingosine-1-phosphate modulates growth and adhesion of ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* 1999, 3, 513-518.
34. Schwartz, B. M., Hong, G., Morrison, B. H., Wu, W., Baudhuin, L. M. et.al. Lysophospholipids increase interleukin-8 expression in ovarian cancer cells. *Gynecol.Oncol* 2001, 2, 291-300.
35. Smicun, Y., Reierstad, S., Wang, F. Q., Lee, C., and Fishman, D. A. S1P regulation of ovarian carcinoma invasiveness. *Gynecol.Oncol* 2006, 3, 952-959.
36. Devine, K. M., Smicun, Y., Hope, J. M., and Fishman, D. A. S1P induced changes in epithelial ovarian cancer proteolysis, invasion, and attachment are mediated by Gi and Rac. *Gynecol.Oncol* 2008, 2, 237-245.
37. Park, K. S., Kim, M. K., Lee, H. Y., Kim, S. D., Lee, S. Y. et.al. S1P stimulates chemotactic migration and invasion in OVCAR3 ovarian cancer cells. *Biochem.Biophys.Res Commun.* 2007, 1, 239-244.
38. Ali-Fehmi, R., Morris, R. T., Bandyopadhyay, S., Che, M., Schimp, V. et.al. Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival. *Am J Obstet.Gynecol.* 2005, 3, 819-825.
39. Ferrandina, G., Lauriola, L., Distefano, M. G., Zannoni, G. F., Gessi, M. et.al. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *J Clin Oncol* 2002, 4, 973-981.
40. Munkarah, A. R., Morris, R., Baumann, P., Deppe, G., Malone, J. et.al. Effects of prostaglandin E(2) on proliferation and apoptosis of epithelial ovarian cancer cells. *J Soc.Gynecol.Investig.* 2002, 3, 168-173.
41. Rask, K., Zhu, Y., Wang, W., Hedin, L., and Sundfeldt, K. Ovarian epithelial cancer: a role for PGE2-synthesis and signalling in malignant transformation and progression. *Mol Cancer* 2006, 62-
42. Obermajer, N., Muthuswamy, R., Odunsi, K., Edwards, R. P., and Kalinski, P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer Res* 2011, 24, 7463-7470.
43. Naka, T., Nishimoto, N., and Kishimoto, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine 7. *Arthritis Res* 2002, S233-S242.

44. Nash, M. A., Ferrandina, G., Gordinier, M., Loercher, A., and Freedman, R. S. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary 1. *Endocr Relat.Cancer* 1999, 1, 93-107.
45. Nilsson, M. B., Langley, R. R., and Fidler, I. J. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine 2. *Cancer Res* 2005, 23, 10794-10800.
46. Garg, R., Wollan, M., Galic, V., Garcia, R., Goff, B. A. et.al. Common polymorphism in interleukin 6 influences survival of women with ovarian and peritoneal carcinoma 4. *Gynecol Oncol* 2006, 3, 793-796.
47. Plante, M., Rubin, S. C., Wong, G. Y., Federici, M. G., Finstad, C. L. et.al. Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer 1. *Cancer* 1994, 7, 1882-1888.
48. Tempfer, C., Zeisler, H., Sliutz, G., Haeusler, G., Hanzal, E. et.al. Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients 6. *Gynecol Oncol* 1997, 1, 27-30.
49. Penson, R. T., Kronish, K., Duan, Z., Feller, A. J., Stark, P. et.al. Cytokines IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel 11. *Int J Gynecol Cancer* 2000, 1, 33-41.
50. Scambia, G., Testa, U., Benedetti, Panici P., Foti, E., Martucci, R. et.al. Prognostic significance of interleukin 6 serum levels in patients with ovarian cancer 1. *Br J Cancer* 1995, 2, 354-356.
51. Wang, Y., Niu, X. L., Qu, Y., Wu, J., Zhu, Y. Q. et.al. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells 1. *Cancer Lett.* 2010, 1, 110-123.
52. Syed, V., Ulinski, G., Mok, S. C., and Ho, S. M. Reproductive hormone-induced, STAT3-mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells 1. *J Natl Cancer Inst* 2002, 8, 617-629.
53. Obata, N. H., Tamakoshi, K., Shibata, K., Kikkawa, F., and Tomoda, Y. Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma 5. *Anticancer Res* 1997, 1A, 337-342.
54. Rath, K. S., Funk, H. M., Bowling, M. C., Richards, W. E., and Drew, A. F. Expression of soluble interleukin-6 receptor in malignant ovarian tissue 1. *Am J Obstet.Gynecol* 2010, 3, 230-238.
55. Waugh, D. J. and Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer 1. *Clin Cancer Res* 2008, 21, 6735-6741.
56. Xu, L. and Fidler, I. J. Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer 4. *Oncol Res* 2000, 2, 97-106.
57. Merritt, W. M., Lin, Y. G., Spannuth, W. A., Fletcher, M. S., Kamat, A. A. et.al. Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth 1. *J Natl Cancer Inst* 2008, 5, 359-372.
58. Shahzad, M. M., Arevalo, J. M., Armaiz Pena, G. N., Lu, C., Stone, R. L. et.al. Stress effects on FOSB and interleukin-8 (IL8) driven ovarian cancer growth and metastasis 1. *J Biol Chem* 2010,

59. Kassim, S. K., El Salahy, E. M., Fayed, S. T., Helal, S. A., Helal, T. et.al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients 1. *Clin Biochem* 2004, 5, 363-369.
60. Huang, S., Robinson, J. B., Deguzman, A., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8 2. *Cancer Res* 2000, 19, 5334-5339.
61. Lee, L. F., Hellendall, R. P., Wang, Y., Haskill, J. S., Mukaida, N. et.al. IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *J Immunol.* 2000, 5, 2769-2775.
62. Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003, 6, 669-676.
63. Kryczek, I., Lange, A., Mottram, P., Alvarez, X., Cheng, P. et.al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 2005, 2, 465-472.
64. Mesiano, S., Ferrara, N., and Jaffe, R. B. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization 2. *Am J Pathol.* 1998, 4, 1249-1256.
65. Hu, L., Hofmann, J., Zaloudek, C., Ferrara, N., Hamilton, T. et.al. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer 2. *Am J Pathol.* 2002, 5, 1917-1924.
66. Hu, L., Hofmann, J., Holash, J., Yancopoulos, G. D., Sood, A. K. et.al. Vascular endothelial growth factor trap combined with paclitaxel strikingly inhibits tumor and ascites, prolonging survival in a human ovarian cancer model 1. *Clin Cancer Res* 2005, 19 Pt 1, 6966-6971.
67. Heitz, F., Harter, P., Barinoff, J., Beutel, B., Kannisto, P. et.al. Bevacizumab in the treatment of ovarian cancer. *Adv. Ther* 2012, 9, 723-735.
68. Scotton, C. J., Wilson, J. L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G. D. et.al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2002, 20, 5930-5938.
69. Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Ino, K., Nawa, A. et.al. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2008, 1, 91-99.
70. Psyrrri, A., Kassar, M., Yu, Z., Bamias, A., Weinberger, P. M. et.al. Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 24 Pt 1, 8637-8643.
71. Gui, T. and Shen, K. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol* 2012,
72. Schilder, R. J., Pathak, H. B., Lokshin, A. E., Holloway, R. W., Alvarez, R. D. et.al. Phase II trial of single agent cetuximab in patients with persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma with the potential for dose escalation to rash. *Gynecol.Oncol* 2009, 1, 21-27.

73. Ahmed, N., Maines-Bandiera, S., Quinn, M. A., Unger, W. G., Dedhar, S. et.al. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006, 6, C1532-C1542.
74. Colomiere, M., Ward, A. C., Riley, C., Trenerry, M. K., Cameron-Smith, D. et.al. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 2009, 1, 134-144.
75. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009, 5, 361-371.
76. Naylor, M. S., Stamp, G. W., Foulkes, W. D., Eccles, D., and Balkwill, F. R. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* 1993, 5, 2194-2206.
77. Kulbe, H., Thompson, R., Wilson, J. L., Robinson, S., Hagemann, T. et.al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007, 2, 585-592.
78. Charles, K. A., Kulbe, H., Soper, R., Escorcio-Correia, M., Lawrence, T. et.al. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest* 2009, 10, 3011-3023.
79. Elliott, R. L. and Blobel, G. C. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005, 9, 2078-2093.
80. Nakanishi, Y., Kodama, J., Yoshinouchi, M., Tokumo, K., Kamimura, S. et.al. The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol.Pathol* 1997, 3, 256-262.
81. Rodriguez, G. C., Haisley, C., Hurteau, J., Moser, T. L., Whitaker, R. et.al. Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor-beta. *Gynecol.Oncol* 2001, 2, 245-253.
82. Elmasri, W. M., Casagrande, G., Hoskins, E., Kimm, D., and Kohn, E. C. Cell adhesion in ovarian cancer. *Cancer Treat.Res* 2009, 297-318.
83. Sodek, K. L., Ringuette, M. J., and Brown, T. J. MT1-MMP is the critical determinant of matrix degradation and invasion by ovarian cancer cells 2. *Br J Cancer* 2007, 3, 358-367.
84. Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Ben Baruch, G. et.al. High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis*. 1999, 10, 799-808.
85. Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Ben Baruch, G. et.al. The prognostic value of metalloproteinases and angiogenic factors in ovarian carcinoma. *Mol.Cell Endocrinol*. 2002, 1-2, 39-45.
86. Kamat, A. A., Fletcher, M., Gruman, L. M., Mueller, P., Lopez, A. et.al. The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer 2. *Clin Cancer Res* 2006, 6, 1707-1714.
87. Podhajcer, O. L., Benedetti, L. G., Girotti, M. R., Prada, F., Salvatierra, E. et.al. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host 3. *Cancer Metastasis.Rev* 2008, 4, 691-705.

88. Mok, S. C., Chan, W. Y., Wong, K. K., Muto, M. G., and Berkowitz, R. S. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells 4. *Oncogene* 1996, 9, 1895-1901.
89. Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, S. W., Chan, P. S., Cheung, K. K. et.al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells 3. *Am J Pathol.* 2001, 2, 609-622.
90. Said, N. A., Najwer, I., Socha, M. J., Fulton, D. J., Mok, S. C. et.al. SPARC inhibits LPA-mediated mesothelial-ovarian cancer cell crosstalk 5. *Neoplasia.* 2007, 1, 23-35.
91. Said, N. and Motamed, K. Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis 7. *Am J Pathol.* 2005, 6, 1739-1752.
92. Said, N., Socha, M. J., Olearczyk, J. J., Elmarakby, A. A., Imig, J. D. et.al. Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC 4. *Mol.Cancer Res* 2007, 10, 1015-1030.
93. Said, N. A., Elmarakby, A. A., Imig, J. D., Fulton, D. J., and Motamed, K. SPARC ameliorates ovarian cancer-associated inflammation. *Neoplasia.* 2008, 10, 1092-1104.
94. Chang, M. C., Chen, C. A., Chen, P. J., Chiang, Y. C., Chen, Y. L. et.al. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. *Biochem.J* 2012, 2, 293-302.
95. Anttila, M. A., Tammi, R. H., Tammi, M. I., Syrjanen, K. J., Saarikoski, S. V. et.al. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2000, 1, 150-155.
96. Voutilainen, K., Anttila, M., Sillanpaa, S., Tammi, R., Tammi, M. et.al. Versican in epithelial ovarian cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors and prognosis. *Int J Cancer* 2003, 3, 359-364.
97. Ween, M. P., Oehler, M. K., and Ricciardelli, C. Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* 2011, 2, 1009-1029.
98. Hapke, S., Kessler, H., Lubber, B., Benge, A., Hutzler, P. et.al. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem.* 2003, 7, 1073-1083.
99. Fogel, M., Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A. et.al. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 2003, 9387, 869-875.
100. Stoeck, A., Gast, D., Sanderson, M. P., Issa, Y., Gutwein, P. et.al. L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol.Oncol* 2007, 2, 461-469.
101. Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., and Hanahan, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989, 6219, 58-61.
102. Carmeliet, P. and Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 6801, 249-257.

103. Schmid, M. C. and Varner, J. A. Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol* 2010, 201026-
104. Su, Y., Zheng, L., Wang, Q., Li, W., Cai, Z. et.al. Quantity and clinical relevance of circulating endothelial progenitor cells in human ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2010, 27-
105. Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J. et.al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000, 3, 952-958.
106. Collino, F., Revelli, A., Massobrio, M., Katsaros, D., Schmitt-Ney, M. et.al. Epithelial-mesenchymal transition of ovarian tumor cells induces an angiogenic monocyte cell population. *Exp Cell Res* 2009, 17, 2982-2994.
107. Alvero, A. B., Fu, H. H., Holmberg, J., Visintin, I., Mor, L. et.al. Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors. *Stem Cells* 2009, 10, 2405-2413.
108. Kusumbe, A. P., Mali, A. M., and Bapat, S. A. CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells* 2009, 3, 498-508.
109. Liby, T. A., Spyropoulos, P., Buff, Lindner H., Eldridge, J., Beeson, C. et.al. Akt3 controls vascular endothelial growth factor secretion and angiogenesis in ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2012, 3, 532-543.
110. Su, Y., Zheng, L., Wang, Q., Bao, J., Cai, Z. et.al. The PI3K/Akt pathway upregulates Id1 and integrin alpha4 to enhance recruitment of human ovarian cancer endothelial progenitor cells. *BMC Cancer* 2010, 459-
111. Keyes, K. A., Mann, L., Teicher, B., and Alvarez, E. Site-dependent angiogenic cytokine production in human tumor xenografts. *Cytokine* 2003, 2, 98-104.
112. Li, L., Wang, L., Zhang, W., Tang, B., Zhang, J. et.al. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. *Anticancer Res* 2004, 3b, 1973-1979.
113. Duncan, T. J., Al-Attar, A., Rolland, P., Scott, I. V., Deen, S. et.al. Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? *Clin Cancer Res* 2008, 10, 3030-3035.
114. Byrne, A. T., Ross, L., Holash, J., Nakanishi, M., Hu, L. et.al. Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* 2003, 15, 5721-5728.
115. Nascimento, I., Schaer, R., Lemaire, D., Freire, S., Paule, B. et.al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels as a tool to discriminate between malignant and nonmalignant ascites. *APMIS* 2004, 9, 585-587.
116. Spannuth, W. A., Nick, A. M., Jennings, N. B., Armaiz-Pena, G. N., Mangala, L. S. et.al. Functional significance of VEGFR-2 on ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 2009, 5, 1045-1053.

117. Ghosh, S., Albitar, L., LeBaron, R., Welch, W. R., Samimi, G. et.al. Up-regulation of stromal versican expression in advanced stage serous ovarian cancer. *Gynecol.Oncol* 2010, 1, 114-120.
118. Lin, Y. G., Han, L. Y., Kamat, A. A., Merritt, W. M., Landen, C. N. et.al. EphA2 overexpression is associated with angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer* 2007, 2, 332-340.
119. Hagemann, T., Robinson, S. C., Thompson, R. G., Charles, K., Kulbe, H. et.al. Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression, and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2007, 7, 1993-2002.
120. Yabushita, H., Shimazu, M., Noguchi, M., Kishida, T., Narumiya, H. et.al. Vascular endothelial growth factor activating matrix metalloproteinase in ascitic fluid during peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2003, 1, 89-95.
121. Belotti, D., Calcagno, C., Garofalo, A., Caronia, D., Riccardi, E. et.al. Vascular endothelial growth factor stimulates organ-specific host matrix metalloproteinase-9 expression and ovarian cancer invasion. *Mol Cancer Res* 2008, 4, 525-534.
122. Sood, A. K., Seftor, E. A., Fletcher, M. S., Gardner, L. M., Heidger, P. M. et.al. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001, 4, 1279-1288.
123. Wang, L., Madigan, M. C., Chen, H., Liu, F., Patterson, K. I. et.al. Expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in advanced epithelial ovarian cancer patients. *Gynecol.Oncol* 2009, 2, 265-272.
124. Agarwal, A., Tressel, S. L., Kaimal, R., Balla, M., Lam, F. H. et.al. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer Res* 2010, 14, 5880-5890.
125. Sonoda, T., Kobayashi, H., Kaku, T., Hirakawa, T., and Nakano, H. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2003, 2, 229-237.
126. Keyes, K. A., Mann, L., Teicher, B., and Alvarez, E. Site-dependent angiogenic cytokine production in human tumor xenografts. *Cytokine* 2003, 2, 98-104.
127. Sonoda, T., Kobayashi, H., Kaku, T., Hirakawa, T., and Nakano, H. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2003, 2, 229-237.
128. Zhang, Y., Tang, H., Cai, J., Zhang, T., Guo, J. et.al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett.* 2011, 1, 47-55.
129. Castells, M., Thibault, B., Mery, E., Golzio, M., Pasquet, M. et.al. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* 2012, 1, 59-68.
130. Jeon, E. S., Heo, S. C., Lee, I. H., Choi, Y. J., Park, J. H. et.al. Ovarian cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates secretion of VEGF and stromal cell-derived factor-1 alpha from human mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med* 2010, 4, 280-293.

131. Schmitt, J. and Matei, D. Targeting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Treat.Rev* 2012, 4, 272-283.
132. Burger, R. A., Brady, M. F., Bookman, M. A., Fleming, G. F., Monk, B. J. et.al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011, 26, 2473-2483.
133. Perren, T. J., Swart, A. M., Pfisterer, J., Ledermann, J. A., Pujade-Lauraine, E. et.al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011, 26, 2484-2496.
134. Yang, G., Rosen, D. G., Zhang, Z., Bast, R. C., Jr., Mills, G. B. et.al. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 44, 16472-16477.
135. Lawrenson, K., Grun, B., Benjamin, E., Jacobs, I. J., Dafou, D. et.al. Senescent fibroblasts promote neoplastic transformation of partially transformed ovarian epithelial cells in a three-dimensional model of early stage ovarian cancer. *Neoplasia*. 2010, 4, 317-325.
136. Noskova, V., Ahmadi, S., Asander, E., and Casslen, B. Ovarian cancer cells stimulate uPA gene expression in fibroblastic stromal cells via multiple paracrine and autocrine mechanisms. *Gynecol Oncol* 2009, 1, 121-126.
137. Westerlund, A., Hujanen, E., Puistola, U., and Turpeenniemi-Hujanen, T. Fibroblasts stimulate human ovarian cancer cell invasion and expression of 72-kDa gelatinase A (MMP-2). *Gynecol Oncol* 1997, 1, 76-82.
138. Boyd, R. S. and Balkwill, F. R. MMP-2 release and activation in ovarian carcinoma: the role of fibroblasts. *Br J Cancer* 1999, 3-4, 315-321.
139. Kenny, H. A., Krausz, T., Yamada, S. D., and 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, 7, 1463-1472.
140. Cai, J., Tang, H., Xu, L., Wang, X., Yang, C. et.al. Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis* 2012, 1, 20-29.
141. Xing, F., Saidou, J., and Watabe, K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci*. 2010, 166-179.
142. Cho, J. A., Park, H., Lim, E. H., Kim, K. H., Choi, J. S. et.al. Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol.Oncol* 2011, 2, 379-386.
143. Yao, Q., Qu, X., Yang, Q., Wei, M., and Kong, B. CLIC4 mediates TGF-beta1-induced fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2009, 3, 541-548.
144. Zhang, Y., Tang, H., Cai, J., Zhang, T., Guo, J. et.al. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett*. 2011, 1, 47-55.
145. Lai, D., Ma, L., and Wang, F. Fibroblast activation protein regulates tumor-associated fibroblasts and epithelial ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 2012, 2, 541-550.

146. Cannistra, S. A. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004, 24, 2519-2529.
147. Niedbala, M. J., Crickard, K., and Bernacki, R. J. Interactions of human ovarian tumor cells with human mesothelial cells grown on extracellular matrix. An in vitro model system for studying tumor cell adhesion and invasion. *Exp Cell Res* 1985, 2, 499-513.
148. Lessan, K., Aguiar, D. J., Oegema, T., Siebenson, L., and Skubitz, A. P. CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol.* 1999, 5, 1525-1537.
149. Cannistra, S. A., Kansas, G. S., Niloff, J., DeFranzo, B., Kim, Y. et.al. Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Res* 1993, 16, 3830-3838.
150. Strobel, T., Swanson, L., and Cannistra, S. A. 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, 7, 1228-1232.
151. Yeo, T. K., Nagy, J. A., Yeo, K. T., Dvorak, H. F., and Toole, B. P. Increased hyaluronan at sites of attachment to mesentery by CD44-positive mouse ovarian and breast tumor cells. *Am J Pathol* 1996, 6, 1733-1740.
152. Burleson, K. M., Casey, R. C., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Oegema, T. R., Jr. et.al. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers 4. *Gynecol Oncol* 2004, 1, 170-181.
153. Offner, F. A., Obrist, P., Stadlmann, S., Feichtinger, H., Klingler, P. et.al. IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells 4. *Cytokine.* 1995, 6, 542-547.
154. Cronauer, M. V., Stadlmann, S., Klocker, H., Abendstein, B., Eder, I. E. et.al. Basic fibroblast growth factor synthesis by human peritoneal mesothelial cells: induction by interleukin-1 1. *Am J Pathol.* 1999, 6, 1977-1984.
155. Stadlmann, S., Amberger, A., Pollheimer, J., Gastl, G., Offner, F. A. et.al. Ovarian carcinoma cells and IL-1beta-activated human peritoneal mesothelial cells are possible sources of vascular endothelial growth factor in inflammatory and malignant peritoneal effusions 6. *Gynecol Oncol* 2005, 3, 784-789.
156. Ren, J., Xiao, Y. J., Singh, L. S., Zhao, X., Zhao, Z. et.al. Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells 3. *Cancer Res* 2006, 6, 3006-3014.
157. Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008, 9, 726-736.
158. Jiang, J., Chen, W., Zhuang, R., Song, T., and Li, P. The effect of endostatin mediated by human mesenchymal stem cells on ovarian cancer cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010, 6, 873-881.
159. Jeon, E. S., Moon, H. J., Lee, M. J., Song, H. Y., Kim, Y. M. et.al. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells 3. *Stem Cells* 2008, 3, 789-797.

160. Lis, R., Touboul, C., Mirshahi, P., Ali, F., Mathew, S. et.al. Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12 1. *Int J Cancer* 2010,
161. McLean, K., Gong, Y., Choi, Y., Deng, N., Yang, K. et.al. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* 2011, 8, 3206-3219.
162. Rafii, A., Mirshahi, P., Poupot, M., Faussat, A. M., Simon, A. et.al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours 2. *PLoS.One.* 2008, 12, e3894-
163. Pasquet, M., Golzio, M., Mery, E., Rafii, A., Benabbou, N. et.al. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis 1. *Int J Cancer* 2010, 9, 2090-2101.
164. Castells, M., Thibault, B., Mery, E., Golzio, M., Pasquet, M. et.al. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* 2012,
165. Martinet, L., Poupot, R., Mirshahi, P., Rafii, A., Fournie, J. J. et.al. Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *Int J Cancer* 2010, 9, 2143-2152.
166. Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R. et.al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* 2011, 11, 1498-1503.
167. Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M. et.al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003, 3, 203-213.
168. Fialova, A., Partlova, S., Sojka, L., Hromadkova, H., Brtnicky, T. et.al. Dynamics of T-cell infiltration during the course of ovarian cancer: The gradual shift from a Th17 effector cell response to a predominant infiltration by regulatory T-cells. *Int J Cancer* 2012,
169. Milne, K., Alexander, C., Webb, J. R., Sun, W., Dillon, K. et.al. Absolute lymphocyte count is associated with survival in ovarian cancer independent of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Transl.Med* 2012, 33-
170. Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P. et.al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2005, 12, 5020-5026.
171. Curiel, T. J., Cheng, P., Mottram, P., Alvarez, X., Moons, L. et.al. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2004, 16, 5535-5538.
172. Huarte, E., Cubillos-Ruiz, J. R., Nesbeth, Y. C., Scarlett, U. K., Martinez, D. G. et.al. Depletion of dendritic cells delays ovarian cancer progression by boosting antitumor immunity. *Cancer Res* 2008, 18, 7684-7691.
173. Labidi-Galy, S. I., Sisirak, V., Meeus, P., Gobert, M., Treilleux, I. et.al. Quantitative and functional alterations of plasmacytoid dendritic cells contribute to immune tolerance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2011, 16, 5423-5434.
174. Labidi-Galy, S. I., Treilleux, I., Goddard-Leon, S., Combes, J. D., Blay, J. Y. et.al. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *Oncoimmunology.* 2012, 3, 380-382.

175. Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H. et.al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A* 2005, 51, 18538-18543.
176. Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y. et.al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A* 2007, 9, 3360-3365.
177. Lai, D., Wang, F., Chen, Y., Wang, C., Liu, S. et.al. Human ovarian cancer stem-like cells can be efficiently killed by gammadelta T lymphocytes. *Cancer Immunol.Immunother.* 2011,
178. Peng, D. J., Liu, R., and Zou, W. Regulatory T cells in human ovarian cancer. *J Oncol* 2012, 345164-
179. Alvero, A. B., Montagna, M. K., Craveiro, V., Liu, L., and Mor, G. Distinct Subpopulations of Epithelial Ovarian Cancer Cells Can Differentially Induce Macrophages and T Regulatory Cells Toward a Pro-Tumor Phenotype. *Am J Reprod.Immunol.* 2011,
180. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P. et.al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004, 9, 942-949.
181. DeNardo, D. G., Barreto, J. B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D. et.al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 2009, 2, 91-102.
182. Gavalas, N. G., Karadimou, A., Dimopoulos, M. A., and Bamias, A. Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization. *Clin Dev.Immunol.* 2010, 791603-
183. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008, 7198, 1051-1057.
184. Miyahara, Y., Odunsi, K., Chen, W., Peng, G., Matsuzaki, J. et.al. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A* 2008, 40, 15505-15510.
185. Leveque, L., Deknuydt, F., Bioley, G., Old, L. J., Matsuzaki, J. et.al. Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4+ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells. *J Immunother.* 2009, 2, 101-108.
186. Lan, C., Huang, X., Lin, S., Huang, H., Cai, Q. et.al. High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Cell Tissue Res.* 2013,
187. Biswas, S. K., Sica, A., and Lewis, C. E. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol.* 2008, 4, 2011-2017.
188. Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N. F. et.al. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol.* 2006, 8, 5023-5032.

189. Robinson-Smith, T. M., Isaacsohn, I., Mercer, C. A., Zhou, M., Van, Rooijen N. et.al. Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer Res* 2007, 12, 5708-5716.
190. Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M. P., Grimaud, L. et.al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007, 13, 4319-4330.
191. Kryczek, I., Zou, L., Rodriguez, P., Zhu, G., Wei, S. et.al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* 2006, 4, 871-881.
192. Kryczek, I., Wei, S., Zhu, G., Myers, L., Mottram, P. et.al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007, 18, 8900-8905.
193. Fridlender, Z. G. and Albelda, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 2012, 5, 949-955.
194. Piccard, H., Muschel, R. J., and Opdenakker, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012, 3, 296-309.
195. Gonzalez, Martin A., Bratos, R., Marquez, R., Alonso, S., and Chiva, L. Bevacizumab as front-line treatment for newly diagnosed epithelial cancer. *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 2013, 2, 123-129.
196. Banerjee, S. and Kaye, S. B. New Strategies in the treatment of ovarian cancer -current clinical perspectives and future potential. *Clin.Cancer Res.* 2013,