



**Investigation des mécanismes moléculaires de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) modulée par l'expression de LY75 dans la dissémination et la réponse au traitement du cancer épithélial ovarien (CEO)**

**Thèse**

**Sadia Mehdi**

**Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire**

Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Sadia Mehdi, 2020

## Résumé

De plus en plus d'études démontrent que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) joue un rôle important dans la progression et les métastases du cancer épithélial de l'ovaire (CEO); cependant, les mécanismes moléculaires de cette transition restent mal définis. Nous avons précédemment montré que le récepteur d'antigène LY75 peut moduler le phénotype des cellules du CEO ainsi que leur potentiel métastatique. En effet, la suppression de LY75 dirigeait la transition mésenchymato-épithéliale (MET) des cellules du CEO avec un phénotype mésenchymateux entraînant une colonisation accrue des cellules tumorales et une croissance métastatique *in vivo* lors de l'utilisation d'un modèle animal de xénogreffe intrapéritonéale (IP). Nous avons utilisé l'EMT modulée par LY75 comme modèle pour étudier les changements de méthylation de l'ADN des cellules du CEO subissant l'EMT, en ayant recours à la méthodologie de séquençage au bisulfite à représentation réduite (RRBS). Les résultats obtenus montrent que de nombreux gènes ont présenté des altérations dans leur profil de méthylation de l'ADN liées à l'EMT spécialement dans leur région du promoteur/1<sup>er</sup> exon. Parmi ces gènes, dix gènes ont été sélectionnés pour validation par des méthodes alternatives de ces altérations observées dans la méthylation de l'ADN. Certains de ces gènes pourraient représenter de nouveaux biomarqueurs et/ou des cibles thérapeutiques dans le CEO. De plus, nos données de méthylation impliquent fortement et de manière prédominante la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les variations de méthylation de l'ADN induites par l'EMT dans les cellules du CEO. Des vérifications plus profondes, notamment la perturbation de l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules du CEO avec un inhibiteur spécifique et l'identification des partenaires d'interaction de LY75 par une approche protéomique, ont montré l'implication directe du récepteur LY75 dans la modulation de la signalisation Wnt / $\beta$ -caténine dans les cellules du CEO.

Dans un autre volet de l'étude visant la compréhension du rôle de l'EMT dans les métastases et la résistance aux traitements du CEO, nous avons utilisé le même modèle de l'EMT modulé par l'expression de LY75 pour étudier *in vivo* le rôle spécifique des cellules du CEO avec phénotype épithélial (E), mésenchymateux (M) ou phénotype mixte épithélial plus mésenchymateux (E + M), dans l'initiation, la dissémination et la réponse au traitement du CEO, après des injections intra-bursales (IB) de SKOV3-M (contrôle), SKOV3-E

(Ly75KD) et une population mixte de SKOV3-E + SKOV3-M chez les souris immunodéficientes SCID. Le modèle orthotopique IB du CEO a été choisi en raison de ses avantages par rapport aux modèles conventionnels de xénogreffes (exemples d'injections sous-cutanée ou intrapéritonéale des cellules tumorales), car il reproduit le schéma de formation des tumeurs dans le site primaire et permet aux cellules tumorales d'interagir avec le microenvironnement approprié.

Nous avons constaté que les cellules SKOV3-E injectées par voie IB présentaient un potentiel métastatique et une résistance au traitement considérablement plus élevés que les cellules SKOV3-M, en raison de l'acquisition des caractéristiques des cellules souches et d'un phénotype hybride médié par Ly75KD. Nous avons également confirmé *in vivo* que l'absence de LY75 dirige la suppression de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules du CEO, suggérant un rôle protecteur de cette voie dans l'étiologie du CEO. De plus, nos données soulèvent des inquiétudes sur l'utilisation de vaccins en ciblant LY75 pour l'immunothérapie à cellules dendritiques dans le CEO, en raison de la survenue possible d'effets secondaires indésirables.

## Abstract

Growing evidence shows that the epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the progression and metastasis of epithelial ovarian cancer (EOC); however, the molecular mechanisms of this transition remain poorly defined. We have previously shown that the LY75 antigen receptor can modulate the phenotype of EOC cells, as well as their metastatic potential. Indeed, the suppression of LY75 directed the mesenchymal-epithelial transition (MET) of mesenchymal EOC cells, which resulted in enhanced tumor cell colonization and metastatic growth *in vivo*, when using an intraperitoneal (IP) xenograft animal model. We used EMT mediated by modulation of the LY75 expression as a model to study the DNA methylation changes in EOC cells undergoing EMT, using the reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) methodology. Numerous genes have shown alterations in their DNA methylation profile linked to EMT, especially in their promoter/1st exon region. Among these genes, ten genes were further selected for validation of these observed alterations in DNA methylation by alternative methods. Some of these genes could represent new biomarkers and/or therapeutic targets in EOC. In addition, our methylation data were strongly and predominantly indicative of the involvement of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the DNA methylation variations induced by EMT in EOC cells. Additional experiments, including the suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in EOC cells using a specific inhibitor and the identification of LY75 interaction partners by a proteomic approach, have demonstrated the direct implication of the LY75 receptor in the modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in EOC cells.

Consecutively, we used the LY75-mediated modulation of EMT in EOC cells as a model to investigate *in vivo* the specific role of EOC cells with epithelial (E), mesenchymal (M) or mixed epithelial plus mesenchymal (E+M) phenotype in EOC initiation, dissemination and treatment response, following intra-bursal (IB) injections of SKOV3-M (control), SKOV3-E (Ly75KD) and a mixed population of SKOV3-E+M cells in SCID mice. The IB orthotopic EOC model was now chosen due to its advantages over conventional xenograft models (e.g. subcutaneous or intraperitoneal injections of tumor cells), since it reproduces the primary site of tumor formation and enables tumor cells to interact with appropriate microenvironment. We found that IB injected SKOV3-E cells displayed considerably higher metastatic potential and resistance to treatment compared to SKOV3-M cells, mainly due to the acquisition of a

hybrid phenotype mediated by the Ly75KD and gain of stem cells characteristics. We have also confirmed *in vivo* that the LY75 ablation directs the suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in EOC cells, suggesting for a protective role of this pathway in the EOC etiology. Moreover, our data raise concern on the use of LY75-targeted vaccines for dendritic-cell EOC immunotherapy, due to possible occurrence of undesirable side effects.

## Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	vi
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux .....	xiii
Liste des abréviations et acronymes .....	xiv
Remerciements .....	xx
Avant-propos .....	xxii
Introduction .....	1
I. Généralités sur le cancer de l’ovaire .....	1
I.1 Données épidémiologiques .....	1
I.2 : Généralités sur l’ovaire, notions anatomiques .....	2
I.2.1 L’épithélium ovarien de surface .....	3
I.3. Étiologie du cancer de l’ovaire.....	5
I.3.1 Théorie sur la genèse du cancer de l’ovaire .....	5
I.3.2 Facteurs de risques du cancer de l’ovaire.....	7
I.3.2.1 Facteurs génétiques .....	7
I.3.2.2 Facteurs liés à la reproduction.....	8
I.3.2.3 Facteur lié à l’allaitement maternel .....	9
I.3.2.4 Facteurs hormonaux .....	9
I.3.2.5 Facteurs inflammatoires .....	10
I.3.2.6 Facteurs chirurgicaux .....	11
I.3.2.7 Facteurs liés au mode de vie.....	11
Obésité.....	11
Diète et nutriments .....	11
Exercice et activité physique.....	12
Tabac et cigarette .....	13
I.3.2.8 Facteurs liés à la distribution géographique .....	13
I.4 Classification des tumeurs ovariennes .....	13
I.4.1 Classification de l’OMS .....	14
I.4.2 La classification FIGO .....	15
I.4.3 Les grades du cancer de l’ovaire : Classification de Silverberg.....	17
I.4.4 Les types histologiques du CEO .....	17
I.4.4.1 Les carcinomes du type I.....	19
I.4.4.1.1 Les carcinomes endométrioides et les carcinomes à cellules claires .....	19
I.4.4.1.2 Les carcinomes mucineux .....	19
I.4.4.1.3 Les tumeurs séreuses de bas-grade (LGSC).....	20
I.4.4.2 Les carcinomes du type II .....	20
I.5 Diagnostic .....	21
I.5.1 Diagnostic basé sur les symptômes .....	21
I.5.2 Diagnostic basé sur l’imagerie .....	22
I.5.3 Diagnostic basé sur les biomarqueurs .....	22
I.5.3.1 Le CA125.....	22
I.5.3.2 HE4.....	23
I.5.3.3 OVX1 .....	23
I.5.3.4 Mésothéline .....	24

1.5.3.5 Autres marqueurs.....	24
I.6 Les traitements du cancer de l’ovaire.....	25
I.6.1 La chirurgie .....	25
I.6.2 La chimiothérapie.....	26
I.6.2.1 Activité anti-cancer du cisplatine et carboplatine .....	26
I.6.2.2 Activité anti-cancer des taxanes (paclitaxel et docétaxel).....	27
I.6.3 Les thérapies ciblées.....	29
I.6.4 L’immunothérapie active .....	30
I.6.4.1 L’immunothérapie cellulaire adoptive .....	30
I.6.4.2 Utilisation des inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire ..	33
I.6.5 L’hormonothérapie dans le traitement du CEO.....	34
I.6.6. Recours à la nanotechnologie dans le traitement du cancer de l’ovaire.....	35
I.7. L’épigénétique dans le cancer de l’ovaire.....	36
I.8 Les modèles animaux dans le cancer de l’ovaire .....	41
I.8.1 Les modèles orthotopiques du CEO avec lignées cellulaires cancéreuses.....	41
I.8.2 Les modèles des xénogreffes dérivées de patients (PDX) dans le CEO .....	42
I.8.3 Les modèles des xénogreffes humanisés.....	44
I.9 Méthodes de suivi de la croissance et de dissémination tumorale <i>in vivo</i> .....	45
II. La transition épithélio-mésenchymateuse.....	49
(EMT: <i>Epithelial to Mesenchymal Transition</i> ) .....	49
II.1 L’adhésion cellulaire.....	49
II.2 Principales étapes de l’EMT .....	51
II.3 Les différents types de l’EMT .....	52
II.3.1 L’EMT de type 1 .....	52
II.3.2 L’EMT de type 2.....	53
II.3.3 L’EMT de type 3.....	53
II.3.4 La plasticité phénotypique durant l’EMT : notion de l’EMT hybride.....	54
II.4 Biomarqueurs de l’EMT .....	56
II.5 Processus cellulaires conduisant à l’EMT .....	58
II.5.1 Les facteurs de transcription et activateurs de l’EMT .....	58
II.5.2 Les voies de signalisation de l’EMT.....	60
II.5.2.1 Voie Notch .....	61
II.5.2.2 Voie TGF- $\beta$ et BMPs ( <i>Bone morphogenetic proteins</i> ) .....	61
II.5.2.3 Voie Wnt/ $\beta$ -caténine .....	62
II.5.2.4 Autres voies inductrices de l’EMT .....	64
II.6 La régulation épigénétique de l’EMT .....	65
II.7 L’EMT dans le cancer épithélial de l’ovaire.....	67
II.7.1 Le modèle de l’EMT médiée par le gène LY75.....	69
III. Problématique et objectifs de l’étude .....	73
III.1 Hypothèse .....	75
III.2 Objectifs.....	75
Préface chapitre 1 .....	77
Chapitre 1 .....	78
LY75 Ablation Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) in Epithelial Ovarian Cancer (EOC) Cells Associated with DNA Methylation Alterations and Suppression of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway.....	78
1.1 Résumé .....	79

1.2 Abstract.....	80
1.3 Introduction.....	81
1.4 Results.....	82
1.4.1 Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) Analysis of Altered DNA Methylation Patterns during LY75-Mediated EMT in SKOV3 Cells; Identification of Novel Genes Displaying EMT-Associated DNA Methylation Variations.....	82
1.4.2 LY75-Mediated EMT Alterations in EOC Cells are Associated with Predominant Epigenetic Regulation of Members of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway ...	86
1.4.3. LY75 Expression Modulates the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activity in EOC Cells .....	88
1.4.4 The Identification of Specific LY75-Interaction Proteins Supports the LY75 Role in Modulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activity .....	90
1.5 Discussion.....	92
1.6 Materials and Methods .....	98
1.6.1 Cell Cultures .....	98
1.6.2 Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) Analysis .....	99
1.6.3 Bisulfite Sequencing PCR (BSP) Analysis.....	99
1.6.4 Short Hairpin RNA (shRNA)- ediated LY75 Knockdown in EOC Cells .....	99
1.6.5 Western Blot Analysis .....	100
1.6.6 Quantitative PCR (qPCR).....	100
1.6.7 Immunoprecipitation and Consecutive Mass Spectrometry (MS) Analysis..	100
1.6.8 Immunofluorescence.....	101
Supplementary Materials .....	102
1.7 Appendix A.....	104
1.8 References.....	107
Préface chapitre 2 .....	114
Chapitre 2 .....	115
LY75 suppression in mesenchymal epithelial ovarian cancer cells generates a stable hybrid EOC cellular phenotype, associated with enhanced tumor initiation, spreading and resistance to treatment in orthotopic xenograft mouse model.....	115
2.1 Résumé .....	116
2.2 Abstract.....	117
2.3. Introduction.....	118
2.4 Results.....	120
2.4.1 Ly75KD SKOV3 cells with epithelial phenotype (SKOV3-E) display enhanced EOC initiation, spread and resistance to treatment in severe combined immunodeficiency (SCID) mice.....	120
2.4.2. SKOV3-E cells display hybrid (E/M) phenotype and cancer stem cells (CSCs) features.....	124
2.5 Discussion.....	129
2.6 Materials and Methods .....	132
2.6.1 Cell Cultures .....	132
2.6.2 Animal experiments.....	133
2.6.3 Statistical Analysis.....	136
2.6.4 Immunohistochemistry (IHC) quantification .....	136
2.6.5 Immunofluorescence (IF) quantification .....	136



2.6.6 Western blot.....	137
2.6.7 Quantitative PCR (qPCR).....	137
2.7 Appendix Tables.....	138
2.8 References.....	140
2.9 Caractérisation du phénomène de résistance au carboplatine des souris injectées par les cellules SKOV3 en EMT (résultats non publiés).....	146
Chapitre 3 .....	148
Discussion générale .....	148
3.1 Profil de méthylation de l'ADN au cours de l'EMT .....	148
3.2 Identification de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine comme voie dominante dans l'EMT médiée par la suppression de LY75 dans le CEO.....	149
3.3 Étude <i>in vivo</i> du potentiel métastatique et de la résistance au traitement des cellules SKOV3 en EMT .....	152
3.4 Caractérisation du phénotype hybride des cellules SKOV3 en EMT.....	153
3.5 Lien entre l'EMT hybride et le caractère souche des cellules cancéreuses .....	154
3.6 Analyse du mécanisme de résistance des cellules hybrides SKOV3-E/M au carboplatine.....	158
Annexes .....	163
Annexe 1 .....	163
Annexe 2 .....	164
Annexe 3 .....	165
Annexe 4.....	166
Annexe 5 .....	167
Annexe 6.....	168
Bibliographie .....	169

## Liste des figures

### I. Généralités sur le cancer de l’ovaire

<b>Figure I. 1 :</b> Représentation des cancers gynécologiques par groupes d’âge. Canada, 2010. ....	2
<b>Figure I. 2 :</b> Localisation anatomique des ovaires. ....	3
<b>Figure I. 3 :</b> Cycle de l’ovulation et rupture de l’EOS. Modifiée de [12]. ....	4
<b>Figure I.4 :</b> Classification des tumeurs du CEO selon FIGO. ....	15
<b>Figure I.5:</b> Représentation schématique de la relation entre la différenciation et l’agressivité tumorale. ....	17
<b>Figure I.6 :</b> Origine des différents types du CEO. ....	18
<b>Figure I.7 :</b> Représentation schématique des différents types du cancer de l’ovaire. ....	21
<b>Figure I.8 :</b> Mécanisme de cytotoxicité du cisplatine/carboplatine dans la cellule cancéreuse. Adaptée de [182]. ....	27
<b>Figure I.9 :</b> Mécanisme de cytotoxicité des taxanes dans la cellule cancéreuse. Adaptée de [182]. ....	28
<b>Figure I.10:</b> Représentation schématique des cellules effectrices de l’immunothérapie adoptive... ..	31
<b>Figure I.11:</b> Illustration de l’approche de l’immunothérapie cellulaire adoptive. ....	32
<b>Figure I. 12 :</b> Représentation schématique de la régulation épigénétique. ....	37
<b>Figure I.13:</b> Méthylation aberrante et cancer. ....	38
<b>Figure I.14 :</b> Représentation schématique des différents modèles animaux utilisés dans le développement de thérapie contre le CEO. ....	45
<b>Figure I.15:</b> Représentation schématique du cycle de bioluminescence de la luciole. ....	47

### II. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT: *Epithelial to Mesenchymal Transition*)

<b>Figure II. 1:</b> Schéma récapitulatif des étapes principales de l’EMT. Modifiée de [289]. ....	52
<b>Figure II. 2:</b> EMT/MET et plasticité cellulaire. ....	54
<b>Figure II. 3:</b> Régulateurs du spectre des cellules cancéreuses durant l’EMT. ....	56
<b>Figure II. 4 :</b> Rôle et régulation des principaux EMT-TF. Modifiée de [333]. ....	60
<b>Figure II.5:</b> Mécanisme d’activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. ....	63
<b>Figure II. 6:</b> Structure du récepteur LY75. ....	72

### Chapitre 1:

#### **LY75 Ablation Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) in Epithelial Ovarian Cancer (EOC) Cells Associated with DNA Methylation Alterations and Suppression of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway**

<b>Figure 1. 1:</b> RRBS analysis of genes displaying common differentially methylated regions (DMRs) in their exons and promoter regions. ....	84
<b>Figure 1. 2 :</b> Validation of methylation status and the corresponding expression levels of the ten RRBS-retained genes in the SKOV3-LY75-related EMT model. ....	85

<b>Figure 1. 3 :</b> Ingenuity pathways analysis (IPA) of the 6666 common hyper- and hypomethylated genes in SKOV3-E cells.....	87
<b>Figure 1. 4 :</b> Representative images of SKOV3-M and OVCAR8-M (parental) cells upon XAV939, SB431542, or DMSO (control) treatment.	
<b>Figure 1. 5 :</b> Identification of LY75 interaction partners. ....	91

## Chapitre 1 : Figures supplémentaires

<b>Supplementary figure 1. S 1:</b> A. Representative phase-contrast images of OVCAR8-M cells (sh-control) and OVCAR8-E cells (LY75-KD clones: sh-63 and sh-64). B. Western blot analysis of the protein expression levels of different EMT markers in OVCAR8-M and OVCAR8-E cells. C. Western blot analysis of the protein expression levels of the ten RRBS-selected genes in OVCAR8-M and OVCAR8-E cells. $\beta$ -actin was used as a loading control.....	86
<b>Supplementary figure 1. S 2 :</b> Immunofluorescence analysis of Axin1, Apc2, $\beta$ -catenin and Ly75 expression and localization in SKOV3-M and SKOV3-E cells. ....	90

## Chapitre 2:

### **LY75 suppression in mesenchymal epithelial ovarian cancer (EOC) cells generates a stable hybrid EOC cellular phenotype, associated with enhanced tumor initiation, spreading and resistance to treatment in orthotopic xenograft mouse EOC model**

<b>Figure 2.1:</b> In vivo examination of tumor initiation, spreading, survival and response to treatment in SCID mice IB-injected with SKOV3-M SKOV3-E and SKOV3-E+M cells. ....	121
<b>Figure 2.2:</b> Analysis of the Wnt/B-catenin pathway status in primary tumor tissue samples of phase 1 mice experimental groups IB-injected with SKOV3-M, SKOV3-E or SKOV3-E+M cells. ....	124
<b>Figure 2.3:</b> Protein expression analysis of different EMT markers in SKOV3-M and SKOV3-E cells. ....	125
<b>Figure 2.4:</b> Protein expression analysis of different EMT markers in tumor tissues extracted from mice IB-injected with SKOV3-M, SKOV3-E and SKOV3-E+M cells. ....	126
<b>Figure 2.5:</b> Gene (mRNA) and protein expression levels of different CSCs markers and hybrid state stability factors in SKOV3-M and SKOV3-E cells, and in tumor tissues extracted from mice IB-injected with SKOV3-M, SKOV3-E and SKOV3-E+M cells. ....	128
<b>Figure 2. 6:</b> Vérification de la résistance au carboplatine des cellules SKOV3 en EMT.....	147

## Annexes

<b>Figure A. 1 :</b> Représentation des gènes dont la région promotrice affiche une méthylation aberrante suite au MET médiée par LY75 dans les cellules SKOV3. ....	163
<b>Figure A. 2 :</b> Illustration du modèle de la régulation du MET et la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par LY75. ....	164
<b>Figure A. 3:</b> Schéma expérimental de l'étude <i>in vivo</i> du rôle de l'EMT dans la dissémination du CEO et la réponse au traitement.....	165
<b>Figure A. 4:</b> Modèle moléculaire hypothétique de la résistance des cellules SKOV3-E/M .....	166
<b>Figure A. 5:</b> Analyse du rôle de LY75 dans d'autres cancers.....	167
<b>Figure A. 6:</b> Analyse par immunofluorescence de la colocalisation nucléolaire de Ly75 et fibrillarin dans les cellules du cancer du sein MDA-231 et les cellules du cancer de poumon H383.....	168

## Liste des tableaux

### I. Généralités sur le cancer de l’ovaire

**Tableau I.1 :** Stadification détaillée précoce et avancée du cancer de l’ovaire selon FIGO, 2018 (Imagyn.org)..... 16

**Tableau I. 2:** Exemples d’altérations de la régulation épigénétique dans le CEO. Modifié de [248] 40

### II. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT: *Epithelial to Mesenchymal Transition*)

**Tableau II.1:** Principales protéines d’adhésions cellulaires..... 50

### Chapitre 1:

#### **LY75 Ablation Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) in Epithelial Ovarian Cancer (EOC) Cells Associated with DNA Methylation Alterations and Suppression of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway**

**Table 1.1:** Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) analysis of altered DNA methylation patterns upon Ly75-mediated epithelial–mesenchymal transition (EMT) variations in SKOV3 cells. .... 83

**Table 1. 2:** Ly75 partners identified by the immunoprecipitation experiments. .... 92

### Chapitre 1 : Appendix

**Table.2. A. 1:** Primers used for quantitative PCR (qPCR)..... 139

## Liste des abréviations et acronymes

A2780S-cis: résistante au cisplatine  
ADN : L'acide désoxyribonucléique  
AGCG2: *ATP-binding cassette, subfamily G, member 2*  
AHNAK: *Neuroblast differentiation-associated protein*  
ALDH1/2: aldéhyde déshydrogénase  
ALK: *activin-like kinase*  
AMC : Agrégats multicellulaires  
APC2: *Adenomatous polyposis coli protein 2*  
ARID1A: *AT-rich interactive domain-containing protein 1A*  
ARN: acide ribonucléique  
ARNm: ARN messenger  
ARNnc: ARN non codant  
ASC/TMS1: *target of methylation-induced silencing/apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*  
ATP: Adénosine triphosphate  
BMI1: B lymphoma mouse Moloney leukemia virus insertion region 1  
BMPs: *Bone morphogenetic proteins*  
BRCA1/2: Breast Cancer 1,2  
BSP : conversion au bisulfite de sodium  
CA125: Le cancer antigène 125  
Ca<sup>2+</sup> : Calcium  
CAMs : molécules d'adhésion cellulaires/*Cellular adhesion molecules*  
CAR : Récepteur d'antigène chimérique /*Chimeric Antigen Receptor*  
Carboplatine : 1,1-cyclobutyldicarboxylate  
CCD (Charge-Coupled Device)  
CD3 : Cluster de différenciation 3  
CD44 : cluster de différenciation  
CDH1 : promoteur de la E-cad  
Cellules E : cellules à phénotype épithélial  
Cellules M : cellules à phénotype mésenchymateux  
CEO : Le cancer épithélial de l'ovaire  
CIK : Cellules tueuses induites par les cytokines  
Cisplatine : cis-diamminedichloroplatinum (II)  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CO-IP: co-immunoprécipitation  
CpG : cytosine précédant une guanine  
CRP: Protéine C-réactive  
CSCs: *cancer stem cells*  
CTCs: *Circulating Tumor Cells*  
CTLA-4 : Antigène 4 associé aux lymphocytes cytotoxiques  
CT-scan: Tomodensitométrie  
DDR2 (*Discoidin Domain Receptor tyrosine kinase 2*).  
DKK: dickkopf  
DNAMT : ADN méthyle transférases  
DSP: desmoplakine  
DVL: Dishevelled  
E-cad: E-cadhérine  
EGF: *Epidermal growth factor*  
EGFR : Facteurs de croissance épidermique

EMT (M/E): EMT hybride  
 EMT : La transition épithélio-mésenchymateuse /Epithelial to Mesenchymal Transition  
 EMT-TF : Facteurs de transcription de l'EMT  
 EOS: L'épithélium ovarien de surface  
 EpCAM : *Epithelial cell adhesion molecules*  
 ERK: *Extracellular signal-regulated kinases*  
 FDA: *Food and Drug Administration*  
 FGF: *Fibroblast growth factor*  
 FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie-Obstétrique  
 FOX: *forkhead box*  
 FSP : Facteurs de stabilité phénotypique  
 FZD: Frizzled  
 GCT : Tumeurs issues des cellules germinales  
 GFP (green fluorescent protein).  
 GRHL2: *Grainyhead Like Transcription Factor 2*  
 GSK-3 $\beta$ : *Glycogene-synthase kinase 3- $\beta$*   
 HIF1 $\alpha$ : *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*  
 HDAC: Histones désacétylases  
 HE4: *Human epididymis gene product*  
 HGF: *Hepatocyte Growth Factor*  
 HGSC : Tumeurs séreuses de haut grade  
 HOTAIR: *HOX transcript antisense RNA*  
 HTS : Hormonothérapie de substitution  
 IB : intrabursale  
 IB: intrabursal  
 Ig : immunoglobuline  
 IHC : d'immunohistochimie  
 IL-2 : l'interleukine -2  
 IL-6: Interleukine 6  
 INF- $\gamma$ : Interféron-gamma  
 IP : Intrapéritonéale  
 IRM : l'imagerie par résonance magnétique  
 IV: intraveineuse  
 JNK: *c-Jun N-terminal kinase*  
 KD: knockdown  
 KDM1A ou LSD1: *Lysine Specific Demethylase 1A*  
 KRAS: *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
 L'ADNg: ADN génomique  
 LAK Cellules tueuses activées par des lymphokines  
 LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse  
 LDL: *Low-Density Lipoprotein*  
 LEF-1: *Lymphoid enhancer-binding factor 1*  
 LGSC : tumeurs séreuses de bas grade  
 lncRNA : long non coding RNA  
 LPR: *LDL-Related Protein*  
 Luc: Luciférase  
 MALAT: *The metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1*  
 MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*  
 M-CSF : Facteur stimulant les colonies de macrophages  
 MDM2: *murine double minute 2*  
 MEC : Matrice Extracellulaire

meDip-seq: *methylation DNA immunoprecipitation*  
 MES : Mésothéline  
 MET : La transition mésenchymato-épithéliale/Mesenchymal to Epithelial Transition  
 Mg<sup>2+</sup> : Magnésium  
 MiR : micro-RNA  
 miR: micro-ARN  
 MLH1: MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2  
 MMPs : métalloprotéines  
 MSH2: *DNA mismatch repair protein Msh2*  
 MSP1 : Enzyme de restriction insensible à la méthylation  
 NF-kB: *nuclear factor-kappa B*  
 NK: Natural killer  
 NKD1: Naked cuticle 1  
 NKG2D (*Natural killer group 2 member D*)  
 NRF2: *Nuclear factor erythroid-derived 2*  
 NSG: NOD scid gamma mouse  
 NY-ESO-1: *New York esophageal squamous cell carcinoma*  
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
 OVOL2: *Ovo like zinc finger 2*)  
 OVX1: *Ovarian cancer antigen 1*  
 P21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1  
 P53 WT : type sauvage de p53  
 p53: *Tumor protein 53*  
 P53mt : forme mutée de p53  
 p53mt: p53 mutée  
 PA-MSHA : *Pseudomonas aeruginosa-mannose-sensitive hemagglutinin*  
 PARP : poly-(adénosine diphosphate-ribose) polymérase  
 PAX2 : *Paired box gene 2*  
 PCI : Points de contrôle immunitaire  
 PCR : *polymerase chain réaction*  
 PCR2 (*polycomb repressive complexe 2*)  
 PD1 : récepteur de mort programmée /*Programmed cell death 1*  
 PDX : xénogreffes dérivées de la tumeur  
 PEG : polyéthylène glycol  
 PET-scan : Tomographie par émission de position  
 PI3K-AKT (*phosphatidylinositol-3-kinase-AKT*)  
 PMS2: Mismatch repair endonuclease PMS2  
 PROM1 : *prominine-1*  
 PSM1: PMS1 protein homolog 1  
 RAS: *Rat sarcoma*  
 RASSF1: *Ras association domain-containing protein 1*  
 RE : Récepteur d'œstrogène  
 ROS : Espèces réactives de l'oxygène mitochondrial  
 RRBS: *Reduced Representation Bisulfite sequencing*  
 RTK: Récepteurs tyrosine Kinase  
 SBT : Tumeur Séreuse Borderline  
 SCID : souris avec une immunodéficiência combinée sévère  
 SCST : Tumeurs du stroma et du cordon sexuel  
 SEER: *Surveillance epidemiology and results programme*  
 SFRP5: *Secretd frizzled-related protein 5*  
 SFRPs: *secreted Frizzled-related proteins*



sh-RNA: *short hairpin RNA*  
si-RNA: *Small Interfering RNA*  
SPTBN1: chaîne de spectrine  
SWI/SNF: *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*  
SWIF/SNF: *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*  
TCF/LEF: *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*  
TCR : Récepteur de l'antigène tumorale/*T cell receptor*  
TDM: Tomodensitométrie  
TGF- $\beta$ : *Transforming growth factor beta*  
TILs : infiltration des tumeurs par les lymphocytes T  
TUG1: *Taurine-upregulated gene 1*  
TUSC7: *Tumor suppressor candidate 7*  
TWIST1: *Twist-related protein 1*  
Ub: Ubiquitination  
USDA: *United States Department of Agriculture*  
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
WIF1: *Wnt inhibitor facteur 1*  
ZEB1: *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*  
ZO-1: Zonula occludens  
 $\alpha$ -SMA: *alpha smooth muscle actin*

*À mes filles, avec tout mon amour et ma tendresse*

*Commencer est facile, persévérer est un art*

## Remerciements

Me voilà arrivée à la fin de ces longues années d'étude, ceci n'aurait été possible sans l'aide et le soutien de plusieurs personnes que je souhaite aujourd'hui remercier du fond du cœur. Tout d'abord je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr Dimcho Bachvarov de m'avoir donné l'occasion de travailler sur ce projet et de m'intégrer dans les activités de son laboratoire. J'ai bien apprécié les longs moments de débats scientifiques. Dr Bachvarov m'a été d'une grande aide tout au long de mon cheminement et m'a bien encadrée pour mener à terme ce projet. Je le remercie aussi particulièrement pour son soutien lors de la rédaction des manuscrits en langue anglaise. Je remercie beaucoup aussi la professionnelle de recherche de notre laboratoire M<sup>me</sup> Magdalena Batchvarova pour son aide précieuse dans le laboratoire et surtout pour les diverses discussions sur la zénitude et le bien-être. J'ai beaucoup appris autant sur le plan professionnel que personnel. Je tiens aussi à remercier la Dre Razan Sheta l'ancienne étudiante du laboratoire qui a facilité mon insertion dans l'équipe. Mes sincères remerciements s'adressent aussi au Dr Arnaud Droit et son assistante Dre Marie-Pier Scot Boyer qui ont grandement facilité le traitement bio-informatique de nos données de méthylation. Un grand merci à notre collaboratrice à Ottawa Dre Barbara Venderhyden et son équipe où se sont déroulées les injections des cellules chez les souris. Un merci chaleureux particulièrement à Elizabeth qui s'est chargée du suivi des tumeurs de la collecte des échantillons et du sacrifice des animaux de l'étude tout en nous gardant informés de l'évolution des expériences. Je remercie au même titre les membres du jury Dre Caroline Diorio, Dre Francine Durocher, Dre Dominique Trudel et Dr Amine Nourani d'avoir accepté d'examiner cette thèse. Un grand

merci pour les membres du comité : Dre Caroline Diorio, Dre Francine Durocher et Dre Josée Lavoie qui ont soutenu Dr Bachvarov dans son encadrement. Merci sincèrement pour vos conseils et suivis tout au long de mon avancement dans ce projet. Plusieurs autres intervenants ont facilité la réalisation de mes expériences, je tiens à nommer l'étudiante au doctorat M<sup>elle</sup> Audrey Champagne et le professionnel de recherche Bertrand Neveu du laboratoire du Dr Frédéric Pouliot, qui m'ont aidé à quantifier l'expression et l'activité de la luciférase. Merci également à Carl Séguin pour son encadrement lors de mon passage en microscopie confocale.

Toute ma reconnaissance va aussi à la communauté scientifique de l'axe oncologie, pour les activités scientifiques enrichissantes organisées qui nous aident à interagir et à mieux s'intégrer.

La réalisation de cette thèse n'aurait pu être possible sans le soutien de ma famille. Merci à ma grande famille qui est à l'autre côté du globe. Ma reconnaissance revient à mes parents qui ont supporté ma longue absence. Merci pour vos encouragements dans les moments de doutes et de découragements, merci pour vos prières. Un merci spécial va à mon mari qui a su absorber mon stress et qui m'a toujours été d'un grand soutien sur plusieurs plans. Pour finir je m'incline devant la patience de mes amours, mes filles chéries Dalia et Amélia qui malgré leur jeune âge arrivent toujours à comprendre et soutenir maman. Elles ont beaucoup grandi avec moi durant cette expérience. J'espère à présent être un modèle de persévérance pour elles.

## Avant-propos

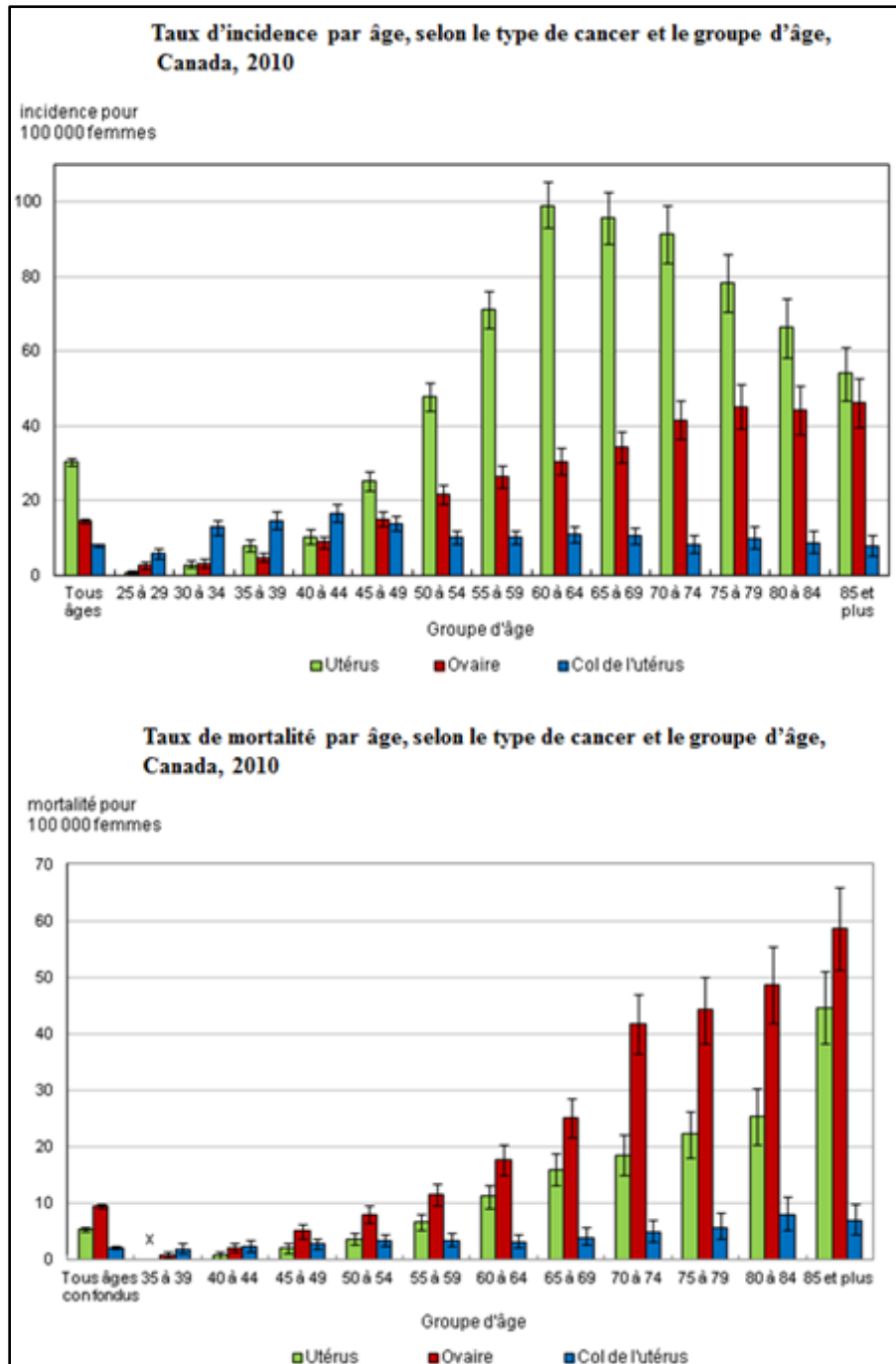
Ce projet de doctorat en biologie moléculaire et cellulaire portant sur l'investigation des mécanismes moléculaires de l'EMT dans la propagation du CEO a été amorcé en juin 2017 sous la direction du Dr Dimcho Bachvarov au sein de son laboratoire au CRCEO (Centre de Recherche Clinique et Évaluative En Oncologie) rattaché au centre de recherche à l'Hôtel-Dieu de Québec. Cette thèse est subdivisée en quatre sections. La première consiste en une introduction qui aborde dans une première partie les généralités sur le CEO, ses différents types, ses facteurs de risque et de prévention ainsi que les méthodes actuelles de son diagnostic et traitements. La deuxième partie de l'introduction porte sur la définition et la caractérisation de l'EMT, ses différents types, sa signalisation, son rôle dans le cancer en général et dans le CEO en particulier. Le lien entre l'EMT et le phénomène de la chimiorésistance est aussi abordé. Cette introduction va découler sur la problématique/hypothèse et les trois objectifs de l'étude. Les résultats du travail expérimental qui s'est étalé sur trois années seront présentés sous forme d'articles scientifiques en deux chapitres distincts. En effet, ce projet a fait l'objet de deux publications. La première traite conjointement le 1<sup>eme</sup> et le 2<sup>eme</sup> objectif. Cet article est publié dans le journal *IJMS (International journal of molecular sciences)* 2020 Mar 7;21(5):1848 [1] dans une issue spéciale sur le rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le cancer. La seconde publication répond au troisième objectif qui porte sur l'étude animale. Cette étude constitue une continuité du premier article. Elle est donc publiée par le même journal *IJMS* 2020 July 15; 21 (14), 4992 suite à leur invitation. À la suite de cet article, les résultats supplémentaires non publiés vont clôturer le chapitre 2. La présente thèse se terminera par un 3<sup>eme</sup> chapitre comprenant une discussion générale des résultats de l'étude.

# Introduction

## I. Généralités sur le cancer de l’ovaire

### I.1 Données épidémiologiques

Le cancer de l’ovaire est un problème majeur de santé publique, car malgré son incidence peu fréquente, il représente la première cause de décès par cancer gynécologique. Selon l’organisation mondiale de la santé (OMS) environ 225 500 cas de cancer de l’ovaire sont diagnostiqués chaque année dont 140 200 décès suite à la maladie. De ce fait le cancer de l’ovaire est classé 7<sup>ème</sup> forme de cancer la plus courante et la 8<sup>ème</sup> cause de décès par cancer des femmes dans le monde [2, 3]. Dans le monde occidental, le cancer de l’ovaire gagne la 5<sup>ème</sup> place de cause de décès la plus fréquente chez la femme [4]. Au Canada, la société canadienne du cancer estime que pour l’année 2020, 3100 canadiennes ont reçu un diagnostic de cancer de l’ovaire dont 1900 femmes sont ou seront décédées. Comme le montre la figure I.1, (Source : statistique Canada : <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/ovarian/statistics>), les taux d’incidence et de mortalité reliés à la maladie augmentent avec l’âge. Cependant, bien que l’incidence du cancer de l’ovaire soit plus faible par comparaison aux autres cancers gynécologiques, le taux de mortalité est plus élevé dans le cas du cancer de l’ovaire. Ce taux passe d’environ 3 pour 100 000 femmes entre 40 et 44 ans à plus de 40 pour 100 000 femmes au-delà de 74 ans (figure I.1). La survie globale des patientes à 5 ans est près de 40% [5]. Cette survie à 5 ans est restée inchangée depuis 1980 [6]. Selon les chiffres les plus récents rapportés par l’institut national sur le cancer SEER (*surveillance epidemiology and results programme*) pour les années comprises entre 2009-2015, le taux de survie actuel à 5 ans aux états Unis d’Amérique (USA) est d’environ 47,6% (source : <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>, consulté le 17 janvier 2020). Ce sombre pronostic s’explique à la fois par la découverte tardive de la maladie et par le développement d’une chimiorésistance au cours du traitement. Dans la majorité des cas, le diagnostic est posé à un stade avancé de la diffusion péritonéale et l’expression symptomatique banale des cancers ovariens (troubles digestifs, urinaires ou gynécologiques) explique la fréquence des diagnostics tardifs [7].



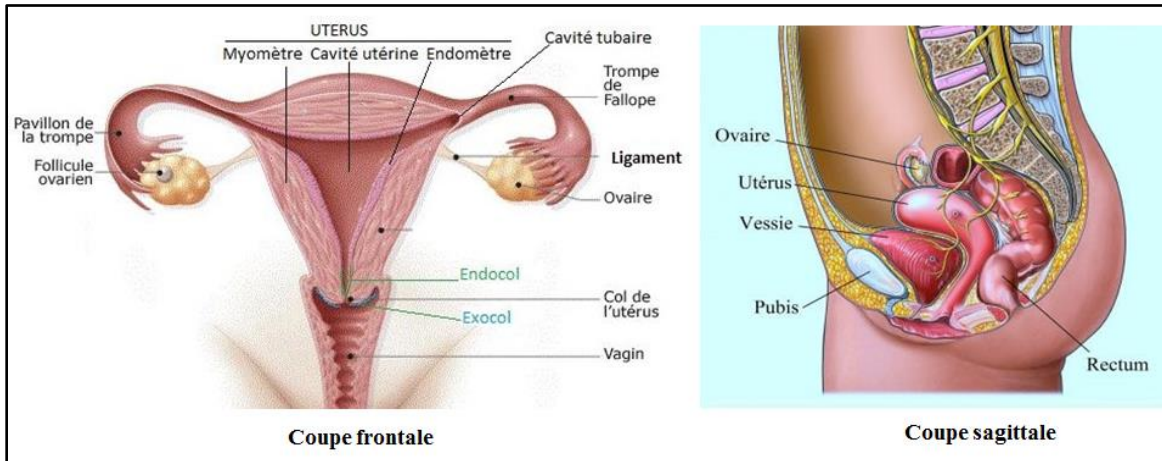
**Figure I. 1:** Représentation des cancers gynécologiques par groupes d'âge. Canada, 2010.

## I.2 : Généralités sur l'ovaire, notions anatomiques

Les ovaires, au nombre de deux, sont situés dans la cavité péritonéale pelvienne, de chaque côté de l'utérus (Figure I.2). Ils sont ovoïdes, aplatis et mesurent environ 4 cm de longueur,



2 cm de largeur et 1 cm d'épaisseur [8]. La localisation des ovaires au sein de la cavité péritonéale et la continuité entre le péritoine et l'épithélium ovarien de surface sont des éléments physiopathologiques importants car toute cellule de la surface, notamment cancéreuse, est susceptible de s'exfolier et de disséminer dans la cavité péritonéale [9].



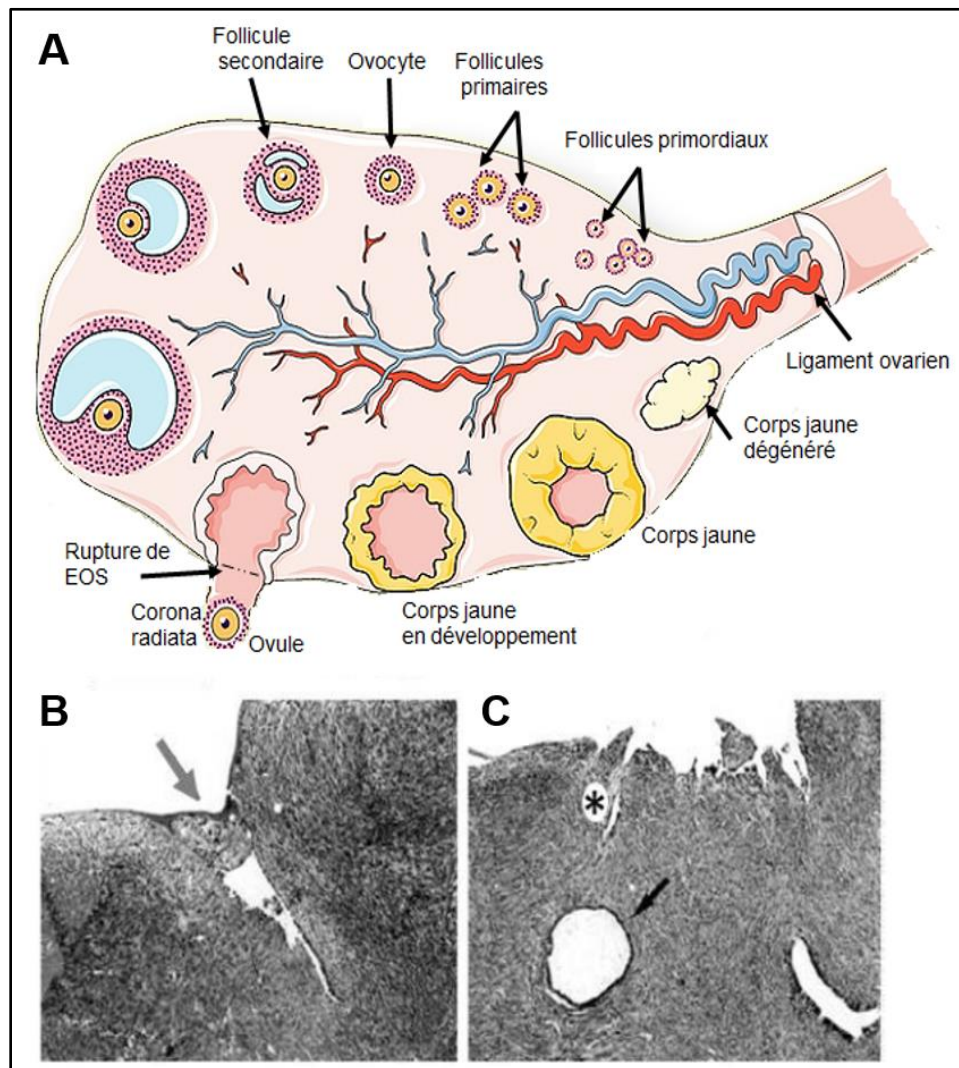
**Figure I. 2 :** Localisation anatomique des ovaires.

### I.2.1 L'épithélium ovarien de surface

L'épithélium ovarien de surface (EOS), appelé aussi mésothorium ovarien [10], constitue l'épithélium recouvrant les ovaires en continuité du mésothorium péritonéal [11]. Chez les femmes adultes, l'EOS est constitué d'une monocouche de cellules squameuses cubiques caractérisées par l'expression de certaines cytokératines. L'EOS est séparé du stroma ovarien sous-jacent par la lame basale et par une couche tissulaire dense riche en collagène appelée : *tunica albuginea* responsable de la couleur blanche des ovaires. Cet épithélium se différencie du péritoine par l'expression de la mucine et des enzymes de types hydroxystéroïdes déshydrogénases. De plus, les cellules de l'EOS, contrairement aux cellules épithéliales du péritoine, possèdent des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone. Les cellules épithéliales de l'EOS sont faiblement ancrées à la matrice extracellulaire (MEC) et présentent peu de contacts entre elles. En effet, l'intégrité de l'épithélium repose sur de simples interactions desmosomales, des jonctions serrées partielles impliquant plusieurs intégrines et cadhérines. Il faut noter aussi que ces cellules prolifèrent peu. Combinées, ces caractéristiques forment un environnement adéquat pour maintenir les cellules isolées et dans un état quiescent. Ces conditions sont idéales pour une population de cellules souches. De ce fait, les cellules de l'EOS expriment des marqueurs de cellules souches et sont capables de

se différencier en un phénotype fibroblastique ou épithélial en fonction de leur microenvironnement [5].

L'EOS intervient lors du développement et de la rupture folliculaire conduisant ainsi à la libération des ovocytes (Figure I.3). En effet, lors de l'ovulation, l'EOS subit une déchirure sous l'action des protéases sécrétées. Un processus de cicatrisation est ensuite mis en place entraînant la prolifération des cellules épithéliales afin de restaurer la continuité de l'EOS. L'ancien follicule peut évoluer en kyste d'inclusion dans le stroma et être à l'origine d'une division cellulaire pouvant subir une transformation néoplasique [12].



**Figure I. 3 :** Cycle de l'ovulation et rupture de l'EOS. Modifiée de [12].

A) Schéma de la maturation et la libération de l'ovule. B) La déformation de l'EOS est indiquée par la flèche grise. La réparation de l'EOS, suite à la libération de l'ovule, mène à la formation d'invagination (\*) et de kystes d'inclusion (flèche noire en C). Grossissement original x25.

### **I.3. Étiologie du cancer de l'ovaire**

De nos jours, l'étiologie du cancer de l'ovaire reste encore ambiguë. Ceci est dû en partie à la localisation intra-abdominale de l'ovaire mais aussi à la prépondérance de la maladie à des stades avancés lors de la mise en évidence de ce type de cancer. De ce fait, il est difficile de caractériser les modifications qu'a subies l'EOS et qui seraient compatibles avec la néoplasie intraépithéliale [13]. Ainsi, peu d'informations sur les événements moléculaires et génétiques précoces associés à la carcinogenèse ovarienne sont recueillies.

#### **I.3.1 Théorie sur la genèse du cancer de l'ovaire**

La cellule d'origine qui déclenche le cancer de l'ovaire n'est pas encore définie de manière concluante. À ce propos, une des hypothèses courantes mais non prouvées est que le cancer de l'ovaire émergerait de cellules kystiques de l'EOS nichées dans le stroma en contact des facteurs de croissance. Plusieurs études soutiennent en effet cette hypothèse. À titre d'exemple, la prise de pilule contraceptive orale constitue un agent préventif du cancer de l'ovaire en activant des voies moléculaires de prévention de la maladie dans les cellules de l'EOS entre autres via l'apoptose [14, 15]. Une autre étude a mis en évidence une corrélation entre les modifications histologiques dysplasiques et la perte des mécanismes suppressifs de tumeurs dans l'EOS des ovaires à haut risque [16]. Il a été observé aussi que chez plusieurs patientes présentant des cancers précoces, l'EOS passe d'une condition non maligne à une condition maligne [17].

D'autres études abordent « l'hypothèse de l'ovulation » comme phénomène potentiel derrière l'avènement du cancer de l'ovaire. Ainsi les perturbations répétitives que subit l'épithélium lors de l'ovulation entre déchirure et réparation peuvent conduire à l'acquisition de lésions géniques dans les cellules épithéliales ovariennes et donc à un cancer de l'ovaire chez les personnes sensibles [18, 19]. Cette théorie est soutenue par plusieurs études épidémiologiques qui justifient le lien entre l'ovulation et la genèse du cancer de l'ovaire. Notamment, il a été démontré que la prise de pilules contraceptives de même que les grossesses multiples protègeraient du cancer de l'ovaire en réduisant l'avènement de l'ovulation [20-22]. Dans le même ordre d'idée, la nulliparité et l'infertilité augmenteraient le risque du cancer de l'ovaire en lien avec le nombre de cycles ovulatoires et leurs perturbations associées entre déchirure et réparation de l'épithélium ovarien comme observé

chez les poules avicoles. Il est donc fort probable que cet épithélium soit prédisposé aux altérations de *p53* (*Tumor protein 53*) ce qui conduirait à une réparation aberrante de l'ADN et donc à une plus grande susceptibilité au cancer de l'ovaire [23, 24]. Le CEO peut aussi émerger à partir des cellules souches et des organes avoisinants. Le mécanisme rapide et robuste impliqué lors de la réparation de la surface de l'ovaire suggère la présence de cellules souches. Les cellules souches ont été décrites comme de parfaites candidates pour induire un cancer dans des tissus épithéliaux et ceci pourrait s'appliquer au cancer de l'ovaire. En effet, les cellules de l'EOS expriment différents marqueurs de cellules souches tels que *NANOG* (*Nanog Homeobox*) et le cluster de différenciation 44 (CD44). Certains de ces marqueurs sont localisés au site d'ovulation suggérant ainsi un possible rôle des cellules souches dans la cicatrisation de la surface épithéliale après l'ovulation [25]. De plus, il est connu ces dernières années que les CEOs expriment aussi les marqueurs de cellules souches qui seraient derrière le phénomène de résistance au traitement [26]. Cependant aucune de ces précédentes hypothèses ne peut expliquer à elle seule complètement les différents types de cancers de l'ovaire. La genèse du cancer de l'ovaire est un processus multifactoriel impliquant un jeu complexe d'évènements biologiques liés à l'ovulation, aux facteurs hormonaux et à l'inflammation. Ces facteurs de risque du CEO seront discutés dans la section 1.3.2. Une autre hypothèse quant à la genèse du cancer de l'ovaire, stipule que la maladie aurait pour origine des cellules de la trompe de Fallope [27-29]. Cette récente hypothèse est soutenue par différentes découvertes qui montrent que la plupart des cancers de l'ovaire ont une histologie similaire à celle de la trompe de Fallope. En outre, le risque du cancer de la trompe de Fallope est nettement plus élevé chez les patientes présentant une prédisposition génétique pour le cancer de l'ovaire [29]. De plus, les patientes atteintes de carcinomes pelviens séreux sont susceptibles de développer des cancers des trompes de Fallope avec les mêmes lésions et altérations de la protéine *p53* tel qu'observé dans les pelvis [30, 31]. Les deux trompes de Fallope sont situées entre les ovaires et l'utérus. Elles sont positionnées de façon symétrique par rapport à la ligne médiane. Chaque trompe de Fallope débute de la partie supérieure et latérale de l'utérus et se prolonge jusqu'à l'ovaire situé du même côté. Chaque trompe de Fallope est divisée en quatre sections. Le segment utérin assure une connexion résistante avec l'utérus. L'isthme constitue la zone suivante reliant la partie utérine à l'ampoule et l'ampoule représente la partie la plus volumineuse. La trompe de Fallope se

termine par le pavillon formé comme un entonnoir au-dessus de l'ovaire et doté de franges pour la réception de l'ovule [32]. Des études plus approfondies ont montré que les femmes porteuses de mutations dans les gènes *BRCA1/2* (*breast cancer 1/2* : gène de prédisposition au cancer du sein) sont également sujettes au cancer des trompes de Fallope en plus du risque pour le cancer du sein et le CEO [33-35]. Par conséquent il est fortement suggéré aux femmes porteuses de ces mutations délétères d'opter pour une chirurgie prophylactique consistant en une ablation des ovaires et des trompes de Fallope afin de réduire leur risque de développer un cancer [36, 37]. L'analyse des trompes de Fallope enlevées par chirurgie des femmes à risque de développer un CEO et porteuses de *BRCA1* a montré que la moitié des femmes présentaient des changements préneoplasiques dans l'épithélium des trompes de Fallope [38]. En revanche, peu d'anomalies ont été trouvées dans les ovaires retirés de façon préventive des femmes porteuses de mutations dans *BRCA1* [39]. Les examens histopathologiques plus approfondis réalisés sur les ovaires et les trompes de Fallope extraits des femmes à risque de manière prophylactique ont permis la découverte des lésions pré-malignes potentielles dans le pavillon des trompes de Fallope qui seraient à l'origine des CEO de type séreux et de haut grade [40-42].

### **I.3.2 Facteurs de risques du cancer de l'ovaire**

Le premier facteur de risque du CEO demeure l'âge. L'âge moyen du diagnostic du cancer de l'ovaire se situe après la ménopause entre 60 et 64 ans. Chez les jeunes femmes (moins de 45 ans), l'incidence est plus faible [43]. Néanmoins, d'autres facteurs de risques sont incriminés dans la genèse du CEO.

#### **I.3.2.1 Facteurs génétiques**

Il a été rapporté que le cancer de l'ovaire peut avoir une origine héréditaire. En effet, les antécédents familiaux du cancer de l'ovaire en particulier chez les personnes dont la parenté est du 1<sup>er</sup> ou 2<sup>eme</sup> degré constituent l'un des facteurs de risque les plus significatifs et ce par comparaison aux femmes qui n'ont pas de cancer de l'ovaire dans la famille [44]. De plus, la découverte des gènes de susceptibilité au cancer, *BRCA1* et *BRCA2*, confirme l'hypothèse que le cancer de l'ovaire pourrait apparaître chez les femmes prédisposées génétiquement. À cet effet, on estime qu'environ 10 à 12% des femmes diagnostiquées avec un cancer de

l'ovaire portent des mutations germinales dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* [45]. L'étude de J M Schildkraut *et al*, (1989) a rapporté une corrélation très significative entre le cancer du sein et le cancer de l'ovaire en incriminant les mutations dans les gènes *BRCA1/2* [46]. Les gènes *BRCA*s sont des suppresseurs de tumeur qui jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome. Ces gènes participent à la réparation des cassures double-brin de l'ADN, au contrôle du cycle cellulaire et veillent à la bonne ségrégation des chromosomes. La perte d'expression de ces gènes ou la présence de mutations germinales conduisent à une instabilité génomique et à la tumorigenèse [47].

En plus des gènes *BRCA*s, environ 2 à 3 % de risque supplémentaire proviendrait de familles atteintes d'un cancer colorectal héréditaire sans polypose ou du syndrome de Lynch. Ces familles portent des mutations dans les gènes de réparation de l'ADN et présentent un risque de 10% à 13% de développer un cancer de l'ovaire au cours de leur vie [48, 49]. En effet, ces personnes présentent des mutations dans les gènes *MSH2* (*DNA mismatch repair protein Msh2*), *MLH1* (*MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2*), *PSM1* (*PMS1 protein homolog 1*) et *PMS2* (*mismatch repair endonuclease*), gènes impliqués dans la réparation des mésappariements d'ADN en lien aussi avec l'instabilité génomique et le risque de développer un cancer [50].

### **I.3.2.2 Facteurs liés à la reproduction**

Il a été rapporté dans des études de cas-témoins que la grossesse réduit le risque du cancer de l'ovaire d'un tiers (1/3) et ce risque diminue davantage avec des grossesses multiples [51, 52]. En outre, une première grossesse tardive est plus protectrice contre le CEO qu'une première grossesse à un jeune âge. En effet, une première grossesse après 35 ans protège deux fois plus contre le cancer de l'ovaire qu'une première grossesse avant 25 ans. Cette constatation est une preuve que les mécanismes de protection contre le cancer de l'ovaire induit par la grossesse vont au-delà de l'anovulation [53]. Il est en effet suggéré que lors de la grossesse, l'apoptose pourrait s'activer par les hormones de grossesses via un mécanisme de protection sous-jacent pour éliminer les cellules pré-malignes ou endommagées de l'EOS [54].

Si la multiparité protège contre le cancer de l'ovaire, la nulliparité et l'infertilité sont associées à un facteur de risque multiplié par deux. De plus, il existe une forte corrélation

entre l'usage de drogues pour stimuler l'ovulation et la genèse d'un cancer épithélial de l'ovaire [55, 56].

Cependant, les femmes fertiles qui sont traitées pour être infertiles bénéficient d'une protection contre le cancer de l'ovaire. En effet, dans de nombreuses études de cas-témoins à travers le temps, l'usage de la pilule contraceptive orale montre une protection contre le cancer de l'ovaire qui peut durer jusqu'à 20 ans après la dernière utilisation [20, 57, 58]. Ces données sont similaires à la protection conférée par la parité ce qui nous laisse suggérer que la pilule contraceptive et la parité partagent un même mécanisme de défense contre le cancer de l'ovaire probablement via l'avènement de l'ovulation en réduisant le nombre de cycles ovulatoires.

### **I.3.2.3 Facteur lié à l'allaitement maternel**

Bien que les résultats des études publiées ne concordent pas, elles tendent à montrer que l'allaitement réduit le risque du cancer de l'ovaire. L'étude de Danforth *et al* (2007) s'est concentrée sur l'impact de l'effet de l'allaitement au sein sur le risque du cancer de l'ovaire indépendamment de la parité. La durée médiane de l'allaitement était de 9 mois. Par comparaison aux femmes non allaitantes, l'allaitement n'a aucun effet significatif [59]. Cependant, les femmes qui ont allaité 18 mois ou plus présentent une diminution significative de 34% du risque de développer un cancer de l'ovaire par rapport aux femmes qui n'ont jamais allaité. Néanmoins, Cet effet protecteur n'augmente pas avec le nombre de bébés allaités [60]. Dans une autre étude, Jordan *et al* (2010) rapportent une timide diminution du risque de 2 % suite à l'allaitement. Cependant, cet effet protecteur ne se manifeste pas contre les cancers de l'ovaire de type séreux, mucineux ou borderline mais est maintenu contre les autres sous-types histologiques du cancer de l'ovaire [61]. Les différents types histologiques du CEO seront abordés dans la section I.4.4.

### **I.3.2.4 Facteurs hormonaux**

L'épithélium ovarien de surface normal exprime naturellement des récepteurs pour plusieurs membres de la superfamille des hormones stéroïdiennes notamment les œstrogènes, les progestatifs, les rétinoïdes, la vitamine D et les androgènes. De plus, l'EOS contient des récepteurs pour les gonadotrophines et peut impliquer une signalisation non-hormonale de la

voie des cyclooxygénases par exemple. Dans cet ordre d'idée, il est tout à fait possible que des facteurs environnementaux et reproductifs aient une incidence sur le risque du cancer de l'ovaire via les interactions biologiques des agents hormonaux et non hormonaux avec l'EOS. À titre d'exemple, il a été rapporté que les effets apoptotiques induits par les progestatifs confèrent une protection contre le cancer de l'ovaire. Cet effet est notamment observé lors de l'usage de pilules contraceptives et lors de la grossesse où le niveau de la progestérone est très élevé [14]. Il a été suggéré que l'apoptose est donc un moyen de défense contre le cancer de l'ovaire induit par la progestérone via entre autre la modulation du niveau de TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) [15]. Les hormones de types œstrogènes et androgènes quant à elle stimulent l'épithélium ovarien augmentant ainsi le risque de la maladie [62].

### **I.3.2.5 Facteurs inflammatoires**

Parmi les premières études qui suggèrent que le cancer de l'ovaire pourrait avoir un lien avec des facteurs inflammatoires fût celle de Ness *et al*, (1999). Dans son analyse, Ness se base sur les lacunes des hypothèses de l'ovulation et de gonadotrophine dans l'explication de la genèse du cancer de l'ovaire suite à l'utilisation du talc, à l'endométriose ou encore à la maladie inflammatoire pelvienne. De plus, ces hypothèses n'éclairent pas plus sur l'effet protecteur de l'hystérectomie et la ligature des trompes de Fallope [63].

De plus en plus d'études suggèrent que l'EOS et les trompes de Fallope baignent de manière chronique dans un environnement inflammatoire relié aux processus normaux de l'ovulation et de la menstruation [64]. En effet, les cytokines pro-inflammatoires sont présentes dans les fluides lors de l'ovulation et de la menstruation et entrent en contact avec les trompes de Fallope. Le niveau de ces mêmes cytokines est nettement plus élevé dans les cancers épithéliaux de l'ovaire tel qu'observé aussi dans d'autres états pathologiques par exemple l'endométriose et les inflammations pelviennes [65]. Récemment une corrélation positive entre le risque accru du cancer de l'ovaire et un dosage sérique élevé de la protéine C-réactive (CRP) a été établi [66, 67]. De plus, une étude cas-témoins nichée dans une cohorte comportant 232 femmes diagnostiquées avec un cancer de l'ovaire appariées à 432 témoins montre que des taux de cytokines (par exemple les interleukines) en circulation mesurés avant le diagnostic étaient plus élevés chez les femmes ayant développé un cancer ovarien par la



suite [68]. Cette étude incrimine de manière directe l'inflammation dans le développement du cancer de l'ovaire.

### **I.3.2.6 Facteurs chirurgicaux**

Il a été rapporté que l'hystérectomie (ablation de l'utérus) réduit à elle seule le risque du cancer de l'ovaire [69]. De même la ligature des trompes de Fallope réduit ce risque de 34% [70]. Chez les femmes prédisposées génétiquement au cancer de l'ovaire suite à des mutations dans *BRCA1*, la ligature des trompes réduit ce risque de 60%. Cet effet protecteur augmente lorsque la ligature est accompagnée de prise de contraceptifs oraux. Toutefois, la diminution du risque du CEO n'est pas observée pour les femmes ayant des mutations dans *BRCA2* [71]. L'hystérectomie et la ligature des trompes de Fallope constituent donc un moyen efficace pour contrer le cancer de l'ovaire surtout pour les femmes prédisposées génétiquement. Toutefois, les mécanismes de protection de ces chirurgies restent incompris.

### **I.3.2.7 Facteurs liés au mode de vie**

#### **➤ Obésité**

Une revue systématique a rapporté une modeste association positive entre le risque de cancer de l'ovaire et un indice de masse corporelle (IMC)  $>30 \text{ kg/m}^2$ . Cette association ne cible pas un sous-type histologique particulier des cancers de l'ovaire [72]. Les différents sous types sont détaillés dans la section 1.4. Dans une autre étude de prévention contre risque du cancer, une relation statistiquement significative entre la mortalité par cancer de l'ovaire et un IMC élevé a été établie dans une cohorte de 495 477 femmes suivies pendant 16 ans par comparaison aux femmes avec un poids normal [73].

#### **➤ Diète et nutriments**

Plusieurs études se sont intéressées à l'identification des facteurs diététiques qui seraient en lien avec le développement du cancer de l'ovaire. L'étude cas-témoins menée en Italie impliquant 455 femmes atteintes de carcinomes épithéliaux confirmés histologiquement comparées à 1385 témoins montrent que les femmes atteintes de cancer de l'ovaire consommaient 7 portions de viandes par semaine en comparaison de 4 portions chez les

témoins. Une association statistiquement significative est également observée entre la consommation de beurre versus autres matières grasses. Toutefois, la consommation de poissons, de légumes verts, de pâtes et de pains à grains entiers serait associée à une diminution de risque [74]. Une autre étude américaine sur une cohorte plus large comportant 29 080 femmes montrent que la consommation fréquentes d'œufs (2 à 4 par semaine) ainsi qu'une consommation élevée de glucides et de produits laitiers augmente le risque de développer le CEO alors que le risque est réduit avec la consommation de fruits et légumes [75]. Toutefois, des études plus récentes rassemblant plusieurs cohortes ne montrent pas d'association significative entre la consommation de fruits et légumes et le risque du CEO [76, 77]. En se basant sur les directives américaines de l'USDA (*United States Department of Agriculture*), l'étude de Chandran *et al* (2011) a évalué le lien entre l'indice d'une saine alimentation et le cancer de l'ovaire. Cette étude cas-témoins regroupe 205 femmes atteintes d'un cancer de l'ovaire et 390 témoins. Les auteurs ont conclu qu'il n'existe aucun effet protecteur ou de risque lié à un groupe ou un régime alimentaire particulier en lien avec le CEO [78].

#### ➤ **Exercice et activité physique**

Les études menées à ce jour tendent toutes à conclure qu'il n'existe pas d'association inverse solide entre l'activité physique et le cancer de l'ovaire. En effet, les résultats sillonnent entre pas d'effet et un effet modeste possiblement néfaste d'une activité physique rigoureuse sur le risque de développer un CEO [79-81]. Une étude plus récente impliquant 264 femmes survivantes du CEO a conclu qu'il n'existe pas de lien significatif entre l'activité physique et le risque de développer un CEO. De plus, cette activité physique ne semble pas aussi avoir un effet protecteur contre les récives pour les femmes diagnostiquées auparavant d'un CEO [82].

Les mécanismes susceptibles de médier l'impact de l'exercice sur le risque de cancer de l'ovaire ne sont pas bien connus. On pourrait penser aux changements hormonaux, que l'activité physique peut provoquer en réduisant l'obésité et les taux d'ostéogènes, ce qui amènerait éventuellement à la réduction du risque du CEO. Cependant, l'activité intense et soutenue pourrait élever le niveau des gonadotrophines et donc augmenter le risque du CEO.

### ➤ **Tabac et cigarette**

L'effet de la cigarette sur le cancer de l'ovaire n'est pas bien étudié. Toutefois, on note une intrigante association entre la consommation des produits de tabac et l'augmentation de l'incidence du cancer de l'ovaire de type mucineux uniquement [83, 84]. Les mécanismes de la cigarette dans le développement du cancer de l'ovaire ne sont pas encore compris. Une étude a rapporté la présence de nicotine et ses dérivés dans le tissu ovarien [85]. On pourrait donc penser que ces agents pourraient causer des dommages directs à l'ADN des cellules de l'EOS. De plus, il est à noter que les fumeuses ont un niveau de gonadotrophine et d'androgène plus élevé ce qui augmente le risque du CEO [86]. Toutefois, il est également connu que la cigarette induit une ménopause précoce ce qui constitue un facteur protecteur contre le CEO [86-88].

### **I.3.2.8 Facteurs liés à la distribution géographique**

Il existe dans le monde une distribution géographique du CEO. En effet, cette maladie présente une incidence croissante et proportionnelle à la distance latitudinale de l'équateur. En d'autres mots, le cancer de l'ovaire est plus présent dans l'hémisphère nord. Cette distribution nord-sud est également observée aux USA où le risque de cancer de l'ovaire est plus élevé dans le nord par rapport au sud du pays. Ce phénomène est expliqué par la durée d'ensoleillement. En effet, le risque du cancer de l'ovaire diminue dans les régions plus ensoleillées [89]. Grâce au soleil, la pré-vitamine D est fabriquée dans la peau et induit ainsi des effets biologiques dans l'EOS. Elle peut par exemple provoquer l'apoptose des cellules épithéliales génétiquement endommagées ce qui prévient leur transformation en cellules malignes [90]. Une étude cas-témoins soutient cette constatation et montre que le risque de développer un cancer de l'ovaire diminue de 50% suite à une alimentation riche en vitamine D [91]. Plusieurs autres études regroupées dans la revue de Guo, (2018) rapportent aussi ces effets bénéfiques de la vitamine D contre le cancer de l'ovaire [92].

## **I.4 Classification des tumeurs ovariennes**

Durant le dernier quart de siècle, les développements scientifiques et les avancées technologiques ont remis en question les concepts traditionnels du cancer de l'ovaire. Tout

d'abord, il a été reconnu que le cancer de l'ovaire n'est pas une maladie homogène mais plutôt un groupe de maladies avec des morphologies, des caractéristiques et des comportements biologiques distincts. Historiquement, différents systèmes classent le cancer de l'ovaire en plusieurs catégories en se basant sur des critères de morphologie des tumeurs. Ces systèmes sont : le système de l'OMS, le système de classification de la Fédération Internationale de Gynécologie-Obstétrique (FIGO) le système de Silverberg et la classification basée sur l'histologie des tumeurs. Cependant, le système de référence le plus courant est le système FIGO [93].

#### **I.4.1 Classification de l'OMS**

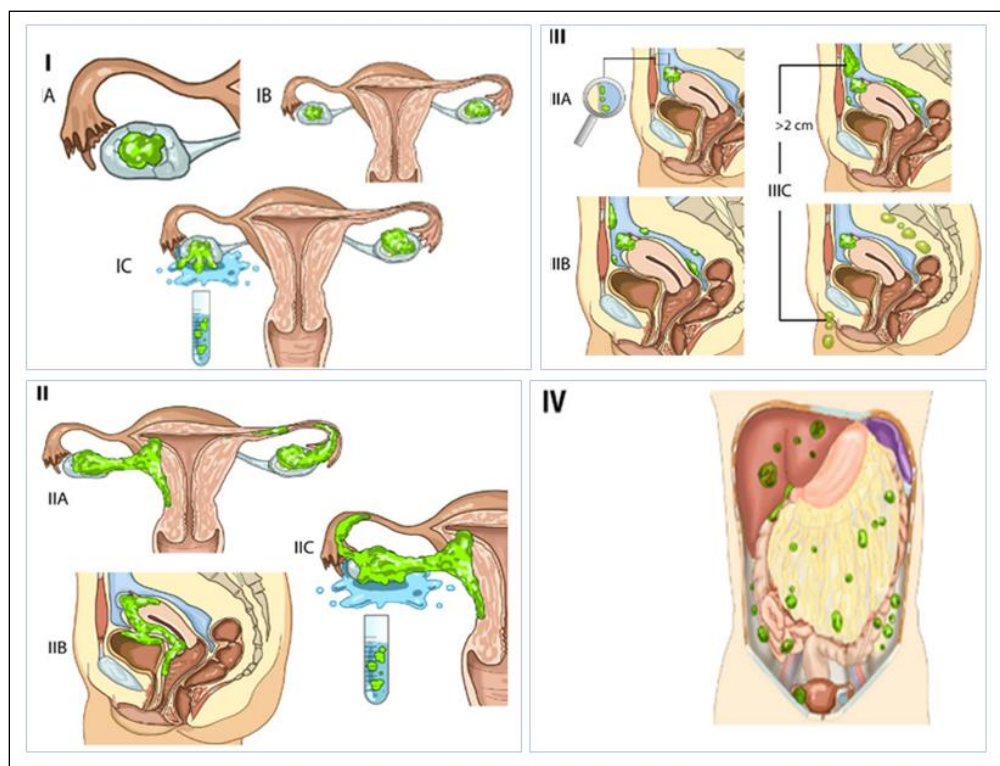
En se basant sur le tissu d'origine le plus probable, l'OMS subdivise les néoplasmes ovariens en trois grandes catégories. On distingue : les tumeurs issues de cellules épithéliales de surface (65%), les tumeurs issues des cellules germinales (GCT) (15%), les tumeurs du stroma et du cordon sexuel (SCST) (10%) et les métastases (5%) [94]. Selon l'histologie des tumeurs chacune de ces trois catégories comprend à son tour plusieurs sous-catégories [95]. Nogales F.F. et Schuldt M. (2017) rapportent dans leur revue que dans le tractus génital féminin, les tumeurs GCT se manifestent principalement dans l'ovaire. Elles sont généralement sous forme de tératomes bénins. Les tumeurs malignes sont donc peu fréquentes. Les GCTs comprennent plusieurs groupes, on note en plus des tératomes, le dysgerminome provenant uniquement de cellules germinales pures et le sac vitellin qui peut se développer à tout âge à partir de cellules germinales et somatiques. Il existe un autre type de GCT appelé mixte. Ce type mixte est rare et souvent associé à des troubles de développements sexuels [96].

Les tumeurs SCSTs sont des tumeurs rares de la zone ovarienne chez la femme adulte. Elles constituent un groupe hétérogène de tumeurs provenant comme leur nom l'indique des cellules du stroma et du cordon sexuel. Ces tumeurs sont généralement détectées à un stade précoce où environ 70% des patientes présentent des tumeurs de stade I. La chirurgie constitue donc le traitement par excellence pour ce type de cancer. Toutefois, la chimiothérapie à base de platine peut être utilisée de nos jours pour les femmes atteintes de SCST de stade avancé ou de récidives. Dans ce cas, le taux de réponse à ce traitement atteint 80% [97].

Il est connu que 90% des carcinomes ovariens dérivent de l'épithélium cœlomique recouvrant la surface des ovaires. Basé sur des études d'histopathologie, d'immunohistochimie (IHC), d'analyses génétiques et moléculaires, le CEO se subdivise en différents types. On distingue : les carcinomes séreux, le carcinome endométrioïde, le carcinome à cellules claires, le mucineux, les tumeurs épithéliales mixtes et les tumeurs épithéliales indifférenciées [98].

#### I.4.2 La classification FIGO

Dans le but de bien évaluer la progression du CEO et de mettre en place un traitement adéquat et une meilleure prise en charge des patientes, quatre stades sont décrits selon l'étendue de la maladie (Tableau I.1 et Figure I.4). Le stade I restreint ainsi la tumeur au niveau des ovaires. Si la maladie touche l'un ou les deux ovaires avec une extension pelvienne ou une atteinte primaire du péritoine il s'agit du stade II. La maladie passe au stade III si en plus des ovaires, elle gagne le péritoine à l'extérieur du pelvis avec des métastases sur les ganglions lymphatiques rétropéritonéaux. Quand l'invasion affecte d'autres organes tels que le foie ou les poumons on parle alors du stade IV [99].



**Figure I.4 :** Classification des tumeurs du CEO selon FIGO.

Stade I : tumeurs limitées aux ovaires. Stade II : tumeurs étendues aux organes avoisinants (utérus, trompes, vessie, rectum). Stade III : métastases péritonéales (à la surface des organes abdominaux). Stade IV : métastases à distance (principalement poumons). Modifiée de [imagyn.org](http://imagyn.org).

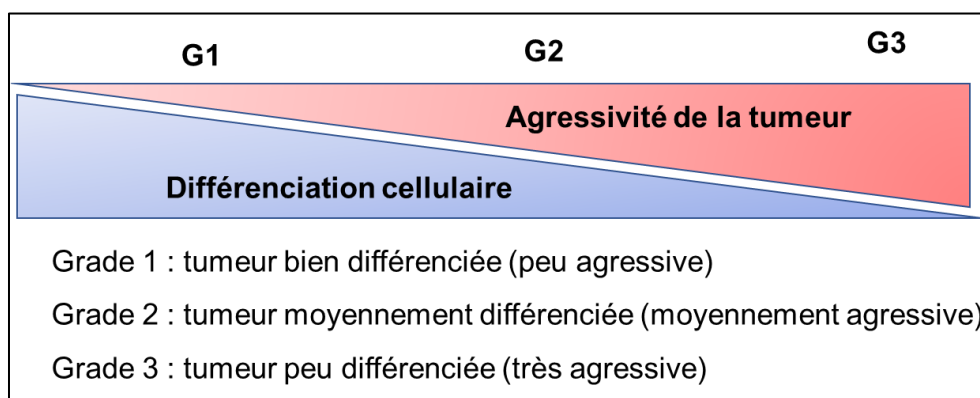
**Tableau I.1 :** Stadification détaillée précoce et avancée du cancer de l’ovaire selon FIGO, 2018 (Imagyn.org).

Stades	Précoces
IA	Cancer limité à un ovaire ou une trompe. Pas de cellules tumorales en surface de l’ovaire ou de la trompe, ni dans le péritoine
IB	Cancer limité aux deux ovaires ou aux deux trompes. Pas de cellules tumorales en surface des ovaires ou des trompes, ni dans le péritoine.
IC	Cancer limité à un ou deux ovaires (une ou deux trompes)
IC1	Rupture chirurgicale
IC2	Rupture pré-opératoire ou cellules tumorales à la surface de l’ovaire ou de la trompe
IC3	Cellules tumorales dans le lavage péritonéal
IIA	Atteinte d’un ou deux ovaires (ou trompe) associée à une extension pelvienne sous le détroit supérieur (utérus, trompe, ovaire)
Stades	Avancés et métastatiques
IIB	Extension aux autres organes pelvien
III	Atteinte de l’abdomen ou des ganglion
IIIA	Atteinte ganglionnaire ou abdominale microscopique
IIIA1	Atteinte ganglionnaire isolée (IIIA1i <10mm ; IIIA1ii >10mm)
IIIA2	Atteinte microscopique abdominale +/- ganglionnaire
IIIB	Atteinte abdominale <2cm +/- ganglionnaire
IIIC	Atteinte abdominale >2cm +/- ganglionnaire
IVA	Épanchement pleural avec une cytologie positive
IVB	Métastase parenchymateuse ou extra-abdominale

### I.4.3 Les grades du cancer de l’ovaire : Classification de Silverberg

Au-delà de la stadification, les pathologistes examinent les tissus ovariens issus de biopsies ou de chirurgies et leur attribuent un grade afin de mieux planifier la stratégie thérapeutique et bien évaluer le pronostic de la maladie.

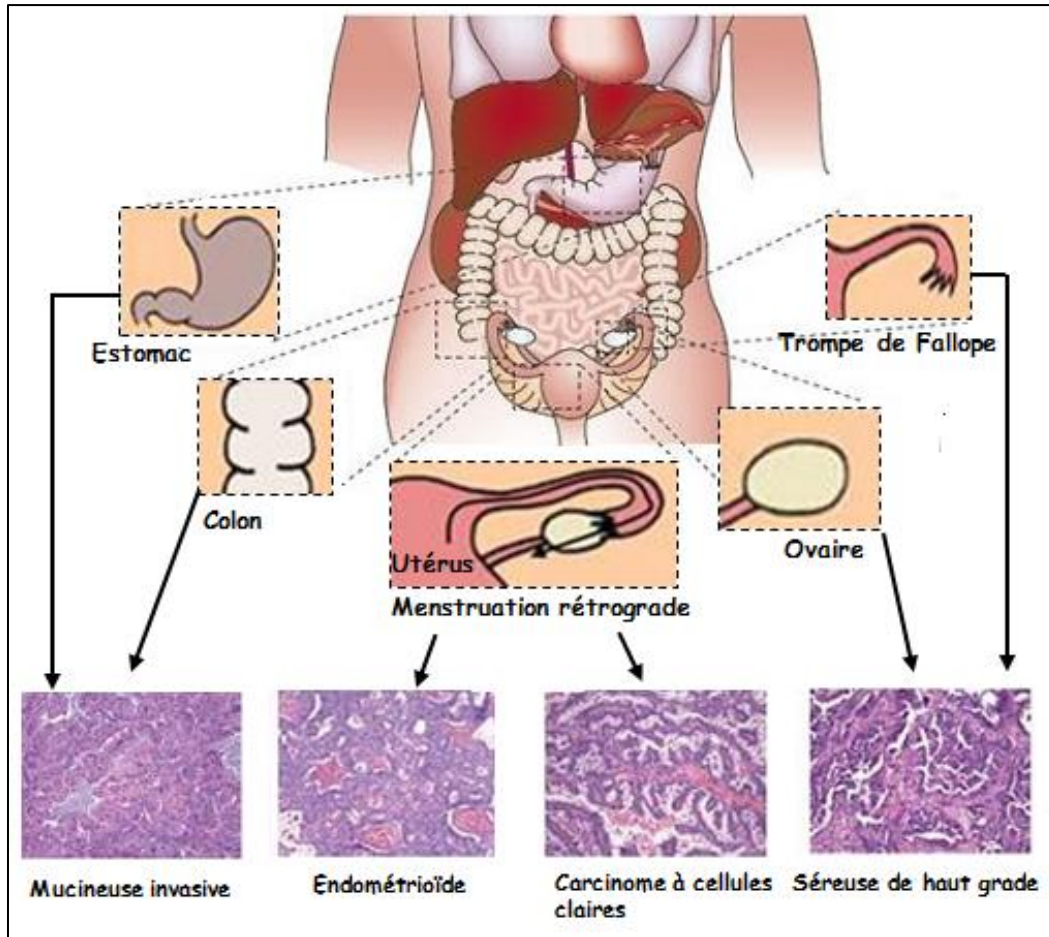
Le grade de la tumeur (connu aussi sous le nom de score de la tumeur) est relatif à l’aspect histologique du tissu tumoral et à l’indice de division cellulaire. En effet, plus les cellules sont indifférenciées par rapport au tissu normal, plus elles se divisent et plus la tumeur est agressive (Figure I.5). Ladite différenciation est appréciée en évaluant la perte de l’architecture du tissu d’origine, la forme et la taille des noyaux cellulaires et le nombre de cellules en division. Le grade est désigné par la lettre G est suivi par un chiffre allant de 1 à 3. En effet, G3 réfère à une tumeur très agressive où la surface devenue indifférenciée dépasse 50%. Cette surface est de 5 à 50% pour le grade 2 et moins de 5% pour le grade 1 [100].



**Figure I. 5:** Représentation schématique de la relation entre la différenciation et l’agressivité tumorale.

### I.4.4 Les types histologiques du CEO

Comme mentionné précédemment, parmi les CEOs, quatre sous-types histologiques sont majoritairement diagnostiqués. On distingue: les carcinomes séreux (environ 75% des cas subdivisés en tumeurs séreuses de haut grade (HGSC) et tumeurs séreuses de bas grade (LGSC), les carcinomes mucineux (environ 3% des cas), les carcinomes endométrioïdes (environ 10% des cas) et les carcinomes à cellules claires (environ 10% des cas) [101] (figure I.6).



**Figure I.6 :** Origine des différents types du CEO.

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 [6].

En 2004, Shih et Kurman proposèrent de classer les CEOs en deux types I et II en se basant sur la voie de tumorigenèse ainsi que sur les caractéristiques génétiques de chaque cancer [102] (voir figure I.7). Ainsi les tumeurs de type I sont des néoplasmes de bas grade provenant par continuum des tumeurs borderlines aussi connues sous le nom de tumeurs à la limite de malignité. D’un point de vue clinique, ces tumeurs de type I se présentent généralement sous forme de néoplasmes kystiques unilatéraux de grande taille qui se développent de manière indolente. Ces tumeurs ont un excellent pronostic lorsqu’elles sont confinées à l’ovaire. Ce type I comprend les LGSCs, les carcinomes mucineux, endométrioides, les tumeurs malignes de Brenner et les carcinomes à cellules claires [103].



#### **I.4.4.1 Les carcinomes du type I**

##### **I.4.4.1.1 Les carcinomes endométrioides et les carcinomes à cellules claires**

Les deux carcinomes endométrioides et à cellules claires proviendraient de transformation maligne de kystes endométriotiques préexistants [104]. Il est en effet proposé que le contenu des kystes endométriotiques notamment l'excès de fer issu du vieux sang est associé au développement d'un cancer suite à un stress oxydatif persistant [105]. De plus, les cellules épithéliales des kystes sont exposées à un stress oxydatif et à l'hypoxie ce qui induit des dommages moléculaires accrus notamment à l'ADN dont la réparation est moins efficace. Ces cellules sont donc facilement transformables en cellules malignes [106]. Une étude associe également les carcinomes ovariens issus de l'endométriose avec l'infertilité, les troubles de la menstruation et la ménopause tardive [107]. Le carcinome à cellules claires est aussi caractérisé par une perturbation du complexe SWIF/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) dont le rôle est la régulation de la transcription des gènes. En effet, des mutations dans le gène *ARID1A* (*AT-rich interactive domain-containing protein 1A*), qui est un des membres du complexe SWIF/SNF, ont été rapportées [108].

##### **I.4.4.1.2 Les carcinomes mucineux**

Les tumeurs mucineuses peuvent être bénignes, borderlines (à la limite de malignité) ou malignes. La caractéristique majeure de ces tumeurs est la présence de cellules sécrétrices de mucus. Les théories quant à l'origine des tumeurs mucineuses sont variées. Il a été suggéré à cet effet qu'un sous ensemble de carcinomes mucineux serait associé à des tératomes ovariens bénins (issus de cellules germinales) [109]. D'autres études proposent la métaplasie (transformation d'un tissu cellulaire différencié en un autre tissu différencié) de l'épithélium de surface, de l'endométriose et des tumeurs de Brenner être à l'origine des tumeurs mucineuses [104]. Il a été aussi observé qu'une évolution d'un cystadénome (tumeur mucineuse kystique) en un carcinome invasif en transitant par une tumeur mucineuse borderline pouvait être l'origine des carcinomes mucineux. En effet, des mutations fréquentes dans le gène *KRAS* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) sont signalées dans les cystadénomes, les tumeurs borderlines de même que dans les carcinomes mucineux [110-112].

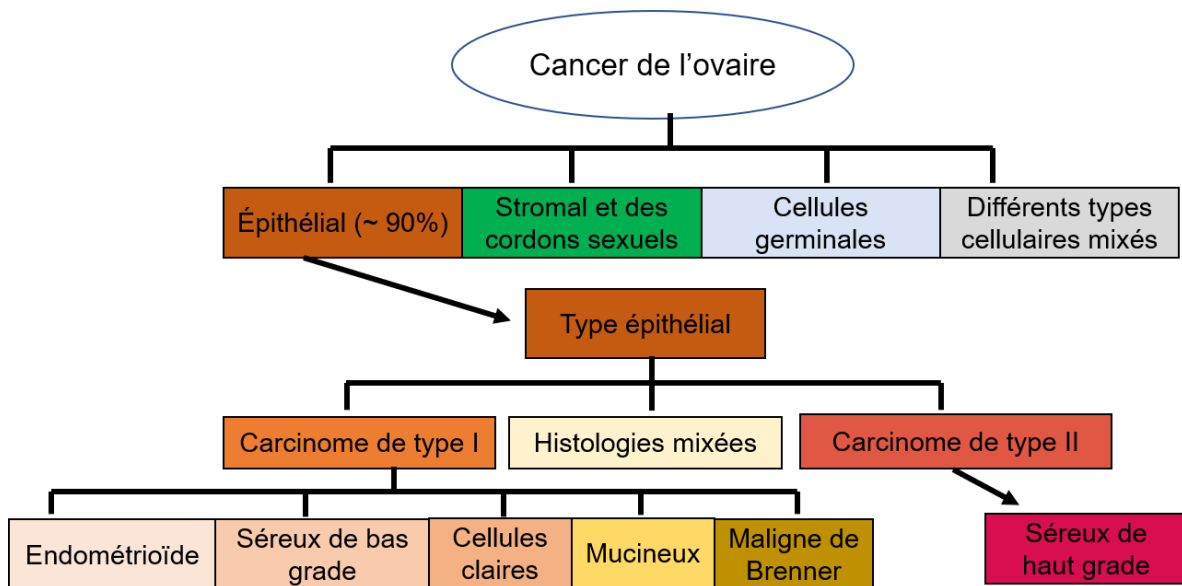
#### **I.4.4.1.3 Les tumeurs séreuses de bas-grade (LGSC)**

Les tumeurs appartenant à cette catégorie sont assez rares. Elles présentent une certaine stabilité génétique avec seulement quelques mutations caractéristiques. De ce fait, ces tumeurs se développent lentement et sont souvent indolentes et asymptomatiques. Il semble que ces tumeurs peuvent provenir d'une évolution progressive d'un cystadénome séreux à une tumeur séreuse borderline (SBT) et enfin à une LGSC. En effet, ces carcinomes présentent des altérations dans l'ADN semblables à celles observées au niveau des SBTs [113, 114]. Cependant, les mutations du gène p53 sont rares dans les LGSCs comme observé aussi dans les SBTs [115].

Une des anciennes théories quant à la genèse des LGSCs est la transformation des cellules mésothéliales en épithélium de Muller suite à leur exposition à l'environnement stromal ovarien. La plus récente théorie suggère que les LGSCs proviendraient des trompes de Fallope [116, 117].

#### **I.4.4.2 Les carcinomes du type II**

Les tumeurs de type II sont des néoplasmes de haut grade pour lesquels aucune lésion ou anomalie morphologique précurseur n'a été détectée. Ce type II est aussi qualifié de développement de novo [102]. Il représente les tumeurs HGSCs. Ces dernières constituent 68% des cancers de l'ovaire. Elles sont associées à un mauvais pronostic et souvent diagnostiquées tardivement. Dans 80 % des cas, ces carcinomes sont caractérisés par des mutations au niveau du gène p53 [118-120] et dans 90% des cas des HGSCs héréditaires, on note des mutations au niveau des gènes *BRCA1/2*. En général ces carcinomes de type II sont caractérisés par un indice mitotique élevé et une instabilité génomique suite aux réarrangements des chromosomes [121]. Plusieurs études rapportent que les HGSCs proviendraient aussi des trompes de Fallope voire même de la jonction entre l'épithélium des trompes et le mésothéliome des séreuses tubaires [38, 122, 123].



**Figure I.7 :** Représentation schématique des différents types du cancer de l'ovaire.

## I.5 Diagnostic

### I.5.1 Diagnostic basé sur les symptômes

L'absence de symptômes a toujours rendu le diagnostic du cancer de l'ovaire imprécis. Les patientes souvent interprètent le peu de symptômes comme des changements normaux du corps liés à la maternité, à la ménopause, au stress ou au vieillissement [124]. Toutefois, le cancer de l'ovaire peut être désormais reconnu par ses signes précoces englobant une distension abdominale (ballonnement et augmentation de la taille abdominale), douleurs pelviennes et/ou abdominales, trouble alimentaire (perte d'appétit sensation de satiété rapide) ou encore mictions fréquentes [125, 126]. Il est reconnu que ces différents symptômes concernent à la fois les stades précoces et les stades avancés. Cependant, le pronostic de la maladie est meilleur si elle est diagnostiquée aux stades précoces. De plus, plusieurs symptômes du cancer de l'ovaire peuvent être confondus avec d'autres désordres physiologiques tel le syndrome du côlon irritable. Cette difficulté à reconnaître les signes du cancer de l'ovaire oriente la patiente sur de mauvaises pistes ce qui retarde le diagnostic de la maladie [127]. De nos jours, il n'existe aucun programme de dépistage du CEO, mais il existe des initiatives basées sur l'indice des symptômes probables et leurs fréquences en combinaison avec les biomarqueurs comme c'est le cas aux USA et au Royaume-Uni [128-130].

## **I.5.2 Diagnostic basé sur l'imagerie**

Suite à la difficulté de détecter le cancer de l'ovaire en se basant uniquement sur les symptômes, l'examen physique demeure le moyen le plus efficace pour détecter une éventuelle masse pelvienne. Généralement une échographie transvaginale, abdominale ou pelvienne est l'examen le plus utilisé pour détecter une quelconque anomalie de taille ou d'architecture des ovaires. Une échographie Doppler peut aussi être utilisée pour un examen plus approfondi de la vascularisation de la masse. L'imagerie photoacoustique est une technique récente (années 2000) basée sur la détection des ondes ultrasonores excitées par la lumière. Elle se joint à l'imagerie par échographie classique pour une meilleure caractérisation du cancer de l'ovaire. Cette technique permet en effet la détection précoce de l'angiogenèse [131, 132]. À l'instar de l'échographie, l'imagerie anatomique par tomodensitométrie (TDM) appelée aussi scanographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont également utilisées pour évaluer l'étendue et la propagation de la maladie. La combinaison de ces différentes techniques d'imagerie permet de recueillir un ensemble d'informations sur la présence et l'étendue du CEO et aide ainsi dans le choix de la thérapie à adopter [133].

De nos jours, malgré les progrès intenses dans le domaine de l'imagerie pour améliorer le diagnostic du CEO, sa détection à un stade précoce reste un défi difficile à atteindre. Il est en effet primordial d'affiner de meilleures modalités d'imagerie et surtout de développer une profonde compréhension des biomarqueurs de la maladie.

## **I.5.3 Diagnostic basé sur les biomarqueurs**

### **1.5.3.1 Le CA125**

Le marqueur tumoral CA125 (*Cancer Antigen 125*) a été identifié pour la première fois en 1981 par Bast *et al.*, comme étant une protéine sérique surexprimée chez 80% des femmes diagnostiquées avec un cancer de l'ovaire. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire qui constitue cliniquement le marqueur le plus étudié et utilisé pour le diagnostic du CEO. Il est associé à environ 70% des CEOs de haut grade mais demeure détectable uniquement dans environ 50% des CEOs précoces [134]. Une augmentation du niveau d'expression de cette glycoprotéine est également observée dans plusieurs conditions physiologiques et bénignes comme l'endométriose, la grossesse, le fibrome utérin, l'inflammation pelvienne, la

menstruation...etc [135]. Le succès de CA125 en tant que marqueur moléculaire pour la détection du cancer de l'ovaire provient de sa faible expression dans l'épithélium ovarien normal. Cette faible expression est couplée à une régulation positive significative dans les tumeurs séreuses et papillaires. De plus, le fait que cette glycoprotéine soit sécrétée dans le sang rend sa détection relativement simple dans le sérum des patientes. Cependant, la non-spécificité de ce marqueur et le nombre élevé de faux positifs rendent le CA125 seul insuffisant pour le diagnostic du CEO, mais peut être combiné à une échographie abdominale ou à d'autres marqueurs pour un meilleur diagnostic. Toutefois, le CA125 est plus approprié pour évaluer les récives du CEO [136].

#### **I.5.3.2 HE4**

Le marqueur HE4 (*human epididymis gene product*) a d'abord été caractérisé par Kirchoff *et al.*, dans le tissu épидидymaire humain [137]. Également connu sous le nom de WFDC2, HE4 présente plusieurs isoformes à domaine WAP [138]. En plus de l'appareil reproducteur masculin, l'expression de HE4 est aussi détectée dans d'autres tissus tels les poumons, les reins et les glandes salivaires [139]. Ce gène se trouve également surexprimé dans le CEO [140, 141]. Plusieurs études ont donc développé des techniques pour promouvoir l'utilisation de HE4 comme marqueur potentiel dans le diagnostic du CEO [142], et rapportent que ce marqueur serait plus sensible que le CA125 pour distinguer les tumeurs bénignes des tumeurs malignes du CEO [143-146]. De plus, contrairement au CA125, HE4 peut être détecté dans des échantillons d'urine, rendant ainsi le diagnostic plus accessible que les tests sériques [147].

#### **I.5.3.3 OVX1**

L'antigène du cancer de l'ovaire OVX1 (*ovarian cancer antigen 1*) est une glycoprotéine de haut poids moléculaire détectée dans plus de la moitié des patientes atteintes du CEO dont l'analyse CA125 était négative [148]. Van Haafren *et al.*, ont rapporté que la combinaison de OVX1 au CA125 et un autre marqueur M-CSF (facteur stimulant les colonies de macrophages) a permis de détecter 85% des CEOs alors que le CA125 seul n'a détecté que 66% [149].

#### **1.5.3.4 Mésothéline**

La mésothéline (MES) est un antigène de 70KDa présent naturellement dans les cellules de la surface mésothéliale, de la plèvre, du péricarde, de la surface ovarienne et en faible quantité dans les cellules des trompes de Fallope [150, 151]. Cette protéine se trouve fortement détectée dans le mésothéliome, dans le CEO ainsi que dans les carcinomes épidermoïdes [152, 153]. Il a été rapporté que l'expression aberrante de MES dans les cellules tumorales promeut la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses [154]. La MES assure aussi l'adhésion cellulaire via son interaction avec le CA125 [155]. Cette interaction joue un rôle dans l'implantation péritonéale des cellules du CEO [156, 157]. Cheng *et al.*, ont rapporté que la surexpression de MES est corrélée à un mauvais pronostic chez les personnes atteintes du CEO [158]. D'après Chang *et al.*, MES serait plus spécifique des CEOs non mucineux [159].

#### **1.5.3.5 Autres marqueurs**

De nombreuses études basées surtout sur l'analyse des protéines sériques tentent d'identifier de nouveaux biomarqueurs alternatifs avec une sensibilité et spécificité améliorée [160, 161]. À l'instar des marqueurs précédemment décrits, plus de 30 marqueurs sériques ont été évalués seuls ou en combinaison avec le CA125 incluant le M-CSF [162], l'ostéopontine [163], la kallikréine 10 [164], le facteur de croissance épidermal soluble [165], l'afamine et l'apolipoprotéine A-IV [166]. En outre, il est à noter qu'aucun marqueur tumoral unique n'a donné de meilleurs résultats que le CA-125 seul. Les nouvelles stratégies misent sur une combinaison de marqueurs tumoraux pour un meilleur diagnostic du CEO surtout pour une distinction plus précise des tumeurs bénignes des malignes [167-169]. Ces dernières années plusieurs études s'intéressent à l'identification de biomarqueurs épigénétiques exemple des micro-ARNs (miR) circulants dont l'expression est aberrante dans le CEO [170] de même qu'à l'analyse du profil de méthylation de l'ADN des cellules cancéreuses en circulation dans les fluides [171]. Bien qu'elles soient peu développées, ces nouvelles approches restent prometteuses car elles reflètent probablement mieux le profil moléculaire dominant du cancer.

## **I.6 Les traitements du cancer de l'ovaire**

Le choix du traitement du CEO dépend des caractéristiques de la tumeur (type histologique, grade, stade). Vu le caractère silencieux du CEO, dans la grande majorité des cas, la maladie est détectée à des stades bien avancés nécessitant des traitements de chirurgie et de chimiothérapie.

### **I.6.1 La chirurgie**

Une fois que le CEO est suspecté grâce à l'examen physique et à l'imagerie, la laparotomie est réalisée d'une part pour l'élimination de la tumeur et d'autre part pour une confirmation de l'origine du CEO (exclusion d'autres causes comme des kystes complexes, métastases et tumeurs stromales) ainsi qu'une meilleure caractérisation du type histologique [172]. Ainsi, la stadification chirurgicale réalisée durant la laparotomie exploratrice fournit des informations importantes qui peuvent influencer les décisions quant au traitement postopératoire à adopter en particulier pour un cancer de stade précoce [173]. Bien que la chirurgie soit le premier recours dans la prise en charge des patientes avec un CEO, il est important de mentionner qu'il existe des cas pour lesquels d'autres approches alternatives sont à envisager. Par exemple, les patientes suspectées d'avoir un CEO mais dont la cytoréduction n'est pas sécuritaire sont de mauvaises candidates pour la chirurgie. Dans ce genre de situation, la caractérisation du CEO suspecté se fait par des biopsies afin d'établir le traitement adéquat par chimiothérapie connue sous le nom de thérapie néoadjuvante. Si la patiente répond bien aux cycles de chimiothérapie, elle pourrait devenir candidate pour une chirurgie appelée dans ce cas cytoréduction d'intervalles [174]. Il a été rapporté en effet qu'il n'existe pas de différence significative entre une thérapie néoadjuvante (où la patiente reçoit un traitement de chimiothérapie avant la chirurgie) et un traitement adjuvant (où la patiente reçoit la chimiothérapie en complément à la chirurgie) [175]. Toutefois, la chirurgie occupe une place importante dans la prise en charge des CEOs. La qualité de l'exérèse et la taille du résidu tumoral après l'intervention chirurgicale ont un impact direct sur la survie de la patiente, en particulier lorsque diagnostiquées à un stade avancé. L'exérèse des lésions s'accompagne généralement d'un lavage péritonéal et d'une vérification minutieuse de tous les organes de la cavité péritonéale. Comme la majorité des cancers ovariens sont diagnostiqués à un stade tardif, une hystérectomie totale (ablation de l'utérus), annexectomie

bilatérale (ablation des trompes de Fallope et des ovaires), omentectomie (ablation du grand épiploon) ou un curetage ganglionnaire pelvien et aortique sont souvent réalisés dépendamment de l'extension du CEO. De plus, une exérèse digestive partielle peut être nécessaire en cas d'atteinte pour réduire au maximum la masse tumorale [176].

## **I.6.2 La chimiothérapie**

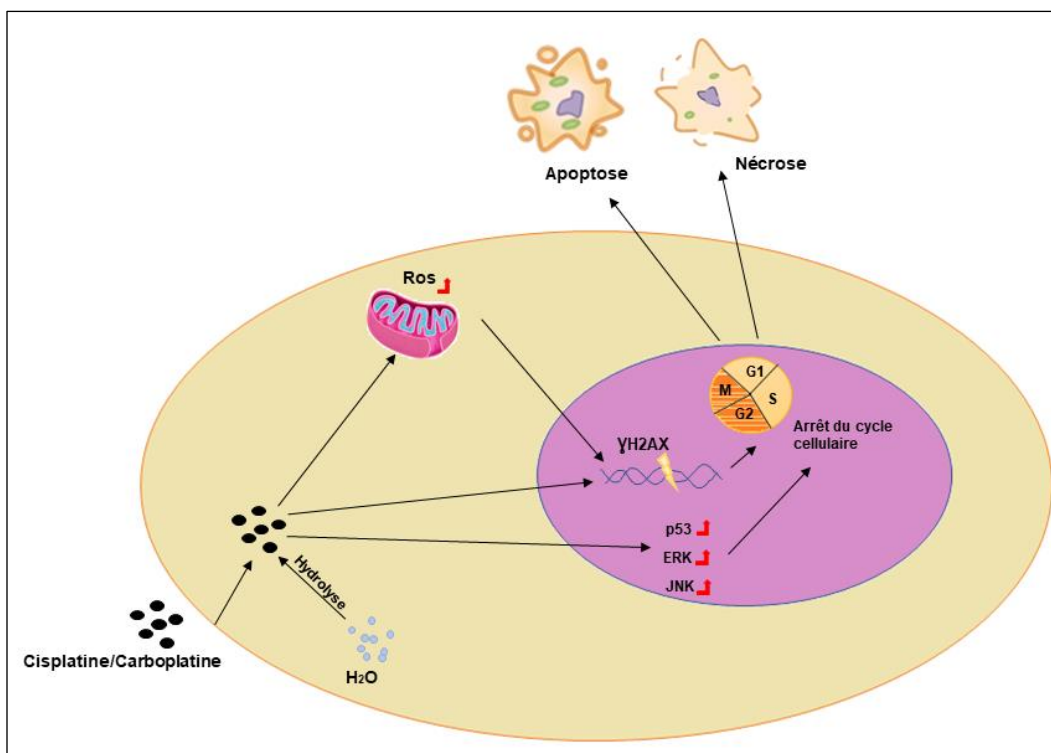
Malgré le traitement chirurgical initial de cytoréduction suivi d'une chimiothérapie de première ligne, environ 70% à 85% des patientes avec un CEO de stades III et IV connaissent une rechute dans les 5 ans suivant le diagnostic initial [177].

Initialement, la chimiothérapie du cancer de l'ovaire était basée sur le dérivé du platine connu sous le nom de cisplatine puis plus tard par son analogue moins toxique : le carboplatine [178]. La découverte du paclitaxel (Taxol®) un composé actif produit par un conifère du pacifique (*Taxus brevifolia*) a changé la stratégie du traitement du CEO. En effet, la combinaison du Taxol avec le carboplatine constitue le traitement par excellence du CEO [179]. Cependant, afin de réduire l'effet neurotoxique rapporté du Taxol, de nouvelles molécules dérivées exemple du docétaxel sont testées avec le carboplatine sur les patientes à haut risque de neurotoxicité [180].

### **I.6.2.1 Activité anti-cancer du cisplatine et carboplatine**

Le cisplatine (cis-diamminedichloroplatinum (II)) est actuellement l'un des médicaments les plus utilisés dans le traitement du cancer. Une fois dans la cellule, les molécules de cette drogue se fixent sur les bases puriques (A/G) de l'ADN et induisent des changements de conformation des deux brins d'ADN conduisant à des lésions et à l'arrêt de la machinerie répliquative. La cellule cancéreuse est donc dirigée vers l'apoptose. Le spectre des changements chimiques induit dans l'ADN par le cisplatine est large. Il a été constaté aussi que ces molécules peuvent provoquer la mort de la cellule suite aux dommages de l'ADN via un stress oxydatif et une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène mitochondrial (ROS). Parmi les voies de signalisation activées par le cisplatine on note : la voie ERK (*Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase*), et la voie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). On note également une surexpression de la protéine p53 [181] (Figure I.8).





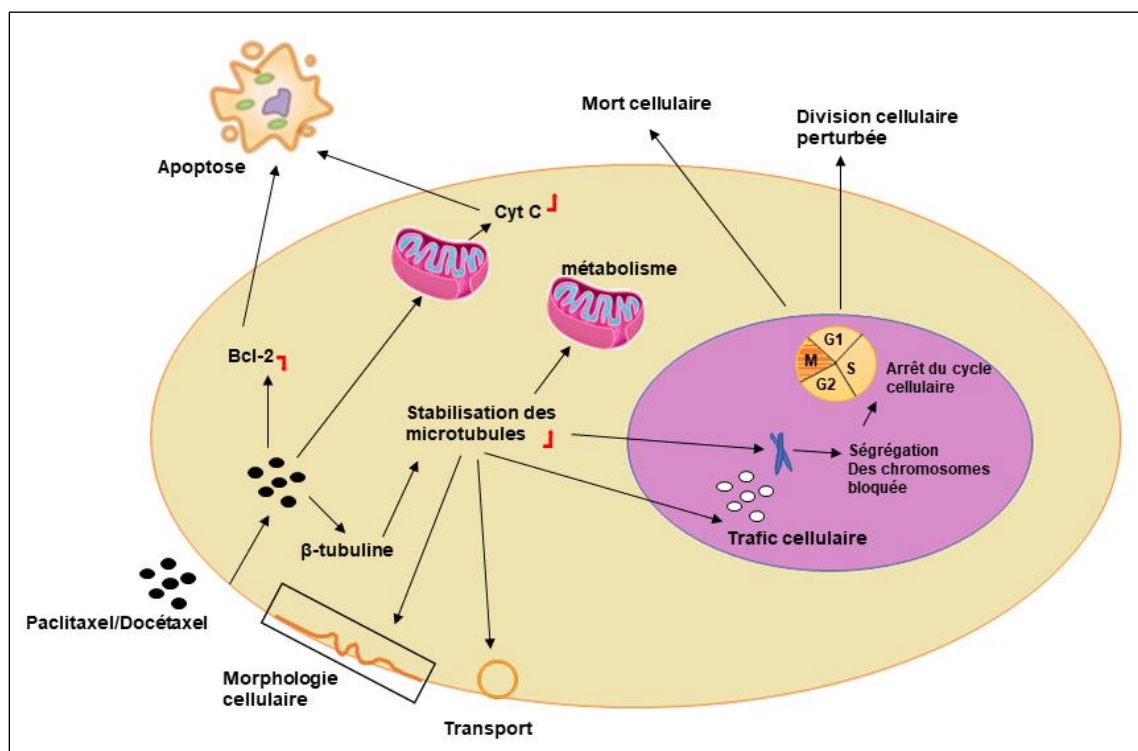
**Figure I.8 :** Mécanisme de cytotoxicité du cisplatine/carboplatine dans la cellule cancéreuse.  
Adaptée de [182].

Parmi les multiples analogues du Platine synthétisés et testés, seul le carboplatine (1,1-cyclobutyldicarboxylate) s’est avéré cliniquement avantageux par rapport au cisplatine et a donc été largement accepté [183]. Une fois pénétré dans la membrane cellulaire, le carboplatine se charge positivement suite à l’hydrolyse. Il se fixe par la suite comme le cisplatine aux sites nucléophiles de l’ADN (base A/G) et compromet ainsi la réplication cellulaire. Par conséquent, les cellules cancéreuses meurent par apoptose ou par nécrose [184] (figure I.8).

### **I.6.2.2 Activité anti-cancer des taxanes (paclitaxel et docétaxel)**

Le principal mode d’action des taxanes est l’inhibition des fonctions des microtubules par leur stabilisation. Les microtubules sont des composantes du cytosquelette composés de sous unités répétées de tubuline- $\alpha$  et tubuline- $\beta$ . Les microtubules sont essentiels dans plusieurs mécanismes de la cellule comme le transport des vésicules, le métabolisme mitochondrial, la séparation des chromosomes lors de la mitose, le trafic et l’organisation de la morphologie cellulaire. Le paclitaxel se lie aux acides aminés N-terminaux des tubulines- $\beta$  et affecte ainsi le mécanisme de dépolymérisation essentiel à la dynamique des microtubules. Les

chromosomes des cellules cancéreuses traitées avec cette drogue ne peuvent plus migrer à chaque pôle de la cellule, ce qui fige la division cellulaire juste avant l'anaphase. Étant bloquées, ces cellules reçoivent un message d'apoptose [185, 186] (Figure I.9).



**Figure I.9 :** Mécanisme de cytotoxicité des taxanes dans la cellule cancéreuse. Adaptée de [182].

Dans le but d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie, plusieurs voies d'administration du médicament ont été testées. La voie intrapéritonéale (IP) semble être plus adéquate compte tenu du site métastatique et de la proximité des tumeurs primaires. En effet, via cette voie le médicament entre en contact direct avec les masses tumorales. De plus, de fortes doses peuvent être administrées sans dépasser la limite de toxicité. Cependant, la voie IP augmenterait les effets indésirables rendant les patientes inconfortables. Actuellement, la voie IP est considérée comme une voie alternative devant la voie classique d'administration qui est la voie intraveineuse (IV). Le débat sur le choix d'administration du médicament se poursuit toujours [187].

### **I.6.3 Les thérapies ciblées**

Malgré les traitements de première ligne consistant en une chirurgie cytoréductrice suivie de chimiothérapie, 70 à 85% des femmes avec un CEO de stades avancés connaissent une rechute suite au phénomène de chimiorésistance. Du fait que la récurrence du CEO est incurable, l'objectif de la thérapie se concentre davantage sur l'atténuation des symptômes liés au cancer, le maintien de la qualité de vie et la prolongation du temps de survie [188]. Dans ce sens, les études actuelles visent à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi, de nombreux essais cliniques se basent sur l'utilisation de molécules inhibitrices des processus impliqués dans la croissance et/ou dans la dissémination tumorale. À titre d'exemple le bévacizumab, connu aussi sous le nom de Avastin, est un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) [189, 190]. Il est testé en association à la chimiothérapie dans plusieurs études telles que : MITO 16B–MANGO OV [191], ENGOT-OV18/AGO-OVAR [192], AURELIA [193] et OCEANS [194] pour un traitement de première ligne ou de récurrences où il a démontré son efficacité quant à la survie sans progression de la tumeur. D'autres drogues contre l'angiogenèse ont aussi montré une meilleure survie comme l'aflibercept, le trebanabib, pazopanib, nintedanib, cediranib, sunitinib, et le sorafenib. Toutefois, certaines de ces drogues sont associées à des effets secondaires assez importants [195]. D'autres stratégies thérapeutiques visent à interférer avec les voies de signalisation souvent perturbées dans le CEO exemples des voies RAS/RAF/MEK et PI3K/AKT/mToR [196], ou encore ciblent la famille des récepteurs des facteurs de croissance épidermiques (EGFR/EGFR2/HER2) souvent surexprimés dans les tumeurs où ils favorisent la croissance tumorale, la migration et l'adhésion cellulaire en stimulant l'EMT. Les anticorps comme le trastuzumab (aussi appelé Herceptin), le pertuzumab et l'apatinib sont utilisés pour bloquer ces récepteurs [197]. Le traitement basé sur les inhibiteurs du système de réparation de l'ADN, par exemple le PARPs (polyadénosine diphosphate–ribose polymérase), est l'une des meilleures réalisations dans la recherche sur le CEO récurrent. Trois molécules différentes : olaparib, niraparib et rucaparib sont approuvées comme médicament pour les patientes ayant une réponse complète ou partielle au dernier traitement à base de platine [198, 199].

## **I.6.4 L'immunothérapie active**

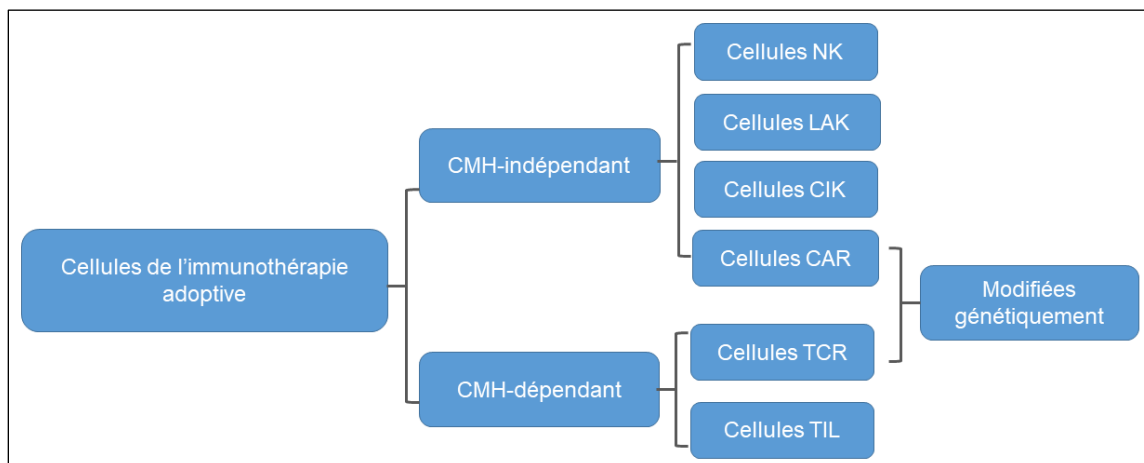
L'immunothérapie est un traitement prometteur contre le cancer de l'ovaire car ces tumeurs peuvent être reconnues et attaquées par le système immunitaire [200].

Le but de l'immunothérapie est de stimuler le système immunitaire afin de détruire les cellules cancéreuses. Les principales thérapies utilisées ciblent l'utilisation des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires, la thérapie cellulaire adoptive ainsi que la vaccination [201]. Les stratégies les plus étudiées dans le cas du CEO sont décrites ci bas :

### **I.6.4.1 L'immunothérapie cellulaire adoptive**

L'immunothérapie adoptive peut impliquer différents types de cellules (Figure I.10). Les cellules LAK (Cellules tueuses activées par des lymphokines) proviennent d'une population de lymphocytes et de cellules tueuses naturelles : NK (*natural killer*) stimulées par l'interleukine -2 (IL-2) pour tuer les cellules cancéreuses [202]. En 1985, Rosenberg *et al.*, ont suggéré que les cellules LAK stimulées par IL-2 ont des effets thérapeutiques contre les tumeurs métastatiques incurables avec les traitements traditionnels. Toutefois, les doses élevées d'IL-2 semblent activer l'expression de cytokines toxiques qui peuvent nuire au patient [203, 204]. Les NKs sont des cellules de la réponse immunitaire innée activées pour l'immunosurveillance du cancer indépendamment du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [205]. Il a été rapporté que ces cellules ont la capacité de reconnaître les cellules du CEO fraîchement isolées et de les tuer *in vitro*. Ces résultats ouvrent un champ d'étude prometteur pour l'immunothérapie adoptive basée sur les NKs dans le traitement du CEO [206]. En effet, un modèle animal de xénogreffe du cancer de l'ovaire a été développé pour l'injection IP des cellules NKs [207]. Dans une autre étude, des cellules CAR-NK92 modifiées génétiquement pour exprimer des récepteurs chimériques anti-CD133 sont utilisées *in vivo* pour capter et éradiquer les cellules du CEO. Le pouvoir thérapeutique de ces cellules est accentué en présence d'un traitement à base de platine [208]. Plusieurs études ont impliqué les cellules tueuses induites par les cytokines (CIK) comme stratégie thérapeutique dans le traitement du CEO. Dans une cohorte de quatre-vingt-douze patientes ayant subi une chirurgie cytoréductive suivie de plusieurs cycles de chimiothérapie (à base de carboplatine et paclitaxel), Liu *et al.*, ont administré à 50% de la cohorte des perfusions de CIK un mois après le dernier cycle de chimiothérapie. Cette équipe a constaté que cette moitié de la cohorte traitée avec les cellules CIK présentent une survie médiane d'environ 15

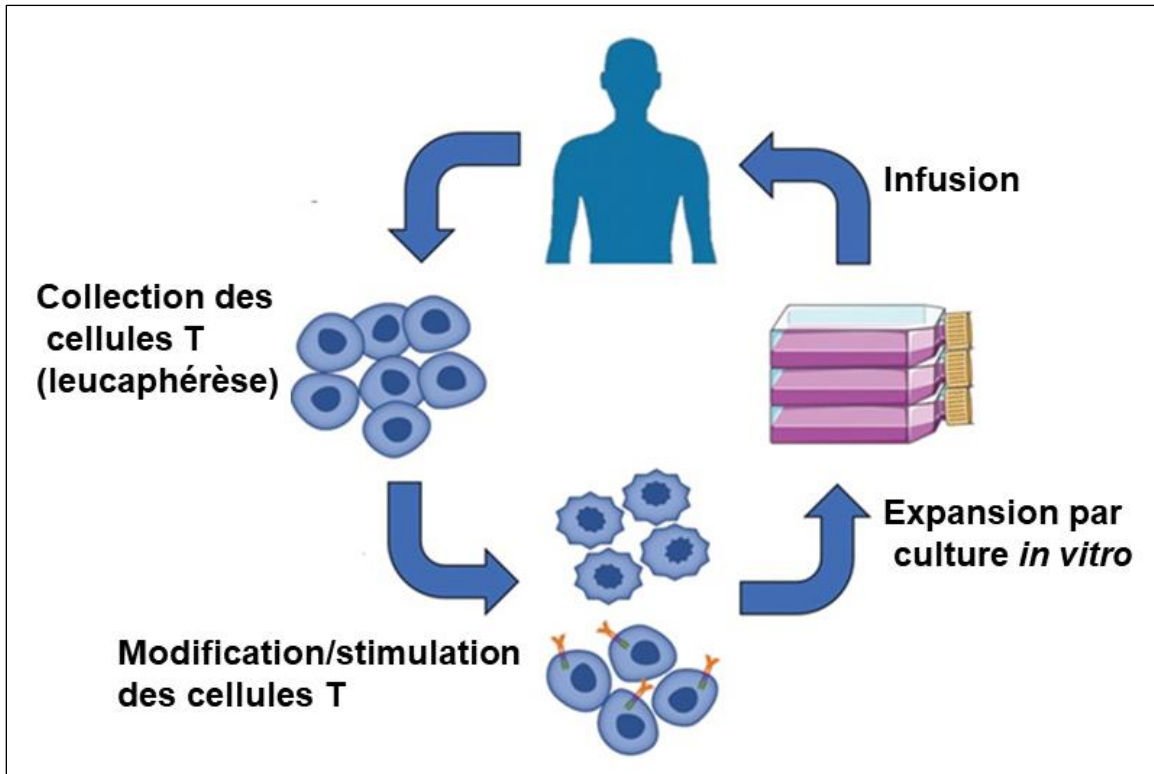
mois plus élevée par comparaison à l'autre moitié contrôle [209]. Dans une autre étude Zhang *et al.*, ont montré que le prétraitement des cellules CIK avec l'adjuvant immunologique PA-MSHA (*Pseudomonas aeruginosa-mannose-sensitive hemagglutinin*) améliore le pouvoir destructeur de ces cellules face aux cellules cancéreuses [210].



**Figure I.10:** Représentation schématique des cellules effectrices de l'immunothérapie adoptive.

Abréviations : CMH : complexe majeur d'histocompatibilité; NK: les cellules tueuses naturelles (Natural killer); LAK : Cellules tueuses activées par des lymphokines (*Lymphokine-Activated Killer*); CIK : cellules tueuses activées par des cytokines (*cytokine induced killer*); CAR : lymphocyte T à récepteur antigénique chimérique (*Chimeric Antigen Receptor*); TCR : récepteurs des cellules T (*T cell receptors*); TILs : Lymphocytes infiltrant la tumeur : *Tumor infiltrating lymphocytes*).

Il a été observé par Zhang *et al.*, en 2003 dans le CEO que l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes T (TILs) corrèle avec la survie globale des patientes. Ces TILs sont ainsi considérés comme un facteur pronostique [211, 212]. Plus tard, une méta-analyse confirme que la survie des patientes est augmentée et serait associée au TILs de type CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>. Ainsi, l'hypothèse des TILs comme biomarqueurs prédictifs dans le pronostic du CEO semble plausible [213]. Plusieurs études se sont donc intéressées à l'activation des cellules T afin de favoriser un meilleur éveil du système immunitaire contre les cellules cancéreuses du soi. La stratégie adoptée consiste en une perfusion intraveineuse de lymphocytes autologues préalablement stimulés, modifiés et amplifiés *in vitro* pour améliorer la réponse anti-tumorale autologue chez les patientes atteintes de tumeurs (Figure I.11).



**Figure I.11:** Illustration de l'approche de l'immunothérapie cellulaire adoptive. Les cellules immunitaires obtenues par leucaphères sont activées par stimulation ou modification génétique puis sont réinfusées au patient après leur expansion *in vitro*. Modifiée de [201].

Les cellules T non réactives peuvent être stimulées *in vitro* avec un antigène tumoral ou par modification génétique (généie génétique) pour exprimer soit un récepteur de l'antigène tumoral (TCR) ou un récepteur d'antigène chimérique (CAR) [214]. Cette stratégie a été utilisée avec le récepteur des cellules NK : NKG2D (*Natural killer group 2 member D*) dont le ligand est spécifique aux cellules tumorales sur un modèle murin. Les résultats montrent une augmentation de la survie des souris traitées avec ces cellules en plus de l'acquisition d'une mémoire immunitaire [215]. Une autre étude a rapporté que l'usage des cellules CAR-T ciblant les récepteurs des folates montre une régression du CEO récurrent accompagnée d'une augmentation des CD3 (cluster de différenciation 3) circulants [216].

#### **I.6.4.2 Utilisation des inhibiteurs des points de contrôle du système immunitaire**

Le système immunitaire dispose de points de contrôle (PCI) pour maintenir la tolérance du soi et pour la modulation des réponses immunitaires. Ces régulateurs clés du système se lient aux cellules immunitaires pour inhiber leurs actions. Les cellules cancéreuses utiliseraient ces PCIs afin de déjouer et se protéger des attaques du système immunitaire. Les protéines de contrôle les plus connues sont : l'antigène 4 associé aux lymphocytes cytotoxiques (CTLA-4), et le récepteur de mort programmée (PDCD1, PD1 aussi connue sous le nom de CD279). L'antigène CTLA-4 a pour fonction d'abolir l'activation des lymphocytes T auto réactifs dans les ganglions lymphatiques alors que PD1 régule l'activité des lymphocytes T précédemment activés dans les tissus non lymphatiques [217]. La liaison de PD1 à ses antigènes PD-L1 et PD-L2 inhibe l'activation, la prolifération et la survie des lymphocytes T, via des changements dans l'interféron-gamma (INF- $\gamma$ ), le facteur de nécrose tumorale alpha et IL-2. Le blocage de ces PCIs avec des anticorps monoclonaux est donc une stratégie intéressante pour le traitement du cancer. Une variété d'inhibiteurs de ces PCIs a obtenu l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*). Cependant, l'étude de ces inhibiteurs dans les cancers gynécologiques est à la traîne par rapport à d'autres cancers. En effet, le nivolumab et le pembrolizumab ciblent PD1. Le nivolumab est recommandé dans les mélanomes pulmonaires, rénaux, le lymphome de Hodgkin, les carcinomes hépatocellulaires, les carcinomes tête-cou, et colorectaux. Le pembrolizumab concerne aussi les cancers des poumons, tête-cou, le lymphome de Hodgkin et les cancers du col de l'utérus. L'ipilimumab quant à lui cible CTLA-4. Il est approuvé pour les cancers urothéliaux et pulmonaires [218]. Plusieurs essais cliniques de phase précoce sont en cours pour examiner les inhibiteurs des PCIs dans le cancer de l'ovaire. Les résultats préliminaires de l'essai clinique JAVELIN sur les tumeurs solides avec l'avélumab qui cible le ligand de PD1 (anti-PD-L1) chez 124 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire récurrent ont révélé un taux de réponse global de 9,7%, la maladie semble stable chez 55 patients (44,4%) et seuls 6,5% des patients (de grade 3/4) ont présenté une réaction indésirable liée au traitement. De façon générale, l'avélumab a montré un profil de sécurité et une activité clinique acceptable chez les patientes à l'étude [219]. Les résultats d'un autre essai du pembrolizumab impliquant 285 patientes atteintes d'un CEO de stade avancé ont rapporté une modeste activité ne dépassant

pas 10% de réponse globale au traitement. Cependant, la réponse à cet agent inhibiteur est corrélée avec la forte expression de PD-L1 [220]. Les limites de l'efficacité clinique de ces PCIs les plus observées résident dans la toxicité et les effets secondaires comprenant le plus souvent une éruption cutanée, des troubles du tractus gastro-intestinal (diarrhée), une extrême fatigue, en plus de l'inconfort lié à la perfusion [218]. De plus, plusieurs essais cliniques récents tentent de combiner l'action des inhibiteurs des PCIs avec les inhibiteurs de PARP et de VEGF dans le but de maximiser leur action thérapeutique. À titre d'exemple on cite la combinaison de niraparid avec le pembrolizumab chez les patientes atteintes d'un CEO résistant au platine [221].

En parallèle à l'immunothérapie, d'autres études tentent de performer de nouvelles approches en vue d'apporter un traitement plus spécifique à la patiente qui pourrait améliorer ou remplacer les traitements de chimiothérapie souvent lourds. Ces nouvelles approches visent à détruire plus spécifiquement les cellules cancéreuses, tout en limitant l'impact sur les cellules saines.

### **1.6.5 L'hormonothérapie dans le traitement du CEO**

L'hormonothérapie substitutive (HTS) a été approuvée par la FDA depuis les années 1940 afin de pallier aux symptômes de la ménopause principalement en administrant l'œstrogène aux femmes concernées. Plusieurs études ont par la suite remarqué que la baisse des hormones dans le cas des cancers du sein et de l'ovaire corrèle avec l'apparition de maladies chroniques et de problèmes cardiovasculaires. L'HTS est donc également prescrites pour ces femmes en guise de prévention [222].

La perte de la fonction ovarienne chez les femmes avec un CEO suite à l'ovariectomie bilatérale (l'ablation chirurgicale des deux ovaires) induit une ménopause immédiate plus intense que la ménopause physiologique surtout pour les jeunes femmes où on constate une instabilité émotionnelle, un dysfonctionnement sexuel, des symptômes vaginaux et une ostéoporose accélérée [223]. L'HTS vient donc au secours de ces femmes. Elle représente un traitement très efficace pour corriger les symptômes de la ménopause et prévenir les maladies cardiaques et d'ostéoporose [224]. Cependant, l'HTS peut stimuler l'angiogenèse et provoquer une récurrence du CEO des cellules microscopiques ou des tumeurs visibles mais pas admissibles à une chirurgie. Ce risque de récurrence est plus grand dans le cas du CEO de haut grade. Dans le cas des CEOs de bas grade le risque de développer des maladies



cardiovasculaires, et des accidents vasculaires cérébraux l'emporte sur le risque des récurrences, dans ce cas les médecins administrent avec précaution l'HTS [225]. Cependant, après avoir établi un lien entre l'œstrogène exogène et le risque de développement du cancer de l'endomètre et du cancer du sein, l'HTS a connu une baisse dans son utilisation. Il a été rapporté que l'œstrogène stimule la genèse du CEO et protège les cellules cancéreuses de l'apoptose. Comme c'est le cas pour le cancer du sein, les cellules du CEO expriment fortement les récepteurs d'œstrogène (RE) et peuvent synthétiser *in situ* de l'œstradiol via le métabolisme des lipides grâce au complexe enzymatique aromatasase ce qui fait du CEO un cancer hormonodépendant. À cet effet, plusieurs molécules inhibitrices sont utilisées dans la thérapie hormonale contre le CEO. Il s'agit principalement du létrozole inhibiteur de l'aromatase, et du tamoxifène modulateur des REs [226]. Contrairement à l'œstrogène, les progestatifs semblent protéger contre le CEO en stimulant l'apoptose des cellules de l'OSE défectueuses [227]. Dans les années 1970, la progestérone a été additionnée à la formule de l'HTS pour être administrée aux femmes souffrant de symptômes de la ménopause physiologique ou chirurgicale [224]. Le recours à la thérapie endocrinienne dans le traitement du CEO, est encore de nos jours, pas convaincant en raison de l'hétérogénéité et du manque d'informations sur le profil d'expression des récepteurs hormonaux (œstrogène/progestérone) dans les cohortes étudiées qui sont, de plus, souvent de petites tailles [222].

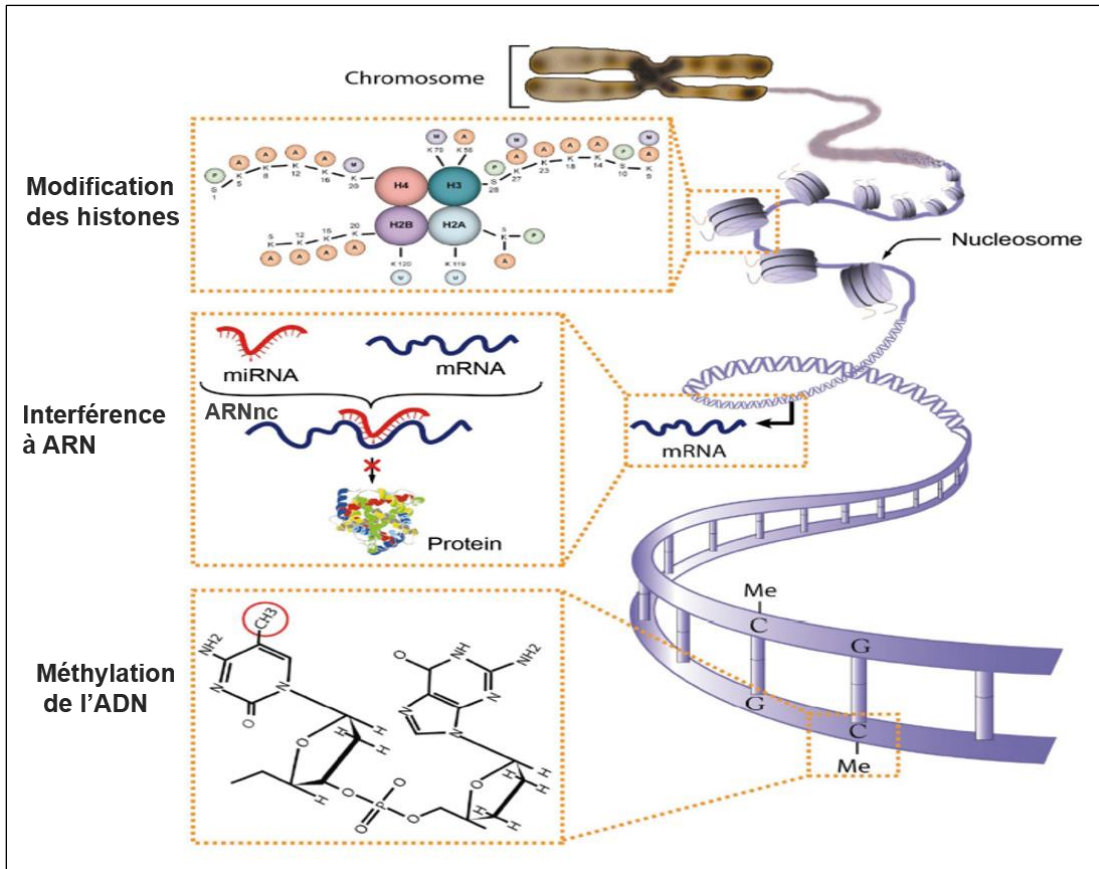
#### **I.6.6. Recours à la nanotechnologie dans le traitement du cancer de l'ovaire**

Afin de pallier aux nombreux effets indésirables de la chimiothérapie et de réduire l'atteinte des tissus sains par ces traitements chimiques toxiques, une nouvelle approche basée sur la nanotechnologie voit le jour. Le principe de cette technologie repose sur l'utilisation d'un nanovecteur afin de vectoriser et d'acheminer le principe actif (médicament) vers la tumeur sans perdre son efficacité lors du passage par les barrières naturelles et sans trop affecter les tissus sains. Plusieurs catégories de ces nanoparticules sont développées dont l'abraxane qui est sous forme de micelles en suspension utilisée dans le traitement du CEO et du cancer de sein, et du doxil approuvée par la FDA, qui est une nanocapsule liposomale enveloppée d'un manteau de polyéthylène glycol (PEG) pour favoriser sa circulation et sa concentration dans les tumeurs. Ces nanoparticules peuvent être aussi utilisées dans le diagnostic du CEO

comme c'est le cas pour le CA125 détecté même à de faibles concentrations grâce à des nanoélectrodes en or [228].

## **I.7. L'épigénétique dans le cancer de l'ovaire**

L'altération épigénétique est intimement liée à la tumorigenèse ovarienne. Par définition, l'épigénétique est un ensemble de facteurs héréditaires qui affectent l'expression des gènes sans altérer la séquence de l'ADN. L'épigénétique comprend la méthylation de l'ADN, la modification post-traductionnelle des histones, et la régulation de l'expression des gènes par les acides ribonucléiques (ARN) non codants (micro-ARN et ARN-long non codant) (Figure I.12). La méthylation de l'ADN est la marque épigénétique la mieux étudiée. Elle survient principalement au niveau d'un résidu cytosine précédant une guanine (CpG) où un groupement méthyle est ajouté au carbone 5 par les enzymes ADN méthyle transférases (DNAMT). Cette modification est impliquée dans la répression de l'activité transcriptionnelle du gène méthylé. Les îlots CpG au niveau des promoteurs des gènes dans une cellule saine sont habituellement non méthylés. La méthylation de l'ADN dans cette cellule normale induit la répression de certains gènes en lien avec les régions génomiques répétitives, pour inactiver le chromosome X ou pour assurer l'intégrité du génome.

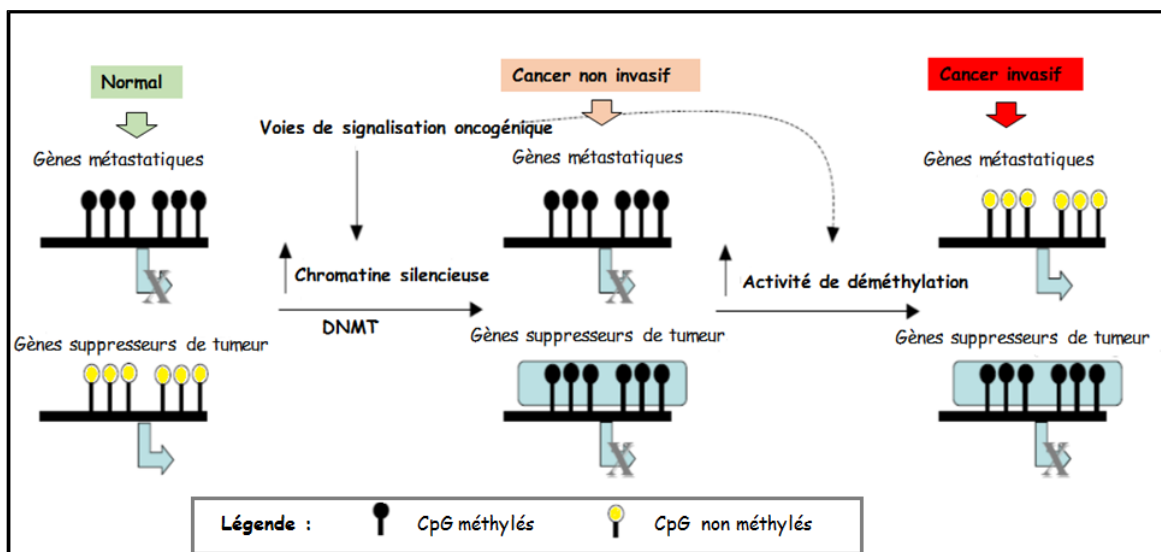


**Figure I. 12 :** Représentation schématique de la régulation épigénétique.

Schéma des mécanismes de régulation épigénétique. La méthylation de l'ADN, les modifications d'histones et la répression génique médiée par les ARNs non codants constituent trois mécanismes distincts de la régulation épigénétique. La méthylation de l'ADN est une modification covalente des cytosines (C) précédant les guanines (G) en position 5' dans les îlots CpG. Les modifications d'histone (chromatine) se réfèrent à des modifications post-traductionnelles covalentes des queues N-terminales des quatre histones centrales (H3, H4, H2A et H2B). Le mécanisme le plus récent de l'héritité épigénétique implique les ARNs non codant [229].

La méthylation de l'ADN est aberrante dans le cancer. En effet, les cellules cancéreuses se caractérisent par une hypométhylation globale qui induit l'expression des oncogènes et une instabilité génomique aboutissant à des translocations et cassures des chromosomes engendrant ainsi des pertes alléliques. À l'inverse, l'hyper-méthylation des CpGs est observée dans les promoteurs des gènes normalement non méthylés codant pour des ARNnc et des suppresseurs de tumeurs, par exemple la E-cad. Les changements épigénétiques dans leur ensemble permettent ainsi aux cellules cancéreuses de passer d'un état non invasif à un état invasif par le biais du remodelage de la chromatine (Figure I.13). Ce phénomène a pour

conséquence la régulation de l'expression des oncogènes et la répression des gènes suppresseurs de tumeurs [230, 231].



**Figure I.13:** Méthylation aberrante et cancer.

La perturbation dans la régulation physiologique de la méthylation de l'ADN conduit à des modèles aberrants de cette méthylation. Il s'agit communément de l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs et une hypométhylation des régions génomiques impliquées dans l'invasion et les métastases tumorales.

Comme dans toutes les tumeurs malignes, la méthylation de l'ADN est aussi aberrante dans le CEO. Un exemple spécifique d'hypométhylation concerne les séquences microsatellites, les éléments transposables LINE-1 ainsi que les séquences répétitives du chromosome 1 [230, 232]. De plus, un certain nombre de gènes incluant les suppresseurs de tumeur dont *BRCA1* [233], *P16* (inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A), et *RASSF1* (*Ras association domain-containing protein 1*) [234], les gènes apoptotiques tels que *ASC/TMS1* (*target of methylation-induced silencing*)/*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) [235] ainsi que les gènes de l'adhésion cellulaire, comme *CDH1* (codant pour la E-cad), qui sont hypométhylés donc sous exprimés dans le CEO [236]. Les données antérieures du laboratoire se sont intéressées à l'implication de la méthylation aberrante de l'ADN dans la dissémination du CEO. À cet effet, le profil de méthylation de l'ADN des tumeurs de types séreux de différents grades et stades par comparaison au profil de méthylation de l'ADN des échantillons contrôles non tumoraux a été étudié. Les principaux résultats de cette étude montrent que toutes les tumeurs affichent un profil semblable de l'hyperméthylation de l'ADN, tandis que les tumeurs de stades avancés (de haut grade) sont exclusivement

associées à un profil hypométhylé de certains oncogènes incriminés dans la progression du CEO mais aussi dans l'invasion et les métastases [237]. Parmi les gènes hypométhylés identifiés par cette étude et dont le rôle fonctionnel a été analysé dans le CEO, figurent *LY75*, *Hic5*, *Runx1/2* (*Runt-related transcription factor 1*), *GRHL2* (*Grainyhead Like Transcription Factor 2*), *BCAT1* (*Branched-chain aminotransferases*) et les protéines Galnt3 et 6 (*polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3/6*) qui sont impliqués dans la glycosylation aberrante du CEO et dont la double suppression semble réduire la propagation du CEO [238]. Parmi ces gènes, quatre sont impliqués dans l'EMT. En effet, *LY75* module le phénotype cellulaire et le potentiel métastatique des cellules du CEO [239]. Semblablement à *LY75*, *Hic5* peut aussi induire l'EMT suite à sa surexpression par TGF- $\beta$  [240], *GRHL2* quant à lui est un oncogène hypométhylé et surexprimé dans les CEOs de haut grade dont la répression compromet les métastases du CEO [241]. Il s'agit d'un facteur de transcription stabilisateur du phénotype hybride qui peut jouer un rôle de suppresseur de tumeur en réprimant la progression de l'EMT [242]. Les facteurs de transcription *Runx1/2* sont aussi impliqués dans la progression du CEO [243, 244]. Une récente étude implique *Runx1* dans la progression du cancer colorectal via l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et l'induction de l'EMT [245].

Les histones jouent un rôle fondamental dans l'organisation de la chromatine en contrôlant le niveau de compaction de l'ADN. Ces protéines subissent des modifications post-traductionnelles incluant l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la déamination et la sumoylation dont le rôle est la régulation des fonctions de la chromatine. L'acétylation est généralement associée à l'euchromatine et à l'ouverture de la transcription des gènes porteurs de marques mono, di ou tri-acétylation des lysines 4 de l'histone 3 (H3K4), et la mono acétylation des H3K27, H3K79 et H4K20. L'hétérochromatine quant à elle est non permissive de la transcription. Elle est caractérisée par les marques di ou triméthylation des lysines 27 ou 9 des histones 3 (H3K27me<sub>2</sub>,me<sub>3</sub>; H3K9me<sub>2</sub>,me<sub>3</sub>). L'hétérochromatine est aussi caractérisée par les marques bivalentes comportant une marque répressive de la transcription (exp : H3K27me<sub>3</sub>) et une autre active de la transcription (exp : H3K4me<sub>3</sub>). Ces marques bivalentes se rencontrent souvent dans les cellules souches embryonnaires [246]. Les mécanismes d'acétylation et de désacétylation sont finement contrôlés par les enzymes acétyltransférases et désacétylases (HDAC) respectivement. Ces

enzymes se trouvent dérégulées dans le CEO. En effet, les HDACs sont surexprimés dans les CEOs de type séreux par comparaison au type mucineux et aux tumeurs bénignes. A titre d'exemple, la marque H3K27me3 répressive de la transcription est inexistante dans 55% des CEOs de haut grade [247]. Plus d'exemples d'altérations de l'épigénétique dans le CEO sont présentés dans le tableau I.2.

**Tableau I. 2:** Exemples d'altérations de la régulation épigénétique dans le CEO. Modifié de [248]

Marque épigénétique	Modification	Fonction	Gènes cibles
Méthylation de l'ADN	Hyperméthylation	Suppresseurs de tumeur	<i>hMLH1, OPCML, ARLTS1, MY018B, SPARC, CTGF, ANGPTL2</i>
		Gènes soumis à empreinte	<i>PEG3, ARH1</i>
		Gènes d'adhésion	<i>ICAM1, CDH1</i>
		Gènes pro-apoptotiques	<i>LOT1, DAPK, PAR-4</i>
	Hypométhylation	Gènes de dommage et de Réparation de l'ADN	<i>PALB2</i>
		Promoteurs de tumeur	<i>SNCG, MCJ, IGF2, BORIS, Claudin4, GATA4, GATA6, Galnt3/6, BCAT1, GRHL2, LY75, Hic5, Runx1/2</i>
Modification des histones	Acétylation des lysines (activation)	Acétylation des histones H3 et H4	<i>P21/WAF1, cyclin B1</i>
	Méthylation des lysines (activation)	Triméthylation H3K4	<i>GATA4, GATA6</i>
	Méthylation des lysines (répression)	Diméthylation H3K9	<i>GATA4, GATA6</i>
		Triméthylation H3K27	<i>GATA4, GATA6, ADAM16, RASSF1, BAP1, SIP1, ZEB1/2</i>
miRNAs	Régulation positive	miR200a/b/c	<i>DLK1</i>
		miR299-5p	<i>MSX2</i>
		miR135-b	<i>BAP1</i>
		miR141	<i>PTEN</i>
		miR214	<i>VEGFA</i>
	Régulation négative	miR302d, mir373, miR199/140//45	<i>MMP13, FGF2, c-SRK</i>

## **I.8 Les modèles animaux dans le cancer de l’ovaire**

Dans le but d’améliorer les thérapies existantes contre le cancer de l’ovaire, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et la biologie fondamentale de cette maladie en développant des modèles spécifiques du CEO. Les souris sont souvent utilisées comme modèle *in vivo* pour les maladies humaines incluant le cancer de l’ovaire en raison de la forte similitude des génomes. Cependant moins de 5 % des traitements anticancéreux utilisés chez la souris ont démontré une efficacité acceptable dans les essais cliniques de phase III chez l’humain pour finalement être homologués. Cette limitation montre la nécessité de développer des modèles cliniques plus représentatifs de ce qui se passe chez l’Homme [249]. En effet, afin de concevoir un modèle murin (ou autre espèce) assez représentatif de l’histotype du CEO et de l’environnement tumoral il faut prendre en considération certains facteurs essentiels comme le choix des lignées de cellules cancéreuses ou des xénogreffes dérivées de la tumeur (PDX) à implanter, le site d’implantation de ces cellules cancéreuses ou PDX (sous cutanée, orthotopique, etc.) et enfin le statut immunitaire de l’hôte (immunodéficient, normal ou autres modifications). Un modèle animal réussi arrivera ainsi à imiter le schéma de croissance tumorale et les métastases observées chez la patiente à l’étude de même que la réponse à la thérapie adoptée [249].

### **I.8.1 Les modèles orthotopiques du CEO avec lignées cellulaires cancéreuses**

Les cellules cancéreuses sont transplantées chez l’hôte dans le même site anatomique d’où elles proviennent (Figure I.14). Ce modèle aboutit à la formation de tumeurs semblables à celles observées chez l’humain entre autre au niveau de l’histologie tumorale, du système vasculaire, de l’expression des gènes, du processus métastatique voire même une ressemblance dans la réponse au traitement [250].

Chez la souris, ce modèle est particulièrement intéressant pour étudier le CEO car les ovaires de la souris sont enveloppés et isolés du milieu péritonéal par une membrane protectrice appelée bourse formant une chambre de fluide pour le développement des ovocytes [251]. Cependant, dans une étude de comparaison du potentiel tumorigénique de onze différentes cellules du CEO injectées dans des souris de type CD-1 Nude immunodéficientes par voie IP et 2 lignées par voie orthotopique IB (dans la bourse des ovaires), les auteurs ont conclu que

le microenvironnement tumoral n'a pas affecté l'histologie des tumeurs formées. Toutefois, les cellules injectées par voie IP ont causé plus de métastases du CEO que celles injectées par voie IB, ce qui suggère que dans la voie IB, les cellules sont confinées dans les ovaires injectés entre autres à cause de la membrane bursale qui empêcherait les cellules cancéreuses de s'évader en dehors de l'ovaire [252]. En effet, la présence de la membrane bursale est une caractéristique anatomique de la souris. Chez l'humain, l'ovaire est situé dans la cavité péritonéale non isolée ce qui facilite le transport des cellules métastatiques par les fluides vers le péritoine et l'omentum. Cette différence anatomique pourrait ainsi limiter le modèle orthotopique de mimer avec précision les événements de métastase du CEO se produisant chez l'humain [253]. Plusieurs équipes ont développé des techniques de précision pour les modèles orthotopiques IB afin de prévenir la rupture de la bourse lors de l'injection des cellules [254, 255]. Il a été rapporté aussi que l'implantation par voie IB de différentes couches de cellules cancéreuses dont les récepteurs et les interactions cellules-cellules sont intactes est plus représentatif des événements du CEO chez l'humain par comparaison à l'injection d'une suspension de cellules [256]. Les mêmes résultats sont obtenus suite à l'injection de morceaux de tumeurs précédemment formées par injection sous cutanée avant d'être implantées par voie orthotopique IB [257]. La limite de ce modèle pourrait être relié au fait que les cellules cultivées *in vitro* après plusieurs passages pourraient perdre les caractéristiques de la complexité de la tumeur d'origine. Ces cellules en effet subissent des mutations spontanées et donc pourraient former des sous-populations hétérogènes donnant naissance après injection chez l'animal à des tumeurs avec une histologie très différente de celle attendue [258].

### **I.8.2 Les modèles des xénogreffes dérivées de patients (PDX) dans le CEO**

Le premier modèle PDX de cancer a été réussi en 1969 par Rygaard et Povlsen qui ont implanté dans des souris Nude des fragments de cancers humains de sein et de colon par voie sous cutanée [259]. En se basant sur cette approche Fu *et al.*, en 1993 ont développé le premier modèle PDX du CEO en implantant des morceaux de tumeur ovarienne humaine par voie orthotopique IB. Sur les cinq souris de l'étude, deux souris ont développé des tumeurs et métastases similaires à celles observées chez l'humain [260]. Par la suite, plusieurs études ont développé d'autres modèles PDX du CEO spécialement pour étudier la réponse aux traitements en utilisant différents types de souris, par exemples des souris Nude caractérisées



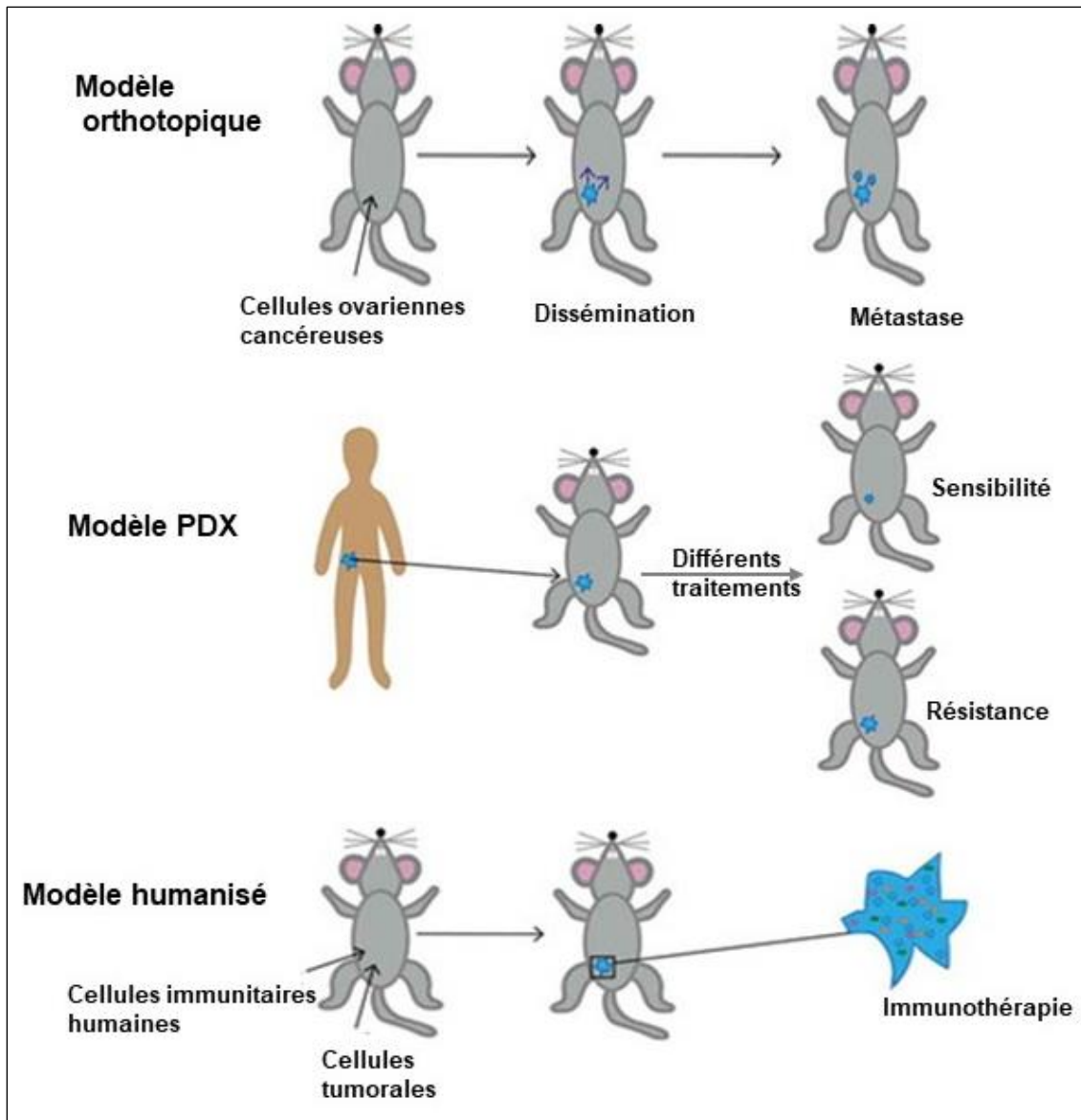
par une déficience en lymphocytes T, des souris avec une immunodéficience combinée sévère (SCID) qui présentent une déficience en lymphocytes T et B et des souris NSG (*NOD scid gamma mouse*) qui quant à elles manquent de cellules B, de cellules T, de cellules NK, de macrophages et de cellules dendritiques [261, 262]. Ricci *et al.*, ont développé des modèles PDX de souris Nude à partir de 138 échantillons d'ascites, de cellules et de fragments de tumeurs de patientes. Sur les 138 échantillons, 34 ont développé des xénogreffes dont 22 suite à une transplantation sous cutanée de fragments de tumeurs et 12 à partir des cellules d'ascites injectées par voie IP. Par la suite, un autre modèle a été développé par injection orthotopique IB des cellules issues des xénogreffes sous cutanées ou IP précédemment obtenus des 34 échantillons. Les auteurs de ce travail ont conclu que les cellules issues de l'ascite des patientes ont donné l'ascite chez les souris, les cellules formant les tumeurs solides chez la patiente ont aussi formé des tumeurs solides chez les souris. La voie d'injection demeure aussi limitante; en effet, les xénogreffes sous cutanées mettent plus de temps que celles IP pour se former. De plus, les métastases formées par le modèle IB étaient semblables au modèle IP et représentent bien le schéma de dissémination chez l'humain de même que la réponse aux traitements administrés [263]. Une autre récente étude a utilisé un modèle de PDX de souris Nude implantées de tumeurs fraîchement extraites de patientes avec un CEO pour évaluer la réponse préclinique au traitement combiné carboplatine/paclitaxel en plus d'un inhibiteur de EGFR nommé l'erlotinib. Parmi les 45 souris greffées, 22 ont donné une réponse au traitement semblable aux patientes d'origines. De plus, les souris traitées également avec l'erlotinib ont positivement répondu au traitement. Ces données suggèrent donc que l'évaluation de la réponse aux traitements des patientes atteintes de CEO peut être prédite par un modèle PDX de souris. De plus, l'erlotinib pourrait être un traitement potentiel dans la thérapie du CEO [264]. Plusieurs autres études ont rapporté que les modèles PDX sont efficaces pour miner la tumorigenèse, le schéma métastatique et la réponse aux traitements se produisant chez l'humain [265-267]. Comme dans le cas des modèles à base de cellules, les modèles animaux de PDX ont aussi certaines limitations. Par exemples les tumeurs des patients peuvent contenir des pathogènes et donc interférer avec les résultats de l'étude comme par exemple celle de Meggetto *et al.*, qui dans leur étude, ont greffé par voie sous cutanée dans des souris SCID des tumeurs lymphatiques issues de patients avec le lymphome hodgkinien. Les masses résultantes chez la souris

n'étaient pas causées par la prolifération des cellules implantées à l'origine mais viennent des lymphocytes B immortalisés par le virus Epstein-Barr [268]. Des constatations similaires sont soulevées dans d'autres études où des tumeurs lymphocytaires humaines se développent dans plusieurs modèles de PDX de cancers humains incluant le cancer de l'ovaire. Il est donc important que les marqueurs lymphocytaires humains soient vérifiés dans ces tumeurs pour bien confirmer que les tumeurs formées par ces modèles seraient semblables à celles observées chez l'humain [269, 270].

### **I.8.3 Les modèles des xénogreffes humanisés**

Un nouveau modèle murin a vu le jour ces dernières années basé sur l'implantation de cellules immunitaires humaines et parfois modifiées génétiquement afin d'étudier l'efficacité de l'immunothérapie dans le traitement du CEO. À titre d'exemple, Bankert *et al.*, dans leur étude ont greffé conjointement des cellules de tumeurs ovariennes avec des cellules immunitaires humaines (lymphocytes T et B et des plasmocytes) dans des souris NSG afin d'évaluer leur réponse à l'IL-12 exogène. Les résultats obtenus montrent que les cellules immunitaires humaines sont restées actives dans les tumeurs et ont réagi au traitement de l'IL-12 par la production de l'INF- $\gamma$  par comparaison aux souris contrôles. De plus, des immunoglobulines humaines sont trouvées dans le sérum des souris [271]. Cette thérapie à l'IL-12 a été confirmée dans un modèle de souris SCID recevant les cellules SKOV3 par voie IP et qui sont humanisées par injection des cellules CART sécrétant de l'IL-12 et qui sont conçues par modification génétique pour reconnaître une mucine des cellules cancéreuses. Les souris traitées avec les cellules CART ont montré une expression de l'INF- $\gamma$ , une régression importante des tumeurs accompagnée de l'augmentation du temps de survie [272].

Ces différents modèles de souris décrits plus hauts et récapitulés dans la Figure I.14 sont développés dans le but d'aider à mieux cerner la complexité entourant la genèse du cancer, ses métastases, sa résistance et surtout établir sa fragilité au traitement. Cette meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux du cancer conduira à l'amélioration des stratégies thérapeutiques déjà existantes.



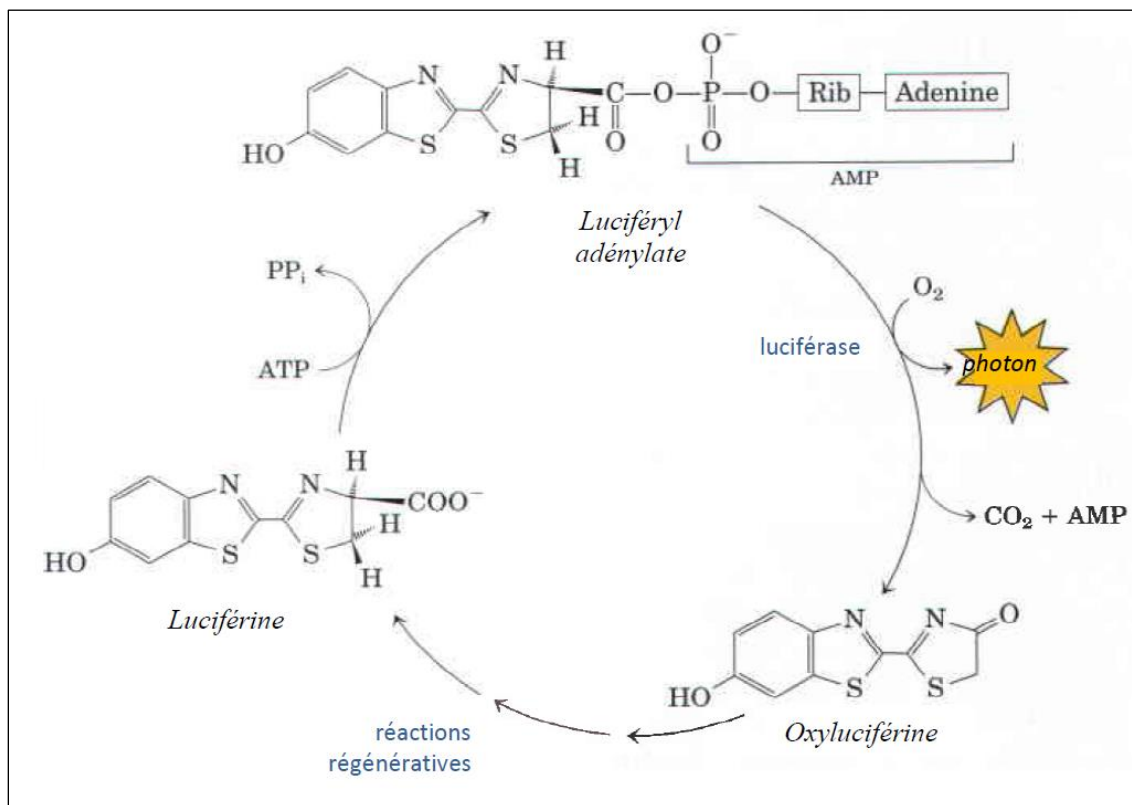
**Figure I. 14 :** Représentation schématique des différents modèles animaux utilisés dans le développement de thérapie contre le CEO.

## I.9 Méthodes de suivi de la croissance et de dissémination tumorale *in vivo*

Avant l'avènement des méthodes de l'imagerie, la mesure de xénogreffe de tumeurs implantées sous cutanée chez les animaux se faisait par palpation et par pied à coulisse [273]. Cependant les techniques d'imagerie non invasives en oncologie adaptées aux modèles murins ont connu un important essor ces dernières années. Parmi ces nouvelles technologies figurent celles qui se basent sur l'utilisation de sondes émettant des signaux (ultrasons) qui

s'accumulent dans les tumeurs pour reproduire les structures formées ou celles qui se basent sur la détection de l'expression d'un transgène rapporteur *in vivo* [274]. On cite à titre d'exemple l'imagerie par fluorescence dont le principe est l'émission de lumière par un fluorophore habituellement additionné à une protéine par clonage moléculaire comme par exemple la GFP (*green fluorescent protein*). Cette protéine recombinante émet alors une fluorescence verte (dans le cas de la GFP) après excitation à une longueur d'onde spécifique. Cette technique est avantageuse car elle nécessite peu de préparation pour l'animal lors de l'imagerie notamment elle ne requiert pas d'injection de substrat. Toutefois elle est caractérisée par la perte du signal par diffusion dans les tissus et elle est considérée moins sensible que la bioluminescence [275]. L'IRM est une autre technique récente qui fournit des images de haute résolution même pour les tissus les plus complexes, comme par exemple les images de tumeurs cérébrales [276]. Cette technique permet un suivi fréquent de l'évolution des tumeurs. Cependant, elle nécessite plus de préparation pour l'animal et les images ne peuvent être interprétées que par un spécialiste [277]. La tomographie par émission de positons (PET-scan) quant à elle est une technique rapide et plus adaptée pour la visualisation des tissus osseux. Alors que la tomographie par émission de positons (PET-scan) est nettement plus avancée que le CT-scan et l'IRM en termes de sensibilité et de précision pour la détection des tumeurs. En effet, un micro-PET-scan spécialement conçu pour les animaux de petites statures permet de détecter les tumeurs sous cutanées d'une aussi petite taille que 3mm de diamètre [278]. Cependant, cette technique se base sur l'utilisation d'isotopes radioactifs comme marqueur dont la demi-vie est très courte. De plus la préparation de l'animal pour l'imagerie peut être relativement longue et comme c'est le cas pour l'IRM, les images sont analysées par un spécialiste [277]. Dans ce projet, c'est la bioluminescence qui a été choisie comme technique pour le suivi de la croissance et de la dissémination des tumeurs *in vivo*. À la base, c'est le médecin physiologiste Raphael Dubois qui a mis au point le mécanisme de la bioluminescence chez des êtres vivants. Il s'agit d'une réaction d'oxydation du substrat luciférine par l'enzyme luciférase en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et de magnésium ( $Mg^{2+}$ ) résultant en une libération de lumière tel que décrit la toute première fois en 1956 par Green and McElroy qui ont étudié ce phénomène sur des molécules de luciférine isolées de quelques milliers de lucioles (*Photinus pyralis*) [279]. Ce cycle de bioluminescence chez les lucioles est par la suite mieux étudié. En effet, la luciférine après

clivage de l'ATP se transforme en luciféryl adénylate. Ce composé est ensuite oxydé en présence d'oxygène pour donner l'oxyluciférine et un photon (lumière). La fréquence de ce photon chez la luciole se situe entre 550-570 nm donnant une lumière verte ou jaune. L'oxyluciférine complète le cycle par des réactions de réduction [280] (Figure I.15).



**Figure I.15:** Représentation schématique du cycle de bioluminescence de la luciole.  
Tirée de [281]

La luciférase chez la luciole est codée par le gène *Luc*. L'introduction de ce gène par transfection dans les lignées cellulaires cancéreuses permet de produire la luciférase. Les souris injectées avec des cellules-*Luc* vont développer des tumeurs exprimant la luciférase qui va catalyser son substrat, la luciférine, injectée souvent par voie IP. Cette réaction va émettre de la lumière invisible à l'œil nu mais détectable par des caméras CCD (*Charge-Coupled Device*) ultrasensibles [282]. Bien que cette technique de bioluminescence présente l'avantage de ne pas avoir de bruit de fond venant de la souris (endogène), elle a néanmoins comme les autres techniques ses limites. En effet, l'expression du gène *Luc* peut parfois être instable ce qui fait disparaître le signal. De plus, seule une partie de la lumière émise arrive jusqu'à la surface de l'animal car cette lumière peut aussi être absorbée et diffusée dans les

tissus. Il est aussi important de noter que parfois un signal trop important dans les tumeurs primaires volumineuses peut se saturer ou masquer les foyers métastatiques naissants. À l'inverse, les tumeurs primaires nécrosées subissent une perte de signal [283].

## **II. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT: *Epithelial to Mesenchymal Transition*)**

Par définition l'EMT est un processus biologique qui permet à une cellule épithéliale polarisée de changer sa morphologie via le remodelage d'expression de certaines protéines favorisant son détachement de la membrane basale et lui conférant un caractère invasif et migratoire et une capacité accrue de remodelage de la MEC [284]. Cette transformation épithélio-mésenchymateuse a été observée la première fois par Elizabeth Hay chez l'embryon de poulet [285]. Par la suite, le terme transformation a été changé par transition car il s'agit d'un processus binaire. En effet, la plasticité phénotypique de l'EMT est révélée par la survenue du processus inverse s'agissant de la transition mésenchymato-épithéliale (MET) observée notamment lors du développement [286].

### **II.1 L'adhésion cellulaire**

L'adhésion de cellules semblables est un processus important pour le maintien de l'architecture tissulaire nécessaire au fonctionnement de l'organisme. En effet, une perturbation dans ce processus conduirait au développement de pathologies, à l'apparition de l'EMT voire même à la tumorigenèse. Ces connections entre les cellules sont assurées par cinq familles de molécules d'adhésion cellulaires (CAMs). Il s'agit de la famille des cadhérines, des immunoglobulines (Ig), des sélectines, des mucines et des intégrines (Tableau II.1). Contrairement aux CAMs à la famille des Ig et des intégrines, l'adhésion cellules-cellules impliquant les cadhérines et les sélectines requière des ions calcium ( $Ca^{2+}$ ). Les intégrines quant à elles sont plus spécifiques des interactions cellules-MEC [287].

**Tableau II.1:** Principales protéines d'adhésions cellulaires

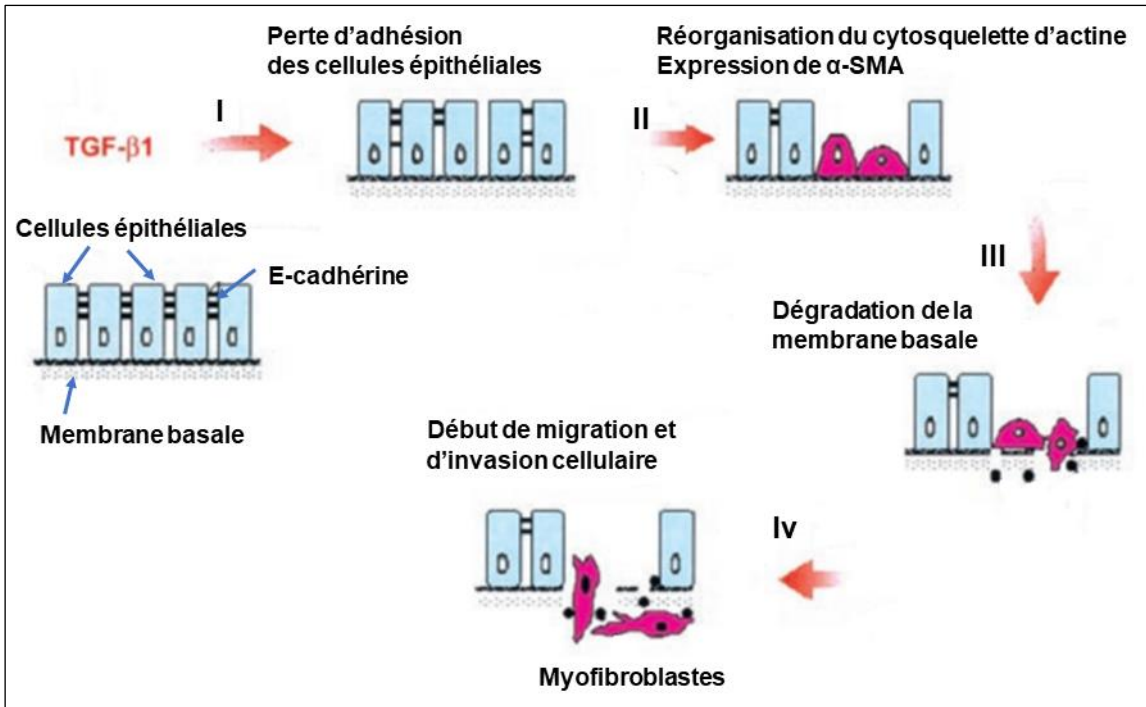
Familles de CAM	Type	Localisation
Cadhérine	E-cad N-cad P-cad VE-cad Autres	Epithéliales et embryonnaires Neurones et muscles Placenta et épiderme Vasculaires et endothéliales Desmosomes
Ig impliquées dans le cancer	ICAM VCAM N-CAM PE-CAM Mad-CAM CEA	Intercellulaire Vasculaire Neuronal Platelet-endothélial (CD31) Adressine mucoale Antigène carcinoembryonnaire
Intégrines	LFA1 MAC-1 (CD11B) VLA-4	Lymphocyte et leucocyte Cellules immunitaires Cellules souches, immunitaires
Sélectines	CD62-E CD62-P CD62-L	Endothéliales Plaquettes Leucocytes
Mucines	CD43 PSGL1	Membrane des cellules immunitaires Membrane des cellules immunitaires

Ces molécules assurent l'intégrité des tissus via différents types de jonctions cellulaires. On distingue les jonctions serrées (*zonula occludens*), les jonctions adhérentes (*zonula adhérence*) et les desmosomes [287]. De plus, les cellules épithéliales jouissent d'une certaine mobilité pour se déplacer au niveau de la même couche d'appartenance. Toutefois, dans les conditions normales, ces cellules ne peuvent pas se séparer de la membrane basale sur laquelle elles sont sises. À l'inverse, les cellules mésenchymateuses sont caractérisées par une plus grande plasticité, elles ne reposent pas sur la lame basale. Elles ne s'organisent pas en couches polarisées et ne présentent pas de points focaux d'adhésion avec les cellules voisines. Grace aux métalloprotéines (MMPs) qu'elles sécrètent, ces cellules sont migratoires, invasives et capables de digérer la MEC pour envahir l'interstitium [288].



## II.2 Principales étapes de l'EMT

L'EMT se déclenche suite à une perturbation dans l'intégrité de l'épithélium, où les cellules perdent leur contact en raison d'une baisse d'expression des protéines d'adhésion épithéliale impliquées dans les jonctions serrées principalement de la cadhérine-E (E-cad) et de ZO-1 (*Zonula occludens*) dû à un facteur externe comme par exemple le facteur de croissance transformant-Beta (TGF- $\beta$ ). La perte de la E-cad va permettre la libération de la  $\beta$ -caténine qui se trouve impliquée dans les interactions cellulaires et séquestrée au niveau de la membrane plasmique. La  $\beta$ -caténine est une protéine maîtresse de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Son enrichissement dans le cytoplasme induit sa translocation vers le noyau pour former un complexe transcriptionnel avec la protéine LEF-1 (*Lymphoid enhancer-binding factor 1*) et déclencher l'expression des gènes impliqués dans l'EMT. Lors de ce processus, le cytosquelette d'actine se réorganise. On assiste à la naissance de fibres de stress et à la synthèse de l'isoforme de l'actine nommée  $\alpha$ -SMA (*alpha smooth muscle actin*) donnant à la cellule des propriétés contractiles pour mieux migrer et mieux remodeler sa morphologie en myofibroblaste. Lors de cette transition, on assiste aussi à la transformation des filaments intermédiaires d'un type épithélial (cytokératine) en un type mésenchymateux (vimentine). Pour franchir la membrane basale, cette cellule détachée dégrade le collagène IV et la laminine. Elle va ensuite déclencher l'expression de nouvelles molécules comme la fibronectine et le collagène 1 et 3 pour faciliter son adhésion à la MEC lors de la migration [289]. Les quatre principales étapes de l'EMT sont résumées dans la Figure II.1.



**Figure II. 1:** Schéma récapitulatif des étapes principales de l'EMT. Modifiée de [289].

### II.3 Les différents types de l'EMT

L'EMT est désormais considérée comme un mécanisme de dispersion des cellules lors de l'embryogenèse. Elle est reconnue pour la formation des cellules mésenchymateuses dans les tissus lésés et aussi responsable de l'initiation du comportement invasif et métastatique des cancers épithéliaux. En effet, l'EMT est retrouvée et peut être distinguée dans trois contextes différents.

#### II.3.1 L'EMT de type 1

Le type 1 concerne toutes les transitions cellulaires rencontrées lors du développement embryonnaire incluant le processus d'implantation et de formation d'organes mais qui n'induit pas de fibrose ni de phénotype invasif entraînant une propagation systémique par la circulation. Toutefois, l'EMT de type 1 peut générer des cellules mésenchymateuses (mésenchyme primaire) qui ont le potentiel de subir par la suite une MET pour former des épithéliums secondaires. Cette transformation des cellules épithéliales primitives est observée lors de la gastrulation, lors de la formation de la crête neuronale et des valves cardiaques [288, 290].

### **II.3.2 L'EMT de type 2**

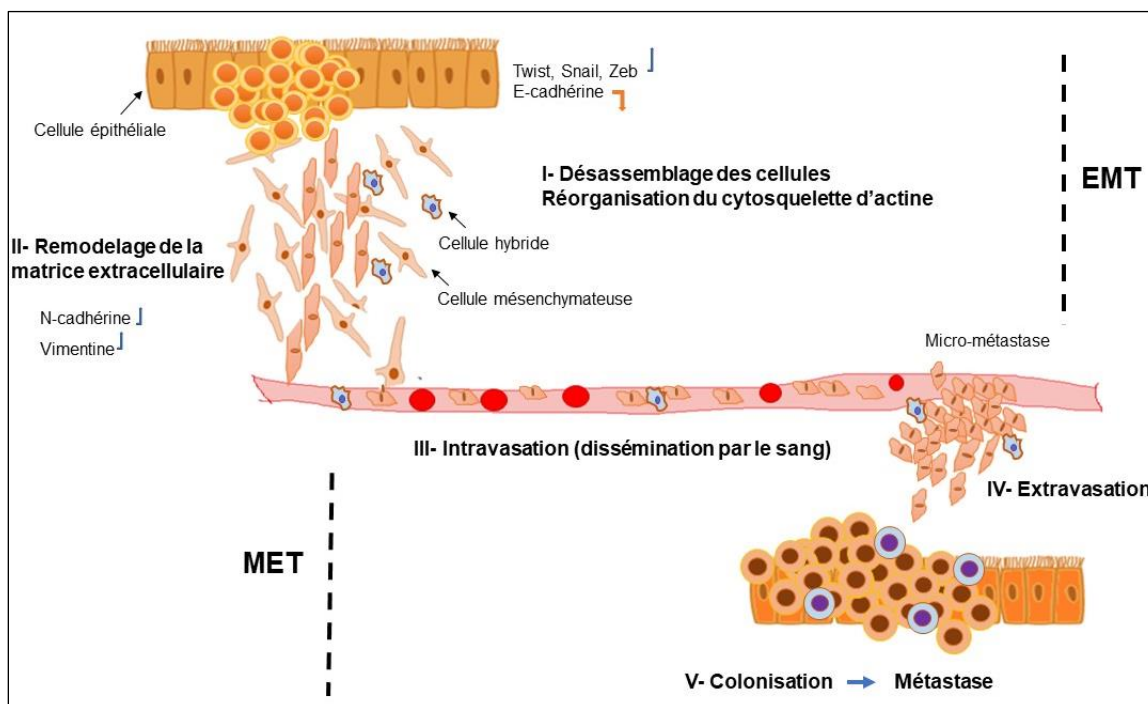
Ce type 2 implique les cellules endothéliales ou épithéliales secondaires qui transitent vers des fibroblastes en réponse à un processus inflammatoire. Cette EMT est associée au phénomène de cicatrisation de régénérescence tissulaire et aux maladies fibrotiques. Contrairement au type 1, lors de l'EMT de type 2 les cellules générées ne sont pas multipotentes mais se différencient pour ressembler spécifiquement au tissu lésé. De plus, l'EMT de type 2 apparaît sous l'effet de l'inflammation et disparaît avec son atténuation. En effet, dans le contexte de la fibrose organique, l'EMT de type 2 continue de se produire en réponse à l'inflammation persistante ce qui résulte en une accumulation de cicatrisations tissulaires aboutissant au dysfonctionnement voire même à la destruction de l'organe. Cette fibrose peut toucher plusieurs organes tels que le poumon, le foie, le rein et l'intestin [284, 291].

### **II.3.3 L'EMT de type 3**

Cette EMT s'observe dans le contexte de la progression tumorale et l'apparition des métastases. En effet, l'EMT de type 3 se produit dans les cellules néoplasiques ayant déjà subi des modifications génétiques et épigénétiques au niveau des gènes qui favorisent la croissance clonale et le développement de tumeurs localisées. Les gènes affectés par ces modifications sont le plus souvent les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs qui vont détourner les mécanismes de l'EMT naïve de base (type1) pour générer une EMT beaucoup plus flexible avec une plus grande plasticité que les EMT de types 1 et 2. En effet, certaines cellules cancéreuses (à la base épithéliales) transitant à travers l'EMT de type 3 aboutissent à des cellules complètement mésenchymateuses avec un grand pouvoir invasif. D'autres gardent leurs caractéristiques épithéliales tout en acquérant des caractéristiques mésenchymateuses donnant naissance ainsi à une EMT hybride [291]. En général, les cellules cancéreuses en cours de l'EMT perdent totalement ou en partie leurs capacités d'adhésion et gagnent en contrepartie des propriétés migratoires et protéolytiques nécessaires pour leur invasion et pour l'établissement des métastases à des organes distants (Figure II.2). L'EMT des cellules cancéreuses est donc synonyme de progression tumorale et de mauvais pronostic [292].

Bien que les trois formes d'EMT (1/2/3) présentent des similitudes phénotypiques, grâce à leurs différences bien distinctes, ces EMTs sont considérées comme trois mécanismes

différents. En effet, les cellules subissant les différents types d'EMT (EMT1, EMT2 ou EMT3) présentent des pools d'ARNm (ARN messager) différents et caractéristiques de chaque EMT. L'analyse de ces différences de transcriptome et de protéome permettra d'identifier les marqueurs décelant d'avantage les caractéristiques les plus précises de chaque type [293].



**Figure II. 2:** EMT/MET et plasticité cellulaire.

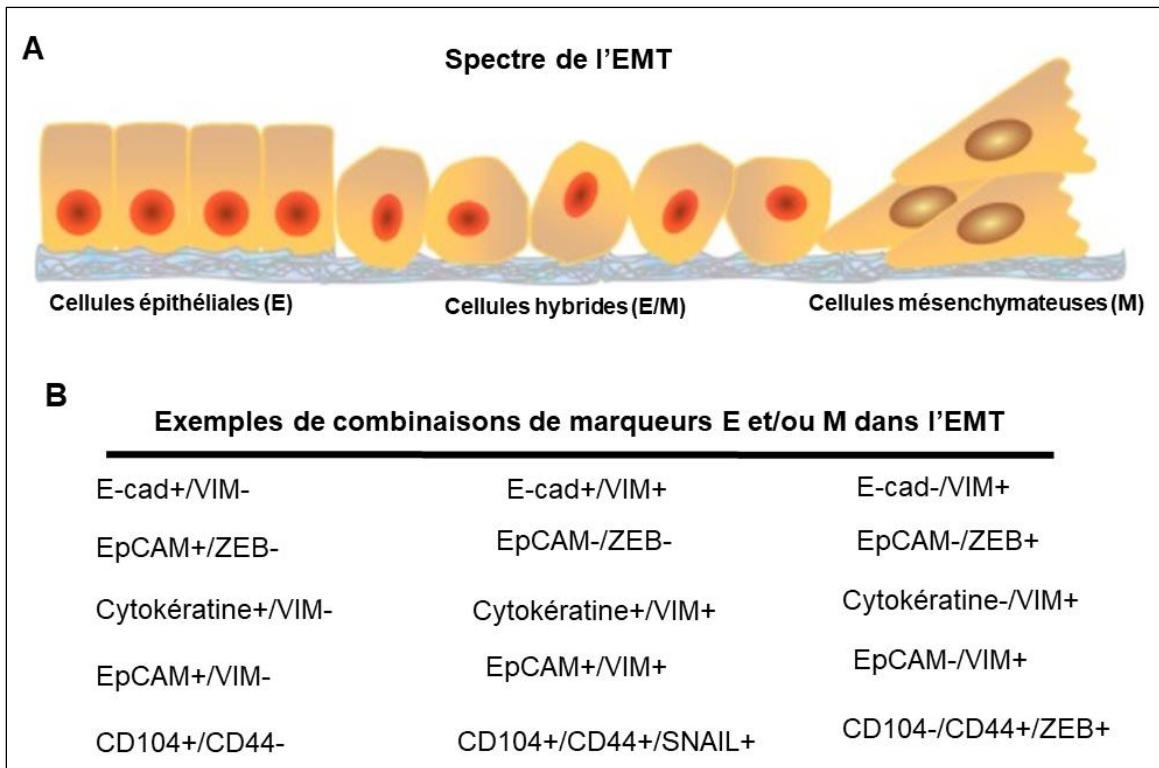
Pareillement à l'EMT de type 1 et 2, l'EMT de type 3 débute par une dispersion des cellules épithéliales suite à la perte des marqueurs épithéliaux principalement de la E-cad sous l'action de certains facteurs de transcription répresseurs comme par exemples SNAIL/ZEB. Les cellules détachées expriment de nouvelles molécules permettant de remodeler leur morphologie (N-cadherine) et la MEC (vimentine, fibronectine). Ces cellules deviennent alors complètement mésenchymateuses ou des cellules hybrides et envahissent les vaisseaux sanguins par intravasation. Pour coloniser un organe cible, ces cellules doivent quitter les vaisseaux sanguins par extravasation et recouvrir leurs caractéristiques épithéliales d'origines via la MET.

### II.3.4 La plasticité phénotypique durant l'EMT : notion de l'EMT hybride

Dans le passé, l'EMT a toujours été identifiée comme un système binaire qui permet à une cellule épithéliale de se transformer en une cellule totalement mésenchymateuse. Ce système est caractérisé par la perte d'expression des marqueurs épithéliaux (E-cad, EpCAM, occludine, cytokératines, etc) et la surexpression des marqueurs mésenchymateux (N-cad,

vimentine, fibronectine, etc) en plus de l'expression des facteurs de transcription de l'EMT (EMT-TF) et des changements morphologiques de la cellule [293]. Toutefois, ce système binaire ne permet pas d'expliquer les phénomènes réels observés dans le contexte clinique qui laissent supposer que l'EMT doit être perçue comme un spectre d'évolution morphologique de la cellule (en cours de l'EMT) plutôt qu'un statut binaire fixe. La notion de l'EMT partielle ou hybride (E/M) est donc née. La cellule hybride exprimerait à la fois des marqueurs épithéliaux et des marqueurs mésenchymateux (par exemple EpCAM<sup>+</sup>/vimentine<sup>+</sup>). Ce phénomène a d'abord été observé dans les cellules cancéreuses en circulation (CTCs : *Circulating Tumor Cells*) [294] puis dans plusieurs types de cancers [295]. La plasticité du statut hybride permet à la cellule cancéreuse de s'adapter à son environnement en lui conférant un potentiel métastatique élevé, des caractéristiques de cellule souches cancéreuses (CSC : *cancer stem cell*), voire même une résistance aux traitements [295]. L'EMT hybride est caractérisée par l'expression de facteurs de stabilisation de ce caractère hybride. En effet, à l'aide de modèles mathématiques, les facteurs NRF2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2*), Numb, OVOL2 (*Ovo like zinc finger 2*) et GRHL2 (*Grainyhead Like Transcription Factor 2*) ont été identifiés. L'expression de ces facteurs représente un mauvais pronostic pour le patient. Leur inhibition induit une EMT totale [296, 297]. Il a été rapporté qu'OVOL1/2 induit la MET dans les cellules cancéreuses via la répression de ZEB par la famille des miR200s [298].

Le statut hybride peut être divisé en des états transitoires précoces et tardifs selon leur combinaison en marqueurs E/M exprimés [299]. Quelques exemples sont illustrés dans la Figure II.3.



**Figure II. 3:** Régulateurs du spectre des cellules cancéreuses durant l'EMT.

A) Représentation schématique des cellules cancéreuses épithéliales, hybrides et mésenchymateuses.  
 B) Exemples de combinaisons de marqueurs identifiés par plusieurs études dans différents types de cancer rapportés par [295].

## II.4 Biomarqueurs de l'EMT

Diverses protéines sont identifiées comme des biomarqueurs de l'EMT suite à leur augmentation (sur-expression) ou à leur atténuation (sous-expression). Ces marqueurs proviennent de la cellule elle-même ou de son environnement. En effet, il peut s'agir de protéines membranaires, de la MEC ou des facteurs de transcription. Le changement d'expression de la E-cad est un évènement déclencheur principal de l'EMT. En effet, la E-cad est une glycoprotéine transmembranaire qui relie deux cellules voisines via son interaction avec le cytosquelette d'actine médiée par d'autres protéines ( $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ -caténine). Cette protéine constitue par excellence un marqueur épithélial. Cependant, le rôle de E-cad ne se limite pas à l'adhésion cellulaire, elle est aussi impliquée dans d'autres fonctions, telle que la prolifération, le cycle cellulaire et l'apoptose [300]. Son expression baisse considérablement avec l'EMT lors du développement embryonnaire, des fibroses tissulaires et dans les cancers [301]. Il a été rapporté aussi que la perte des fonctions de la E-cad

engendre à son tour l'EMT [302]. Un des phénomènes caractéristiques de l'avènement de l'EMT est le remplacement des cadhérines appelés *switch des cadhérines*. En effet, lors de l'EMT, la E-cadhérine qui est un marqueur typiquement épithélial disparaît et laisse place à la N-cadhérine qui caractérise plus les cellules mésenchymateuses, les fibroblastes, les neurones et les cellules cancéreuses métastatiques. Un autre *switch des cadhérines* concerne le remplacement de la E-cad par OB-cad qui est une protéine typique des fibroblastes et annonciatrice de l'EMT de type 2 [293]. Comme mentionné précédemment, l'EMT induit le déplacement de la cellule dans son environnement grâce à des changements dans la constitution de la MEC. Comme c'est le cas pour les cadhérines, les intégrines subissent aussi un *switch* durant l'EMT. Toutefois, les intégrines peuvent être conjointement exprimées dans les cellules épithéliales, fibroblastiques et mésenchymateuses. À titre d'exemple, dans le cancer du côlon, les cellules ayant subi l'EMT-3 (type3) évoluent en un phénotype métastatique caractérisé par l'expression élevée de l'intégrine B6. Alors que dans les cellules épithéliales normales et cancéreuses non invasives cette protéine est faiblement exprimée [303]. Toutefois, l'intégrine  $\alpha 5$  est caractéristique du développement embryonnaire (EMT-1) [304], de la fibrose rénale [305] ainsi que du cancer [306]. Un autre exemple de biomarqueur de l'EMT-3 est le récepteur du collagène 1 appelé DDR2 (*Discoidin Domain Receptor tyrosine kinase 2*). Ce récepteur est connu pour sa régulation positive de MMP1 et de la motilité cellulaire [307]. De plus, son expression accrue est corrélée avec la progression et les métastases du cancer du sein [308]. Durant l'EMT, la composition des filaments intermédiaires change avec la répression des kératines et l'expression accrue de la vimentine [309]. Ce changement dans les intégrines corrèle avec la surexpression des MMP2 et 9 contribuant ainsi à la dégradation de la MEC et l'invasion des cellules [310]. Contrairement aux kératines qui dirigent la E-cad à la membrane plasmique, la vimentine cible les protéines motrices et favorise, probablement via ses interactions, la morphologie et la motilité cellulaire [311]. La vimentine est utilisée comme biomarqueur pour l'EMT-3. Plusieurs études ont rapporté une corrélation positive entre ce filament intermédiaire dynamique et l'agressivité tumorale de plusieurs cancers [312-314]. La localisation de  $\beta$ -caténine est aussi indicatrice de l'EMT. En effet, comme déjà mentionné plus haut, dans les cellules épithéliales, la  $\beta$ -caténine est impliquée avec la E-cad dans les jonctions cellulaires au niveau de la membrane plasmique. L'excès de  $\beta$ -caténine est dégradé par le protéasome après

ubiquitination. La libération de la  $\beta$ -caténine et son accumulation dans le cytoplasme et le noyau induit l'activation des gènes de l'EMT. Cette protéine est en effet utilisée comme marqueur de l'EMT embryonnaire, de fibrose et du cancer incluant le CEO [315-317].

Plusieurs facteurs de transcription peuvent aussi être considérés comme des marqueurs de l'EMT. Cependant, ces mêmes facteurs sont aussi des activateurs de l'EMT, leurs rôles seront donc discutés dans la rubrique II.5.1.

## **II.5 Processus cellulaires conduisant à l'EMT**

Dans tous les contextes, la récapitulation des évènements clés de l'EMT sont : 1) la perte de la polarité apico-basale des cellules épithéliales et la dislocation des interactions cellules-cellules, 2) la réorganisation du cytosquelette et l'acquisition d'une morphologie mésenchymateuse, 3) le remodelage de la MEC et le gain d'un pouvoir invasif. L'avènement de ces changements nécessite une reprogrammation cellulaire affectant plusieurs réseaux dont la signalisation, le programme transcriptionnel et épigénétique.

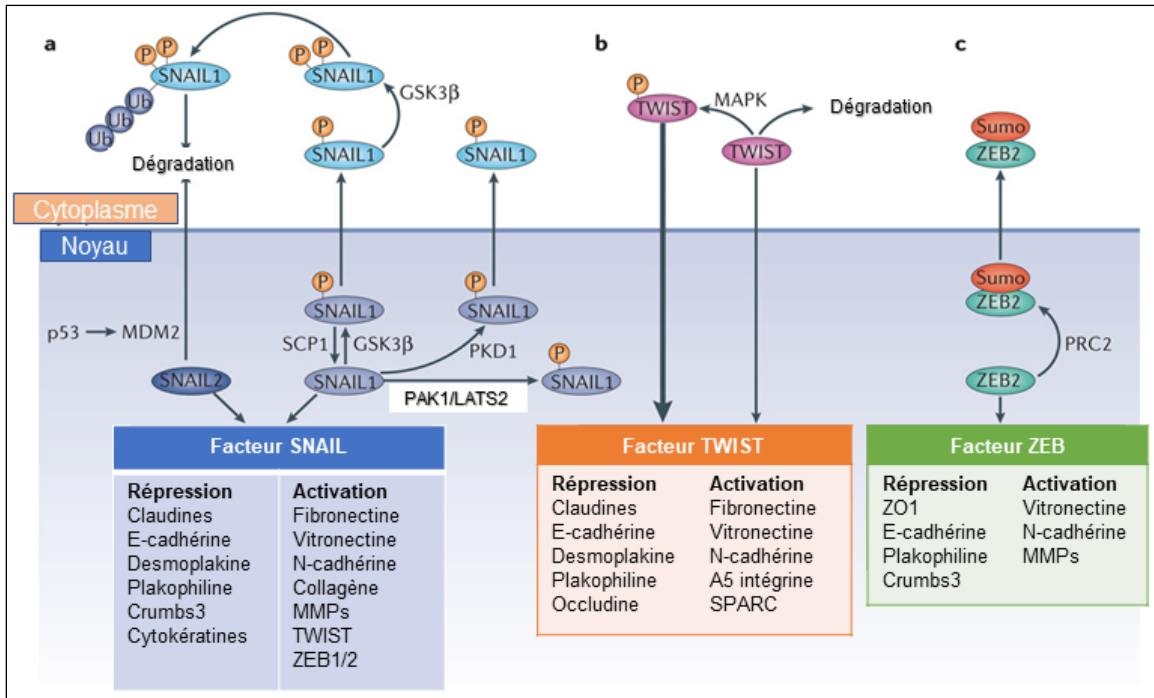
### **II.5.1 Les facteurs de transcription et activateurs de l'EMT**

Le changement dans l'expression des gènes impliqués dans le maintien du phénotype épithélial ou mésenchymateux est régulé par un ensemble de facteurs de transcription dont les facteurs à doigts de zinc : SNAIL et ZEB1 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*) et le facteur hélice-boucle-hélice : TWIST1 (*Twist-related protein 1*). Ces EMT-TF se régulent mutuellement et coopèrent dans la régulation des gènes cibles. En général, ces facteurs de transcription sont des activateurs de l'EMT dont la fonction principale est la répression des marqueurs épithéliaux et l'induction des marqueurs mésenchymateux [318, 319] (Figure II.4). La protéine SNAIL1/2 (aussi connue sous le nom de SLUG) est incriminée dans l'activation de l'EMT pendant le développement, la fibrose et le cancer [320]. Ce facteur de transcription réprime la protéine E-cad en se fixant sur son promoteur [321] et en impliquant un mécanisme complexe de régulation épigénétique des histones au niveau de son promoteur [322]. En plus de réprimer les gènes épithéliaux, SNAIL active les marqueurs mésenchymateux comme par exemple la vimentine [323] et peut être régulé à son tour par plusieurs voies de signalisation favorisant [324] ou inhibant son action [325].



Le facteur de transcription TWIST1 est activé par plusieurs voies de signalisation durant le développement et la tumorigenèse [318]. À titre d'exemple, le facteur 1-alpha inductible par l'hypoxie (HIF1 $\alpha$  : *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) active TWIST dans des conditions d'hypoxie et à son tour TWIST induit l'EMT et la propagation des cellules tumorales [326]. Comme dans le cas de SNAIL, TWIST est également un répresseur de la E-cad [327]. Ce facteur est aussi stabilisé via sa phosphorylation [328].

Le facteur de transcription ZEB est aussi connu pour son activité répressive de la E-cad via le recrutement des protéines du remodelage de la chromatine tel que le complexe SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) [329]. Comme c'est le cas dans le cancer colorectal, ZEB1 peut en parallèle activer l'expression des gènes de l'EMT via un mécanisme épigénétique impliquant la méthylation des histones [330]. ZEB est régulé positivement par TGF- $\beta$ , Wnt et par la signalisation des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*). Il est régulé et régule à son tour les facteurs SNAIL et TWIST [331, 332].



**Figure II. 4 :** Rôle et régulation des principaux EMT-TF. Modifiée de [333].

L'EMT est gouvernée par les trois facteurs de transcription clés SNAIL, TWIST et ZEB qui ont pour principale fonction la répression des marqueurs épithéliaux et la stimulation des marqueurs mésenchymateux. Ces EMT-TF sont à leur tour contrôlés par des modifications post-traductionnelles régulant leur activité, leur localisation et leur stabilité. **a)** SNAIL est phosphorylée (P) par l'enzyme GSK-3 $\beta$  (*glycogene-synthase kinase 3- $\beta$* ) au niveau de deux motifs. La phosphorylation du premier motif permet l'exportation de SNAIL en dehors du noyau tandis que la 2<sup>ème</sup> phosphorylation la protège de l'ubiquitination (Ub). La phosphorylation de SNAIL par la protéine kinase D1 (PKD1) ou par le suppresseur de tumeur 2 (LATS2) ou sa déphosphorylation par phosphatase SCP1 maintient SNAIL active dans le noyau. SNAIL peut être aussi dégradée via le complexe P53-MDM2 (*murine double minute 2*). **b)** TWIST est protégée de la dégradation et reste fonctionnelle dans le noyau suite à sa phosphorylation par JNK (*MAPK p38, JUN N-terminal kinase*) et ERK. **c)** ZEB2 perd ses fonctions suite à sa SUMOylation par PRC2 (*polycomb repressive complexe 2*) qui induit son exportation du noyau.

De récentes études ont mis en évidence de nouveaux EMT-TF impliqués dans le développement ou dans le cancer. À titre d'exemple, on cite les facteurs FOX (*forkhead box*) à domaines de liaison à l'ADN [334], la famille des facteurs de transcription GATA présentent aussi un domaine de liaison à l'ADN et contrôlent la différenciation cellulaire [335, 336].

## II.5.2 Les voies de signalisation de l'EMT

La capacité des cellules épithéliales à transiter vers un phénotype complètement ou partiellement mésenchymateux est régi par un programme transcriptionnel contrôlé par

plusieurs voies de signalisation. Ces voies, activées par différents stimuli du microenvironnement (facteurs de croissance, cytokines, hypoxie...) induisent l'expression ou la translocation nucléaire des facteurs de transcription ( $\beta$ -caténine, SNAIL, ZEB, TWIST) définissant le devenir de cette transition.

### **II.5.2.1 Voie Notch**

La voie de signalisation Notch provoque l'EMT via l'hypoxie dans plusieurs cancers incluant le cancer du sein, [337] de la prostate [338] et de l'ovaire [339] accompagnée d'une forte expression des marqueurs mésenchymateux et du phénomène de résistance aux traitements. Cette voie induit l'expression du facteur HIF-1 $\alpha$  et stabilise ainsi SNAIL [340]. Il a été observé dans l'adénocarcinome pulmonaire que l'inhibition de Notch diminue le pouvoir invasif des cellules en inversant partiellement l'EMT [341]. De plus, Notch promeut aussi indirectement l'EMT via d'autres voies de signalisation (NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) et  $\beta$ -caténine) et à travers la répression des miRNAs de la famille des miR200s connus pour leur régulation négative de l'EMT [342].

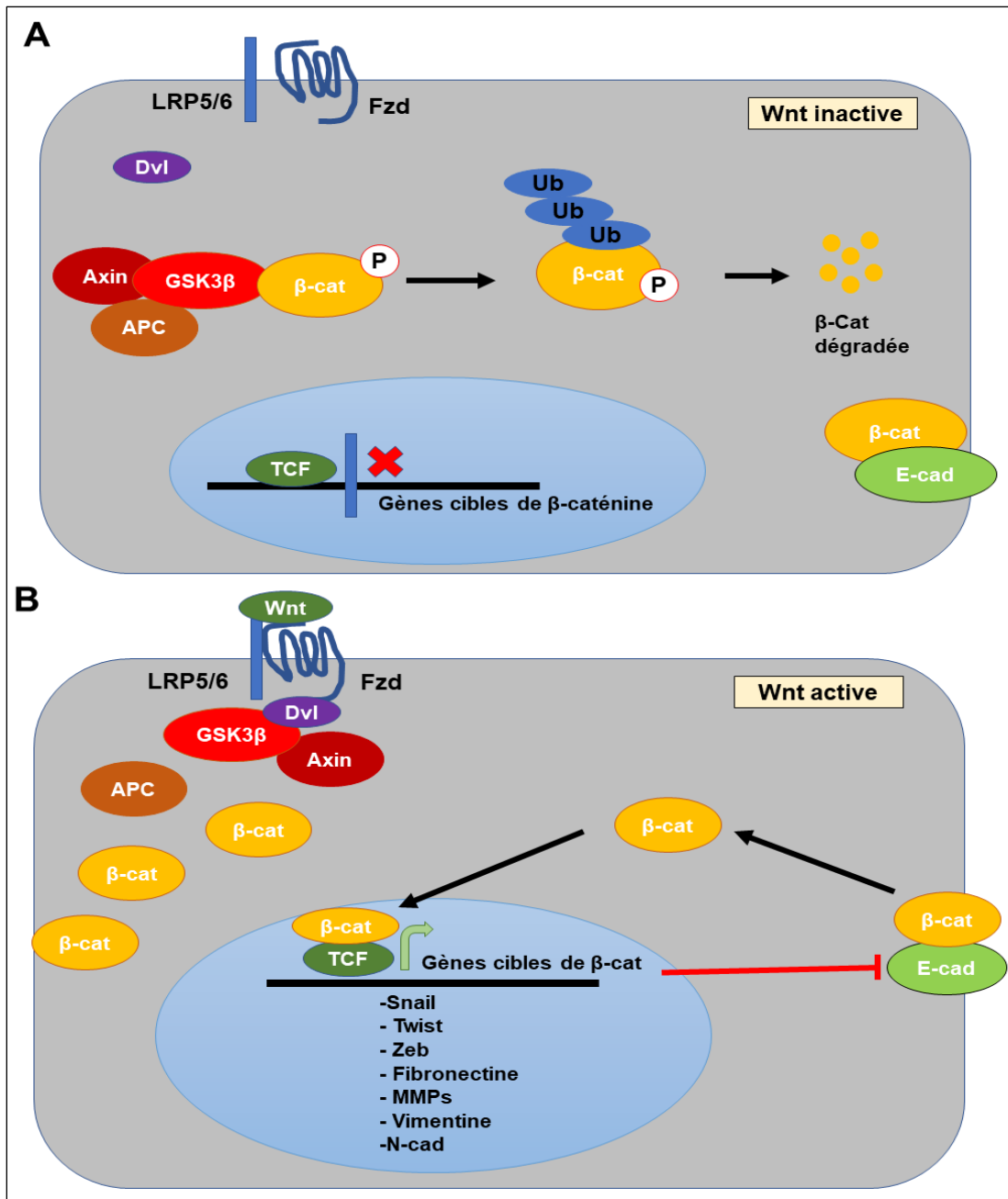
### **II.5.2.2 Voie TGF- $\beta$ et BMPs (*Bone morphogenetic proteins*)**

La voie du TGF- $\beta$  est la voie la plus caractérisée dans l'induction de l'EMT observée dans la fibrose et le cancer. Cette signalisation est généralement activée par les molécules TGF- $\beta$ 1/2/3 et les protéines BMPs [343]. La cascade de signalisation du TGF- $\beta$  est déclenchée suite à la liaison du ligand TGF- $\beta$  avec son récepteur hétéro-tétramérique de type I et II (TGF- $\beta$ R1 et TGF- $\beta$ R11). TGF- $\beta$ R11 active la fonction kinase de TGF- $\beta$ R1 par transphosphorylation. Les facteurs de transcription smad2 et 3 phosphorylés par TGF- $\beta$ R1 forment alors un complexe avec smad4. Ce complexe trimérique régule ainsi la localisation et la transcription des gènes cibles dont les facteurs pionniers de l'EMT : SNAIL, TWIST et ZEB [344, 345]. Semblablement au TGF- $\beta$ , la signalisation BMP implique les ligands BMPs et des récepteurs de type I appelés kinases de type activine (ALK : *activin-like kinase*) et des récepteurs de type II spécifiques appelés BMP-RII [346]. La signalisation BMP est aussi impliquée dans l'EMT comme rapporté dans le contexte du cancer du pancréas où les BMP4 et BMP7 favorisent l'invasion des cellules cancéreuses via la répression de E-cad et l'expression des MMPs [347]. D'autre part, ces BMPs sont aussi impliquées dans la MET

comme c'est rapporté dans la fibrose rénale où BMP7 favorise la restauration de la E-cad et l'expression du collagène 1 [348].

### II.5.2.3 Voie Wnt/ $\beta$ -caténine

L'activation de cette voie débute par le recrutement du ligand Wnt par son récepteur complexe composé de la protéine Frizzled (FZD) (contenant 7 domaines transmembranaires) et une protéine apparentée aux récepteurs des LDL (*Low-Density Lipoprotein*) appelée LPR (*LDL-Related Protein*). Le complexe Wnt/FZD/LPR formé du côté extracellulaire recrute la protéine Dishevelled (DVL) qui va recruter à son tour la kinase GSK-3 $\beta$ . Cette kinase va d'un côté phosphoryler les domaines intracellulaires de LPR et d'un autre côté lever cette phosphorylation sur la  $\beta$ -caténine cytoplasmique médiée par les protéines Axin1 et APC2 (*Adenomatous polyposis coli protein 2*). La  $\beta$ -caténine non phosphorylée est protégée de l'ubiquitination et de la dégradation par le protéasome. Cette protéine s'accumule dans le cytoplasme puis transloque vers le noyau pour induire l'expression de ses gènes cibles à travers son association avec les facteurs de transcription TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*). Les gènes cibles de la  $\beta$ -caténine incluent les marqueurs mésenchymateux et les facteurs de transcription inducteurs de l'EMT [349] (Figure II.5). La signalisation Wnt est rencontrée dans l'EMT reliée au processus du développement. En effet, il a été rapporté que les embryons de souris déficients en WNT3 ne forment pas de mésoderme [350]. Cette signalisation permet aussi le développement de la crête neuronale [351]. La signalisation Wnt promeut également l'EMT reliée à la progression de plusieurs types de cancer [352].



**Figure II.5:** Mécanisme d'activation de la voie Wnt/β-caténine.

**A)** En absence du ligand Wnt le complexe destructeur Axin/APC2/GSK3-β est actif. La kinase GSK3-β va donc phosphoryler la β-Caténine (β-cat) au niveau des serines 33/37/45 et de la thréonine 41. L'ubiquitine E-3 reconnaît et ubiquitine la β-cat phosphorylée pour être dégradée par le protéasome 26S. La transcription des gènes cibles de cette voie est réprimée. **B)** Le ligand Wnt présent dans le milieu extracellulaire, se lie à ses récepteurs Fzd et LRP5/6 pour initier la signalisation en aval. Ce complexe ligand-récepteurs active la protéine Dvl dont le rôle est d'inhiber la formation du complexe destructeur Axin/APC/GSK3-β. Il en résulte une accumulation de la β-cat dans le cytoplasme. Une fois au noyau, la β-cat s'associe aux facteurs TCF/LEF pour induire l'expression des gènes cibles. Certains de ces gènes sont essentiels pour l'EMT, leur rôle est de réprimer l'E-cad. La β-cat séquestrée au niveau de la membrane se libère suite à la répression de E-cad et transloque de nouveau dans le noyau pour maintenir la voie active. Figure modifiée de [353].

#### II.5.2.4 Autres voies inductrices de l'EMT

La stimulation des récepteurs tyrosine Kinase (RTK) induit l'activation des voies de signalisation PI3K-AKT (*phosphatidylinositol-3-kinase-AKT*), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Ces voies sont toutes reconnues comme activatrices de l'EMT [354]. Les voies ERK et MAPK peuvent aussi être activées par les mutations des gènes RAS (*Rat sarcoma*) et RAF dans les cellules cancéreuses. La signalisation RAS et RAF aboutit à l'activation de SNAIL des RHO-GTPase favorisant l'activation de l'EMT et la motilité cellulaire [355]. Une récente étude a rapporté que la signalisation ERK intervient dans la reprogrammation épigénétique en faveur de l'expression des gènes impliqués dans l'EMT. En effet, l'inhibition chimique de ERK affecte l'acétylation des histones H3K27 aux niveaux des gènes régulateurs de l'EMT ce qui résulte en un phénotype proche des cellules épithéliales [356]. La signalisation FGF (*fibroblast growth factor*) est aussi impliquée dans l'activation de l'EMT dans les cellules cancéreuses accompagnée de la surexpression de SNAIL2 et MMP3 en plus de la déstabilisation des desmosomes [357]. Cette signalisation est aussi importante dans l'EMT-1 lors de la gastrulation et la migration des cellules de la crête neuronale [358]. D'autres études rapportent que L'EGF (*Epidermal growth factor*) est aussi impliqué dans l'induction de l'EMT lors du développement embryonnaire et durant le cancer [359, 360].

Les cellules épithéliales perçoivent de nombreux signaux extracellulaires et activent une réponse de différenciation pouvant mener à l'EMT. Plusieurs voies de signalisation peuvent donc être activées en même temps conduisant à l'activation de facteurs de transcription qui à leur tour induisent l'activation d'autres voies. Il existe alors une coopération de signalisation et une convergence commune de ces voies sur l'avènement de l'EMT. À titre d'exemples, la voie Wnt coopère avec les membres de la famille du TGF- $\beta$  et du FGF pour réguler l'EMT durant la gastrulation [361]. TGF- $\beta$  facilite l'EMT induit par l'EGF et le FGF dans les cellules cancéreuses [362]. Également, l'activation des voies ERK et MAPK en réponse aux facteurs de croissance font augmenter l'EMT induite par le TGF- $\beta$  [363]. Les voies Wnt et TGF- $\beta$  coopèrent aussi pour la régulation d'expression des gènes de l'EMT [288]. À l'inverse, ces voies de signalisation se chevauchent aussi pour réprimer l'EMT. À titre d'exemple l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) qui peut induire l'EMT peut aussi inhiber l'EMT induite par TGF- $\beta$  tel qu'observé dans la fibrose rénale [364].

## II.6 La régulation épigénétique de l'EMT

Outre les molécules, facteurs de transcription et voies de signalisation, la plasticité de la cellule en EMT est aussi régulée par des mécanismes épigénétiques. Nous abordons quelques exemples de cette régulation.

L'inactivation de *CDHI* par hyperméthylation d'ADN est un évènement courant dans plusieurs cancers humains notamment le cancer du sein, du poumon, de la vessie, de l'ovaire et de la prostate [365, 366]. Cette hyperméthylation du promoteur du gène *CDHI* (codant pour la E-cadhérine) corrèle avec l'apparition de l'EMT et avec le pouvoir invasif et métastatique des cellules cancéreuses comme c'est le cas dans le cancer du sein [367]. Dans le cancer du sein de type basal, *CDHI* est également réprimé par hyperméthylation médiée par ZEB1 qui recrute la DNMT1 au niveau de son promoteur [368]. Le gène *KLF4* (*Krüppel-like factor 4*) est un facteur de transcription qui semble réprimer l'EMT en activant l'expression des protéines épithéliales. *KLF4* se trouve inactivé par hyperméthylation dans la fibrose rénale [369]. Dans le cancer de l'ovaire, le gène *IQGAP2* (*GTPase-activating-like protein*) est hyperméthylé et sous exprimé. En effet, *IQGAP2* est considéré comme un suppresseur de tumeur qui bloque l'EMT et les métastases du CEO via la suppression de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine [370]. Les inhibiteurs de méthylation de l'ADN tel que la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-aza-CdR) se sont révélés intéressants comme agents anti-cancéreux via la réactivation de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur [371]. Toutefois, d'autres études ont montré que ces inhibiteurs de la méthylation de l'ADN peuvent en contrepartie activer les oncogènes et les gènes de l'EMT ce qui peut conduire à l'invasion et aux métastases des tumeurs [372, 373].

Il est connu que généralement, l'acétylation des histones est associée à l'activation de la transcription tandis que la désacétylation est reliée au caractère répressif de la transcription. Ce processus se fait par le biais d'enzymes appelées acétyltransférases qui ont pour rôle de rajouter un groupement acétyle à certaines lysines d'histones distinctes comme les résidus K9 et K14 de l'histone H3. Ce processus est inversé par une autre famille d'enzyme appelées les HDACs. Pendant la métastase des cellules cancéreuses, les désacétylases HDAC1 et HDAC2 sont recrutées par SNAIL au niveau du promoteur *CDHI* (promoteur de la E-cad) pour le rendre silencieux. En effet, il a été montré que le blocage de HDAC par un inhibiteur chimique prévient les métastases et inverse l'EMT [374]. D'autres études ont impliqué

l'histone déméthylase 1A spécifique à la lysine (KDM1A appelée aussi LSD1 (*Lysine Specific Demethylase 1A*)) dans la régulation de l'EMT et la progression tumorale. Cette enzyme permet l'élimination du groupe méthyle de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) afin d'activer la transcription [375]. Le rôle de LSD1 est aussi montré dans le cancer du sein, où cette enzyme est recrutée par SNAIL au niveau des promoteurs des gènes épithéliaux (E-cad, cytokératine, claudine) afin de les désactiver par déméthylation de la chromatine au niveau de la marque activatrice de la transcription H3K4m2 ce qui induit l'EMT [376]. Un autre exemple concerne la régulation par les micro-ARNs. La famille des miR200s (miR200a, miR200b, miR200c, miR141 et miR429) de même que miR205 maintiennent le phénotype épithélial et l'expression de E-cad par les cellules via la dégradation des ARNm de ZEB1/2 [377, 378]. À l'inverse, une fois l'EMT enclenchée, les facteurs ZEB1/2 à leur tour induisent la répression des miR200s au niveau de leur promoteur afin d'assurer la progression de l'EMT et l'acquisition des caractéristiques de cellules souches cancéreuses [379]. Ces miRNAs contribuant à la plasticité phénotypique sont eux-mêmes soumis à une régulation épigénétique. En effet, l'inactivation par hyperméthylation des ilots CpG réduit sous silence de manière stable les promoteurs des miR200s comme observé dans le cancer hautement invasif de poumon [380], dans les cancers de vessie résistants au cisplatine [381], ainsi que dans le cancer du sein [382]. Les ARNs longs non-codant (LncRNA : *Long non-coding RNA*) sont des ARNs qui dépassent les 200 nucléotides de long et qui ne codent pour aucune protéine. En plus de leurs divers rôles de régulation dans de nombreux mécanismes cellulaires, ces LncRNA sont aussi impliqués dans l'EMT et le cancer [383]. En effet, le LncRNA TUG1 (*Taurine-upregulated gene 1*) est associé au caractère invasif du cancer colorectal via la promotion de l'EMT [384]. À l'inverse dans le cancer du foie, le LncRNA TUSC7 (*tumor suppressor candidate 7*) réprime l'EMT. La baisse d'expression de cet ARN est un mauvais pronostic pour les patients avec ce type de cancer [385]. Le LncRNA MALAT (*The metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1*) est aussi considéré comme un suppresseur de tumeur dans le cancer du sein, où sa baisse est accompagnée de l'apparition de l'EMT [386].



## II.7 L'EMT dans le cancer épithélial de l'ovaire

Les observations cliniques des tumeurs du CEO révèlent l'existence d'une variété de cellules à divers phénotypes (épithélial, hybride et mésenchymateux) formant des agrégats multicellulaires (AMC). Ces cellules qui s'organisent en AMC sont caractérisées par une dynamique d'expression des cadhérines de types E ou N ou l'expression conjointe des deux types E+N générant des agrégats hybrides beaucoup plus invasifs que les cellules exprimant uniquement la E-cad [387, 388]. Comme dans plusieurs cancers, un petit groupe de cellules initiatrices de tumeur a été trouvé dans le CEO [389, 390]. Ces cellules présentent des caractéristiques mésenchymateuses, hybrides et de cellules souches avec un potentiel tumorigénique et de prolifération élevé [391, 392]. La contribution de l'EMT dans le développement du CEO de type séreux a été constatée suite à l'inhibition du facteur de transcription PAX2 (*Paired box gene 2*) dont le rôle est la préservation de l'état différencié des cellules épithéliales de l'oviducte. La répression de ce facteur de transcription a conduit au développement de lésions précurseurs du CEO de type séreux de haut grade [393]. Comme déjà mentionné, l'EMT dans le CEO est aussi provoquée par divers stimuli menant à l'activation de certaines voies comme celle du TGF- $\beta$ . En effet, le TGF- $\beta$  est une molécule présente dans le liquide folliculaire qui est libérée pendant l'ovulation [391, 394]. Les autres facteurs tels que EGF, HGF et l'endothéline-1 peuvent aussi induire l'EMT dans le CEO [395]. Chez des patientes avec un CEO de type carcinome à cellules claires, l'expression de TWIST est très élevée et corrèle avec la progression de la maladie. L'expression de TWIST constitue donc un mauvais pronostic pour ces patientes [396]. Dans une autre étude incluant 174 échantillons de tumeurs ovariennes primaires et 34 métastases, il a été observé que l'expression de la E-cad analysée par IHC est inversement proportionnelle à l'expression de SNAIL dans les métastases. En effet, les tumeurs disséminées dans l'espace péritonéal présentent une très forte expression de SNAIL par comparaison aux tumeurs primaires [397]. Le facteur de transcription ZEB corrèle aussi avec le potentiel métastatique dans le CEO. En effet, la suppression de ZEB dans les cellules SKOV3 par sh-RNA (*short hairpin RNA*) réduit le développement de tumeur dans un modèle de xénogreffe de souris. De plus, la répression de ZEB a conduit au blocage de l'EMT suite à l'expression de miR200c [398]. De nombreuses études ont mis en évidence la relation EMT-résistance aux traitements dans le CEO. Il a été observé que les cellules du CEO (SKOV3, NOS2, TAOV) exposées à des doses

élevées du paclitaxel de manière continue finissent par développer une chimiorésistance et une EMT avec un potentiel accru pour les métastases [399]. Une étude similaire a montré que le cisplatine induit l'expression de TWIST dans les cellules du CEO augmentant leur potentiel métastatique [400]. Un effet semblable de chimiorésistance et de pouvoir métastatique est obtenu avec les cellules SKOV3 traitées avec le carboplatine [401]. En plus des facteurs de transcription, les marqueurs de l'EMT sont aussi liés à la chimiorésistance du CEO. À titre d'exemple, la vimentine est fortement exprimée dans la lignée cellulaire A2780S-cis (résistante au cisplatine) par comparaison à la lignée A2780S sensible à ce traitement [402]. La vimentine et ZEB se sont également démarqués comme marqueurs de chimiorésistance dans une étude analysant l'expression de 10 marqueurs de l'EMT dans 100 échantillons du CEO de stades avancés [403]. À ce jour, les mécanismes exacts de cette résistance aux traitements ne sont pas bien clairs. Plusieurs études basées sur l'utilisation d'échantillons humains suggèrent que ce phénomène serait relié à l'activation de certaines voies de signalisation via l'EMT qui faciliteraient la progression tumorale et les récives après traitement. À titre d'exemple, les cellules cancéreuses exprimant SNAIL et SLUG acquièrent une résistance aux traitements par chimio- et radiothérapie via l'expression des marqueurs des cellules souches et arrivent à berner la voie d'apoptose médiée par p53 [404]. D'autres voies telles que TGF- $\beta$  [405], Notch [406], EGFR/STAT3 [407] et Wnt/ $\beta$ -caténine [408] sont reliées à ce phénomène de résistance via l'EMT et la genèse de CSCs. En effet, de plus en plus de preuves établissent un lien étroit entre les CSCs et la propagation ou la chimiorésistance du CEO. Ces cellules sont retrouvées dans l'ascite, les tumeurs primaires et les métastases du CEO [409, 410]. Les CSCs partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules souches normales comme la capacité de former des agrégats sous formes de sphéroïdes ou des clones en culture mais surtout, ces CSCs présentent un grand potentiel pour la genèse tumorale. Ces cellules sont caractérisées par l'expression d'un ensemble de marqueurs de surfaces qui permettent leur isolement. Ces marqueurs incluent : CD44, CD133, CD117, ALDH1A1, EpCAM et ABCG2 [411]. Plusieurs études ont rapporté en effet le rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la progression du CEO via le maintien des CSCs [412, 413]. Cependant, une large étude d'association pangénomique impliquant des échantillons du CEO a révélé une régulation négative des protéines agonistes de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine [414]. De plus, une autre étude récente a rapporté que les CEOs de haut grade progressent

plus agressivement dans un milieu exempt de Wnt. En effet, l'inactivation de cette voie permet de maintenir les cellules cancéreuses indifférenciées jouissant des caractéristiques de CSCs [415].

Comme discuté auparavant dans d'autres types de cancers, l'EMT dans le CEO est également affectée par les modifications épigénétiques. À titre d'exemples, le promoteur de *CDH1* (de E-cad) est retrouvé hyperméthylé dans les CEOs invasifs probablement via le recrutement de la DNMT1 par ZEB1[416]. L'étude du profil de méthylation de l'EMT médiée par TGF- $\beta$  a révélé que les gènes mésenchymateux (*MMP*, *ZEB2*, *SNAIL*, *WNT5A*, *KRT7*...) sont hypométhylés alors que le gène *CDH1* est hyperméthylé. Une autre étude a rapporté que le gène *SFRP5* (*Secreted frizzled-related protein 5*) antagoniste de la voie Wnt se trouve hyperméthylé dans le CEO. En effet, la restauration d'expression de *SFRP5* bloque l'EMT et la résistance aux traitements médiée par la voie Wnt [417]. Parmi les miRNAs régulateurs de l'EMT dans le CEO, on retrouve aussi la famille des miR200s dont la fonction est la dégradation de l'ARNm de ZEB [418]. À l'inverse, miR9 semble promouvoir l'EMT en réprimant la E-cad [419]. Le microRNA miR30d bloque l'EMT médiée par TGF- $\beta$  en ciblant *SNAIL* [420].

Parmi les lncRNAs régulateurs de l'EMT dans le CEO, on retrouve *HOTAIR* (*HOX transcript antisense RNA*). En effet, il a été observé que la suppression de *HOTAIR* par des si-RNAs (*Small Interfering RNA*) dans des lignées du CEO hautement métastatiques comme SKOV3 réduit leur capacité de migration et d'invasion. De plus, l'expression de E-cad se stabilise alors que celle de vimentine et de N-cad diminue [421].

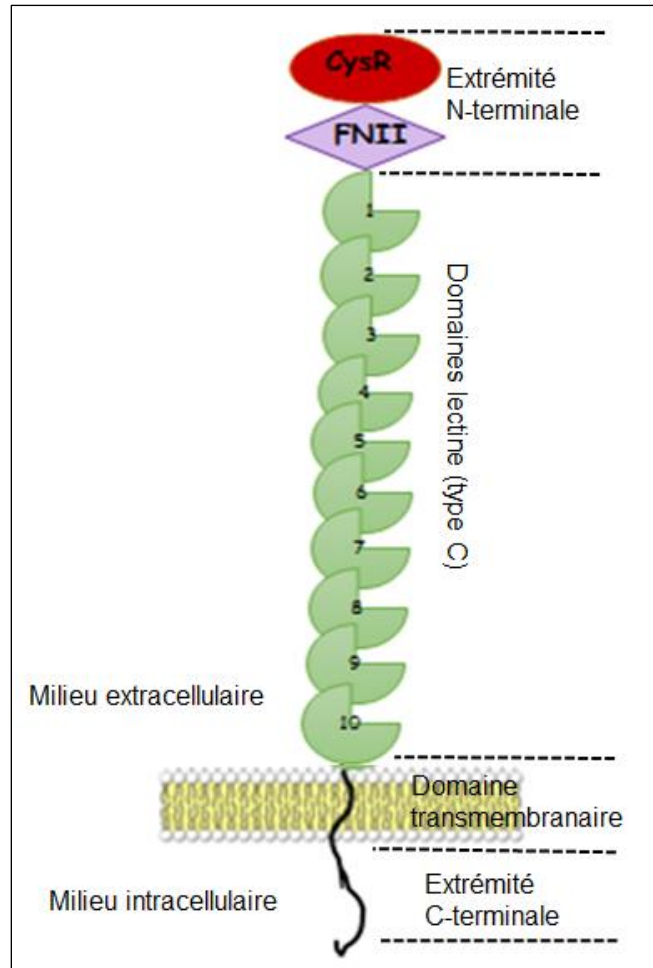
### **II.7.1 Le modèle de l'EMT médiée par le gène LY75**

Plusieurs modèles de l'EMT/MET *in vitro* [422], *in vivo* [423] et même des modèles mathématiques [296, 424] ont été développés pour tenter de mieux comprendre les mécanismes moléculaires employés par l'EMT lors de la dissémination du CEO. Nous disposons au laboratoire d'un modèle approprié pour étudier le rôle de l'EMT dans le CEO en modulant l'expression d'un seul gène qui est le lymphocyte antigène LY75. En effet, les données antérieures du laboratoire se sont intéressées à l'implication de la méthylation aberrante de l'ADN dans la dissémination du CEO. À cet effet, le profil de méthylation de l'ADN des tumeurs de types séreux de différents grades et stades par comparaison au profil de méthylation de l'ADN des échantillons contrôles non tumoraux a été étudié. Le

lymphocyte antigène LY75 (aussi appelé DEC205/gp200-MR6) représente un des gènes hypométhylés et surexprimés dans les tumeurs séreuses de haut grade identifiés par cette étude [237].

LY75 appartient à la famille des récepteurs macrophage mannose à domaine lectine de type C. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 205KDa comportant cinq différentes régions. On distingue la région N-terminale riche en cystéine, un domaine fibronectine de type II, dix domaines lectine type C en tandem, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique C-terminal [425] (Figure II.6). LY75 est principalement exprimé par les cellules dendritiques et par l'épithélium thymique. Récemment, l'expression de LY75 est détectée aussi dans les cellules T et B et dans d'autres types cellulaires comme par exemples les cellules de l'épithélium intestinal, pulmonaire et du cerveau. Cependant, cette expression est 10 à 50 fois plus faible par comparaison à l'expression observée dans les cellules dendritiques [426]. LY75 joue un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire via la présentation d'antigènes aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) après leur endocytose via les vésicules de clathrine [427]. Cette capacité de LY75 de déclencher la réponse immunitaire est exploitée dans la vaccination et l'immunothérapie du cancer. En effet, les récepteurs DEC-205 présents sur les cellules dendritiques sont ciblés par des anticorps monoclonaux anti-DEC205 jumelés à un antigène tumoral capable de générer l'activation des cellules T [428]. À titre d'exemple, un vaccin anti-cancer potentiel ciblant l'antigène NY-ESO-1 (*New York esophageal squamous cell carcinoma*) a été rapporté. L'antigène NY-ESO-1 est exprimé dans plusieurs types de cancers. Jumelé à LY75, cet antigène a généré une réponse immunitaire à cellules T donnant une régression des tumeurs d'environ 20% ainsi qu'un prolongement du temps de survie chez les personnes vaccinées. De plus, aucun effet de toxicité n'a été rapporté. Toutefois, ce vaccin combiné n'a apporté aucun effet positif quant à la survie des patientes vaccinées souffrant d'un CEO [429]. Une autre étude a rapporté que la combinaison du récepteur LY75 à la mésothéline (MSLN), qui est un antigène tumoral humain, génère une meilleure réponse immunitaire aux lymphocytes T (CD4+ et CD8+) ainsi qu'une réponse humorale par comparaison à l'injection de MSLN seule [430]. Un récent modèle basé sur le jumelage d'un anticorps et une drogue ciblant les cellules cancéreuses qui expriment fortement LY75 a été développé et testé sur des modèles de xénogreffes de plusieurs types de cancers. Il s'agit de

l'anticorps/drogue MEN1309/OBT076-CD205 [431]. D'autres études montrent l'implication de LY75 dans le cancer. En effet, dans les tumeurs du sein, l'expression de LY75 diminue considérablement avec l'avancement de la maladie [432]. Les mêmes observations sont rapportées dans le cancer colorectal [433]. Peu d'études se sont intéressées à l'implication de LY75 dans le CEO. Il a été montré que la suppression des cellules dendritiques LY75<sup>+</sup> retarde la progression des tumeurs ovariennes chez la souris et renforce la chimiothérapie standard [434]. De plus, l'expression de LY75 est contrôlée par l'interleukine 6 (IL-6). Le complexe IL6/récepteur de l'IL-6 s'avère être impliqués aussi dans la dissémination du CEO [435]. Une récente étude de notre laboratoire a conféré un nouveau rôle à LY75 comme modulateur majeur du phénotype des cellules du CEO et de leur potentiel métastatique [239]. En effet, la suppression de LY75 dans les cellules du CEO à morphologie mésenchymateuse (SKOV3, et TOV112) induit le MET. Ce phénomène est accompagné d'une diminution *in vitro* du pouvoir migratoire et invasif des cellules et une augmentation de la capacité de colonisation *in vivo* des métastases dans un modèle de souris immunodéficientes de xéno greffe intrapéritonéale. L'expression ectopique de LY75 (SKOV3-OV-LY75) résistant aux ARNs à épingle à cheveux (sh-RNA) dans le clone SKOV3-LY75-knockdown (KD) restaure complètement le phénotype parental ainsi que l'expression des marqueurs mésenchymateux. À l'inverse, l'absence de LY75 dans les cellules du CEO à phénotype épithélial (A2780S et OV2008) dirige l'EMT accompagnée de la baisse de la capacité de colonisation *in vivo*.



**Figure II. 6:** Structure du récepteur LY75.

L'ectodomaine comporte une extrémité N-terminale riche en cystéine suivie d'un domaine fibronectine et de 10 domaines lectine en tandem. La protéine comporte un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique en C-terminal impliqué dans l'endocytose via les vésicules de clathrine.

### **III. Problématique et objectifs de l'étude**

Le CEO représente le cancer le plus mortel parmi les cancers gynécologiques [436]. Ceci est principalement dû au fait que près de 80% des patientes ne sont diagnostiquées qu'aux stades avancés de la maladie, c'est-à-dire une fois que les métastases ont gagné la cavité pelvienne (stade II), l'abdomen (stade III) ou au-delà de la cavité péritonéale (stade IV) [437]. Il a été estimé que dans plus de trois quarts des cas que le CEO se trouve métastasé généralement dans la cavité intrapéritonéale. En effet, si le cancer est détecté aux stades précoces, plus de 90% des femmes guériraient suite à une chirurgie conventionnelle. Le traitement standard du CEO est une chirurgie cytoréductive suivie d'une chimiothérapie. Bien que la réponse initiale à la thérapie soit élevée, la résistance au traitement se développe souvent. Seulement 10-15% des patientes atteignent et maintiennent une réponse complète à la thérapie. Dans 30% des cas, la survie est prolongée à cinq ans à partir du moment du diagnostic grâce à une prise en charge chirurgicale plus agressive suivie d'une chimiothérapie plus efficace [438, 439]. Dans cette optique, la prise en charge du CEO métastatique est un enjeu de taille. De plus, les mécanismes de la tumorigenèse, de l'agressivité tumorale et de la progression du CEO ne sont pas encore bien définis. Les études futures doivent se concentrer sur l'identification de gènes et de molécules pro-métastatiques afin d'améliorer les thérapies actuelles et d'en découvrir d'autres plus efficaces. La propagation des cellules cancéreuses à des organes distants représente un défi clinique majeur dans le traitement du cancer. L'EMT est apparue comme un régulateur clé des métastases dans certains cancers en conférant un phénotype invasif [441, 442]. En plus de faciliter les métastases, l'EMT génère des cellules souches cancéreuses et contribue à la résistance au traitement [285, 443]. L'EMT est un programme de développement exploité par les cellules cancéreuses pour passer de manière réversible d'un phénotype épithélial avec une polarité apico-basale et des adhérences cellules-cellules à un phénotype mésenchymateux plus mobile caractérisé par une morphologie fusiforme et une polarité inversée [444]. À l'instar de la motilité et des caractéristiques invasives du phénotype mésenchymateux, l'EMT est potentiellement associée aux caractéristiques de cellules cancéreuses souches (pluripotence cellulaire) à la résistance aux traitements de même qu'à la suppression de la réponse immunitaire [445-447]. Pour coloniser un site secondaire, les cellules mésenchymateuses et celles présentant des caractéristiques de CSCs doivent recouvrer les caractéristiques initiales prolifératives et épithéliales via la MET [444, 448].

L'EMT est fréquemment régulée par les mécanismes épigénétiques. Ces changements permettent ainsi aux cellules cancéreuses de passer d'un état non invasif à un état invasif par le biais du remodelage de la chromatine. Ce phénomène a pour conséquence la régulation de l'expression des oncogènes et la répression des gènes suppresseurs de tumeurs [231, 449]. De plus, il a été rapporté récemment, que l'EMT n'est pas tout à fait un mécanisme binaire (EMT/MET) à phénotype mésenchymateux versus épithélial totalement inversé mais peut passer par des états hybrides (E/M) où les cellules hybrides E/M présentent à la fois des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses [299, 450]. En effet, en plus des cellules de l'EOS qui présentent des caractéristiques E et M ainsi qu'une remarquable plasticité lors de la réparation de la membrane post-ovulation, des cellules doubles positives pour E-cadhérine (un marqueur typique épithélial) et vimentine (un marqueur typique mésenchymateuse) sont détectées dans les cancers de l'ovaire [451]. En effet, des phénotypes intermédiaires de l'EMT sont détectés dans plusieurs lignées cellulaires du cancer de l'ovaire [452] ainsi que dans les sphéroïdes retrouvées dans l'ascite [453]. Toutes ces études rapportent que certaines cellules du cancer de l'ovaire présentent un état hybride et de pluripotence cellulaire avec expression de marqueurs de cellules souches, une résistance à l'apoptose ainsi qu'une capacité migratoire et invasive plus accrue que les cellules entièrement épithéliales ou mésenchymateuses [452-454]. Il n'est encore pas compris si les cellules en état hybride forment une population stable et potentiellement invasive et métastatique ou si ces cellules passent par cet état hybride de manière éphémère et transitoire durant l'EMT.

L'EMT constitue donc une intéressante cible thérapeutique dans le traitement du CEO soit pour prévenir la dissémination tumorale chez les patientes à haut risque de développer des métastases, soit pour éradiquer les cellules cancéreuses métastatiques déjà existantes chez les patientes dont la maladie est avancée.



### III.1 Hypothèse

*Il a été suggéré que l'EMT joue un rôle majeur dans la dissémination du CEO. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène restent à définir. Grâce au modèle de l'EMT médiée par la modulation d'expression de LY75 dans les cellules du CEO, nous avons émis l'hypothèse que les cellules SKOV3-M in vivo seraient plus métastatiques et résistantes aux traitements que les cellules SKOV3-E. Ce potentiel métastatique des cellules mésenchymateuses du CEO serait justifié par les modifications épigénétiques qui surviendraient principalement dans la méthylation de l'ADN ainsi qu'une possible activation des voies de signalisation métastatiques s'y reliant.*

### III.2 Objectifs

**1<sup>er</sup> objectif : Analyse des altérations de la méthylation de l'ADN durant l'EMT/MET suite à la modulation de l'expression de LY75**

Cet objectif visait d'étudier le profil de méthylation de l'ADN au cours de l'EMT des clones SKOV3-M et SKOV3-E précédemment générés afin d'identifier les gènes principalement affectés. Nous avons opté pour la technique de séquençage au bisulfite à représentation réduite, appelée RRBS, pour l'analyse des différents profils de méthylation de l'ADN. Il s'agit d'une technique combinant la digestion enzymatique de l'ADN et le traitement au bisulfite de sodium permettant de cibler les régions du génome enrichies en CpG renfermant les promoteurs. La taille du génome à séquencer est ainsi réduite à 2% ce qui réduit les coûts d'analyse tout en générant des données fiables.

**2<sup>eme</sup> objectif : Identification des partenaires d'interaction de LY75 présentant une possible implication dans la modulation de l'EMT médiée par LY75 dans les cellules du CEO**

Nous avons utilisé la co-immunoprécipitation (CO-IP) pour identifier les partenaires d'interaction de LY75. Il s'agit d'une technique standard dont le principe repose sur l'extraction de protéines des cellules SKOV3-M et SKOV3-E et de les incuber avec l'anticorps monoclonal anti-LY75. Le complexe protéique, partenaires d'interaction/LY75/anticorps anti-LY75, est précipité par l'ajout des billes magnétiques à

protéines G qui se sont liées de manière covalente aux chaînes lourdes des immunoglobulines de type IgG. Les partenaires d'interaction sont identifiés par chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-MS/MS) à la plateforme protéomique du centre de génomique du CRCHU de Québec-Université Laval.

### **3<sup>ème</sup> Objectif : Étude *in vivo* du rôle de l'EMT dans la dissémination du CEO et sa réponse aux traitements**

Dans cet objectif nous avons proposé d'étudier et de comparer le potentiel métastatique des cellules du CEO à phénotype mésenchymateux (M) (SKOV3 sh-contrôle), épithélial (E) (SKOV3-sh3-8) et d'une population de cellules E et M mixées (ratio 1 :1 SKOV3-sh-contrôle/SKOV3-sh3-8) précédemment transfectées par le plasmide pcDNA3-luciférase (Addgene). Nous avons envisagé de déterminer le potentiel invasif des trois groupes de cellules cités plus haut ainsi que leur réponse aux traitements dans un modèle de souris immunodéficientes (CB17 SCID) suite à leur injection par voie orthotopique intrabursale. Le choix du modèle orthotopique IB se base sur les avantages qu'offre ce modèle par rapport aux xéno greffes par voie IP et sous-cutanée. En effet, tel que fortement documenté, ce modèle IB permet aux cellules cancéreuses d'interagir avec leur microenvironnement approprié et d'imiter ainsi la formation des tumeurs au site primaire. Ce modèle permet aussi de suivre précisément la propagation du cancer aux sites métastatiques connus cliniquement de même que la sensibilité aux drogues (chimiothérapie).

## Préface chapitre 1

L'article suivant portant sur les objectifs 1 et 2 est publié le 7 mars 2020 dans le journal *IJMS* (facteur d'impact: 4.556) dans un numéro spécial ayant pour thème: « Le rôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans le cancer».

Plusieurs personnes ont contribué dans ce projet. En effet, la professionnelle de recherche de notre laboratoire M<sup>me</sup> Magdalena Bachvarova a extrait, purifié et quantifié les ADN des différents clones de SKOV3 générés auparavant par sh-RNA, CRISPR et par restauration de phénotype des cellules SKOV3 en réintroduisant le gène LY75 par transfection dans le nouveau clone SKOV3-E. Les profils de méthylation de ces échantillons sont analysés par la compagnie américaine *Diagenode* en utilisant la technique RRBS. Dre Marie-Pier Scott-Boyer et Dr Arnaud Droit ont transformé les données brutes des profils de méthylation en des extensions lisibles par le logiciel IGV (*Integrative genomic viewer*). De plus, Marie-Pier a délimité les régions promotrices et des premiers exons pour les différentes combinaisons. Mon travail a consisté en le traitement des données RRBS, par IGV et IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*) et la sélection des gènes candidats. J'ai également préparé les amorces par le logiciel *metylprimer express* et validé les statuts de méthylation des gènes retenus par BSP dans les clones SKOV3-E (sh-LY75) vs SKOV3-M-(sh-control) en analysant les données du séquençage fait par la plateforme de séquençage et de génotypage de l'Université Laval. J'ai validé par la suite l'expression de ces mêmes gènes aux niveaux de l'ARNm et protéique dans le modèle de l'EMT SKOV3 et dans le nouveau modèle de OVCAR8 que j'ai généré par knock-down de LY75. J'ai effectué toute l'expérimentation reliée à l'implication de la voie Wnt dans le CEO de même que le mécanisme de LY75 dans cette régulation à travers notre approche protéomique analysée par LC/MS/MS. J'ai participé à la rédaction de l'article en rédigeant le document original. En plus du design des combinaisons des trois comparaisons de l'étude pour RRBS, Dr Bachvarov a supervisé l'évolution du projet en m'assistant dans les analyses IPA, et dans le design des amorces pour BSP. Il a enrichi, corrigé et amélioré la rédaction de l'article notamment en ce qui concerne le style d'écriture en langue anglaise.

Version originale de l'article en anglais

## Chapitre 1

### **LY75 Ablation Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) in Epithelial Ovarian Cancer (EOC) Cells Associated with DNA Methylation Alterations and Suppression of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway**

By [Sadia Mehdi](#)<sup>1,2</sup>, [Magdalena Bachvarova](#)<sup>2</sup>, [Marie-Pier Scott-Boyer](#)<sup>2</sup>,  
[Arnaud Droit](#)<sup>1,2</sup> and [Dimcho Bachvarov](#)<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine, Université Laval, Québec, QC PQ G1V 0A6, Canada

<sup>2</sup>Research Center of Quebec CHU-Université Laval, Québec, QC PQ G1E6W2, Canada

\* Corresponding author

*Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(5), 1848; <https://doi.org/10.3390/ijms21051848>

**Received: 29 January 2020 / Revised: 26 February 2020 / Accepted: 5 March 2020 /**

**Published: 7 March 2020**

(This article is published in IJMS special issue [The Wnt Signaling Pathway in Cancer](#))

## 1.1 Résumé

De plus en plus d'études démontrent que la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) joue un rôle important dans la progression et la dissémination du cancer épithélial ovarien (CEO). Cependant les mécanismes moléculaires de l'EMT restent mal définis. Dans une précédente étude, nous avons montré que le récepteur d'antigènes LY75 des cellules dendritiques peut moduler le phénotype et le potentiel métastatique des cellules du CEO. En effet, la déplétion de LY75 induit la transition mésenchymato-épithéliale (MET) dans les cellules du CEO à morphologie mésenchymateuse. Nous avons donc utilisé ce modèle de l'EMT médiée par la modulation d'expression de LY75 pour étudier le changement de méthylation de l'ADN dans les cellules du CEO en EMT. Pour cette étape, nous avons opté pour la technique de séquence à représentation réduite (RRBS). De nombreux gènes ont montré une altération dans la méthylation de l'ADN au niveau des régions promotrices/1<sup>er</sup>exon. Parmi ces gènes, dix sont sélectionnés pour être validés par des méthodes alternatives. Ces gènes pourraient représenter de nouveaux biomarqueurs/cibles thérapeutiques pour le CEO. Ces données de méthylation incriminent la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine dans la régulation de méthylation de l'ADN induite par l'EMT. De plus, l'inhibition de la voie Wnt ainsi que les partenaires d'interaction de LY75 identifiés par une approche protéomique ont mis en évidence l'implication directe du récepteur LY75 dans la modulation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules du CEO.

## 1.2 Abstract

Growing evidence demonstrates that epithelial–mesenchymal transition (EMT) plays an important role in epithelial ovarian cancer (EOC) progression and spreading; however, its molecular mechanisms remain poorly defined. We have previously shown that the antigen receptor LY75 can modulate EOC cell phenotype and metastatic potential, as LY75 depletion directed mesenchymal–epithelial transition (MET) in EOC cell lines with mesenchymal phenotype. We used the LY75-mediated modulation of EMT as a model to investigate for DNA methylation changes during EMT in EOC cells, by applying the reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) methodology. Numerous genes have displayed EMT-related DNA methylation patterns alterations in their promoter/exon regions. Ten selected genes, whose DNA methylation alterations were further confirmed by alternative methods, were further identified, some of which could represent new EOC biomarkers/therapeutic targets. Moreover, our methylation data were strongly indicative for the predominant implication of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the EMT-induced DNA methylation variations in EOC cells. Consecutive experiments, including alterations in the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activity in EOC cells with a specific inhibitor and the identification of LY75-interacting partners by a proteomic approach, were strongly indicative for the direct implication of the LY75 receptor in modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in EOC cells.

### 1.3 Introduction

Epithelial ovarian cancer (EOC) accounts for 5% of all cancers in women and is the leading cause of death from gynecologic malignancies [1,2]. Despite treatment improvements, long-term survival rates for patients with advanced disease remain disappointing [3]. EOC lethality primarily stems from the inability to detect the disease at an early, organ-confined stage, and the lack of effective therapies for advanced-stage disease (e.g., metastasis) [4]. Indeed, despite advances in cytotoxic therapies [5,6], only 30% of patients with advanced-stage EOC survive 5 years after initial diagnosis. One way to resolve this problem is to target metastasis-specific pathways with novel therapies. Hence, focused identification of novel prometastatic EOC pathways and molecules could improve the chances of discovering new and more effective EOC therapies [4].

Metastasis is a complex multistep process in the progression of cancer, causing approximately 90% of all human cancer mortalities [7]. To colonize a distant secondary site, cancer cells undergo epithelial–mesenchymal transition (EMT) characterized by the suppression of epithelial markers E-cadherin and EpCAM and acquisition of migratory capacity, pivotal for invasion and metastasis. Although EMT is clearly important to tumor progression, it is inconsistent with the observation that metastatic lesions mostly exhibit epithelial phenotypes, thus suggesting that mesenchymal–epithelial transition (MET) is critical to the latter stages of metastasis [7]. EMT has emerged as a key regulator of various biological processes implicated in embryogenesis, organ fibrosis, and cancer metastasis [8], including EOC dissemination [9,10,11]; however, the molecular mechanisms sustaining this process in EOC remain poorly defined. Both EMT and MET involve widespread reprogramming of gene expression and as recently shown, epigenetic mechanisms, that include post-translational histone modifications, noncoding RNAs (ncRNA), and DNA methylation could play important roles in these processes [12,13,14].

We have previously shown that the antigen receptor LY75 (also known as DEC205/CD205) can modulate EOC cell phenotype and metastatic potential [7]. Indeed, LY75 depletion directed MET in EOC cell lines with mesenchymal-like phenotype (SKOV3 and TOV112), associated with the induction of the expression of the epithelial markers E-cadherin, EpCAM, and EMP1 and loss of expression of the mesenchymal markers N-cadherin, TWIST1, FN1, and SNAIL1 [7]. Moreover, re-expression of a shRNA-resistant

LY75 gene variant in the LY75 knockdown SKOV3 clones (SKOV3-shR) completely restored the initial mesenchymal phenotype and re-established the SKOV3 parental pattern of mesenchymal markers' expression [7].

In the present study, we used the LY75-mediated modulation of EMT in EOC cells as a model to investigate DNA methylation changes during EMT in EOC cells. We applied the reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) approach, a bisulfite-based cost-effective protocol that enriches CpG-dense regions of the genome, thus reducing the amount of sequencing required, while capturing the majority of promoters and other relevant genomic regions [15]. This approach led to the identification of numerous genes showing altered DNA methylation patterns following LY75-mediated EMT alterations in SKOV3 cells. Some of these genes could be implicated in EOC progression and/or could represent new EOC therapeutic targets. Consecutive Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of the methylation data was strongly indicative for the predominant implication of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the EMT-induced DNA methylation variations in EOC cells mediated by the LY75 expression changes. Consecutive experiments, including alterations in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activity in EOC cells with the use of a specific inhibitor, and the identification of LY75-interacting partners by a proteomic approach, were strongly indicative for the direct role of LY75 in modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activity in EOC cells.

## 1.4 Results

### 1.4.1 Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) Analysis of Altered DNA Methylation Patterns during LY75-Mediated EMT in SKOV3 Cells; Identification of Novel Genes Displaying EMT-Associated DNA Methylation Variations

We applied the RRBS technology in order to identify specific genomic regions that undergo DNA methylation alterations during LY75-mediated EMT in EOC cells. Thus, we analyzed the DNA methylation patterns in previously generated SKOV3 cell clones with mesenchymal (M) phenotype (sh-control-SKOV3, SKOV3-shR), as compared to SKOV3 cell clones displaying epithelial (E) phenotype (sh-LY75-SKOV3, LY75-KO-SKOV3), as described before [7]; see also Table 1.1A for details. Three different experimental comparison (SKOV3-M vs. SKOV3-E) combinations were used for RRBS analysis, as shown in Table 1B.

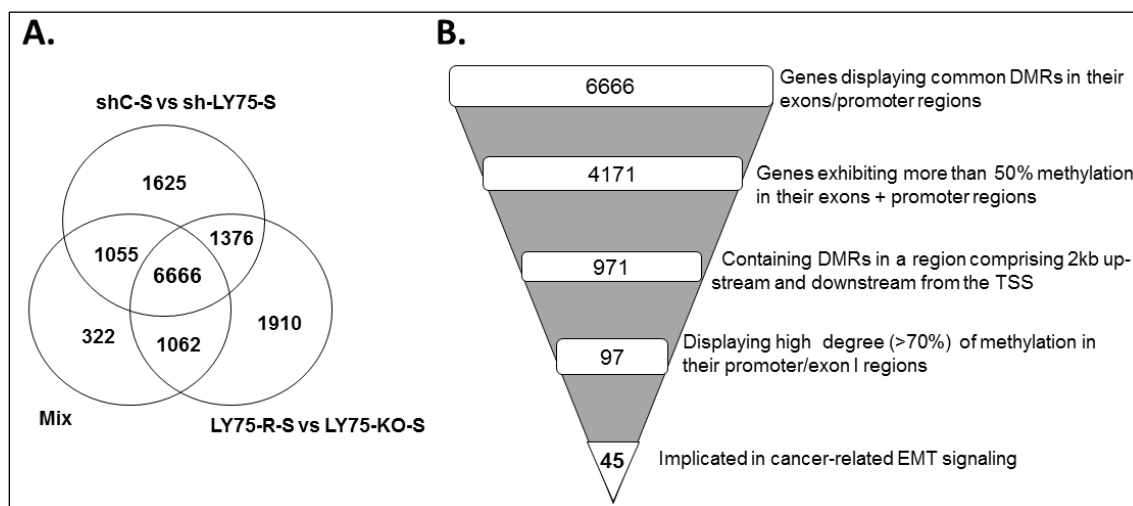


**Table 1.1:** Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) analysis of altered DNA methylation patterns upon Ly75-mediated epithelial–mesenchymal transition (EMT) variations in SKOV3 cells.

A. Description of the SKOV3 clones used (as described in Ref. 14)	Phenotype
<b>shC-S:</b> control shRNA expressed in SKOV3 cells <b>sh-LY75-S:</b> shRNA-mediated LY75-KD in SKOV3 cells <b>LY75-KO-S:</b> CRISPR/Cas9-mediated Ly75 KO in SKOV3 cells <b>LY75-shR-S:</b> sh-resistant-Ly75 cDNA expressed in sh-LY75-S cells	Mesenchymal ( <b>M</b> ) Epithelial ( <b>E</b> ) Epithelial ( <b>E</b> ) Mesenchymal ( <b>M</b> )
B. Experimental comparison combinations used for RRBS analysis	Number of differently methylated regions (hypo + hyper) identified in exons and promoter regions of different genes
shC-S vs sh-LY75-S (M vs E) LY75-R-S vs LY75-KO-S (M vs E) (mix: shC-S + LY75-R-S) vs (mix: sh-LY75-S + LY5-KO-S) (M vs E)	10722 11014 9105

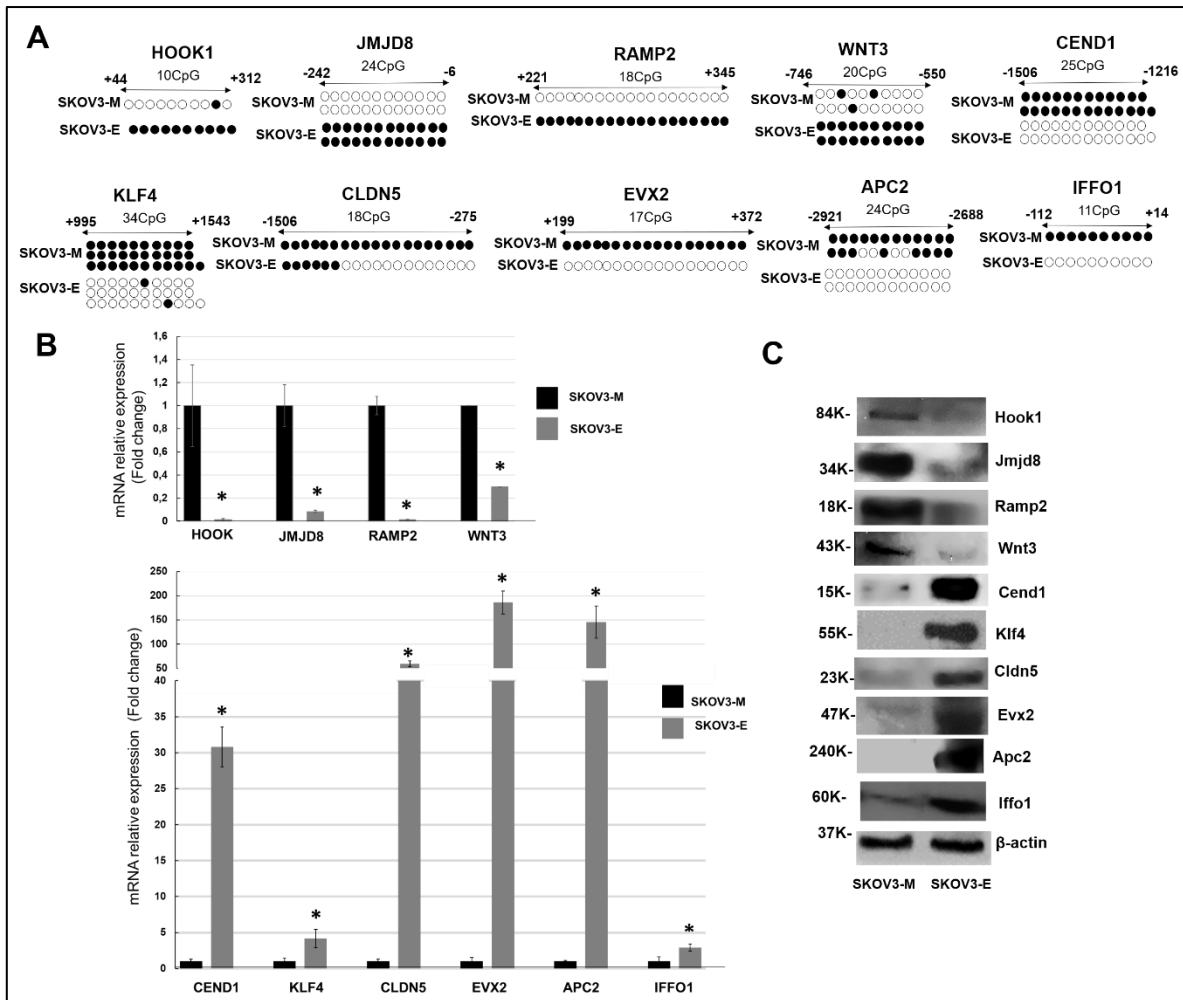
Further analysis of the sequencing data based on differentially methylated regions (DMRs) covering genes' exons and promoter regions led to the identification of ~10,000 genes displaying DMRs for each of the three experimental combinations used (see Table 1.1B and Supplementary Table S1A–C). As shown in Figure 1.1A, consecutive Venn diagram analysis of the DMRs data from the three experimental combinations revealed 6666 genes, displaying common altered DMRs in their exons/promoter regions, following LY75-mediated EMT alterations in SKOV3 cells (see Supplementary Table S1D). Based on the 6666 gene list, we performed consecutive selections based on increasing-stringency criteria in order to retain highly hyper- or hypomethylated genes with potential role in EMT-mediated EOC dissemination (Figure 1.1B). Thus, we initially selected genes exhibiting more than 50% methylation in their exons/promoter regions (4171 genes), then we focused on genes displaying predominant methylation alterations in a region comprising 2 kb upstream and downstream from the transcription start site (TSS; 971 genes). Using the Integrative Genomic Viewer (IGV) software, we further selected genes with high degree ( $\geq 70\%$ ) of CpG island methylation at their promoter/exon I regions (97 genes), and finally retained 45 genes, shown previously to be implicated in cancer-related EMT signaling (see Supplementary Table S1E for the 45-gene list). Bisulfite-sequencing PCR (BSP) validation of DNA methylation status of most of the 45 genes, combined in parallel with analysis of their mRNA and protein expression levels, led to final selection of 10 genes, including HOOK1, RAMP1, JMJD8, and WNT3, hypermethylated in SKOV3-E cells, and CEND1, EVX2, CLDN5, APC2,

IFFO1, and KLF4, hypomethylated in SKOV3-E cells (see Supplementary Table S1E for details). Figure 1.2A shows the BSP-mediated confirmation of the methylation status of these genes, which precisely correlated with both their mRNA (Figure 1.2B) and protein (Figure 1.2C) expression values in the corresponding SKOV3 cell clones.



**Figure 1. 1:** RRBS analysis of genes displaying common differentially methylated regions (DMRs) in their exons and promoter regions.

(A) Venn diagram analysis of the three different comparison (M vs. E) experimental combinations used for RRBS analysis (see Table 1B for details); (B) A funnel plot indicating the selection criteria for the genes retained for further analyses, exhibiting a high degree of methylation in their promoter regions and implicated in cancer-related EMT signaling.

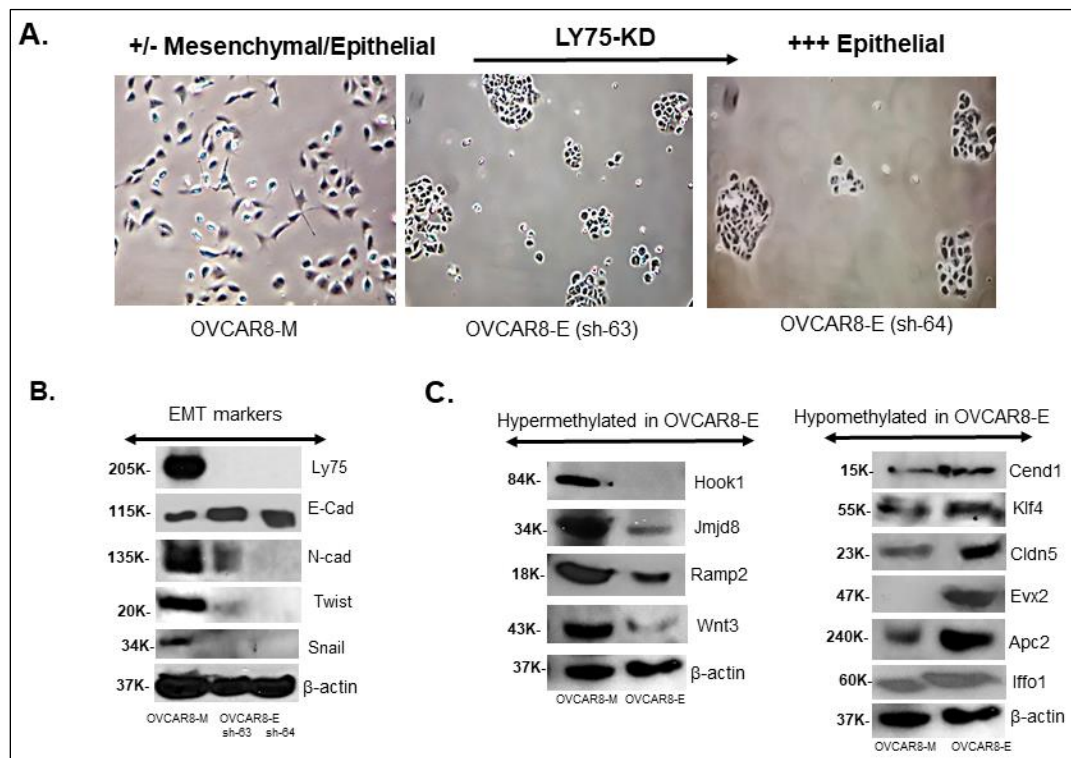


**Figure 1. 2 :** Validation of methylation status and the corresponding expression levels of the ten RRBS-retained genes in the SKOV3-LY75-related EMT model.

(A) Bisulfite-sequencing PCR (BSP) analysis of the methylation status of selected genes in the SKOV3-M (sh-control) and the SKOV3-E (sh3-8 clone). Filled circles represent methylated CpGs and open circles represent unmethylated CpGs. The indicated positions on the CpG plots represent the number of nucleotides stretching upstream (+) and downstream (-) of the transcription initiation (ATG) codon for each gene analyzed. (B) Quantitative PCR analysis of the mRNA expression profiles of the ten selected genes in SKOV3-M and SKOV3-E cells. In all analyses, mRNA levels were displayed as relative to their expression levels in SKOV3-M cells and normalized to the ribosomal 18S (control) gene expression. Error bars represent SD; \* p < 0.05. (C) Western blot analysis of the protein expression levels of the 10 selected genes in SKOV3-M and SKOV3-E cells. β-Actin was used as a loading control.

These data were further confirmed upon performing shRNA-mediated LY75 knockdown in the serous EOC cell line OVCAR8, which also exhibits a mesenchymal-like phenotype. Indeed, the shRNA-mediated LY75 knockdown OVCAR8 clones sh-63 and sh-

64 displayed a typical epithelial morphology (see Supplementary Figure 1.S1A), accompanied with the overexpression of E-cadherin, and the suppression of N-cadherin, TWIST1, and SNAIL1 (Supplementary Figure 1.S1B). As shown in Supplementary Figure S1C, the protein expression profiles of the 10 genes described above displayed quite similar expression patterns in OVCAR8-M (control) and OVCAR8-E (sh-63) cells as those found in SKOV3-E or SKOV3-M cells (see Figure 1.2C for comparison).

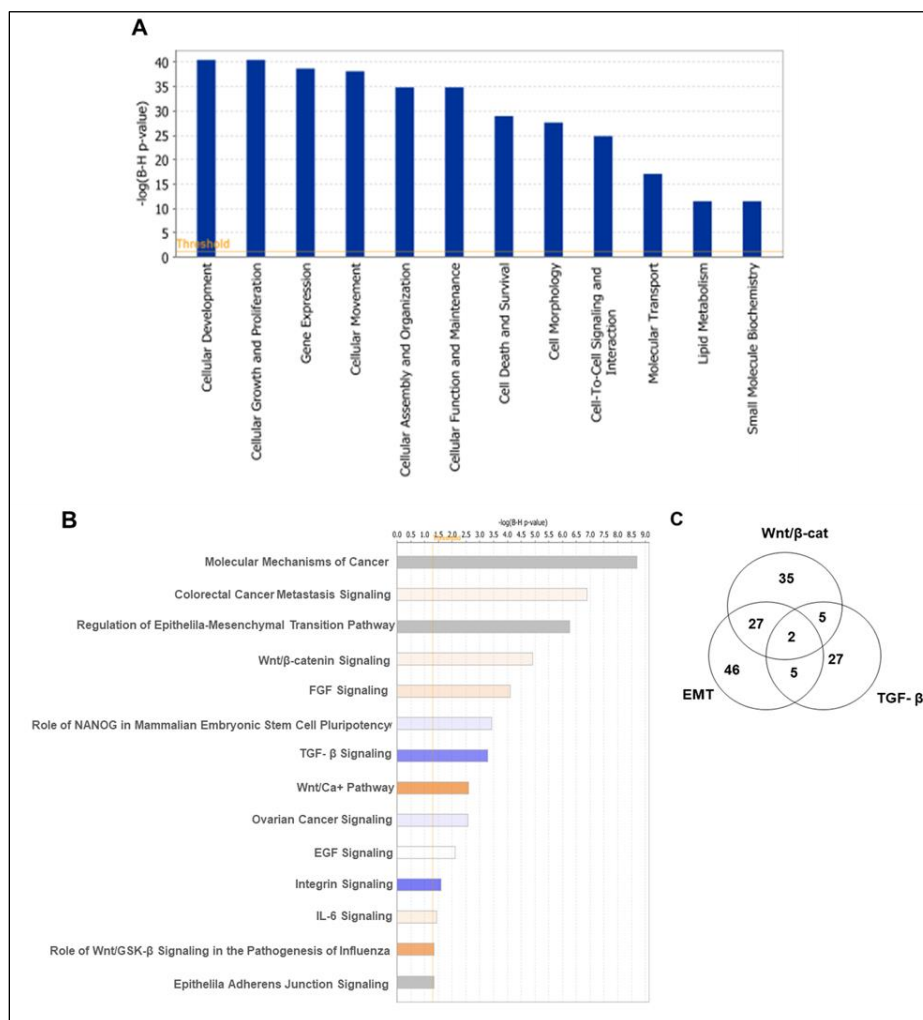


**Supplementary figure 1. S 1:** A. Representative phase-contrast images of OVCAR8-M cells (sh-control) and OVCAR8-E cells (LY75-KD clones: sh-63 and sh-64). B. Western blot analysis of the protein expression levels of different EMT markers in OVCAR8-M and OVCAR8-E cells. C. Western blot analysis of the protein expression levels of the ten RRBS-selected genes in OVCAR8-M and OVCAR8-E cells.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

#### 1.4.2 LY75-Mediated EMT Alterations in EOC Cells are Associated with Predominant Epigenetic Regulation of Members of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway

We further analyzed the 6666 genes displaying common DNA methylation alterations in their exons/promoter regions upon LY75-mediated EMT by using the Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software to identify relevant biological pathways and networks. As shown in Figure 1.3A, IPA analysis was indicative for EMT-related epigenetic alterations of functionally related groups, mostly linked to cellular development, cellular growth and

proliferation, cellular movement, cellular function and maintenance, and importantly - cellular morphology. As expected, consecutive IPA canonical pathway analysis displayed predominant modulation of EMT-pathway-related genes and genes implicated in ovarian cancer signaling, as genes related to other major EMT-related pathways (including the Wnt/ $\beta$ -catenin, the Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ , and the TGF- $\beta$  pathways) similarly exhibited significant DNA methylation alterations (see Figure 1.3B and Table 1.A1).



**Figure 1. 3 :** Ingenuity pathways analysis (IPA) of the 6666 common hyper- and hypomethylated genes in SKOV3-E cells.

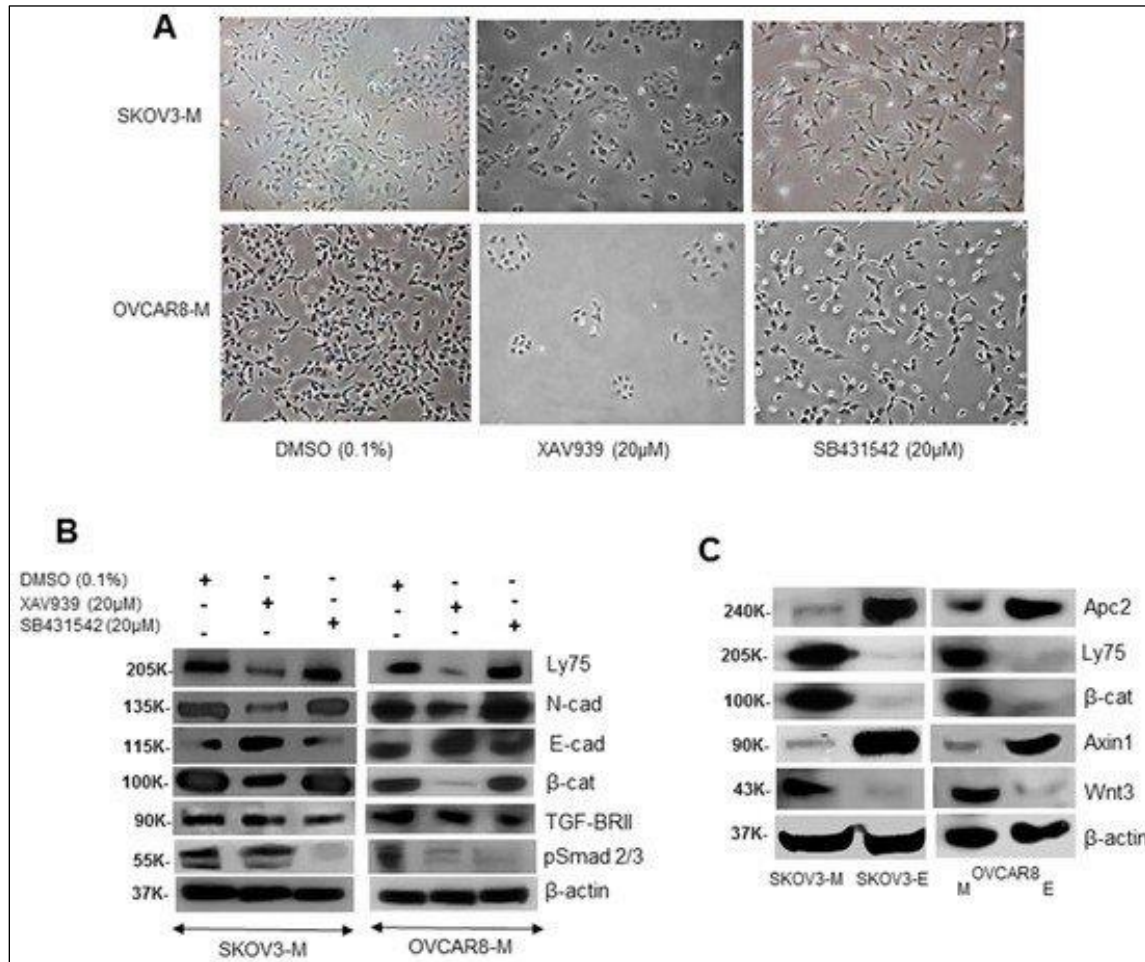
(A) Functional analysis for a dataset of the common hyper- and hypomethylated genes. Top functions that meet a Bonferroni–Holm multiple testing correction p-value of 0.05 are displayed. (B) List of selected canonical pathways that were significantly altered in SKOV3-E cells. Top functions that meet a Bonferroni–Holm multiple testing correction p-value of 0.05 are displayed. (C) Venn diagram analysis displaying common genes between the EMT, Wnt/ $\beta$ -catenin, and TGF- $\beta$  signaling pathways, as derived from the IPA canonical pathways analysis.

Remarkably, and as shown in Table 1.A1, the number of Wnt/ $\beta$ -catenin-pathway-related genes with altered DMRs (69 genes) was significantly higher, compared to the TGF- $\beta$ -pathway-related genes (39 genes). This was further supported by the number of the common genes shared between the EMT and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways (27 genes) compared to those of the EMT/TGF- $\beta$  pathways (five genes; see Figure 1.3C and Table 1.A1), suggesting that the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling might be the predominant pathway modulated by the LY75-mediated EMT alterations in EOC cells.

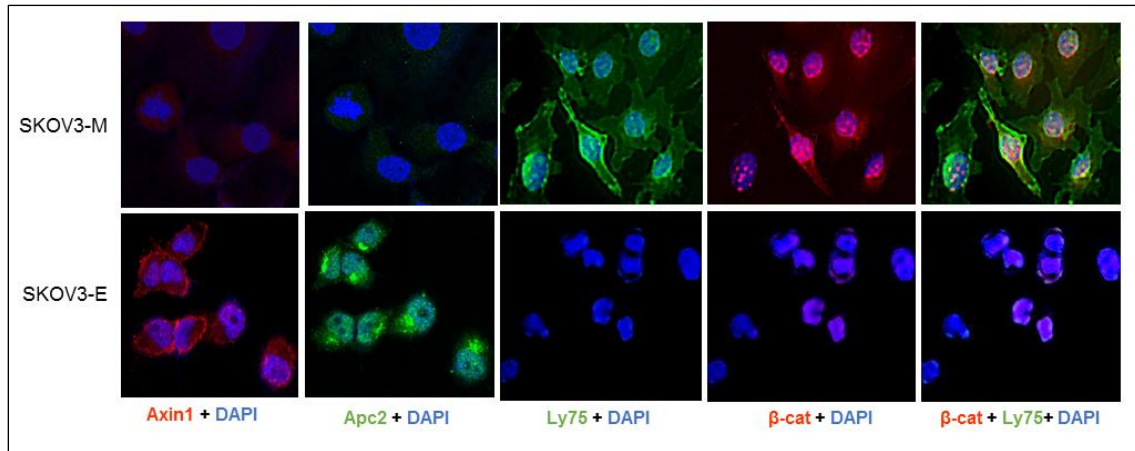
#### **1.4.3. LY75 Expression Modulates the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activity in EOC Cells**

The above IPA analyses prompted us to more profoundly investigate the relative implications of the Wnt/ $\beta$ -catenin and the TGF- $\beta$  signaling pathways during the LY75-mediated EMT alterations in EOC cells. As shown in Figure 1.4A, treatment of SKOV3-M and OVCAR8-M (parental) cells with the Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor XAV939 led to the acquirement of epithelial-like cellular phenotype, while treatment with the TGF- $\beta$  inhibitor SB431542 had no effect on SKOV3-M and OVCAR8-M cellular morphologies. XAV939 treatment resulted in N-cadherin protein suppression and E-cadherin protein overexpression in SKOV3-M and OVCAR8-M cells, similar to the LY75 KD effect in these cell lines (Figure 1.4B). Moreover, XAV939 treatment in both these cell lines was also associated with decreased levels of  $\beta$ -catenin, while members of the TGF- $\beta$  pathway, including TGF- $\beta$ RII and the phosphorylated form of Smad2/3 (pSmad2/3) were not affected (Figure 1.4B). Interestingly, XAV939 treatment resulted in reduced LY75 expression in EOC cells, suggestive for a possible feed-back mechanism between Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and LY75 functional activity (Figure 1.4B). The use of the TGF- $\beta$  inhibitor SB431542 was only associated with pSmad2/3 suppression, especially in SKOV3-M cells; however, this inhibitor induced no changes in the N-cadherin and E-cadherin expression levels in both EOC cell lines, despite a prolonged (5 days) treatment (Figure 1.4B). The impact of the LY75 gene expression on the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway was further confirmed by Western blot analysis of the expression levels of some of its members and regulatory proteins. Thus, LY75 KD in both SKOV3 and OVCAR8 cells was associated with decreased  $\beta$ -catenin and Wnt3 expression and strong induction of the expression of Axin1 and APC2, both previously characterized as members of the suppressor complex of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway ([16];

see Figure 1.4C). This was also confirmed by immunofluorescence analysis of Axin1 and APC2 expression in the SKOV3-E cells and high expression and nuclear localization of  $\beta$ -catenin in the SKOV3-M (control) cells (Supplementary Figure 1.S2).



**Figure 1. 4:** (A) Representative images of SKOV3-M and OVCAR8-M (parental) cells upon XAV939, SB431542, or DMSO (control) treatment. (B) Western blot analysis of Ly75,  $\beta$ -catenin, TGF-B-RII, p-Smad2/3, E-cadherin, and N-cadherin expression levels in SKOV3-M and OVCAR8-M cells upon treatment with the Wnt/ $\beta$  catenin inhibitor XAV939, the TGF- $\beta$  inhibitor SB431542, and DMSO (control treatment). (C) Western blot analysis of the expression levels of different members ( $\beta$ -catenin, Axin1, Apc2, and Wnt3) of the Wnt/ $\beta$  catenin pathway in SKOV3-M, SKOV3-E, OVCAR8-M, and OVCAR8-E cells.  $\beta$ -Actin was used as a loading control.



**Supplementary figure 1. S 2 :** Immunofluorescence analysis of Axin1, Apc2,  $\beta$ -catenin and Ly75 expression and localization in SKOV3-M and SKOV3-E cells.

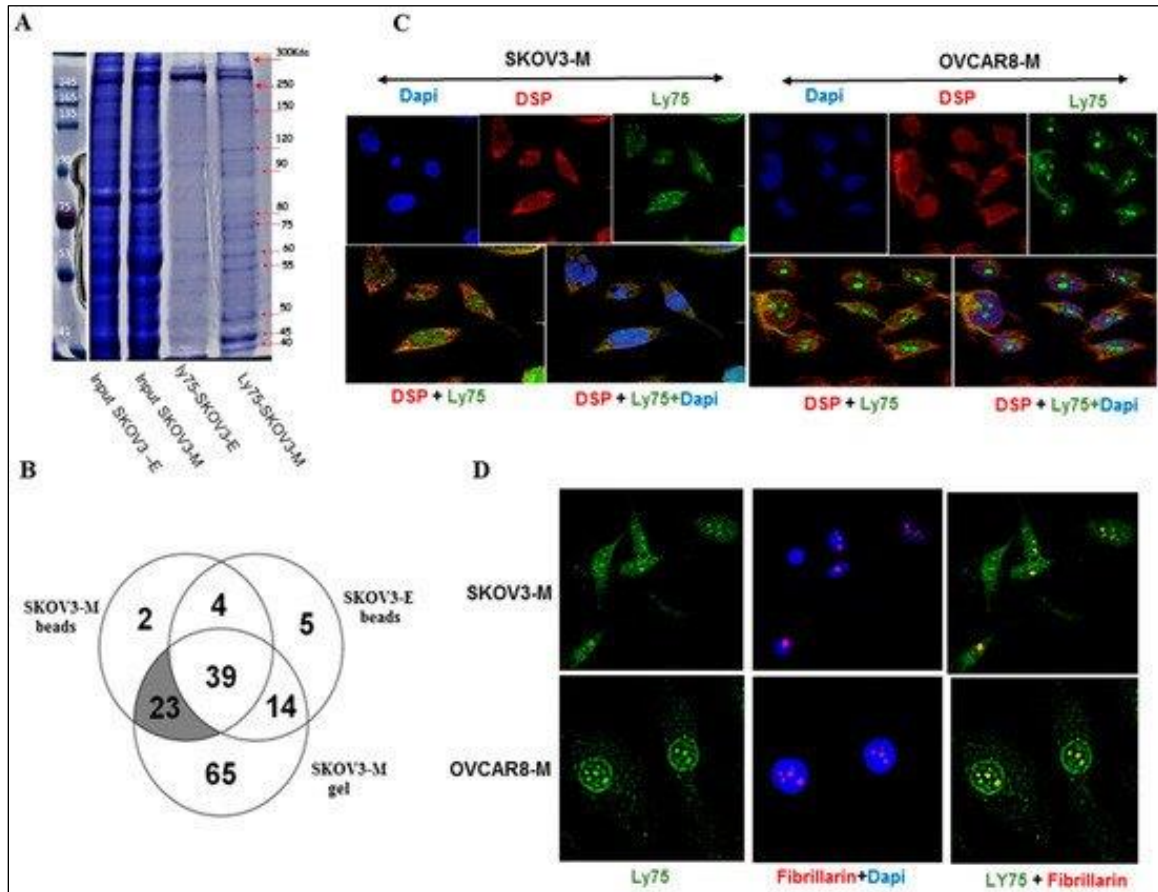
Moreover, analysis of the TCGA data for ovarian cancer via the cBioPortal software (<https://www.cbioportal.org/>) was indicative for significant LY75 co-expression correlations ( $p < 0.05$ ) with 5046 genes (Supplementary Table S2A), including most (64) of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway gene members (Supplementary Table 1.S2B).

#### **1.4.4 The Identification of Specific LY75-Interaction Proteins Supports the LY75 Role in Modulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activity**

We further proceeded with the identification of LY75-interaction proteins, as whole cell lysates of SKOV3-M (parental) cells and Ly75 KD SKOV3-E cells were anti-LY75 immunoprecipitated using streptavidin beads, and the resulting peptides were analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS). Alternatively, and following the repetition of the same experimental procedure, immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis and specific bands (present in the SKOV3-M fraction and absent in the SKOV3-E fraction) were gel-eluted and subjected to LC-MS/MS (Figure 1.5A). Venn diagram analysis of the common immunoprecipitated proteins in SKOV3-M (beads) and SKOV3-M (gel), as compared to those in SKOV3-E cells (beads), led to the identification of 23 LY75 specific interaction partners (Figure 1.5B and Table 1.2). As shown in Table 1.2, most LY75 interacting partners (including ACTN4, DNMT2, KRT7, KRT8, KRT18, KRT19, SPTAN1, PLEC) were previously known to be involved in actin cytoskeleton remodeling and/or cell trafficking. Importantly, three of the newly identified LY75 partners (DSP, AHNAK, and SPTBN1) were formerly characterized as repressors of the Wnt/ $\beta$ -catenin



pathway [17,18,19]. Moreover, immunofluorescence analysis was confirmative of cellular membrane and cytoplasmic co-localization of LY75 and DSP (Figure 5C).



**Figure 1.5 :** Identification of LY75 interaction partners.

(A) Gel electrophoresis (Coomassie blue-stained) of anti-LY75 immunoprecipitated protein fractions in SKOV3-E and SKOV3-M cells. Bands of interest are indicated by arrows. (B) Venn diagram analysis of LY75-interaction proteins identified by LC-MS-MS in SKOV3-M cells, either eluted directly from beads (SKOV3-M beads), or gel-extracted (SKOV3-M gel), compared to nonspecific LY75 interaction proteins extracted from the SKOV3-E (LY75 KD) cells. (C) Immunofluorescence analysis of LY75 and DSP cellular co-localization in SKOV3-M and OVCAR8-M cells. The green label is also indicative for a specific nuclear localization of LY75 in both epithelial ovarian cancer (EOC) cell lines. (D) Immunofluorescence analysis of LY75 and fibrillar nucleolar co-localization in SKOV3-M and OVCAR8-M cells.

**Table 1. 2:** Ly75 partners identified by the immunoprecipitation experiments.

<b>Ly75 partners identified by Scaffold</b>	<b>M Weight</b>
<b>AHNAK:</b> Neuroblast differentiation-associated protein	629 kDa
<b>PLEC:</b> Isoform 4 of Plectin	516 kDa
<b>DSP:</b> Desmoplakin	332 kDa
<b>SPTAN1:</b> Spectrin alpha chain, non-erythrocytic	285 kDa
<b>SPTBN1:</b> Spectrin beta chain	275 kDa
<b>CAD</b> protein	243 kDa
<b>RRBP1:</b> Ribosome-binding protein 1	152 kDa
<b>ACTN4:</b> Alpha-actinin-4	105 kDa
<b>MVP:</b> Major vault protein	99 kDa
<b>DNM2:</b> Isoform 2 of Dynamin-2	98 kDa
<b>HSD17B4:</b> Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	80 kDa
<b>HNRNPM:</b> Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	78 kDa
<b>LMNA:</b> Prelamin-A/C	74 kDa
<b>PABPC1:</b> Polyadenylate-binding protein 1	71 kDa
<b>SEPT9:</b> Septin-9	65 kDa
<b>KRT8:</b> Keratin, type II cytoskeletal 8	54 kDa
<b>SPATS2L:</b> Isoform 2 of SPATS2-like protein	54 kDa
<b>KRT7:</b> Keratin, type II cytoskeletal 7	51 kDa
<b>KRT18:</b> Keratin, type I cytoskeletal 18	48 kDa
<b>KHDRBS1:</b> KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	48 kDa
<b>KRT19:</b> Keratin, type I cytoskeletal 19	44 kDa
<b>RPL6:</b> 60S ribosomal protein L6	33 kDa

Interestingly, seven nucleolar proteins (including RRBP1, MVP, HSD17B4, HNRNPM, LMNA, KHDRBS1, and RPL6) were among the proteins identified as LY75 interacting partners (Table 2), suggesting for a possible LY75 nucleolar localization. This was further confirmed by immunofluorescence-mediated co-localization analysis of LY75 and the nucleolar protein fibrillarin (Figure 1.5D).

## 1.5 Discussion

Numerous studies have previously suggested that EMT induction in cancer is accompanied by a dynamic reprogramming of the epigenome, including DNA methylation alterations, aberrant expression of noncoding RNAs, and post-translational histone modifications. EMT-related epigenetic changes have been described in many cancer types,

including EOC [11]; however, the implications of the different epigenetic regulatory mechanisms in EMT-mediated cancer initiation and progression remain largely unexplored [12].

Using an epigenomic approach (methylated DNA immunoprecipitation coupled to CpG island tiling arrays), we have previously shown that DNA hypermethylation occurs in all (comprising less-invasive and early) stages of ovarian tumorigenesis, while advanced disease is exclusively associated with DNA hypomethylation of a number of oncogenes, implicated in EOC progression and invasion/metastasis [20], including genes (LY75, GRHL2, Hic-5, and RUNX1), implicated in EMT regulation [7,21,22,23,24]. In this study, we used the RRBS technology for a comprehensive analysis of DNA methylation changes during LY75-mediated EMT alterations in EOC cells. We initially compared the DNA methylation patterns of SKOV3 control (SKOV3-M) versus LY75-KD SKOV3 (SKOV3-E) cells, using three different experimental combinations, as shown in Table 1.1B. In each experimental condition, more than 10,000 genes displayed DMRs in their exons and promoter regions, as 6666 common genes were identified under these selection criteria as hypo- or hypermethylated in the SKOV3-E clones (Figure 1.1A). Based on the 6666 gene list, we further proceeded with a more stringent selection of genes displaying rather high degree (>70%) of methylation in their promoter/exon I regions and previously shown to be implicated in cancer-related EMT signaling. Our stringent selection retained 45 genes (see Supplementary Table S1E), as the DNA methylation status of the promoter regions of most of these genes was further validated by an alternative approach (BSP sequencing). Ten genes were finally selected, whose promoter/exon I DNA methylation patterns completely coincided with their mRNA and protein expression levels. Indeed, HOOK1, RAMP2, JMJD8, and WNT3 appeared hypomethylated and overexpressed (both on mRNA and protein levels) in SKOV3-M cells, whereas EVX2, CLDN5, KLF4, APC2, CEND1, and IFFO1 demonstrated hypomethylated profiles and strong mRNA/protein expression in SKOV3-E cells. These 10 genes also displayed quite similar mRNA and protein expression patterns in OVCAR8-M and OVCAR8-E cells (the latter generated upon shRNA-mediated LY75 KD in OVCAR8 EOC cells; see Supplementary Figure 1.S1A–C). Consecutive analysis of the literature data was indicative for their involvement in carcinogenesis, as some of these genes displayed altered DNA methylation profiles in different cancers. Accordingly, Hook1 (Hook microtubule

tethering protein1) represents a microtubule-binding protein involved in microtubule cytoskeleton dynamics, endocytic trafficking, and cell differentiation [25]. It was recently reported that Hook1 inhibits malignancy and EMT in several cancer types, including hepatocellular carcinoma, thyroid cancer and non-small-cell lung cancer [26,27,28]. Ramp2 (receptor activity-modifying protein-2) encodes a family member of single-transmembrane-domain proteins called RAMPs, which transport the calcitonin-receptor-like receptor to the plasma membrane. A specific combination of RAMP members and calcitonin-receptor-like receptor defines Ramp2 ligand affinity for either calcitonin or adrenomedullin [29]. A dual role of Ramp2 has been described in different cancer types; thus Ramp2 and its ligand adrenomedullin were shown to be overexpressed and to promote vascularization and metastasis in human colon cancer [30], while RAMP2 expression has been suppressed by promoter hypermethylation in lung cancer, and ectopic expression of RAMP2 directed apoptosis and inhibited lung cancer cell growth [31]. Similarly, the literature data for Jmjd8 implication in carcinogenesis are rather controversial. Jmjd8 belongs to the family of JmjC domain-redox enzymes that catalyze protein hydroxylation or demethylation [32], as a role of Jmjd8 in regulating cellular metabolism and angiogenesis has been recently reported [33]. An oncogenic role of Jmjd8 as a positive regulator of TNF-induced NF- $\kappa$ B signaling in colorectal cancer has been described [34,35]; however, a recent study demonstrated that JMJD8 knockdown promotes cell proliferation and double-strand base (DSB) repair in lung and bone cancer cells, suggesting that Jmjd8 could represent a potential target for more effective tumor radio- and chemotherapies [36]. As a member of Wnt/ $\beta$ -catenin family, an oncogenic role for Wnt3 has been reported in different cancer types, including colorectal, gastric, breast, liver, and lung cancer [37,38,39,40,41]; yet a potential tumor-suppressor role for Wnt3 has been described in chronic lymphocytic leukemia, where decreased Wnt3 expression is associated with disease progression and worse prognosis [42]. Interestingly, Wnt3 levels were found to be strongly reduced in malignant ovarian tissues compared to normal ovarian tissues [43]. EVX2 (even-skipped homeobox 2) was previously shown to be implicated in vertebrate spinal cord interneuron development [44]. This gene was found highly methylated in lung cancer, where a role for EVX2 as a methylation biomarker for early detection of the disease has been suggested [45]. Claudin5 (CLDN5) is a member of claudin gene family encoding proteins implicated in tight junction formation and function

[46]. Cldn5 expression is frequently altered in different human cancers, as CLDN5 gene was found to be downregulated in colorectal, liver, lung cancer and glioma [47,48,49,50], suggestive for a potential tumor-suppressor role of CLDN5 in these cancer types. However, CLDN5 has been described as an oncogene in breast, pancreatic, and esophageal cancers [51,52,53]. CLDN5 was also found to be highly expressed in malignant EOC tumors compared to benign EOC tumors [54]. Moreover, Cldn5 overexpression correlated with aggressive behavior in serous ovarian adenocarcinoma [55] and was shown to be involved in the malignant transformation of borderline mucinous EOC tumors [56]. Interestingly, CLDN5 was also found to be aberrantly methylated in pancreatic ductal adenocarcinomas [57]. Klf4 (Krüppel-like factor 4) is a zinc-finger-containing transcription factor implicated in regulating cellular growth, proliferation, differentiation, apoptosis, and cell cycle arrest [58]. Recently, a role of KLF4 was reported in inducing pluripotent stem cells and also maintaining the stemness of cancer stem cells [59]. Thus, KLF4 can act as a tumor suppressor or oncogene in different cancer types, largely depending on the cellular context, chromatin structure, cell cycle regulation, and expression patterns of other genes, including specific oncogenic drivers [60]. KLF4 expression was also shown to be frequently mediated through epigenetic or post-transcriptional mechanisms [61]. Moreover, a controversial role of KLF4 in regulating EMT in gastrointestinal cancer has been described [62,63], as currently, the mechanisms underlying its controversial role in this cancer type remain undefined. KLF4 has been characterized as a tumor-suppressor in EOC, as KLF4 downregulation correlated with accelerated EOC proliferation, invasion, and migration and poor patient survival [64,65]. Accordingly, the KLF4 overexpression significantly reduced the metastatic potential of EOC cells by inhibiting the TGF $\beta$ -induced EMT [66] and sensitized EOC cells to chemotherapy drugs [65]. Apc2 (adenomatous polyposis coli 2) promotes the assembly of a multiprotein  $\beta$ -catenin destruction complex which results in negative regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [67]. This protein functions as a tumor suppressor in different cancer types, including prostate, colorectal, and lung cancers, osteosarcoma, retinoblastoma, and glioma [68,69,70,71,72,73], where the APC2 gene expression was frequently found to be inhibited by hypermethylation [72,74,75]. Similarly, a critical role of APC2 in suppressing EOC progression has been demonstrated [76], as APC2 silencing promoted EOC cell proliferation [77] and was associated with decreased overall survival in EOC patients

following intraperitoneal chemotherapy [78]. CEND1 (cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1) plays an important role in neuronal differentiation by modulating cell cycle progression/exit or apoptosis of neuronal progenitors [79]. CEND1 was shown to suppress cell proliferation via modulating the cyclin D1 pathway, which is linked to its potential tumor suppressor functions, associated with proliferation inhibition of neuroblastoma cells [80]. CEND1 was found to be epigenetically suppressed by methylation in invasive breast carcinoma, also suggestive for a potential tumor suppressor role in this cancer type [81]. IFFO1 (intermediate filament family orphan 1) is a member of the intermediate filament family which includes essential components of the cyto- and nucleoskeleton [82]. Recently, a potential role of IFFO1 in suppressing chromosome translocations during tumorigenesis has been discovered [83]. IFFO1 was reported to be downregulated by promoter methylation in different cancer types [83]. Accordingly, we and others have identified IFFO1 as a highly methylated gene in EOC [20,84], as the IFFO1 methylation has been proposed as EOC biomarker [84].

All the above described genes, epigenetically modulated during EMT in EOC cells, could represent potential prognostic/diagnostic EOC biomarkers. Further studies are warranted to more completely elucidate the functional implications of these 10 genes in ovarian tumorigenesis.

Moreover, our results suggest that Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is the principal EMT-related pathway modulated by LY75 expression in EOC cells. *In silico* analysis of the TCGA data for ovarian cancer was also confirmative for the role of LY75 in modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activity in EOC. Deregulations of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway have been associated with the etiology of different human cancers, including colorectal, prostate, breast and skin cancers [85,86,87,88]. Accordingly, the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling has been shown to play critical role in EOC development, including EOC stemness, EMT, progression to malignancy, and therapy resistance (recently reviewed in [89,90]). The  $\beta$ -catenin is the key mediator of this pathway, as in the presence of Wnt ligands, the Frizzled and LRP5/6 receptors prevent the formation of the destruction Axin/Apc2/Gsk $\beta$  complex, allowing the stabilized  $\beta$ -catenin to translocate to the nucleus and to interact with the TCF/LEF transcription factors, thus modulating the transcription of Wnt downstream target genes, many of which regulate EMT, invasion, and metastasis [89].

The IPA canonical pathway analysis of the 6666-gene list displaying common altered DMRs in their exons/promoter regions upon LY75 KD in SKOV3 cells was strongly indicative for the implication of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the EMT-associated DNA methylation variations in this EOC cell line (see Figure 1.3B and Table 1.A1). This was further confirmed following treatment of EOC cells with the Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor XAV939, as XAV939 treatment induced MET-related phenotype changes in SKOV3-M and OVCAR8-M cells (similar to the LY75-KD effect; see Figure 1.4A), accompanied with suppression of the  $\beta$ -catenin and N-cadherin expression (see Figure 1.4B). Analogous changes in cells morphology and  $\beta$ -catenin and N/E cadherin switching were not observed following treatment with TGF- $\beta$  inhibitor SB431542 (Figure 1.4B). Consecutive immunofluorescence analyses were also indicative for abundant expression and importantly, nuclear localization of  $\beta$ -catenin in SKOV3-M cells, while a rather weak cytomembrane/cytoplasmic  $\beta$ -catenin expression was observed in SKOV3-E cells, accompanied with strong Axin 1 and Apc2 expression (see Supplementary Figure 1.S2).

Furthermore, our proteomics approach led to the identification of 23 LY75 interaction partners mostly involved in actin cytoskeleton organization and/or in cell-cell interactions, which confirms the implication of LY75 in modulating the EOC cellular phenotype (see Figure 5A). Interestingly, three LY75 interaction partners, including spectrin beta chain (SPTBN1), desmoplakin (DSP) and neuroblast differentiation-associated protein (AHNAK) were previously shown to be associated with suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. Indeed, SPTBN1 has been found to potentiate the expression of the Wnt inhibitor kallistatin in liver cancer [19]. Similarly, DSP was shown to enhance the expression of plakoglobin (also known as  $\gamma$ -catenin) in human lung cancer, which is associated with the suppression of  $\beta$ -catenin [17]. AHNAK has been described as a tumor suppressor in breast cancer that negatively regulates both the AKT/MAPK and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways [18]. Thus, our data suggest a possible role of LY75 in maintaining active Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in EOC cells by sequestering some of its inhibitors.

Remarkably, seven of the LY75 interaction partners identified were previously recognized as nucleolar proteins [91], and further co-localization immunofluorescence analysis of LY75 and the nucleolar protein fibrillarlin was confirmative for a possible LY75 nucleolar localization in EOC cells. Thus, our data suggest a putative LY75 implication in

some of the nucleolus functions that mainly include transcription regulation, rRNAs processing, and their subsequent assembly into ribosomal subunits. However, further studies are needed to understand the exact role of LY75 in the nucleolus.

In conclusion, we have shown that LY75-modulated EMT changes directed numerous DNA methylation alterations in EOC cells, as our experimental conditions resulted in the identification of 6666 genes displaying common altered DMRs in their exons/promoter regions. Ten genes were consecutively identified with significant methylation alterations in their promoter regions, which corresponded with their expression levels in EOC cells, suggesting their further investigation as potential EOC biomarkers/therapeutic targets. Moreover, LY75-mediated EMT alterations in EOC cells were predominantly associated with epigenetic regulation of members of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. We further demonstrated that LY75 supports an active status of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in EOC cells, while the LY75 depletion predominantly directs the pathway suppression. Though, a possible back-loop regulation of the LY75 expression via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling cannot be excluded. Our data are also indicative for a possible LY75 nucleolar localization; however, the role of LY75 in the nucleolus needs to be further elucidated.

A comprehensive understanding of molecular processes and the chronology of events between DNA methylation and the signaling pathways triggering EMT in EOC could arrange for the development of more effective (including epigenetic) treatment strategies for this deadly disease.

## **1.6 Materials and Methods**

### **1.6.1 Cell Cultures**

The SKOV3 and OVCAR8 EOC cell lines were purchased from American Tissue Type Collection (Manassas, VA, USA). Cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA) and cultured in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C as previously described [7]. In some experimental conditions, SKOV3 and OVCAR8 cells were treated for 24 h with the Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor XAV939 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and for 5 days with the TGF- $\beta$  inhibitor SB431542 (Reagents Direct, Encinitas, CA, USA), as both inhibitors were



applied at a final concentration of 20  $\mu$ M. The corresponding SKOV3 and OVCAR8 control cells were treated with 0.1% DMSO.

### **1.6.2 Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) Analysis**

For RRBS analysis,  $\sim$ 10  $\mu$ g of genomic DNA was extracted from different SKOV3-M and SKOV3-E clones using the Blood & Cell culture DNA Mini Kit (Qiagen, Montreal, PQ, Canada). RRBS analysis was performed on a service basis by the company Diagenode Inc. (<https://www.diagenode.com/en/p/rrbs-service>). The comparisons between the RRBS datasets were carried out using the R package methylKit, using the hg19 refGene and CpG island annotation from the UCSC GenomeBrowser database (<http://genome.ucsc.edu>). Differentially methylated CpGs, as well as differentially methylated regions (DMRs) were identified with a  $>$ 25% methylation difference and an adjusted  $p$ -value  $<$  0.05 (the latter with a window size of 1000 bp, since this has been found to include the majority of DMRs [92]). The DMRs were annotated using the UCSC RefSeq tracks (hg19) to further analyze CpG sites included in genes' exons and promoter regions (window size of 25 bp; promoter regions spanning around 2 kb upstream and downstream of the transcriptional start site). All RRBS sequencing and processed data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) with accession number GSE142310.

### **1.6.3 Bisulfite Sequencing PCR (BSP) Analysis**

BSP analysis was performed, as previously described [20]. BSP primer selection was performed using the Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA); all primers are listed in [Table 1.A3](#). PCR was done for 40 cycles (94  $^{\circ}$ C, 45 s; 54–60  $^{\circ}$ C, 45 s; 72  $^{\circ}$ C, 45 s), as shown before [20]. PCR products were sent for dideoxy-sequencing analysis at the Genomics Analysis Platform at Laval University (<http://www.bioinfo.ulaval.ca/seq/en/>).

### **1.6.4 Short Hairpin RNA (shRNA)- mediated LY75 Knockdown in EOC Cells**

The shRNA-mediated LY75 knockdown in EOC cells was done, as previously described [7]. Briefly, two LY75 shRNAs cloned into the pLKO.1-puro vector (targeting the LY75 mRNA sequences 5'-GCCCUAAUACUCAACCUCCAA-3' and 5'-UCCCGTCUUACAUAUUCAUCA-3') were retrieved from the Sigma Mission TRC human 1.5 shRNA library (clone numbers TRCN0000057363 and TRCN0000057364). Viral

supernatants were generated by transfecting 293T cells with the shRNA constructs and the packaging vectors psPAX2 and pMD2.G (Addgene, Cambridge, MA, USA). The high-titer lentiviral supernatants in the presence of 8 µg/mL polybrene were used to infect SKOV3 and OVCAR8 cells. Two days later, infected cells were treated with puromycin (2 µg/mL) for the selection of stably-transduced clones. The pLKO.1-puro vector encoding a scramble sequence not matching any mammalian sequence was used for the generation of mock-transduced (control) clones. Stable clones with inhibited LY75 expression were evaluated and validated by quantitative RT-PCR and Western blot.

### **1.6.5 Western Blot Analysis**

Western blot analyses were performed as previously described [7]. List of antibodies used: anti-LY75 (Abcam, Branford, CT, USA and Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA), anti-Snail1, anti-FN1, anti-E-cad, anti-EpCAM, anti-AXIN1, anti-WNT3, anti-EVX2, anti-IFFO1, anti-CLDN5, anti-HOOK1, anti-JMJD8, anti-RAMP2, anti-KLF-4, anti-β-actin antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and anti-Twist1, anti-E-cadherin, anti-N-cadherin, anti-APC2, and anti-Cend1 antibodies (Abcam Branford, CT, USA).

### **1.6.6 Quantitative PCR (qPCR)**

Quantitative PCR was performed as previously described [7]. Briefly, total RNA was extracted by the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Montreal, PQ, Canada) and RNA was reverse transcribed into cDNA using Superscript III transcriptase, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RT-qPCR was performed using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) on ROTOR GENE real-time PCR machine (Corbett research, Corbett Robotics, Brisbane, Australia). Relative quantification of RNA expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  method [93]. The 18S ribosomal gene was used as an internal standard. Each sample was tested in triplicate. Primers were designed as previously shown [7]; all primers for qPCR are listed in Table 1.A2.

### **1.6.7 Immunoprecipitation and Consecutive Mass Spectrometry (MS) Analysis**

For immunoprecipitation, SKOV3-M and SKOV3-E cells were lysed in 1 mL cell RIPA lysis buffer. Following lysis, 500 µg of proteins were incubated with 2 µg of the LY75

antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) for 4 h at room temperature and overnight at 4 °C upon gentle rotation, before being incubated with 40 µL Dynabeads Protein G (Invitrogen, Waltham, MA, USA) at 4 °C for 2 h under rotation. Beads were digested with trypsin and the resulting peptides were analyzed by LC-MS/MS. The same immunoprecipitation experiment was repeated once again; however, this time the beads were consecutively resuspended in 40 µL SDS sample buffer and boiled for 10 min; the supernatant was analyzed by electrophoresis and stained by Coomassie blue. Gel bands of interest of the SKOV3-M peptide fraction were digested with trypsin, and the resulting peptides were analyzed by LC-MS/MS. Protein digestion and MS analyses were performed at the Proteomics Platform of the CHU de Québec Research Center (Quebec, PQ, Canada), using the Ekspert NanoLC425 HPLC system (Eksigent technologies Dublin, CA, USA) coupled to a 5600+ mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source, as previously described [94]. MGF peak list files were consecutively created using Protein Pilot version 4.5 software (Sciex, Framingham, MA, USA). MGF sample files were then analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1). Mascot was set up to search the contaminants\_thegpm\_20170713.fasta; CP\_HomoSapiens\_9606\_CI\_20170329\_2 database (unknown version, 92,988 entries) assuming the digestion enzyme trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.100 Da and a parent ion tolerance of 0.100 Da. Carbamidomethyl of cysteine was specified in Mascot as a fixed modification. Deamidated of asparagine and glutamine and oxidation of methionine were specified in Mascot as variable modifications. Scaffold software (version Scaffold\_4.8.4, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA) was used to validate MS/MS-based peptide and protein identifications. An FDR less than 1.0% for peptide and protein was used. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony.

### **1.6.8 Immunofluorescence**

Cells were plated on poly-D-lysine coated slides (Sigma Aldrich Oakville, ON, Canada), then fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 1 x PBS–0.2% Triton X-100. After blocking, cells were incubated with different primary antibodies, including anti-β-catenin (Santa-Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA), anti-LY75 (Santa-Cruz

Biotechnology Dallas, TX, USA and Abcam, Branford, CT, USA), anti-APC2 (Abcam, Branford, CT, USA), anti-Axin1 (Santa-Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA), and anti-DSP (Santa-Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA), and subsequently incubated with secondary antibodies, including rhodamine-linked goat-anti-mouse IgG1 (Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA) or Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit antibody (Abcam, Branford, CT, USA). Cells were finally stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Images were captured using a Zeiss LSM 700 confocal microscope (Carl Zeiss Meditec AG Jena, Germany).

### **Supplementary Materials**

Supplementary materials can be found at <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/5/1848/s1>.

### **Author Contributions**

Conceptualization, S.M. and D.B.; data curation, D.B., S.M., M.-P.S.-B. and A.D.; funding acquisition, D.B.; methodology, S.M., M.B. and M.-P.S.-B.; project administration, D.B.; resources, D.B.; supervision, D.B.; validation, S.M., M.-P.S.-B., A.D. and D.B.; writing—original draft, S.M. and D.B.; writing—review and editing, S.M., M.-P.S.-B. and D.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Funding**

This study was sustained by grants to D.B. from the Cancer Research Society of Canada, and financial support from FRQ-S—Réseau de Recherche en Cancer (<http://www.rrcancer.ca>).

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## **Abbreviations**

EOC	Epithelia ovarian cancer
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
MET	Mesenchymal–epithelial transition
ncRNA	Noncoding RNA
RRBS	Reduced Representation Bisulfite Sequencing
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
DMRs	differentially methylated regions
IGV	Integrative Genomic Viewer
BSP	Bisulfite-sequencing PCR
shRNA	Short hairpin RNA
q-PCR	Quantitative PCR
LC-MS/MS	liquid chromatography–mass spectrometry

## 1.7 Appendix A

**Table 1.A. 1:** List of genes displaying EMT-related DNA methylation alterations upon IPA analysis of the EMT, Wnt/ $\beta$ -cat and TGF- $\beta$  canonical pathways, including common genes between EMT/Wnt/ $\beta$ -cat or EMT/TGF- $\beta$  canonical pathways

EMT genes		Wnt/ $\beta$ -cat genes		TGF- $\beta$ genes	Common EMT/Wnt/ $\beta$ -cat genes	Common EMT/TGF- $\beta$ genes
WNT3	PDGFD	CDKN2A	EP300	INHA	WNT3	SMAD3
AXIN1	NOTCH1	WNT3	AKT1	BMP4	AXIN1	HRAS
PIK3R1	WNT1	AXIN1	JUN	SMAD3	WNT6	MAP2K2
SMAD3	FGF5	PPP2R5B	CDH3	SKI	WNT7B	SOS1
HRAS	RELA	TLE1	UBA52	HRAS	WNT4	GRB2
PARD6G	FZD10	WNT6	DKK3	BMPR1B	WNT5B	
WNT6	FGF8	SOX13	TGFB2	MAPK13	AKT2	
PIK3R4	TWIST1	MYC	SOX14	MAPK11	WNT9A	
FGFR3	KLB	TGFB1	CSNK2B	TLX2	FZD9	
FOXC2	HNF1A	PPM1J	SOX7	TGIF1	TCF3	
MAP2K2	WNT2	WNT7B	LRP5	EP300	CDH1	
TGFB1	mir34	RARA	WNT9B	BCL2	CDH12	
WNT7B	FGF13	WNT4	CSNK1G3	JUN	FZD6	
FGF12	FGF4	MAP4K1	WNT2B	MAP2K2	LEF1	
WNT4	AKT1	WNT5B	DVL1	TGFB1	WNT1	
IRS2	KL	AXIN2	DKKL1	SOS1	FZD10	
WNT5B	SOS1	AKT2	TCF7L1	TGFB2	HNF1A	
FGF19	TGFB2	CSNK1G2	SOX11	MAP4K1	WNT2	
PIK3C2B	FGF23	WNT9A	FZD8	VDR	AKT1	
AKT2	PIK3R2	CREBBP	WNT3A	HNF4A	WNT9B	
TWIST2	FGF3	CSNK1D	WNT10A	RUNX3	WNT2B	
JAG2	EGFR	FZD9	SOX6	GRB2	DVL1	
WNT9A	MAP2K7	TCF3	APC2	FOXH1	TCF7L1	
TYK2	ESRP2	ACVR1B	NR5A2	CREBBP	FZD8	
FGFR2	WNT9B	CDH1	PPP2R5E	SMAD6	WNT3A	
FZD9	GRB2	CDH12	SOX15	SMAD7	WNT10A	
MMP2	EGR1	TLE3	WNT11	MAPK9	WNT11	
NFKB2	WNT2B	FZD6	LRP1	PITX2		
ZEB1	DVL1	LEF1	SOX3	MAPK12		
TCF3	FGF14	SOX8		ACVR1B		
TLR9	TCF7L1	SFRP1		INHBB		
MET	FGF21	WNT1		TRAF6		
CDH1	FZD8	FZD10		NKX2-5		
CDH12	WNT3A	SFRP2		FOS		
IRS1	WNT10A	FRZB		ZNF423		
mir-192	ZEB2	SOX1		IRF7		
FZD6	FGF20	FRAT1		SMURF2		
LEF1	FGF11	MARK2		BMP7		
FGFRL1	RBPJ	HNF1A		PMEPA1		
WNT11	JAK3	WNT2				

**Table 1.A. 2:** Primers used for quantitative PCR (qPCR).

Gene	q-PCR Primers	Sequence (5'→3')
HOOK1 (NM_015888)	Forward	AGTGAGTTGACACCCTGTGG
	Reverse	TGGTATATGTACTIONCAAGCCTCCC
	Product length (pb)	103
JMJD8 (NM_001005920)	Forward	TCATCACCTCGTGGTTTCG
	Reverse	ATCTGGCCAGGTCCATCTCT
	Product length (pb)	83
RAMP2 (NM_005854)	Forward	GCACGAGCTTCTCAACAACC
	Reverse	CAACCCTGGCTTCCATTCCC
	Product length (pb)	134
KRT7 (NM_005556)	Forward	ATTCCACTGGTGGCAGTAGC
	Reverse	TGGAGAAGCTCAGGGCATTG
	Product length (pb)	83
APC2 (NM_001351273)	Forward	GCTCCGACAGCATTACCTCA
	Reverse	AGACCCGGTACAGAAACGTG
	Product length (pb)	115
CEND1 (NM_016564)	Forward	TACATACGCCCCAACACAC
	Reverse	TCITTCTGCCCTGGAGGTTG
	Product length (pb)	92
CLDN5 (NM_001130861)	Forward	GGATTTCGCTTCCCCTCCAA
	Reverse	GTACACATCTTCCGGTGGGG
	Product length (pb)	119
EVX2 (NM_001080458)	Forward	GGGAGAACTATGTGTGCGCGG
	Reverse	CGGTTCTGGAACCACACCTT
	Product length (pb)	91
KLF4 (NM_004235.6)	Forward	AGAACAGATGGGGTCTGTGAC
	Reverse	TCCACAACCTCCAGTCACCC
	Product length (pb)	106
WNT3 (NM_030753)	Forward	ATCTACGACGTGCACACCTG
	Reverse	TGCTTCCCATGAGACTTCGC
	Product length (pb)	95
18S (NR_003278)	Forward	AACCCGTTGAACCCCAT
	Reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
	Product length (pb)	119

**Table 1.A. 3 : Primers used for BSP analysis**

<b>Genes</b>	<b>Primers</b>	<b>Outer PCR-Sequence (5'-&gt;3')</b>	<b>Inner PCR-Sequence (5'-&gt;3')</b>
HOOK1 (NM_015888)	Forward	GGTTTAGGTGTTTGGTAGYG	GGTTTAGGTGTTTGGTAGYG
	Reverse	ACCCAAATCATAAACTATCRC	ACCRCTCTCCTCCAAAAA
	Product length (pb)	318	204
JMJD8 (NM_001005920)	Forward	ATGAAGTGGTTGGAAGGTAGTT	GGAGGTTGGAATTTGAGATTT
	Reverse	CRAAAATAACCTCCTTTAACCC	CRAAAATAACCTCCTTTAACCC
	Product length (pb)	367	231
RAMP2 (NM_005854)	Forward	TTTTTTTTTTGTTGGGYG	TTTTTTTTTTGTTGGGYG
	Reverse	CTTATCACTCACACCCAAACC	CCCCTCATCTCTAACCAACTT
	Product length (pb)	318	291
KRT7 (NM_005556)	Forward	TTTGGATTGAAAGTTTG	TGGTAGTAGAGAAAGGTGGTT
	Reverse	AACCCCCATAAACAAAAC	AACCCCCATAAACAAAAC
	Product length (pb)	396	325
APC2 (NM_001351273)	Forward	TTGGTTGTTGTTATGGTATTAGT	TTGGTTGTTGTTATGGTATTAGT
	Reverse	AACTCAATTTCCCTCCAA	CCTCCAACCTCCCACTCTAA
	Product length (pb)	447	435
CEND1 (NM_016564)	Forward	AGTAGTGATTGTGGGAAATTTT	AGTAGTGATTGTGGGAAATTTT
	Reverse	ACTACTACCACCTCCAAA	CCCAATAACCTTCAAAACC
	Product length (pb)	391	191
CLDN5 (NM_001130861)	Forward	GTAAATTTTGGTTAGGGAAGTG	GTAAATTTTGGTTAGGGAAGTG
	Reverse	CACCTCCTAAATCTACCAACTC	ACCAATCACAAAACCTCTAACA
	Product length (pb)	436	310
EVX2 (NM_001080458)	Forward	GGGTTATTGTGATATTTTAAAGAA	TGGAGAGAGGGTTGTATAGTT
	Reverse	ATTACCTTTACCATTATTTTCCTT	ATTACCTTTACCATTATTTTCCTT
	Product length (pb)	463	398
KLF4 (NM_004235.6)	Forward	ATTTTTTGGATTTGGATTTTATT	ATTTTTTGGATTTGGATTTTATT
	Reverse	AAATATACACCRAATCCAATTC	AAACRAACTCCCTACCATA
	Product length (pb)	339	266
WNT3 (NM_030753)	Forward	AGGAAATGTAAAGGTAGTAGGAG	AGGAAATGTAAAGGTAGTAGGA
	Reverse	AAAAACACAAAATATTTCCAA	ACAAAATATTTCCAAAAACCC
	Product length (pb)	286	280



## 1.8 References

1. Siegel, R.; Ward, E.; Brawley, O.; Jemal, A. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA A Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 212–236. [Google Scholar] [CrossRef]
2. Reid, B.M.; Permeth, J.B.; Sellers, T.A. Epidemiology of ovarian cancer: A review. *Cancer Biol. Med.* **2017**, *14*, 9–32. [Google Scholar] [CrossRef]
3. Marchetti, C.; Pisano, C.; Facchini, G.; Bruni, G.S.; Magazzino, F.P.; Losito, S.; Pignata, S. First-line treatment of advanced ovarian cancer: Current research and perspectives. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2010**, *10*, 47–60. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
4. Sheta, R.; Woo, C.M.; Roux-Dalvai, F.; Fournier, F.; Bourassa, S.; Droit, A.; Bertozzi, C.R.; Bachvarov, D. A metabolic labeling approach for glycoproteomic analysis reveals altered glycoprotein expression upon GALNT3 knockdown in ovarian cancer cells. *J. Proteom.* **2016**, *145*, 91–102. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
5. Fruscio, R.; Corso, S.; Ceppi, L.; Garavaglia, D.; Garbi, A.; Floriani, I.; Franchi, D.; Cantu, M.G.; Bonazzi, C.M.; Milani, R.; et al. Conservative management of early-stage epithelial ovarian cancer: Results of a large retrospective series. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 138–144. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
6. Alouini, S. Management of ovarian cancer has changed. *Gynecol. Oncol.* **2012**, *126*, 313. [Google Scholar] [CrossRef]
7. Faddaoui, A.; Bachvarova, M.; Plante, M.; Gregoire, J.; Renaud, M.C.; Sebastianelli, A.; Gobeil, S.; Morin, C.; Macdonald, E.; Vanderhyden, B.; et al. The mannose receptor LY75 (DEC205/CD205) modulates cellular phenotype and metastatic potential of ovarian cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 14125–14142. [Google Scholar] [CrossRef]
8. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 1420–1428. [Google Scholar] [CrossRef]
9. Takai, M.; Terai, Y.; Kawaguchi, H.; Ashihara, K.; Fujiwara, S.; Tanaka, T.; Tsunetoh, S.; Tanaka, Y.; Sasaki, H.; Kanemura, M.; et al. The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* **2014**, *7*, 1757–2215. [Google Scholar] [CrossRef]
10. Davidson, B.; Trope, C.G.; Reich, R. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Front Oncol* **2012**, *2*. [Google Scholar] [CrossRef]
11. Klymenko, Y.; Kim, O.; Stack, M.S. Complex Determinants of Epithelial: Mesenchymal Phenotypic Plasticity in Ovarian Cancer. *Cancers* **2017**, *9*, 104. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
12. Tam, W.L.; Weinberg, R.A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1438–1449. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
13. Bedi, U.; Mishra, V.K.; Wasilewski, D.; Scheel, C.; Johnsen, S.A. Epigenetic plasticity: A central regulator of epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Oncotarget* **2014**, *5*, 2016–2029. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
14. Sun, L.; Fang, J. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 4493–4515. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
15. Gu, H.; Smith, Z.D.; Bock, C.; Boyle, P.; Gnirke, A.; Meissner, A. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 468–481. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
16. MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **2009**, *17*, 9–26. [Google Scholar] [CrossRef]
17. Petersen, I.; Yang, L.; Zhang, Q.; Knösel, T.; Cui, T.; Chen, Y.; Albring, K.F.; Huber, O. Desmoplakin acts as a tumor suppressor by inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human lung cancer. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 1863–1870. [Google Scholar] [CrossRef]

18. Chen, B.; Wang, J.; Dai, D.; Zhou, Q.; Guo, X.; Tian, Z.; Huang, X.; Yang, L.; Tang, H.; Xie, X. AHNAK suppresses tumour proliferation and invasion by targeting multiple pathways in triple-negative breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 65. [Google Scholar] [CrossRef]
19. Zhi, X.; Lin, L.; Yang, S.; Bhuvaneshwar, K.; Wang, H.; Gusev, Y.; Lee, M.-H.; Kallakury, B.; Shivapurkar, N.; Cahn, K.; et al.  $\beta$ II-Spectrin (SPTBN1) suppresses progression of hepatocellular carcinoma and Wnt signaling by regulation of Wnt inhibitor kallistatin. *Hepatology* **2015**, *61*, 598–612. [Google Scholar] [CrossRef]
20. Keita, M.; Wang, Z.Q.; Pelletier, J.F.; Bachvarova, M.; Plante, M.; Gregoire, J.; Renaud, M.C.; Mes-Masson, A.M.; Paquet, E.R.; Bachvarov, D. Global methylation profiling in serous ovarian cancer is indicative for distinct aberrant DNA methylation signatures associated with tumor aggressiveness and disease progression. *Gynecol. Oncol.* **2013**, *128*, 356–363. [Google Scholar] [CrossRef]
21. Faddaoui, A.; Sheta, R.; Bachvarova, M.; Plante, M.; Gregoire, J.; Renaud, M.C.; Sebastianelli, A.; Gobeil, S.; Morin, C.; Ghani, K.; et al. Suppression of the grainyhead transcription factor 2 gene (GRHL2) inhibits the proliferation, migration, invasion and mediates cell cycle arrest of ovarian cancer cells. *Cell Cycle* **2017**, *16*, 693–706. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
22. Sheta, R.; Wang, Z.Q.; Bachvarova, M.; Plante, M.; Gregoire, J.; Renaud, M.C.; Sebastianelli, A.; Gobeil, S.; Morin, C.; Macdonald, E.; et al. Hic-5 regulates epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells in a TGFbeta1-independent manner. *Oncotarget* **2017**, *8*, 82506–82530. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
23. Keita, M.; Bachvarova, M.; Morin, C.; Plante, M.; Gregoire, J.; Renaud, M.C.; Sebastianelli, A.; Trinh, X.B.; Bachvarov, D. The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 972–986. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
24. Li, Q.; Lai, Q.; He, C.; Fang, Y.; Yan, Q.; Zhang, Y.; Wang, X.; Gu, C.; Wang, Y.; Ye, L.; et al. RUNX1 promotes tumour metastasis by activating the Wnt/beta-catenin signalling pathway and EMT in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 334. [Google Scholar] [CrossRef]
25. Maldonado-Baez, L.; Cole, N.B.; Kramer, H.; Donaldson, J.G. Microtubule-dependent endosomal sorting of clathrin-independent cargo by Hook1. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 233–247. [Google Scholar] [CrossRef]
26. Sun, X.; Zhang, Q.; Chen, W.; Hu, Q.; Lou, Y.; Fu, Q.-H.; Zhang, J.-Y.; Chen, Y.-W.; Ye, L.-Y.; Wang, Y.; et al. Hook1 inhibits malignancy and epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* **2017**, *39*. [Google Scholar] [CrossRef]
27. Cao, J.; Huang, Y.-Q.; Jiao, S.; Lan, X.-B.; Ge, M.-H. Clinicopathological and prognostic significance of SHP2 and Hook1 expression in patients with thyroid carcinoma. *Hum. Pathol.* **2018**, *81*, 105–112. [Google Scholar] [CrossRef]
28. Li, S.; Wang, L.; Zhao, Q.; Liu, Y.; He, L.; Xu, Q.; Sun, X.; Teng, L.; Cheng, H.; Ke, Y. SHP2 positively regulates TGFbeta1-induced epithelial-mesenchymal transition modulated by its novel interacting protein Hook1. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 34152–34160. [Google Scholar] [CrossRef]
29. McLatchie, L.M.; Fraser, N.J.; Main, M.J.; Wise, A.; Brown, J.; Thompson, N.; Solari, R.; Lee, M.G.; Foord, S.M. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **1998**, *393*, 333–339. [Google Scholar] [CrossRef]
30. Nouguerède, E.; Berenguer, C.; Garcia, S.; Bennani, B.; Delfino, C.; Nanni, I.; Dahan, L.; Gasmi, M.; Seitz, J.-F.; Martin, P.-M.; et al. Expression of adrenomedullin in human colorectal tumors and its role in cell growth and invasion in vitro and in xenograft growth in vivo. *Cancer Med.* **2013**, *2*, 196–207. [Google Scholar] [CrossRef]
31. Yue, W.; Dacic, S.; Sun, Q.; Landreneau, R.; Guo, M.; Zhou, W.; Siegfried, J.M.; Yu, J.; Zhang, L. Frequent Inactivation of RAMP2, EFEMP1 and Dutt1 in Lung Cancer by Promoter

- Hypermethylation. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4336–4344. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
32. Accari, S.L.; Fisher, P.R. Emerging Roles of JmjC Domain-Containing Proteins. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2015**, *319*, 165–220. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
  33. Boeckel, J.N.; Derlet, A.; Glaser, S.F.; Luczak, A.; Lucas, T.; Heumuller, A.W.; Kruger, M.; Zehendner, C.M.; Kaluza, D.; Doddaballapur, A.; et al. JMJD8 Regulates Angiogenic Sprouting and Cellular Metabolism by Interacting With Pyruvate Kinase M2 in Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 1425–1433. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
  34. Yeo, K.S.; Tan, M.C.; Wong, W.Y.; Loh, S.W.; Lam, Y.L.; Tan, C.L.; Lim, Y.-Y.; Ea, C.-K. JMJD8 is a positive regulator of TNF-induced NF- $\kappa$ B signaling. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34125. [Google Scholar] [CrossRef]
  35. Wang, L.; Jiang, F.; Ma, F.; Zhang, B. MiR-873-5p suppresses cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition via directly targeting Jumonji domain-containing protein 8 through the NF-kappaB pathway in colorectal cancer. *J. Cell Commun. Signal.* **2019**, *13*, 549–560. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
  36. Su, Y.; Wang, J. JmjC domain-containing protein 8 (JMJD8) represses Ku70/Ku80 expression via attenuating AKT/NF-kappaB/COX-2 signaling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 118541. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
  37. Nie, X.; Xia, F.; Liu, Y.; Zhou, Y.; Ye, W.; Hean, P.; Meng, J.; Liu, H.; Liu, L.; Wen, J.; et al. Downregulation of Wnt3 Suppresses Colorectal Cancer Development Through Inhibiting Cell Proliferation and Migration. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1110. [Google Scholar] [CrossRef]
  38. Wang, H.S.; Nie, X.; Wu, R.B.; Yuan, H.W.; Ma, Y.H.; Liu, X.L.; Zhang, J.Y.; Deng, X.L.; Na, Q.; Jin, H.Y.; et al. Downregulation of human Wnt3 in gastric cancer suppresses cell proliferation and induces apoptosis. *Oncotargets Ther.* **2016**, *9*, 3849–3860. [Google Scholar] [CrossRef]
  39. Wu, Y.; Ginther, C.; Kim, J.; Mosher, N.; Chung, S.; Slamon, D.; Vadgama, J.V. Expression of Wnt3 activates Wnt/beta-catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **2012**, *10*, 1597–1606. [Google Scholar] [CrossRef]
  40. Chu, Y.; Fan, W.; Guo, W.; Zhang, Y.; Wang, L.; Guo, L.; Duan, X.; Wei, J.; Xu, G. miR-1247-5p functions as a tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma by targeting Wnt3. *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 343–351. [Google Scholar] [CrossRef]
  41. Xing, Z.; Wang, H.Y.; Su, W.Y.; Liu, Y.F.; Wang, X.X.; Zhan, P.; Lv, T.F.; Song, Y. Wnt3 knockdown sensitizes human non-small cell type lung cancer (NSCLC) cells to cisplatin via regulating the cell proliferation and apoptosis. *Eur. Rev. Med Pharmacol. Sci.* **2018**, *22*, 1323–1332. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
  42. Poppova, L.; Janovska, P.; Plevova, K.; Radova, L.; Plesingerova, H.; Borsky, M.; Kotaskova, J.; Kantorova, B.; Hlozkova, M.; Figulova, J.; et al. Decreased WNT3 expression in chronic lymphocytic leukaemia is a hallmark of disease progression and identifies patients with worse prognosis in the subgroup with mutated IGHV. *Br. J. Haematol.* **2016**, *175*, 851–859. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
  43. Yoshioka, S.; King, M.L.; Ran, S.; Okuda, H.; MacLean, J.A., 2nd; McAsey, M.E.; Sugino, N.; Brard, L.; Watabe, K.; Hayashi, K. WNT7A regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/beta-catenin pathway. *Mol. Cancer Res.* **2012**, *10*, 469–482. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
  44. Juarez-Morales, J.L.; Schulte, C.J.; Pezoa, S.A.; Vallejo, G.K.; Hilinski, W.C.; England, S.J.; de Jager, S.; Lewis, K.E. Evx1 and Evx2 specify excitatory neurotransmitter fates and suppress inhibitory fates through a Pax2-independent mechanism. *Neural Dev.* **2016**, *11*, 5. [Google Scholar] [CrossRef]

45. Rauch, T.A.; Wang, Z.; Wu, X.; Kernstine, K.H.; Riggs, A.D.; Pfeifer, G.P. DNA methylation biomarkers for lung cancer. *Tumor Biol.* **2012**, *33*, 287–296. [Google Scholar] [CrossRef]
46. Liu, F.; Koval, M.; Ranganathan, S.; Fanayan, S.; Hancock, W.S.; Lundberg, E.K.; Beavis, R.C.; Lane, L.; Duek, P.; McQuade, L.; et al. Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 339–359. [Google Scholar] [CrossRef]
47. Cherradi, S.; Martineau, P.; Gongora, C.; Del Rio, M. Claudin gene expression profiles and clinical value in colorectal tumors classified according to their molecular subtype. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 1337–1348. [Google Scholar] [CrossRef]
48. Sakaguchi, T.; Suzuki, S.; Higashi, H.; Inaba, K.; Nakamura, S.; Baba, S.; Kato, T.; Konno, H. Expression of tight junction protein claudin-5 in tumor vessels and sinusoidal endothelium in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Res.* **2008**, *147*, 123–131. [Google Scholar] [CrossRef]
49. Kudinov, A.E.; Deneka, A.; Nikonova, A.S.; Beck, T.N.; Ahn, Y.H.; Liu, X.; Martinez, C.F.; Schultz, F.A.; Reynolds, S.; Yang, D.H.; et al. Musashi-2 (MSI2) supports TGF-beta signaling and inhibits claudins to promote non-small cell lung cancer (NSCLC) metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 6955–6960. [Google Scholar] [CrossRef]
50. Karnati, H.K.; Panigrahi, M.; Shaik, N.A.; Greig, N.H.; Bagadi, S.A.; Kamal, M.A.; Kapalavayi, N. Down regulated expression of Claudin-1 and Claudin-5 and up regulation of beta-catenin: Association with human glioma progression. *Cns Neurol. Disord. Drug Targets* **2014**, *13*, 1413–1426. [Google Scholar] [CrossRef]
51. Escudero-Esparza, A.; Jiang, W.G.; Martin, T.A. Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2012**, *31*, 43. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
52. Soini, Y.; Eskelinen, M.; Juvonen, P.; Karja, V.; Haapasaari, K.M.; Saarela, A.; Karihtala, P. Strong claudin 5 expression is a poor prognostic sign in pancreatic adenocarcinoma. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 3803–3808. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
53. Takala, H.; Saarnio, J.; Wiik, H.; Soini, Y. Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal cancer: Loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **2007**, *115*, 838–847. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
54. Soini, Y.; Talvensaaari-Mattila, A. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 in ovarian tumors of diverse types. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2006**, *25*, 330–335. [Google Scholar] [CrossRef]
55. Turunen, M.; Talvensaaari-Mattila, A.; Soini, Y.; Santala, M. Claudin-5 overexpression correlates with aggressive behavior in serous ovarian adenocarcinoma. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 5185–5189. [Google Scholar]
56. Nissi, R.; Talvensaaari-Mattila, A.; Kuvaja, P.; Paakko, P.; Soini, Y.; Santala, M. Claudin-5 is associated with elevated TATI and CA125 levels in mucinous ovarian borderline tumors. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 973–976. [Google Scholar]
57. Hong, S.M.; Kelly, D.; Griffith, M.; Omura, N.; Li, A.; Li, C.P.; Hruban, R.H.; Goggins, M. Multiple genes are hypermethylated in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod. Pathol.* **2008**, *21*, 1499–1507. [Google Scholar] [CrossRef]
58. Ghaleb, A.M.; Yang, V.W. Kruppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene* **2017**, *611*, 27–37. [Google Scholar] [CrossRef]
59. Tetreault, M.P.; Yang, Y.; Katz, J.P. Kruppel-like factors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 701–713. [Google Scholar] [CrossRef]
60. Yu, M.; Hao, B.; Zhan, Y.; Luo, G. Kruppel-like factor 4 expression in solid tumor prognosis: A meta-analysis. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *485*, 50–59. [Google Scholar] [CrossRef]
61. Park, C.S.; Lewis, A.; Chen, T.; Lacorazza, D. Concise Review: Regulation of Self-Renewal in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells by Kruppel-Like Factor 4. *Stem Cells Transl. Med.* **2019**, *8*, 568–574. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

62. Zhang, J.; Niu, Y.; Huang, C. Role of FoxM1 in the Progression and Epithelial to Mesenchymal Transition of Gastrointestinal Cancer. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* **2017**, *12*, 247–259. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
63. Cui, J.; Shi, M.; Quan, M.; Xie, K. Regulation of EMT by KLF4 in gastrointestinal cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **2013**, *13*, 986–995. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
64. Zhang, C.; Liu, J.; Zhang, Y.; Luo, C.; Zhu, T.; Zhang, R.; Yao, R. LINC01210 accelerates proliferation, invasion and migration in ovarian cancer through epigenetically downregulating KLF4. *Biomed. Pharmacother. = Biomed. Pharmacother.* **2019**, *119*, 109431. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
65. Wang, B.; Shen, A.; Ouyang, X.; Zhao, G.; Du, Z.; Huo, W.; Zhang, T.; Wang, Y.; Yang, C.; Dong, P.; et al. KLF4 expression enhances the efficacy of chemotherapy drugs in ovarian cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *484*, 486–492. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
66. Chen, Z.; Wang, Y.; Liu, W.; Zhao, G.; Lee, S.; Balogh, A.; Zou, Y.; Guo, Y.; Zhang, Z.; Gu, W.; et al. Doxycycline inducible Kruppel-like factor 4 lentiviral vector mediates mesenchymal to epithelial transition in ovarian cancer cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105331. [Google Scholar] [CrossRef]
67. Roberts, D.M.; Pronobis, M.I.; Poulton, J.S.; Kane, E.G.; Peifer, M. Regulation of Wnt signaling by the tumor suppressor adenomatous polyposis coli does not require the ability to enter the nucleus or a particular cytoplasmic localization. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 2041–2056. [Google Scholar] [CrossRef]
68. Xing, R. miR-3648 Promotes Prostate Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Adenomatous Polyposis Coli 2. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19*, 7526–7531. [Google Scholar] [CrossRef]
69. Geng, Y.; Zheng, X.; Hu, W.; Wang, Q.; Xu, Y.; He, W.; Wu, C.; Zhu, D.; Jiang, J. Hsa\_circ\_0009361 acts as the sponge of miR-582 to suppress colorectal cancer progression by regulating APC2 expression. *Clin. Sci.* **2019**, *133*, 1197–1213. [Google Scholar] [CrossRef]
70. Xu, G.; Zhang, Z.; Zhang, L.; Chen, Y.; Li, N.; Lv, Y.; Li, Y.; Xu, X. miR-4326 promotes lung cancer cell proliferation through targeting tumor suppressor APC2. *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *443*, 151–157. [Google Scholar] [CrossRef]
71. Wu, Z.; Shi, W.; Jiang, C. Overexpressing circular RNA hsa\_circ\_0002052 impairs osteosarcoma progression via inhibiting Wnt/beta-catenin pathway by regulating miR-1205/APC2 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *502*, 465–471. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
72. Beta, M.; Chitipothu, S.; Khetan, V.; Biswas, J.; Krishnakumar, S. Hypermethylation of adenomatous polyposis coli-2 and its tumor suppressor role in retinoblastoma. *Curr. Eye Res.* **2015**, *40*, 719–728. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
73. Fang, B.; Li, G.; Xu, C.; Hui, Y. MicroRNA miR-1249 downregulates adenomatous polyposis coli 2 expression and promotes glioma cells proliferation. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 1324–1336. [Google Scholar] [PubMed]
74. Mokarram, P.; Kumar, K.; Brim, H.; Naghibalhossaini, F.; Saberi-firoozi, M.; Nouraie, M.; Green, R.; Lee, E.; Smoot, D.T.; Ashktorab, H. Distinct high-profile methylated genes in colorectal cancer. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7012. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
75. Zhang, K.; Wang, J.; Yang, L.; Yuan, Y.C.; Tong, T.R.; Wu, J.; Yun, X.; Bonner, M.; Pangen, R.; Liu, Z.; et al. Targeting histone methyltransferase G9a inhibits growth and Wnt signaling pathway by epigenetically regulating HP1alpha and APC2 gene expression in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 153. [Google Scholar] [CrossRef]
76. Mohamed, N.E.; Hay, T.; Reed, K.R.; Smalley, M.J.; Clarke, A.R. APC2 is critical for ovarian WNT signalling control, fertility and tumour suppression. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 677. [Google Scholar] [CrossRef]

77. Ying, X.; Li-ya, Q.; Feng, Z.; Yin, W.; Ji-hong, L. MiR-939 promotes the proliferation of human ovarian cancer cells by repressing APC2 expression. *Biomed. Pharmacother.* = *Biomed. Pharmacother.* **2015**, *71*, 64–69. [Google Scholar] [CrossRef]
78. Seagle, B.L.; Eng, K.H.; Yeh, J.Y.; Dandapani, M.; Schiller, E.; Samuelson, R.; Odunsi, K.; Shahabi, S. Discovery of candidate tumor biomarkers for treatment with intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21591. [Google Scholar] [CrossRef]
79. Gaitanou, M.; Segklia, K.; Matsas, R. Cend1, a Story with Many Tales: From Regulation of Cell Cycle Progression/Exit of Neural Stem Cells to Brain Structure and Function. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 2054783. [Google Scholar] [CrossRef]
80. Tsioras, K.; Papastefanaki, F.; Politis, P.K.; Matsas, R.; Gaitanou, M. Functional Interactions between BM88/Cend1, Ran-binding protein M and Dyrk1B kinase affect cyclin D1 levels and cell cycle progression/exit in mouse neuroblastoma cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82172. [Google Scholar] [CrossRef]
81. Fleischer, T.; Frigessi, A.; Johnson, K.C.; Edvardsen, H.; Touleimat, N.; Klajic, J.; Riis, M.L.; Haakensen, V.D.; Wärnberg, F.; Naume, B.; et al. Genome-wide DNA methylation profiles in progression to in situ and invasive carcinoma of the breast with impact on gene transcription and prognosis. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 435. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
82. Quinlan, R.; Hutchison, C.; Lane, B. Intermediate filament proteins. *Protein Profile* **1994**, *1*, 779–911. [Google Scholar] [PubMed]
83. Li, W.; Bai, X.; Li, J.; Zhao, Y.; Liu, J.; Zhao, H.; Liu, L.; Ding, M.; Wang, Q.; Shi, F.Y.; et al. The nucleoskeleton protein IFFO1 immobilizes broken DNA and suppresses chromosome translocation during tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 1273–1285. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
84. Campan, M.; Moffitt, M.; Houshdaran, S.; Shen, H.; Widschwendter, M.; Daxenbichler, G.; Long, T.; Marth, C.; Laird-Offringa, I.A.; Press, M.F.; et al. Genome-scale screen for DNA methylation-based detection markers for ovarian cancer. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28141. [Google Scholar] [CrossRef]
85. Christie, M.; Jorissen, R.N.; Mouradov, D.; Sakthianandeswaren, A.; Li, S.; Day, F.; Tsui, C.; Lipton, L.; Desai, J.; Jones, I.T.; et al. Different APC genotypes in proximal and distal sporadic colorectal cancers suggest distinct WNT/beta-catenin signalling thresholds for tumourigenesis. *Oncogene* **2013**, *32*, 4675–4682. [Google Scholar] [CrossRef]
86. Kypta, R.M.; Waxman, J. Wnt/beta-catenin signalling in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **2012**, *9*, 418–428. [Google Scholar] [CrossRef]
87. Lin, S.Y.; Xia, W.; Wang, J.C.; Kwong, K.Y.; Spohn, B.; Wen, Y.; Pestell, R.G.; Hung, M.C. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: Its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4262–4266. [Google Scholar] [CrossRef]
88. Kovacs, D.; Migliano, E.; Muscardin, L.; Silipo, V.; Catricala, C.; Picardo, M.; Bellei, B. The role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: Evidences from patients-derived cell lines. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43295–43314. [Google Scholar] [CrossRef]
89. Teeuwssen, M.; Fodde, R. Wnt Signaling in Ovarian Cancer Stemness, EMT, and Therapy Resistance. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1658. [Google Scholar] [CrossRef]
90. Nguyen, V.H.L.; Hough, R.; Bernaudo, S.; Peng, C. Wnt/beta-catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *J. Ovarian Res.* **2019**, *12*, 122. [Google Scholar] [CrossRef]
91. Andersen, J.S.; Lyon, C.E.; Fox, A.H.; Leung, A.K.L.; Lam, Y.W.; Steen, H.; Mann, M.; Lamond, A.I. Directed Proteomic Analysis of the Human Nucleolus. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1–11. [Google Scholar] [CrossRef]

92. Juhling, F.; Kretzmer, H.; Bernhart, S.H.; Otto, C.; Stadler, P.F.; Hoffmann, S. metilene: Fast and sensitive calling of differentially methylated regions from bisulfite sequencing data. *Genome Res.* **2016**, *26*, 256–262. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
93. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
94. Dionne, U.; Chartier, F.J.M.; Lopez de Los Santos, Y.; Lavoie, N.; Bernard, D.N.; Banerjee, S.L.; Otis, F.; Jacquet, K.; Tremblay, M.G.; Jain, M.; et al. Direct Phosphorylation of SRC Homology 3 Domains by Tyrosine Kinase Receptors Disassembles Ligand-Induced Signaling Networks. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 995–1007.e11. [Google Scholar] [CrossRef]

© 2020 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 (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Préface chapitre 2

Le chapitre 2 traite du rôle de l'EMT dans la dissémination du CEO dans un modèle de xénogreffes de souris immunodéficientes. Cette étude est publiée dans le journal *IJMS* le 15 juillet 2020. Dans cette étude nous avons utilisé le même modèle de l'EMT des cellules SKOV3 (généralisé via la modulation d'expression de LY75) précédemment utilisé pour l'analyse du profil de méthylation dans le chapitre 1. J'ai introduit le gène Luc codant pour la luciférase par transfection des cellules SKOV3-M et SKOV3-E par pcDNA3-luc. Les clones exprimant la luciférase de manière forte et stable sont envoyés au laboratoire du Dre Barbara Vanderhyden qui est notre collaboratrice à Ottawa où s'est déroulée une partie de cette étude animale. En effet, la professionnelle de recherche M<sup>me</sup> Elizabeth Macdonald et ses assistants Kristianne Galpin, David A.Landry, Galaxia Rodriguez se sont chargés des chirurgies et des injections IB des cellules SKOV3 dans les souris des deux phases expérimentales. Elizabeth a continué le suivi du développement des tumeurs par l'imagerie IVIS captant le signal de la luciférase dans les différentes souris injectées. Elizabeth s'est également chargée du sacrifice des souris et de la collecte des tumeurs formées. Ces dernières nous sont parvenues sous forme de tissus congelés et de blocs de paraffine. En parallèle aux expériences à Ottawa j'ai caractérisé *in vitro* les cellules SKOV3-E issues du knock-down de LY75 en vérifiant l'expression des marqueurs des CSCs, et du phénotype hybride. À la réception des tumeurs extraites des souris, j'ai validé par IHC et IF le statut hybride et les caractéristiques des CSCs observées *in vitro*. J'ai également validé le statut actif de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine *in vivo* par IHC, IF et western blot. J'ai assisté Dr Batchvarov dans la rédaction du manuscrit en écrivant la version originale. Dr Bachvarov a par la suite, corrigé, réorganisé et enrichi le manuscrit. Dr Bachvarov et Dre Vanderhyben ont encadré cette étude notamment en élaborant le protocole expérimental en deux phases chez la souris.



## Chapitre 2

### **LY75 suppression in mesenchymal epithelial ovarian cancer cells generates a stable hybrid EOC cellular phenotype, associated with enhanced tumor initiation, spreading and resistance to treatment in orthotopic xenograft mouse model**

Sadia Mehdi<sup>1,2</sup>, Elizabeth Macdonald<sup>3</sup>, Kristianne Galpin<sup>3</sup>, David A. Landry<sup>3</sup>, Galaxia Rodriguez<sup>3</sup>, Barbara Vanderhyden<sup>3</sup> and Dimcho Bachvarov<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Medicine, Université Laval, Québec City, QC G1V 0A6, Canada; [sadia.mehdi.1@ulaval.ca](mailto:sadia.mehdi.1@ulaval.ca)

<sup>2</sup> Centre de recherche du CHU de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec City, QC G1X 3S3, Canada

<sup>3</sup> Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Ottawa, Ottawa, ON K1N 6N5, Canada; [ElMacdonald@ohri.ca](mailto:ElMacdonald@ohri.ca) (E.M.); [kgalpin@ohri.ca](mailto:kgalpin@ohri.ca) (K.G.); [davlandry@ohri.ca](mailto:davlandry@ohri.ca) (D.A.L.); [garodriguez@ohri.ca](mailto:garodriguez@ohri.ca) (G.R.); [bvanderhyden@ohri.ca](mailto:bvanderhyden@ohri.ca) (B.V.)

\* Correspondence: [dimtcho.batchvarov@crchudequebec.ulaval.ca](mailto:dimtcho.batchvarov@crchudequebec.ulaval.ca); Tel.: +1-(418)-525-4444 (ext. 15590)

Received: 8 June 2020; Accepted: 13 July 2020; Published: 15 July 2020

This article is published in IJMS special issue [The Wnt Signaling Pathway in Cancer](#)

## 2.1 Résumé

L'implication des mécanismes de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans l'initiation et la progression du cancer épithélial de l'ovaire (CEO) reste mal connue. Nous avons précédemment montré que la suppression du récepteur d'antigène LY75 dirige la transition mésenchymato-épithéliale (MET) dans les lignées cellulaires du CEO avec phénotype mésenchymateux, accompagnée de la perte d'activité de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Dans la présente étude, nous avons utilisé l'EMT médiée par la modulation d'expression de LY75 dans les cellules du CEO comme modèle pour étudier *in vivo* le rôle spécifique des cellules du CEO épithéliales (E), mésenchymateuses (M) ou mixtes (épithéliales + mésenchymateuses: E + M) dans l'initiation, la diffusion et la réponse au traitement du CEO. L'initiation de la maladie, la propagation et l'apparition de la résistance au traitement ont été surveillées dans un modèle de xénogreffe orthotopique de souris après injections intra-bursite (IB) de SKOV3-M (contrôle), SKOV3-E (Ly75KD) et une population mixte de SKOV3-E + SKOV3-M. Dans ces conditions expérimentales, les cellules SKOV3-E injectées par voie IB présentent un potentiel métastatique et une résistance au traitement considérablement plus élevés que les cellules SKOV3-M, en raison de l'acquisition d'un phénotype hybride et des caractéristiques de cellules souches induites par le Ly75KD. Nous avons également confirmé *in vivo* que LY75 soutient le statut actif de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les cellules du CEO, alors que la déplétion de LY75 induit sa suppression, suggérant un rôle protecteur de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans l'étiologie du CEO. De plus, nos résultats soulèvent des réticences et des inquiétudes quant à l'utilisation de LY75 comme cible de l'immunothérapie dans le développement de vaccin contre le CEO en raison de la possibilité d'effets secondaires graves.

## 2.2 Abstract

The implications of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) mechanisms in the initiation and progression of epithelial ovarian cancer (EOC) remain poorly understood. We have previously shown that suppression of the antigen receptor LY75 directs mesenchymal-epithelial transition (MET) in EOC cell lines with mesenchymal phenotype, associated with loss of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activity. In the present study, we used the LY75-mediated modulation of EMT in EOC cells as a model to investigate *in vivo* the specific role of EOC cells with epithelial (E), mesenchymal (M) or mixed epithelial plus mesenchymal (E+M) phenotype in EOC initiation, dissemination and treatment response, following intra-bursal (IB) injections of SKOV3-M (control), SKOV3-E (Ly75KD) and a mixed population of SKOV3-E+M cells in SCID mice. We found that the IB-injected SKOV3-E cells displayed considerably higher metastatic potential and resistance to treatment as compared to the SKOV3-M cells, due to the acquisition of a Ly75KD-mediated hybrid phenotype and stemness characteristics. We also confirmed *in vivo* that the LY75 depletion directs suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in EOC cells, suggestive for a protective role of this pathway in EOC etiology. Moreover, our data raise concern on the use of LY75-targeted vaccines for dendritic-cell EOC immunotherapy due to possible occurrence of undesirable side effects.

### 2.3. Introduction

Epithelial ovarian cancer (EOC) is a disease that is responsible for more cancer deaths among women in the Western world than all other gynecologic malignancies [1]. EOC lethality primarily stems from the inability to detect the disease at an early, organ-confined stage, and the lack of effective therapies for advanced-stage disease. Approximately 70% of patients with advanced-stage EOC have widespread intraperitoneal metastases, including the formation of malignant serous effusions within the peritoneal cavity. Unlike the majority of solid tumors, particularly at the primary site, cancer cells in effusions are not amenable to surgical removal, and failure in their eradication is one of the main causes of treatment failure. Moreover, although 40% to 60% of advanced patients display a complete response rate to standard EOC taxane/platinum-based chemotherapy, most of them relapse after a median period of 18 months due to the emergence of chemoresistance, and only 30% survive 5 years after initial diagnosis [2]. Thus, management of the metastatic disease becomes a crucial problem for the treatment of EOC, and focused identification of novel pro-metastatic target pathways and molecules could enhance the chances of discovering new and effective EOC therapies.

Metastasis is a complex multistep process in the progression of cancer, causing approximately 90% of all human cancer mortalities [3,4]. To colonize a distant secondary site, cancer cells undergo epithelial-mesenchymal transition (EMT) characterized by the suppression of epithelial markers E-cadherin and EpCAM and by the expression of mesenchymal markers such as Snail1/2, Twist1/2, vimentin and N-cadherin, associated with the acquisition of migratory capacity pivotal for invasion and metastasis [5–7]. Cancer cells with a high Snail/E-cadherin ratio possess characteristics of mesenchymal cells and display higher mobility and resistance to treatment [8]. Several signaling pathways, including the TGF- $\beta$  pathway, the Notch pathway and the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, are involved in EMT. Among these, the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is shown to be an important regulator of EMT in several cancers [9–11] including EOC [12–14]. Although EMT is clearly important to tumor progression, it is inconsistent with the observation that metastatic lesions mostly exhibit epithelial phenotypes, thus suggesting that mesenchymal-epithelial transition (MET) is critical to the latter stages of metastasis, allowing the mesenchymal cells to re-

differentiate into epithelial structures defining the enhanced colonization of secondary sites [15,16].

However, this EMT/MET model is still debated, since as lately shown, circulating tumor cells can form clusters containing cells with both epithelial/mesenchymal (E/M) or hybrid phenotype that display higher metastatic potential and increased drug resistance compared to either epithelial or mesenchymal cells alone [17–19], and that breast and EOC metastases are mainly driven by hybrid (E/M) cells [20,21]. Based on these findings, the term epithelial-mesenchymal plasticity (EMP) has been recently introduced, which encompasses both EMT and MET [22,23]. However, it is not yet understood if cells in a hybrid state form a stable and potentially invasive and metastatic population, or whether these cells pass through this hybrid state temporarily and transiently during EMT. Moreover, recent findings demonstrated that epithelial tumor cells do not need EMT to form metastases at secondary sites, and that EMT rather mediates cancer-cell survival by contributing to chemoresistance, since residual cancers following therapy displayed a mesenchymal phenotype and tumors-initiating features [24,25]. Thus, the role of EMT in the cancerogenesis and disease progression, including EOC progression, is still not well defined.

We have previously shown that the antigen receptor LY75 (also known as DEC205/CD205) can modulate EOC cell phenotype and metastatic potential. Indeed, LY75 depletion directed MET in EOC cell lines with mesenchymal-like phenotype (SKOV3 and TOV112), associated with the induction of the E-cadherin, EpCAM and EMP1 expression and the loss of the N-cadherin, TWIST1, FN1 and SNAIL1 expression [26]. Moreover, re-expression of a shRNA-resistant LY75 gene variant in the LY75 knockdown (KD) SKOV3 clones completely restored the initial mesenchymal phenotype and re-established the SKOV3 parental pattern of mesenchymal markers' expression [26]. We have also demonstrated that the LY75 kD-mediated MET in EOC cells is associated with DNA methylation alterations and suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [27].

In the present study, we used the LY75-mediated modulation of EMT in EOC cells as a model to investigate *in vivo* the specific implications of EOC cells with epithelial (E), mesenchymal (M) or mixed epithelial plus mesenchymal (E+M) phenotype in EOC initiation, dissemination and treatment response, due to the conflicting data about the roles of these different cellular phenotypes in the EMT-mediated EOC etiology. The disease

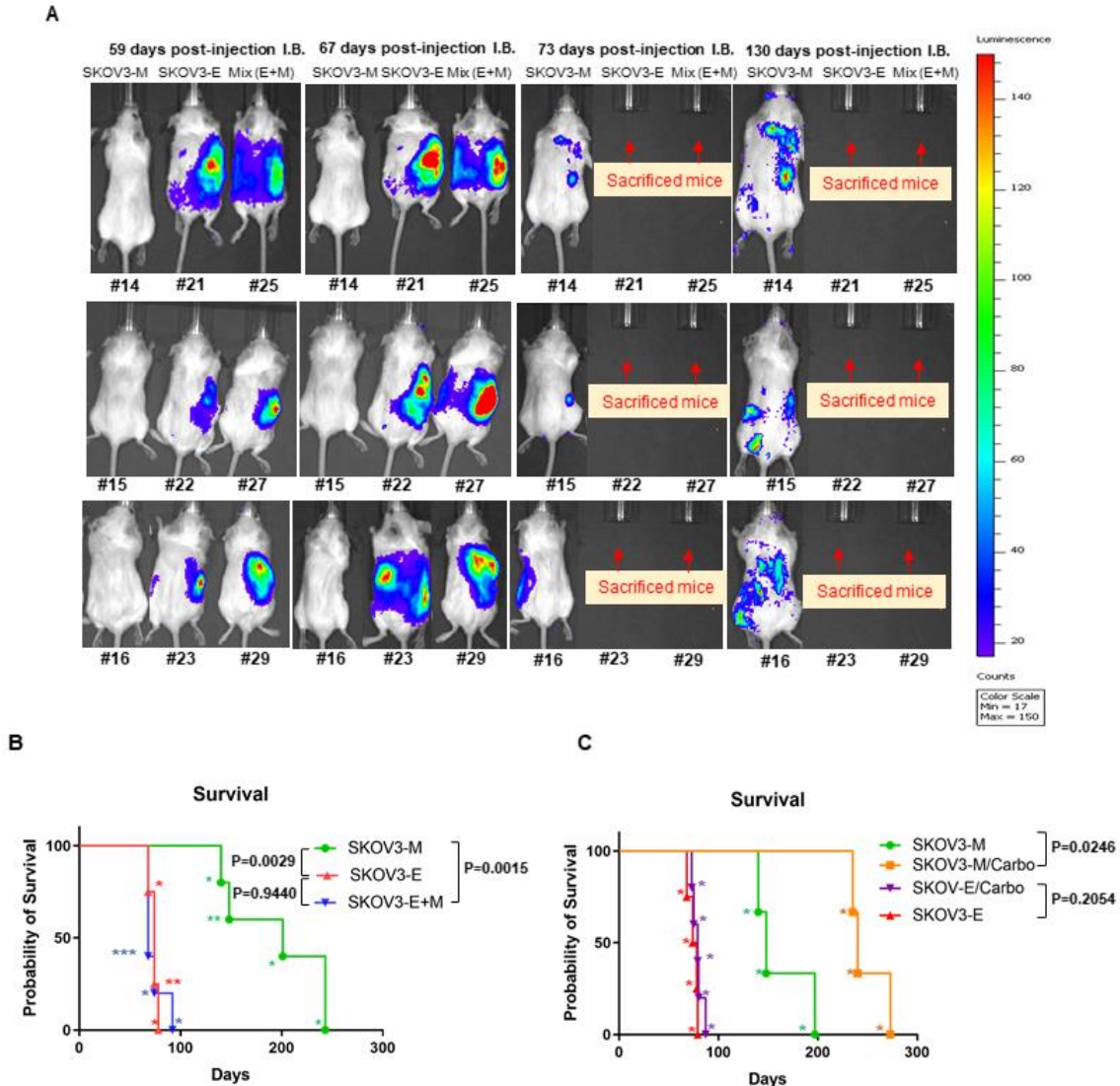
initiation, spreading and occurrence of therapy resistance was monitored in orthotopic xenograft mouse EOC model, following intra-bursal (IB) injections of SKOV3-M (control), SKOV3-E (Ly75KD) and a mixed population of SKOV3-E+M cells. The IB orthotopic EOC model was chosen due to its advantages over conventional xenograft models (e.g. subcutaneous or intraperitoneal injections of tumor cells), since it reproduces the primary site of tumor formation and enables tumor cells to interact with appropriate microenvironment. Moreover, this model represents quite accurately clinical cancer with regard to common sites of metastases and drug sensitivity [28,29].

## 2.4 Results

### 2.4.1 Ly75KD SKOV3 cells with epithelial phenotype (SKOV3-E) display enhanced EOC initiation, spread and resistance to treatment in severe combined immunodeficiency (SCID) mice

For our *in vivo* experiments, we used the orthotopic intrabursal (IB) mice model to investigate the tumor-initiating and metastatic potential of EOC cells with mesenchymal (M), epithelial (E) and mixed E+M phenotype. The previously generated cell clones sh-control-SKOV3 (SKOV3-M) and sh-LY75KD-SKOV3 (SKOV3-E) [27] were initially transfected with firefly luciferase plasmid in order to facilitate further monitoring by bioluminescent imaging for tumor formation and spreading. In our initial set (phase 1) of experiments, stable luciferase-expressing SKOV3-M and SKOV3-E clones, as well as a mixed population of SKOV3-E+M cells (1:1 ratio), were directly injected under the bursal membrane (between the bursa and the ovary) of female SCID mice (n=5 for each experimental group; see Materials and Methods for details).

We found that the median survival of mice injected with the SKOV3-M cells was 201 days, as primary tumors appeared approximately 73 days post-injection (Figure 2.1 and Table 2.1). Mice injected with SKOV3-E and SKOV3-E+M cells displayed quite similar, but significantly lower survival rates, when compared to the SKOV3-M injected animals (74 days and 68 days;  $p = 0.0029$  and  $p = 0.0015$ , respectively), as primary tumors appeared approximately 55 days post-injection (Figure 2.1 and Table 2.1).



**Figure 2.1:** In vivo examination of tumor initiation, spreading, survival and response to treatment in SCID mice IB-injected with SKOV3-M SKOV3-E and SKOV3-E+M cells.

A) Whole body representative bioluminescence images of the emerging tumors and metastatic lesions in SCID mice following 59 days, 67 days, 73 days and 130 days post-injection IB of SKOV3-M, SKOV3-E and SKOV3-E+M cells. B) Survival plots for phase 1 mice IB-injected with SKOV3-M, SKOV3-E and Mix cells. C) Survival plots for phase 2 mice IB-injected with SKOV3-M and SKOV3-E cells, followed by treatment with carboplatin. Asterisks represent the number of sacrificed mice at each step according to the survival time, as indicated in Table 2.1; see also section 2.6.2 (Data analysis) for details.

In addition to the observed primary tumors, all SKOV3 phenotypes (M, E and E+M) generated metastases in the intraperitoneal space, affecting the diaphragm, liver, pancreas and omentum. However, we noticed additional dorsal metastases in mice injected with

SKOV3-E and SKOV3-E+M cells. Detailed data on the survival values of each experimental animal, as well as the medium survival rates and tumor spreading (metastatic) sites of the three experimental groups, are presented in Table 2.1.

**Table 2. 1:** Survival time of mice included in phase 1 experimental groups and sites of metastasis formation.

<b>Cells injected IB</b>	<b>Animal ID (#)</b>	<b>Survival days</b>	<b>Metastasis sites</b>
<b>SKOV3-M (shCont)</b>	14	243	Tumor nodules in gut mesentery Tumor nodules in Pancreas/Omentum Tumor nodules attached to dorsal wall
	15	148	
	16	201	
	17	140	
	18	243	
<b>Median survival</b>		<b>201</b>	
<b>SKOV3-E (shSKOV3-LY75-KD)</b>	20	78	Tumor in gut mesentery Tumor nodules in Pancreas/Omentun Tumor nodules attached to dorsal wall
	21	68	
	22	74	
	23	74	
<b>Median survival</b>		<b>74</b>	
<b>SKOV3-M/SKOV3-E (mixed; SKOV3-E+M)</b>	24	92	Small nodules in mesentery Tumor nodules in Pancreas/Omentum Invasion of liver Nodules attached to dorsal wall
	25	68	
	27	68	
	28	68	
	29	74	
<b>Median survival</b>		<b>68</b>	

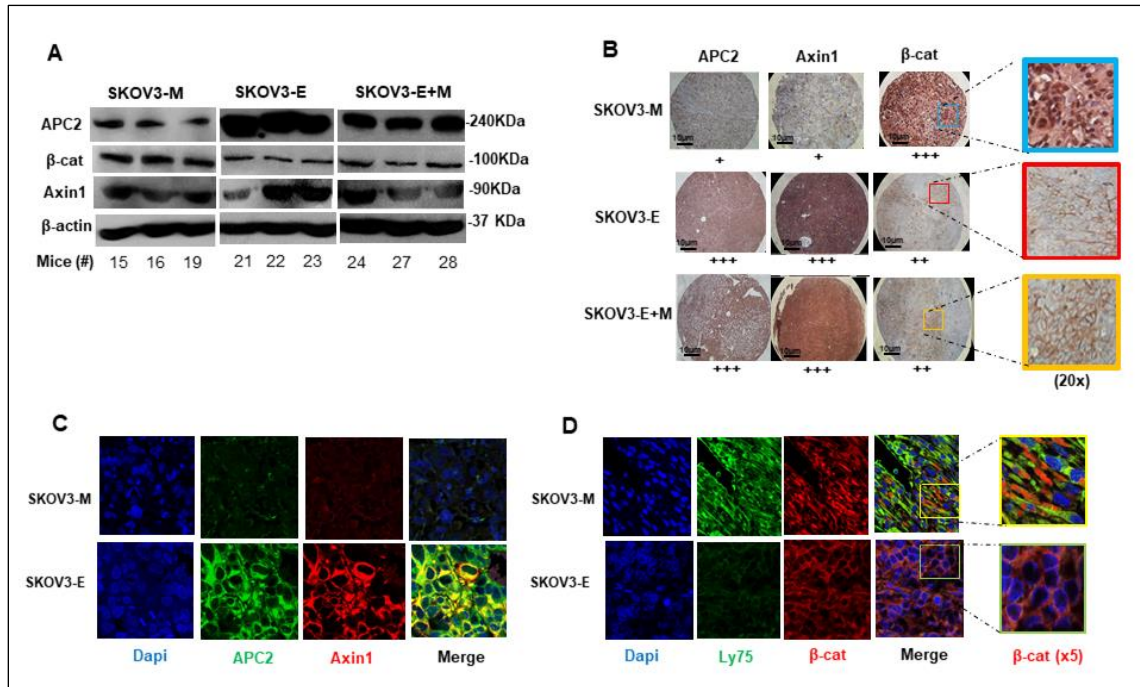
We further carried additional (phase 2) experiments in order to evaluate the treatment's effect on disease progression in mice injected with different SKOV3 cellular phenotypes. Since, in our phase 1 experiments, mice injected with SKOV3-E or SKOV3-E+M cells displayed almost identical disease initiation, spreading and survival rates, we further evaluated the response to carboplatin treatment of four additional groups of experimental animals (n = 5) previously IB-injected with either SKOV3-E or SKOV3-M cells.

For two of the experimental groups, injected with SKOV3-E or SKOV3-M cells, intraperitoneal injection of carboplatin was weekly applied at a dose of 60 mg/kg body weight over a 3-week period, while the other two groups, injected with SKOV3-E or SKOV3-M cells respectively, were used as controls (placebo injected). The carboplatin treatment started 73 days post-injection for the SKOV3-M treated mice, and 55 days post-injection for the



SKOV3-E treated mice, based on the phase 1 data of the initial appearance of the primary tumors in these experimental animal groups. As shown on Figure 2.1C, SKOV3-E-injected mice displayed essentially identical survival rates, as seen in our phase 1 experiments (see Figure 2.1B for comparison), with practically no difference between the carboplatin-treated and non-treated (control) animals. Similarly, SKOV3-M-injected mice from the control group showed similar survival rates as those found in our phase 1 experiments; however, carboplatin-treated animals from the SKOV3-M treated group displayed a significantly longer survival ( $p = 0.0246$ ) than those from the corresponding control group (Figure 2.1C).

We have previously shown that LY75 supports the active status of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in EOC cells, and the LY75 depletion results in the suppression of Wnt/ $\beta$ -catenin activity, associated with decreased  $\beta$ -catenin expression and the strong induction of Axin1 and APC2, representing members of the Wnt/ $\beta$ -catenin suppressor complex [27]. Analysis of primary ovarian tumor samples obtained from our phase 1 experimental animals confirmed these data, as tumor tissues derived from SKOV3-E- and SKOV3-E+M-injected mice displayed considerably diminished  $\beta$ -catenin expression and enhanced Axin1 and APC2, following both Western blot and immunohistochemistry (IHC) analyses, as compared to SKOV3-M-injected mice (Figure 2.2A,B). Moreover,  $\beta$ -catenin, Axin1 and APC2 also exhibited similar protein expression patterns in tumors from SKOV3-E- and SKOV3-M-injected mice following immunofluorescence (IF) analysis (Figure 2.2C), as the  $\beta$ -catenin expression profile seemed to be more concentrated onto, and around, the nuclei in SKOV3-M tumor tissues, while  $\beta$ -catenin displayed enriched plasma membrane localization in SKOV3-E and SKOV3-E+M tumors (Figure 2.2B,D).



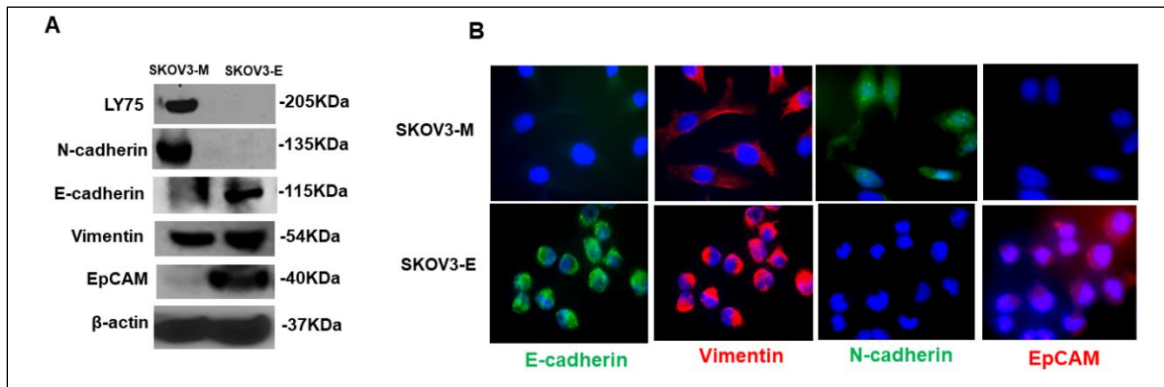
**Figure 2.2:** Analysis of the Wnt/B-catenin pathway status in primary tumor tissue samples of phase I mice experimental groups IB-injected with SKOV3-M, SKOV3-E or SKOV3-E+M cells.

A) Western blot analysis of β-catenin, APC2 and Axin1 proteins in SKOV3-M (mice 15, 16 and 19), SKOV3-E (mice 21, 22 and 23) and SKOV3-E+M mice (samples: 24, 27 and 28). β-actin was used as the loading control. B) Immunohistochemistry (IHC) analysis of the expression of β-catenin, APC2 and Axin1 and β-catenin sub-cellular localization in tumor tissues extracted from mice injected with the SKOV3-M, SKOV3-E and SKOV3-E+M cells at 40× (scale bar 10 μm). The plus symbols (+ to +++) indicate the level of expression (from lower to higher) of the corresponding protein. C) Immunofluorescence (IF) analysis of β-catenin, APC2 and Axin1 expression in tumor tissues extracted from mice injected with SKOV3-M and SKOV3-E cells (magnification at 60×). D) IF analysis of Ly75, β-catenin, and β-catenin sub-cellular localization in tumor tissues extracted from mice IB-injected with SKOV3-M and SKOV3-E cells (magnification at 40×).

#### 2.4.2. SKOV3-E cells display hybrid (E/M) phenotype and cancer stem cells (CSCs) features

The above results were more or less unexpected since, as repeatedly shown, cancer cells with a mesenchymal phenotype display higher migration and invasion potential and enhanced resistance to treatment, when compared to cancer cells with epithelial morphology [5,30,31]. This prompted us to characterize the EMT-related phenotypic features of the SKOV3-E cell clones used in our *in vivo* experiments as more profoundly significant. The expression levels of several EMT markers were analyzed in SKOV3-E cells, in comparison to SKOV3-M cells. Western blot analysis of the protein expression levels of the epithelial

markers E-cadherin and EpCAM, and the mesenchymal markers N-cadherin and vimentin, confirmed our previous findings [26] concerning the weak (absence of) E-cadherin and EpCAM expression, and the strong N-cadherin and vimentin expression, in SKOV3-M cells, as well as the high levels of E-cadherin and EpCAM expression and weak N-cadherin expression in SKOV3-E cells (Figure 2.3A). However, even stronger vimentin expression was also found in SKOV3-E cells (Figure 2.3A), which was consecutively confirmed by IF analysis (Figure 2.3B).



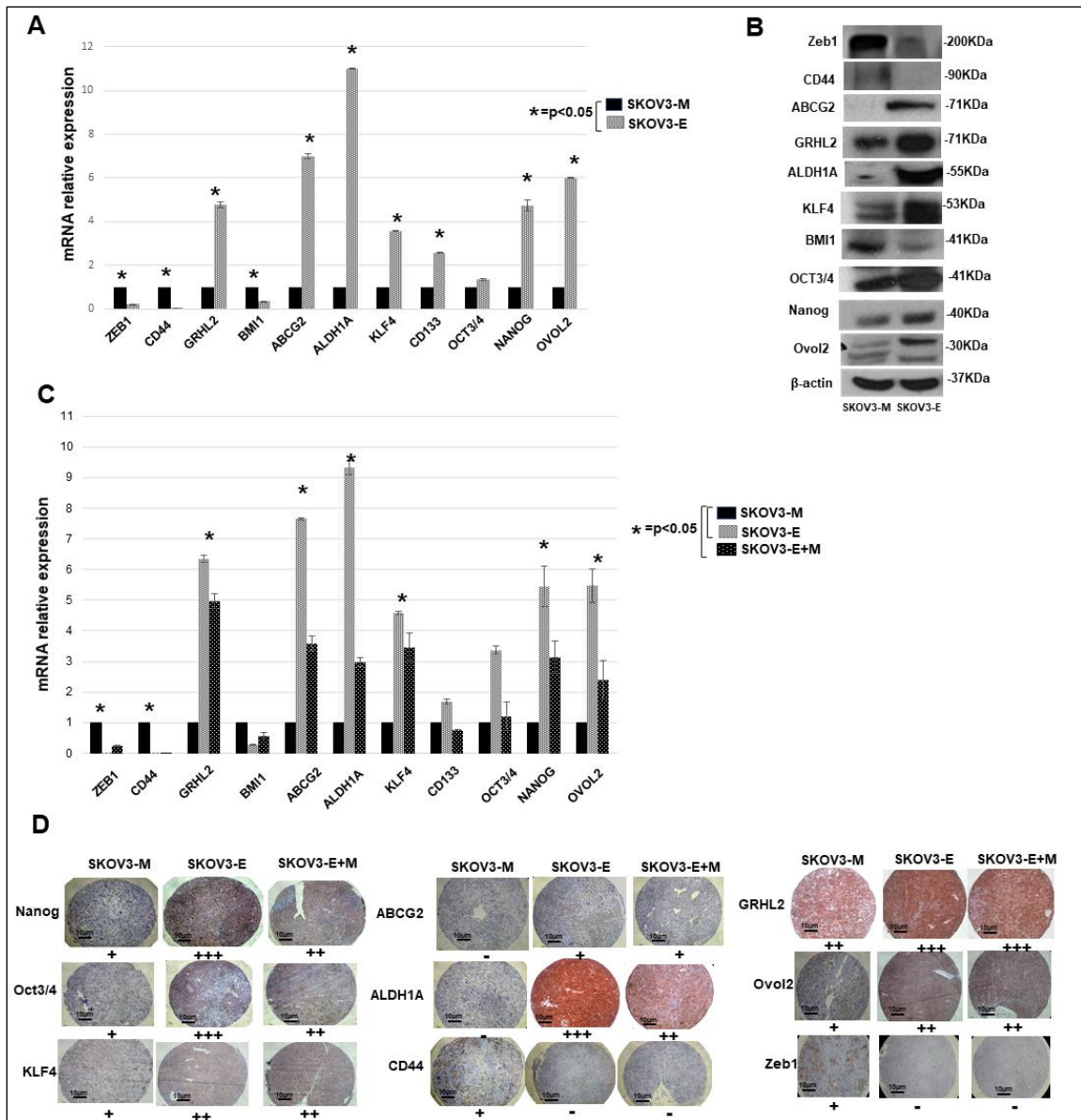
**Figure 2.3:** Protein expression analysis of different EMT markers in SKOV3-M and SKOV3-E cells. A) Western blot analysis of the protein expression of LY75, N-cadherin, E-cadherin, vimentin and EpCAM in SKOV3-M and SKOV3-E cells.  $\beta$ -actin was used as a loading control. B) Immunofluorescence analysis of the protein expression of N-cadherin, E-cadherin, vimentin and EpCAM in SKOV3-M and SKOV3-E cells (magnification at 60 $\times$ ).

These data were further supported by Western blot, IHC and IF analyses of the expression levels of these four EMT markers in ovarian tumor samples obtained from our phase 1 experimental animals. As seen from the Western blot presented on Figure 2.4A, strong vimentin expression was observed in tumor tissues derived from mice injected with SKOV3 cells, comprising all three phenotypes tested (M, E and E+M), while tumors from SKOV3-M-injected animals displayed strong N-cadherin and weak E-cadherin expression, and tumors derived from SKOV3-M and SKOV3-E+M mice showed very high E-cadherin expression and a lack of N-cadherin expression. Further IHC and IF analyses using tumor tissues of phase 1 experimental animals were strongly confirmative for the above-described differential expression patterns of the four EMT markers, including the strong vimentin expression in all experimental groups (Figure 2.4B,C), suggesting that SKOV3-E cells could exhibit a hybrid phenotype.



These data were further confirmed by analyzing the mRNA (qPCR) and protein (IHC) expression levels of most of the CSCs markers listed above in the tumor samples derived from SKOV3-M-, SKOV3-E- and SKOV3-E+M-injected animals (Figure 2.5C,D).

Finally, the suggested SKOV3-E hybrid phenotype was supported by the strong expression of the hybrid state-associated phenotypic stability factors (PSFs) OVOL2 and GRHL2 in the SKOV3-E cells, and in tumors derived from SKOV3-E- and SKOV3-E+M-injected animals (Figure 2.5), while the EMT progression factor Zeb1 was more sustained in SKOV3-M cells and tumor samples from the SKOV3-M-injected mice (Figure 2.5).



**Figure 2.5:** Gene (mRNA) and protein expression levels of different CSCs markers and hybrid state stability factors in SKOV3-M and SKOV3-E cells, and in tumor tissues extracted from mice IB-injected with SKOV3-M, SKOV3-E and SKOV3-E+M cells.

A) Quantitative PCR (qPCR) analysis of the mRNA expression levels of some CSCs markers (CD44, BMI1, ABCG2, ALDH1A, KLF4, CD133, OCT3/4 and NANOG) and genes implicated in the control of the hybrid cellular state (ZEB1, GRHL2 and OVOL2), in SKOV3-M and SKOV3-E cells. B) Western blot analysis of the protein expression levels of some CSCs markers (CD44, ABCG2, ALDH1A, KLF4, BMI1, OCT3/4, Nanog) and genes implicated in the control of the hybrid cellular state (ZEB1, GRHL2 and OVOL2), in SKOV3-M and SKOV3-E cells. C) qPCR analysis of the mRNA expression levels of some CSCs markers (CD44, BMI1, ABCG2, ALDH1A, KLF4, CD133, OCT3/4 and NANOG) and genes implicated in the control of the hybrid cellular state (ZEB1, GRHL2 and OVOL2), in tumor tissues extracted from mice IB-injected with SKOV3-M, SKOV3-E and SKOV3-E+M cells. Data are presented as mean  $\pm$  SD. \*,  $P < 0.05$ ; (Student's t test). D) Representative

IHC images of Nanog, Oct3/4, Klf4, ABCG2, ALDH1A, CD44, GRHL2, OVOL2 and EpCAM expression in tumor tissues extracted from mice injected with the SKOV3-M, SKOV3-E and SKOV3-E+M cells. Magnification at 40× (scale bar 10 μm). The plus symbols (+ to +++) indicate the level of expression (from lower to higher) of the corresponding protein. The minus (-) symbol means no expression.

## 2.5 Discussion

The main objective of this study was to investigate the role of EMT in EOC initiation, progression and treatment response *in vivo* in intrabursal (IB) orthotopic xenograft mouse EOC model. More specifically, we used SKOV3 EOC cells with Ly75 expression-modulated E or M phenotype for IB injections in SCID mice, to better understand the specific implication of EOC cells with different EMT-related phenotypes in EOC dissemination. Initially, the results of our *in vivo* experiments were rather surprising, as we were expecting that EOC cells with mesenchymal phenotype (SKOV3-M cells) will display higher spreading, metastatic potential and resistance to treatment, compared to epithelial SKOV3 (SKOV3-E) cells. Moreover, a mixed population (1:1 ratio) of SKOV3-M and SKOV3-E cells (SKOV3E+M cells) displayed quite similar tumor initiating and spreading characteristics, including resistance to treatment when compared to SKOV3-E cells, suggesting that the portion of SKOV3-E cells in this cellular mix is the one responsible for such a high aggressiveness in tumor formation and treatment response. As previously reported in the literature, only mesenchymal EOC cells and mesenchymal EOC cell-containing aggregates were able to invade through 3-dimensional collagen-rich matrices [34], and EMT cells with complete mesenchymal or partial (hybrid) EMT phenotype were much more aggressive in driving ascites formation and development of peritoneal metastases than epithelial EOC cells [20,35]. Indeed, we have previously shown that SKOV3-E (Ly75KD) cells, intraperitoneally (IP) injected in SCID mice, resulted in enhanced tumor cell formation and metastatic growth *in vivo* [26], but this was to be expected, since EOC metastases frequently appear disseminated throughout the peritoneum [36], and metastatic lesions mostly exhibit epithelial phenotypes due to the increased capacity of epithelial cells to colonize distant sites [26].

In cancer, EMT has been initially considered as a binary process with two very distinct cell populations - epithelial and mesenchymal, characterized by the loss of expression of the

epithelial marker E-cadherin and the gain of the expression of the mesenchymal markers N-cadherin and vimentin [37]. However, there is accumulating evidence that EMT occurs progressively, and the cells pass by intermediate states displaying transcriptional, morphological and epigenetic E/M (hybrid) features, a process called partial/incomplete EMT, or EMP [38–40]. Further studies in various cancers (including EOC) have shown that hybrid cells can acquire a multipotent stem cell like phenotype associated with higher proliferative and invasive characteristics and resistance to treatment [20,41]

We now show that SKOV3-E cells display hybrid phenotype and stemness characteristics, which could explain their aggressive behavior in our experimental EOC animal model. As reported before [26,27], SKOV3-M cells exhibited a typical EMT mesenchymal markers-expression profile, while SKOV3-E (Ly75KD) cells have displayed EMT-related epithelial features; however, we have now found that SKOV3-E cells also strongly express the mesenchymal marker vimentin (Figure 2.3), as a strong vimentin expression was also retained in tumors, extracted from mice, IB-injected with SKOV3-E and SKOV3-E+M cells (Figure 2.4). Vimentin is highly expressed in most epithelial cancers including EOC, and its expression correlates with disease progression and poor prognosis [42,43]. Moreover, CSCs expressing vimentin, NANOG and other markers of pluripotency were found in tumor tissue sections of women with high grade serous ovarian carcinoma [44]. Indeed, we have also shown that SKOV3-E cells express a number of CSCs markers, including EpCAM, ALDH1A, ABCG2, CD133, KLF4, OCT3/4 and NANOG (see Figure 2.3; Figure 2.5A-B), as the expression profile of these CSCs markers was preserved in tumors of mice, IB-injected with SKOV3-E cells (Figures 2.4B-C and 2.5C-D). All these CSCs markers have been previously shown to be implicated in the maintenance of EOC stem cells, including their aggressive behavior and resistance to treatment [45–51]. The correlation between the expression of CSCs markers and the development of cancer (initiation, progression, and spreading) is questioned and seems to differ from one cancer type to another. Indeed, each CSCs marker shows independent expression levels and seems to interact with other CSCs markers at different stages of tumorigenesis. Thus, several studies have reported that ALDH1(+) CD133(+) EpCAM (+) cells have the potential to initiate the EOC spread and drug resistance [13,52]. The highly tumorigenic OVCAR5 EOC cell line has been also characterized by the simultaneous expression of the pluripotency-associated



genes including CD133, NANOG, OCT4 and KLF4 [53]. When compared to SKOV3-E cells, SKOV3-M cells also exhibited some CSCs characteristics, but most of the above listed pluripotency markers were presented with weaker/loss of expression, as only two CSCs markers - BMI1 and CD44 exhibited enhanced expression in these cells, as well as in tumors extracted from SKOV3-M-injected experimental animals (Figure 2.5A-C).

Importantly, SKOV3-E cells, as well as tumor tissues of mice IB-injected with SKOV3-E and SKOV3-E+M cells, displayed enhanced expression of OVOL2 and GRHL2 - two phenotypic stability factors (PSFs), previously shown by us and others to stabilize the highly aggressive and metastatic E/M (hybrid) phenotype of cancer cells [17,38,54,55] (see Fig. 2.5). Moreover, these PSFs repress the EMT progression factor Zeb1 to prevent the EMT advancement to a complete mesenchymal state [17,38,55], and our data are indicative for weaker/lack of expression of Zeb1 in SKOV3-E cells and tumor tissues of mice IB-injected with SKOV3-E and SKOV3-E+M cells, compared to SKOV3-M cells and corresponding tumors.

As previously stated [26], our findings raise again concern on the use of LY75-targeted vaccines for dendritic-cell EOC immunotherapy. LY75 is a type I transmembrane surface protein that belongs to the macrophage mannose receptor (MMR) family of C-type lectin endocytic uptake receptors, as the LY75 receptor plays an important role in antigen uptake for presentation and cross-presentation to T cells and the initiation of the immune response [26]. Accordingly, loading of LY75 with antigens is widely used in vaccination including cancer immunotherapy. This approach has been exploited *in vitro* and *in vivo*, both in mice and humans, to deliver specific antigens to dendritic cells, and induces specific CD81 and CD41 T-cell responses [26]. However, and based on our data, blocking the LY75 receptor with specific antibodies could generate undesirable side effects, associated with the acquisition of the more aggressive hybrid phenotype and stemness features in mesenchymal-type tumor cells.

Finally, our *in vivo* data have also confirmed our previous findings [27] for the direct implication of the LY75 receptor in modulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in EOC cells. Here, we show that Ly75 gene ablation also directed the suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in tumor samples from mice IB-injected with SKOV3-E and SKOV3-E+M cells. These findings were initially surprising, since Wnt/ $\beta$ -catenin signaling has been shown to be

associated with partial EMT states and the acquisition of stemness traits in cancer cells [57], although some protective functions of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway have been also suggested, as active Wnt/ $\beta$ -catenin signaling was associated with the inhibition of melanoma growth [58]. There is also growing evidence that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates many key aspects of EOC progression, including the maintenance of CSCs, metastases, and chemoresistance [59,60]; however, the mechanisms underlying the hyperactivation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and its role in EOC etiology are not entirely clear [61]. Indeed, data from a large genome-wide association study (GWAS) in EOC were indicative for a significant downregulation of the Wnt pathways-agonist WNT4 in ovarian tumors [62]. Moreover, a recent study has demonstrated that the inactivation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is required for maintaining stemness and preventing the differentiation of organoid cultures derived from high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) patients, and that HGSOC progresses more aggressively in an environment free of Wnt [63].

In conclusion, we have shown that Ly75 suppression in the mesenchymal EOC cell line SKOV3 generates cells bearing a hybrid (E/M) phenotype and stemness characteristics, associated with a strong expression of the PSFs OVOL2 and GRHL2. These SKOV3-LY75 KD cells directly enhanced EOC initiation, tumor spread and resistance to treatment following intra-bursal IB injection in severe combined immunodeficiency (SCID) mice, compared to mesenchymal-type SKOV3 cells. As previously suggested [27], we also demonstrated *in vivo* that LY75 supports an active status of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in EOC cells, while the LY75 depletion predominantly directs the pathway suppression, indicative for a protective role of this pathway in EOC etiology. Moreover, our data raise concern on the use of LY75-targeted vaccines for dendritic-cell EOC immunotherapy due to possible occurrence of undesirable side effects. A comprehensive understanding of molecular processes and the chronology of events triggering EMT in EOC could arrange for the development of more effective treatment strategies for this deadly disease.

## **2.6 Materials and Methods**

### **2.6.1 Cell Cultures**

The SKOV3 cell line is purchased from American Tissue Type Collection (Manassas, VA, USA). Cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal

bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA) and cultured in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C as previously described [27].

### **Firefly luciferase stable transfection**

SKOV3 clones (SKOV3-M and SKOV3-E) were stably transfected with the firefly luciferase gene plasmid pcDNA3 (#18964, Addgene, Cambridge, MA, USA) using turbofect reagent and according to the manufacture instructions (#R0532, Thermo Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Stable cells population were selected by incubation with 800 µg/mL of G418 and then maintained in RPMI medium with 500 µg/mL of G418.

To test the luciferase activity, one day prior to the experiment  $1.5 \times 10^4$  SKOV3-luc cells were plated per well in 100 µL of standard RPMI medium, in 96-well plates. The next day, the cells were harvested, and luciferase activity was quantified on a Tristar LB941 Multimode Microplate Reader (by Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany) using a Luc-Pair™ Firefly Luciferase HS Assay Kit (GeneCopoeia, Rockville, MD, USA). Firefly luciferase activity was then normalized to non-transfected control cells. Clones displaying more stable luciferase signals were further selected for animal injections.

### **2.6.2 Animal experiments**

Animal experiments were carried out at the University of Ottawa under a protocol approved on 14<sup>th</sup> of March 2018 by the Animal Care Committee (protocol approval number OHR1e-2120) and conformed with or exceeded standards outlined in the Canadian Council on Animal Care Standards (CCAC) and the Animals for Research Act, R.S.O. 1990, Chapter c. A.22. Female Fox Chase SCID mice (Charles River; CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrl) were randomly assigned to cages in groups of 4 upon arrival and were acclimated in conventional micro-isolator cages with plastic huts and corn cob bedding for 1 week prior to commencement of the trial. SCID mice were maintained in a dedicated room for immune compromised mice (21 °C, 40–60% humidity, 12/12-h light/dark cycle) with a commercial rodent diet (2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, Harlan Laboratories), along with acidified water available ad libitum. Housing, food and water were autoclaved, and animal manipulations were carried out in a certified ESCO type A2 BSC hood, following a two-person dirty/clean protocol.

#### Study Design

The experiments were carried out in two phases. All mice were allocated to cages in groups of 5 following intra-bursal surgeries. Cages of phase 1 mice ( $n = 15$ ; 7 weeks old) housed 1 mouse, allocated randomly, from each of the three experimental groups [SKOV3-M, SKOV3-E and SKOV3-E+M, representing a mixed cellular population of SKOV3-M and SKOV3-E cells (50:50)]. Cages of phase 2 mice ( $n = 20$ ; 7 weeks old; average weight  $17.3 \pm 0.94$  g) housed mice from the experimental groups SKOV3-M or SKOV3-E. Wellness assessments were carried out by Animal Care staff daily, and necropsies of end pointed mice were blinded with regard to the treatment group. End of wellness criteria were based on several factors, including signs of pain, Body Condition Score (BCS), respiratory distress, pallor and coat condition. End point mice were euthanized in Ancare static microisolators by CO<sub>2</sub> asphyxiation delivered at a flow rate of 20–30% chamber volume per minute.

#### Intrabursal Injections

One hour prior to surgery, mice were given subcutaneous (s.c.) buprenorphine HCL (0.1 mg/kg, PHR1729) for pain management. At time of sacrifice, mice were anesthetized (3% isofluorane; Fresenius Kabi, Canada and 1% oxygen), given fluids (1 mL Saline, s.c.) and received an application of eye ointment (Optixcare Eye Lube; Aventix). The dorsal surface of the mouse was shaved and cleaned using antiseptic (SoluPrep; 2% chlorhexidine in 70% alcohol, 3M cat # 7000136295). Once prepped, a 2–3-cm dorsal wall incision was made followed by a 0.5-cm incision in the peritoneal wall. The fat pad enveloping the ovary was exteriorized and held in place using a bulldog clamp. One ovary of each mouse received an injection of cells (2  $\mu$ L of a  $5.0 \times 10^4$  cell suspension) using a custom Hamilton syringe (50  $\mu$ L capacity, supplied with small hub RN needle, 4-point style, 30-gauge, 52° angle, 3/4” needle length, Cat#7803-07) and dispenser repeater (Hamilton, Cat# 1482225). The ovary was carefully returned to the peritoneal cavity, which was then closed with proline sutures [6/0 Surgipro, VP-718X, CV-11 (taper)]. The dorsal body wall was stapled (VWR, Cat#CA-BD427631), and transdermal Bupivacane (2%, 0.1 mL/animal BID; Chiron Compounding Pharmacy) was applied over the incision and staples. The entire process required approximately 10 min, during which time mice were maintained at 3% isofluorane/1% oxygen on a sterile gauze-covered heated pad. All mice were maintained and observed for complications while recovering from the anesthetic in a heated incubator box. Upon regaining consciousness, mice were randomized to cages as per the experimental design.

Post-operative care included s.c analgesic (Buprenorphine HCL) administration (q8-12; 36–48 h post-op), observation and staple removal 7–10 days later.

#### *In Vivo Bioluminescence Imaging*

All *in vivo* imaging was carried out on the IVIS<sup>®</sup> Spectrum *in vivo* imaging system (Caliper Life Sciences, PerkinElmer, Guelph ON, Canada) and images were analyzed with the Living Image<sup>®</sup> advanced *in vivo* imaging software (Version 4.3.1; PerkinElmer, Guelph ON, Canada). D-Luciferin (Xenolight D-Luciferin Potassium salt; PerkinElmer # 122799) at a dose of 150 mg/kg body weight was delivered intraperitoneal (i.p.) (phase 1 trial) and s.c. (phase 2 trial) using a 25 G × 5/8 needle. At 10 min post-injection, mice were anesthetized with Isoflurane (3% isoflurane/1% oxygen) and received an application of eye ointment. Mice were imaged 15 min post-injection. Anesthetization was maintained throughout imaging with 3% Isoflurane. Image acquisition was carried out on groups of 3 mice (cage mates) at a time. Following image acquisition, mice were returned to their cage and monitored to ensure full recovery from anesthetic.

#### *Carboplatin Treatment*

One group of SKOV3-M ( $n=5$ ) and one group of SKOV3-E ( $n=5$ ) phase 2 mice were treated intraperitoneally with carboplatin (DIN 02320371) at a dose of 60 mg/kg body weight ( $n=10$ ), weekly over a 3-week period. Respectively, one group of SKOV3-M ( $n=5$ ) and one group of SKOV3-E ( $n=5$ ) phase 2 mice were treated intraperitoneally with an equal volume of placebo (PBS). All mice were monitored and provided with supportive care in the form of soaked food as needed.

#### *Data Analysis*

Of the mice entered in the phase 1 trial, 14 were included in the analysis. These included 5 mice of the SKOV3-M group, 4 mice of SKOV3-E group and 5 mice of the SKOV3-E+M group. One mouse from SKOV3-E group was further excluded due to lack of tumor development. From the phase 2 group, 3 SKOV3-M mice and all 5 SKOV3-E mice treated with carboplatin were included in the analysis. Two SKOV3-M mice died due to anesthetic complications during imaging. Two SKOV3-M (placebo) mice and one SKOV3-E (placebo) mouse were also excluded from the analysis, due to anesthetic complications during imaging or lack of detectable tumor by imaging.

### 2.6.3 Statistical Analysis

The Prism software (Version 7.0d, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to determine the statistical significance of differences in the means of experimental groups. A Kaplan–Meier plot was used to analyze the survival of animal groups used in the study, with a log-rank test to represent survival significance. A significant association was considered when  $p$ -values were  $< 0.05$ .

### 2.6.4 Immunohistochemistry (IHC) quantification

IHC analyses of the expression of different markers in tumor tissues derived from the experimental animals were performed as previously described [26] and all retrieval methods were performed using Tris-EDTA buffer (10 mM Tris base, 1 mM EDTA solution, pH 6.0) using a pressure cooker. Briefly, tissue sections were deparaffinized and rehydrated in graded alcohols, then incubated with blocking serum for 20 min. Following treatment with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min to quench the endogenous peroxidase activity, sections were incubated with the primary antibody overnight at 4 °C. List of antibodies used: From Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA): anti-LY75 (sc-515016 1:50) anti-vimentin (sc-373717, 1:200), anti-KLF4 (sc-166100, 1:40), anti-oct3/4 (sc-5279, 1:50), anti-Nanog (sc-376915, 1:50), anti-CD44 (sc-9960, 1:100), anti-ABCG2 (sc-37716,1:100),anti-Zeb1(sc-515793,1:100) anti-ALDH1A (sc-374149, 1:300), anti-EpCAM (sc-25308, 1:100), anti-Ovol2 (sc-515001, 1:50), anti- $\beta$ -catenin (sc-133240, 1:100), anti-axin1 (sc293190, 1:100), anti-P53 (sc-126, 1:100) anti-RAD51 (sc-398587, 1:100) anti-MDM2 (sc-965, 1:100), anti-ki67 ( sc-23900 1: 100), from Millipore Sigma, ON, Canada: anti- $\gamma$ -H2AX (07-627, 1:100). (From Abcam (Toronto, ON, Canada): anti-N-cadherin (ab-18203, 1:100), anti-E-cadherin (ab-1416, 1:100), anti-APC (ab40778, 1:200), anti-PUMA (ab-9643 1:100), from GeneTex: anti-GRHL2 (gtx109410, 1:150).

### 2.6.5 Immunofluorescence (IF) quantification

IF analysis was performed as previously described [26]. Fixed samples were incubated with different primary antibodies, including anti- $\beta$ -catenin (Santa-Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA), anti-LY75 (Santa-Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA and Abcam, Branford, CT, USA), anti-APC2 (Abcam, Branford, CT, USA), anti-Axin1 (Santa-Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA), anti-N-cadherin, anti-E-cadherin, anti-vimentin, anti-

EpCAM, and subsequently incubated with secondary antibodies, including rhodamine-linked goat-anti-mouse IgG1 (Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, USA) or Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit antibody (Abcam, Branford, CT, USA).

### **2.6.6 Western blot**

Western blot analyses for cells and tumor tissue fractions were performed as previously described [65]. The following antibodies were used for monitoring protein expression: from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA): anti-LY75 (sc-515016 1:500) anti-vimentin (sc-373717, 1:1000), anti-KLF4 (sc-166100, 1:500), anti-oct3/4 (sc-5279, 1:500), anti-Nanog (sc-376915, 1:500), anti-CD44 (sc-9960, 1:500), anti-ABCG2 (sc-37716,1:1000), anti-ALDH1A (sc-374149, 1:1000), anti-Bmi-1(sc-390443, 1:500), anti-EpCAM (sc-25308, 1:1000), anti-Ovol2 (sc-515001, 1:500), anti-B-catenin (sc-133240, 1:800), anti-axin1 (sc293190, 1:500), anti- $\beta$ -Actin (sc-517582, 1:2000). From Abcam (Toronto, ON, Canada): anti-N-cadherin (ab-18203, 1:1000), anti-E-cadherin (ab-1416, 1:1000), anti-APC (ab40778, 1:1000), goat-anti-rabbit HRP conjugated (ab6721, 1:3000), goat-anti-mouse HRP conjugated (ab6789, 1:3000) From GeneTex (Hsinchu City, Taiwan): anti-GRHL2 (gtx109410, 1:1000). The same antibodies were used both for IHC and Western blot analyses.

### **2.6.7 Quantitative PCR (qPCR)**

Quantitative PCR was performed as previously described [26]. Relative quantification of RNA expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  method [65]. The 18S ribosomal gene was used as an internal standard. Each sample was tested in triplicate. Primers were designed as previously shown [26]; all primers for qPCR are listed in Table 2.A1.

### **Author Contributions:**

Conceptualization, S.M., B.V., D.B.; Data curation, D.B., S.M., E.M., K.G., D.L., G.R., B.V.; Funding acquisition, D.B., B.V.; Methodology, S.M., E.M., K.G., D.L., G.R.; Project administration, D.B.; Resources, D.B.; Supervision, D.B., B.V.; Validation, S.M., E.M., K.G., D.L., G.R., B.V., D.B.; Writing – original draft, S.M, D.B.; Writing – review & editing, S.M., B.V., D.B.

**Acknowledgments:**

This study was sustained by grant to D.B. and B.V. from the Cancer Research Society of Canada, and financial support from FRQ-S - Réseau de Recherche en Cancer (<http://www.rrcancer.ca>).

**Conflicts of Interest:**

The authors declare no conflicts of interest.

**Abbreviations:**

EOC - epithelial ovarian cancer

EMT- epithelial-mesenchymal transition

MET - mesenchymal-epithelial transition

EMP - epithelial-mesenchymal plasticity

SCID mice - severe combined immunodeficient mice

IB injection - intrabursal injection

CSCs - cancer stem cells

IHC - immunohistochemistry

IF - immunofluorescence

qPCR - quantitative PCR

**2.7 Appendix Tables**



**Table.2. A. 1:** Primers used for quantitative PCR (qPCR)

Gene	q-PCR primers	Sequence (5'-3')
ZEB1 (NM_001128128.3)	Forward Reverse Product lengths (pb)	CATTTTCAGGGAAGCCTGGGT CACCTGTTAGGCAGTGAGG 158
Nanog (NM_024865.4)	Forward Reverse Product lengths (pb)	ATATTGCATGCCTCCTGGGG GTGCCGGAAGCTTTTGTCTG 104
POU5F1(Oct4) (NM_001285986.1)	Forward Reverse Product lengths (pb)	AGATGCTTTGAGCTCCCTCTG TTGGCTGAATACCTTCCCTGG 124
CD44 (NM_001001391.2)	Forward Reverse Product lengths (pb)	TCCCTGCTACCAGAGACCAA GCTCCACCTTCTTGACTCCC 106
CD133 (Prom1) (NM_001371406.1)	Forward Reverse Product lengths (pb)	CCCCGCAGGAGTGAATCTTT GAAGGACTCGTTGCTGGTGA 137
ABCG2 (NM_004827.3)	Forward Reverse Product lengths (pb)	GAGTTAACTGAGCTGGGGCA TGACAGAATGTCAGGGCACC 98
BMI1 (NM_005180.9)	Forward Reverse Product lengths (pb)	TGCTTTGGTCGAACTTGGTG TGCAGACTGGGGACAATGAA 129
KLF4 (NM_001314052.2)	Forward Reverse Product lengths (pb)	CCAAAAATGCGACCGAGCAT TGTAGTGCTTTCTGGCTGGG 174
ALDH1A1 (NM_000689.5)	Forward Reverse Product lengths (pb)	TTGGACCAGTGCAGCAAATC CGCCATAGCAATTCACCCAC 171

## 2.8 References

1. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. "Cancer Statistics, 2019." *CA Cancer J Clin* 69, no. 1 (2019): 7-34.
2. Coleman, R.L., Monk, B.J., Sood, A.K., Herzog, T.J. "Latest Research and Treatment of Advanced-Stage Epithelial Ovarian Cancer." *Nat Rev Clin Oncol* 10, no. 4 (2013): 211-24.
3. Yao, D., Dai, C., Peng, S. "Mechanism of the Mesenchymal-Epithelial Transition and Its Relationship with Metastatic Tumor Formation." *Mol Cancer Res* 9, no. 12 (2011): 1608-20.
4. Suhail, Y., Cain, M.P., Vanaja, K., Kurywchak, P.A., Levchenko, A., Kalluri, R., Kshitiz. "Systems Biology of Cancer Metastasis." *Cell Syst* 9, no. 2 (2019): 109-27.
5. Thiery, J.P. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Tumour Progression." *Nat Rev Cancer* 2, no. 6 (2002): 442-54.
6. Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K., Takeichi, M. "Transformation of Cell Adhesion Properties by Exogenously Introduced E-Cadherin Cdna." *Nature* 329, no. 6137 (1987): 341-3.
7. Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., Christofori, G. "A Causal Role for E-Cadherin in the Transition from Adenoma to Carcinoma." *Nature* 392, no. 6672 (1998): 190-3.
8. Hojo, N., Huisken, A., Wang, H., Chirshev, E., Kim, N., Nguyen, S., Campos, H., Glackin, C., Ioffe, Y., Unternaehrer, J. "Snail Knockdown Reverses Stemness and Inhibits Tumour Growth in Ovarian Cancer." *Scientific reports* 8, no. 1 (2018): 1-10.
9. Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., Kirchner, T. "Migrating Cancer Stem Cells— an Integrated Concept of Malignant Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer* 5, no. 9 (2005): 744-49.
10. Wu, Z.-Q., Li, X.-Y., Hu, C.Y., Ford, M., Kleer, C.G., Weiss, S.J. "Canonical Wnt Signaling Regulates Slug Activity and Links Epithelial–Mesenchymal Transition with Epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (Brcal1) Repression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, no. 41 (2012): 16654-59.
11. Yook, J.I., Li, X.-Y., Ota, I., Fearon, E.R., Weiss, S.J. "Wnt-Dependent Regulation of the E-Cadherin Repressor Snail." *Journal of biological chemistry* 280, no. 12 (2005): 11740-48.
12. Abbott, S.E., Camacho, F., Peres, L.C., Alberg, A.J., Bandera, E.V., Bondy, M., Cote, M.L., Funkhouser, E., Moorman, P.G., Peters, E.S., Qin, B., Schwartz, A.G., Barnholtz-Sloan, J., Terry, P., Schildkraut, J.M. "Recreational Physical Activity and Survival in African-American Women with Ovarian Cancer." *Cancer Causes & Control* 29, no. 1 (2018): 77-86.
13. Deng, Z., Wang, L., Hou, H., Zhou, J., Li, X. "Epigenetic Regulation of Iqgap2 Promotes Ovarian Cancer Progression Via Activating Wnt/B-Catenin Signaling." *International journal of oncology* 48, no. 1 (2016): 153-60.
14. Bernaudo, S., Salem, M., Qi, X., Zhou, W., Zhang, C., Yang, W., Rosman, D., Deng, Z., Ye, G., Yang, B. "Cyclin G2 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Disrupting Wnt/B-Catenin Signaling." *Oncogene* 35, no. 36 (2016): 4816-27.

15. Elloul, S., Vaksman, O., Stavnes, H.T., Trope, C.G., Davidson, B., Reich, R. "Mesenchymal-to-Epithelial Transition Determinants as Characteristics of Ovarian Carcinoma Effusions." *Clinical & Experimental Metastasis* 27, no. 3 (2010): 161-72.
16. Wells, A., Yates, C., Shepard, C.R. "E-Cadherin as an Indicator of Mesenchymal to Epithelial Reverting Transitions During the Metastatic Seeding of Disseminated Carcinomas." *Clin Exp Metastasis* 25, no. 6 (2008): 621-8.
17. Jolly, M.K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Ben-Jacob, E., Onuchic, J.N., Levine, H. "Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis." *Front Oncol* 5 (2015): 155.
18. Grosse-Wilde, A., Fouquier d'Herouel, A., McIntosh, E., Ertaylan, G., Skupin, A., Kuestner, R.E., del Sol, A., Walters, K.A., Huang, S. "Stemness of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival." *PLoS One* 10, no. 5 (2015): e0126522.
19. Andriani, F., Bertolini, G., Facchinetti, F., Baldoli, E., Moro, M., Casalini, P., Caserini, R., Milione, M., Leone, G., Pelosi, G., Pastorino, U., Sozzi, G., Roz, L. "Conversion to Stem-Cell State in Response to Microenvironmental Cues Is Regulated by Balance between Epithelial and Mesenchymal Features in Lung Cancer Cells." *Mol Oncol* 10, no. 2 (2016): 253-71.
20. Strauss, R., Li, Z.Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Moller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P., Drescher, C., Urban, N., Bartek, J., Lieber, A. "Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity." *PLoS One* 6, no. 1 (2011): e16186.
21. Klymenko, Y., Johnson, J., Bos, B., Lombard, R., Campbell, L., Loughran, E., Stack, M.S. "Heterogeneous Cadherin Expression and Multicellular Aggregate Dynamics in Ovarian Cancer Dissemination." *Neoplasia* 19, no. 7 (2017): 549-63.
22. Francart, M.E., Lambert, J., Vanwynsberghe, A.M., Thompson, E.W., Bourcy, M., Polette, M., Gilles, C. "Epithelial-Mesenchymal Plasticity and Circulating Tumor Cells: Travel Companions to Metastases." *Dev Dyn* 247, no. 3 (2018): 432-50.
23. Bhatia, S., Monkman, J., Toh, A.K.L., Nagaraj, S.H., Thompson, E.W. "Targeting Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer: Clinical and Preclinical Advances in Therapy and Monitoring." *Biochem J* 474, no. 19 (2017): 3269-306.
24. Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.C., LeBleu, V.S., Kalluri, R. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer." *Nature* 527, no. 7579 (2015): 525-30.
25. Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R.F., Vahdat, L.T., Altorki, N.K., Mittal, V., Gao, D. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Not Required for Lung Metastasis but Contributes to Chemoresistance." *Nature* 527, no. 7579 (2015): 472-6.
26. Faddaoui, A., Bachvarova, M., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.C., Sebastianelli, A., Gobeil, S., Morin, C., Macdonald, E., Vanderhyden, B., Bachvarov, D. "The Mannose Receptor Ly75 (Dec205/Cd205) Modulates Cellular Phenotype and Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells." *Oncotarget* 7, no. 12 (2016): 14125-42.

27. Mehdi, S., Bachvarova, M., Scott-Boyer, M.-P., Droit, A., Bachvarov, D. "Ly75 Ablation Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition (Met) in Epithelial Ovarian Cancer (Eoc) Cells Associated with DNA Methylation Alterations and Suppression of the Wnt/B-Catenin Pathway." *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 5 (2020): 1848.
28. Killion, J.J., Radinsky, R., Fidler, I.J. "Orthotopic Models Are Necessary to Predict Therapy of Transplantable Tumors in Mice." *Cancer Metastasis Rev* 17, no. 3 (1998): 279-84.
29. Kuo, T.H., Kubota, T., Watanabe, M., Furukawa, T., Kase, S., Tanino, H., Saikawa, Y., Ishibiki, K., Kitajima, M., Hoffman, R.M. "Site-Specific Chemosensitivity of Human Small-Cell Lung Carcinoma Growing Orthotopically Compared to Subcutaneously in Scid Mice: The Importance of Orthotopic Models to Obtain Relevant Drug Evaluation Data." *Anticancer Res* 13, no. 3 (1993): 627-30.
30. Lu, W., Kang, Y. "Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis." *Dev Cell* 49, no. 3 (2019): 361-74.
31. van Staalduinen, J., Baker, D., Ten Dijke, P., van Dam, H. "Epithelial-Mesenchymal-Transition-Inducing Transcription Factors: New Targets for Tackling Chemoresistance in Cancer?" *Oncogene* 37, no. 48 (2018): 6195-211.
32. Pastushenko, I., Blanpain, C. "Emt Transition States During Tumor Progression and Metastasis." *Trends Cell Biol* 29, no. 3 (2019): 212-26.
33. Garg, M. "Epithelial, Mesenchymal and Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotypes and Their Clinical Relevance in Cancer Metastasis." *Expert Rev Mol Med* 19 (2017): e3.
34. Klymenko, Y., Kim, O., Loughran, E., Yang, J., Lombard, R., Alber, M., Stack, M.S. "Cadherin Composition and Multicellular Aggregate Invasion in Organotypic Models of Epithelial Ovarian Cancer Intraperitoneal Metastasis." *Oncogene* 36, no. 42 (2017): 5840-51.
35. Loret, N., Denys, H., Tumeurs, P., Berx, G. "The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance." *Cancers (Basel)* 11, no. 6 (2019).
36. Garson, K., Shaw, T.J., Clark, K.V., Yao, D.S., Vanderhyden, B.C. "Models of Ovarian Cancer--Are We There Yet?" *Mol Cell Endocrinol* 239, no. 1-2 (2005): 15-26.
37. Ribatti, D., Tamma, R., Annese, T. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview." *Transl Oncol* 13, no. 6 (2020): 100773.
38. Jolly, M.K., Tripathi, S.C., Jia, D., Mooney, S.M., Celiktas, M., Hanash, S.M., Mani, S.A., Pienta, K.J., Ben-Jacob, E., Levine, H. "Stability of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype." *Oncotarget* 7, no. 19 (2016): 27067-84.
39. Jordan, N.V., Johnson, G.L., Abell, A.N. "Tracking the Intermediate Stages of Epithelial-Mesenchymal Transition in Epithelial Stem Cells and Cancer." *Cell Cycle* 10, no. 17 (2011): 2865-73.
40. Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S. "Identification of the Tumour Transition States Occurring During Emt." *Nature* 556, no. 7702 (2018): 463-68.
41. Singh, A., Settleman, J. "Emt, Cancer Stem Cells and Drug Resistance: An Emerging Axis of Evil in the War on Cancer." *Oncogene* 29, no. 34 (2010): 4741-51.

42. Strauss, R., Li, Z.-Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Möller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P. "Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity." *PloS one* 6, no. 1 (2011).
43. Satelli, A., Li, S. "Vimentin in Cancer and Its Potential as a Molecular Target for Cancer Therapy." *Cell Mol Life Sci* 68, no. 18 (2011): 3033-46.
44. Hudson, L.G., Zeineldin, R., Stack, M.S. "Phenotypic Plasticity of Neoplastic Ovarian Epithelium: Unique Cadherin Profiles in Tumor Progression." *Clin Exp Metastasis* 25, no. 6 (2008): 643-55.
45. Kenda Suster, N., Smrkolj, S., Virant-Klun, I. "Putative Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition Revealed in Sections of Ovarian Tumor in Patients with Serous Ovarian Carcinoma Using Immunohistochemistry for Vimentin and Pluripotency-Related Markers." *Journal of ovarian research* 10, no. 1 (2017): 11.
46. Tsikouras, P., Tsagias, N., Pinidis, P., Csorba, R., Vrachnis, N., Dafopoulos, A., Bouchlariotou, S., Liberis, A., Teichmann, A.T., von Tempelhoff, G.F. "The Contribution of Catumaxomab in the Treatment of Malignant Ascites in Patients with Ovarian Cancer: A Review of the Literature." *Arch Gynecol Obstet* 288, no. 3 (2013): 581-5.
47. Li, Y., Chen, T., Zhu, J., Zhang, H., Jiang, H., Sun, H. "High Aldh Activity Defines Ovarian Cancer Stem-Like Cells with Enhanced Invasiveness and Emt Progress Which Are Responsible for Tumor Invasion." *Biochem Biophys Res Commun* 495, no. 1 (2018): 1081-88.
48. Li, X., Zou, Z., Tang, J., Zheng, Y., Liu, Y., Luo, Y., Liu, Q., Wang, Y. "Nos1 Upregulates Abcg2 Expression Contributing to Ddp Chemoresistance in Ovarian Cancer Cells." *Oncology letters* 17, no. 2 (2019): 1595-602.
49. Roy, L., Bobbs, A., Sattler, R., Kurkewich, J.L., Dausinas, P.B., Nallathamby, P., Cowden Dahl, K.D. "Cd133 Promotes Adhesion to the Ovarian Cancer Metastatic Niche." *Cancer Growth Metastasis* 11 (2018): 1179064418767882.
50. Meng, E., Mitra, A., Tripathi, K., Finan, M.A., Scalici, J., McClellan, S., Madeira da Silva, L., Reed, E., Shevde, L.A., Palle, K., Rocconi, R.P. "Aldh1a1 Maintains Ovarian Cancer Stem Cell-Like Properties by Altered Regulation of Cell Cycle Checkpoint and DNA Repair Network Signaling." *PLoS One* 9, no. 9 (2014): e107142.
51. Hu, L., McArthur, C., Jaffe, R. "Ovarian Cancer Stem-Like Side-Population Cells Are Tumourigenic and Chemoresistant." *British journal of cancer* 102, no. 8 (2010): 1276-83.
52. Pan, Y., Jiao, J., Zhou, C., Cheng, Q., Hu, Y., Chen, H. "Nanog Is Highly Expressed in Ovarian Serous Cystadenocarcinoma and Correlated with Clinical Stage and Pathological Grade." *Pathobiology* 77, no. 6 (2010): 283-88.
53. Silva, I.A., Bai, S., McLean, K., Yang, K., Griffith, K., Thomas, D., Ginestier, C., Johnston, C., Kueck, A., Reynolds, R.K., Wicha, M.S., Buckanovich, R.J. "Aldehyde Dehydrogenase in Combination with Cd133 Defines Angiogenic Ovarian Cancer Stem Cells That Portend Poor Patient Survival." *Cancer Res* 71, no. 11 (2011): 3991-4001.
54. Cioffi, M., D'Alterio, C., Camerlingo, R., Tirino, V., Consales, C., Riccio, A., Ierano, C., Cecere, S.C., Losito, N.S., Greggi, S., Pignata, S., Pirozzi, G., Scala, S. "Identification of a Distinct Population of Cd133(+)Cxcr4(+) Cancer Stem Cells in Ovarian Cancer." *Sci Rep* 5 (2015): 10357.

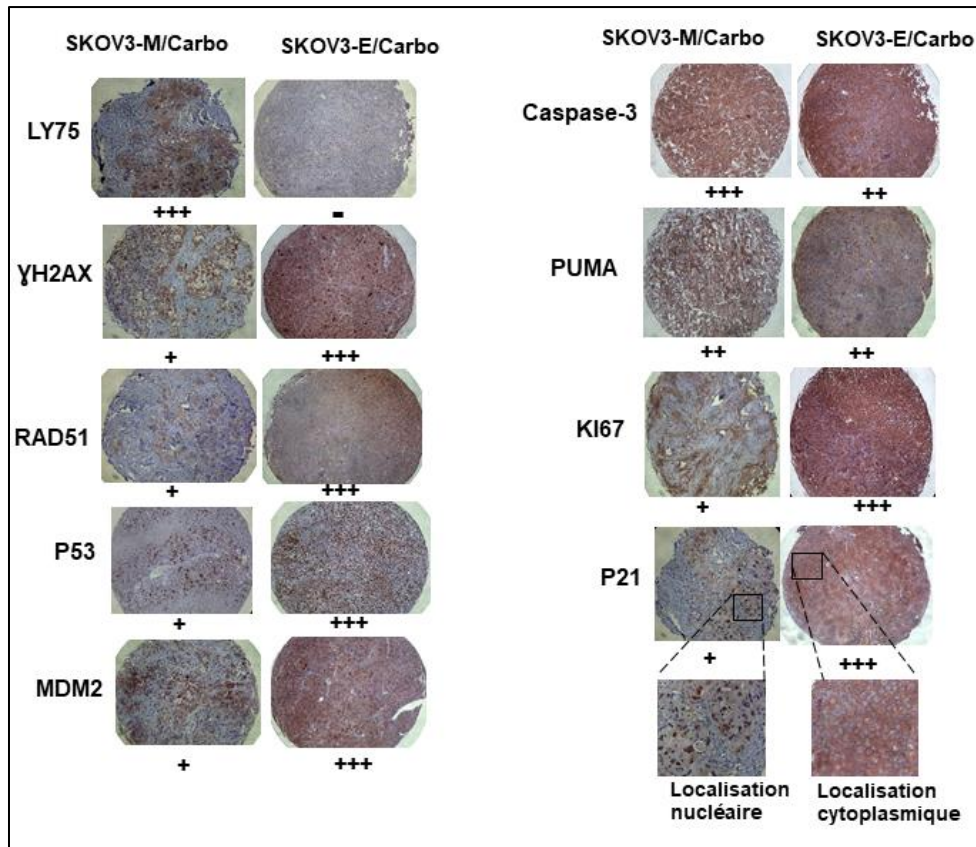
55. Faddaoui, A., Sheta, R., Bachvarova, M., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.C., Sebastianelli, A., Gobeil, S., Morin, C., Ghani, K., Bachvarov, D. "Suppression of the Grainyhead Transcription Factor 2 Gene (*Grhl2*) Inhibits the Proliferation, Migration, Invasion and Mediates Cell Cycle Arrest of Ovarian Cancer Cells." *Cell Cycle* 16, no. 7 (2017): 693-706.
56. Hong, T., Watanabe, K., Ta, C.H., Villarreal-Ponce, A., Nie, Q., Dai, X. "An *Ovol2-Zeb1* Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-Step Transition between Epithelial and Mesenchymal States." *PLoS Comput Biol* 11, no. 11 (2015): e1004569.
57. Basu, S., Cheriyaundath, S., Ben-Ze'ev, A. "Cell-Cell Adhesion: Linking Wnt/Beta-Catenin Signaling with Partial Emt and Stemness Traits in Tumorigenesis." *F1000Res* 7 (2018).
58. Uka, R., Britschgi, C., Krattli, A., Matter, C., Mihic, D., Okoniewski, M.J., Gualandi, M., Stupp, R., Cinelli, P., Dummer, R., Levesque, M.P., Shakhova, O. "Temporal Activation of Wnt/Beta-Catenin Signaling Is Sufficient to Inhibit Sox10 Expression and Block Melanoma Growth." *Oncogene* 39, no. 20 (2020): 4132-54.
59. Arend, R.C., Londoño-Joshi, A.I., Straughn, J.M., Buchsbaum, D.J. "The Wnt/B-Catenin Pathway in Ovarian Cancer: A Review." *Gynecol Oncol* 131, no. 3 (2013): 772-79.
60. Nagaraj, A.B., Joseph, P., Kovalenko, O., Singh, S., Armstrong, A., Redline, R., Resnick, K., Zanotti, K., Waggoner, S., DiFeo, A. "Critical Role of Wnt/B-Catenin Signaling in Driving Epithelial Ovarian Cancer Platinum Resistance." *Oncotarget* 6, no. 27 (2015): 23720.
61. Nguyen, V.H.L., Hough, R., Bernaudo, S., Peng, C. "Wnt/Beta-Catenin Signalling in Ovarian Cancer: Insights into Its Hyperactivation and Function in Tumorigenesis." *J Ovarian Res* 12, no. 1 (2019): 122.
62. Kuchenbaecker, K.B., Ramus, S.J., Tyrer, J., Lee, A., Shen, H.C., Beesley, J., Lawrenson, K., McGuffog, L., Healey, S., Lee, J.M., Spindler, T.J., Lin, Y.G., Pejovic, T., Bean, Y., Li, Q., Coetzee, S., Hazelett, D., Miron, A., Southey, M., Terry, M.B., Goldgar, D.E., Buys, S.S., Janavicius, R., Dorfling, C.M., van Rensburg, E.J., Neuhausen, S.L., Ding, Y.C., Hansen, T.V., Jonson, L., Gerdes, A.M., Ejlersen, B., Barrowdale, D., Dennis, J., Benitez, J., Osorio, A., Garcia, M.J., Komenaka, I., Weitzel, J.N., Ganschow, P., Peterlongo, P., Bernard, L., Viel, A., Bonanni, B., Peissel, B., Manoukian, S., Radice, P., Papi, L., Ottini, L., Fostira, F., Konstantopoulou, I., Garber, J., Frost, D., Perkins, J., Platte, R., Ellis, S., Godwin, A.K., Schmutzler, R.K., Meindl, A., Engel, C., Sutter, C., Sinilnikova, O.M., Damiola, F., Mazoyer, S., Stoppa-Lyonnet, D., Claes, K., De Leeneer, K., Kirk, J., Rodriguez, G.C., Piedmonte, M., O'Malley, D.M., de la Hoya, M., Caldes, T., Aittomaki, K., Nevanlinna, H., Collee, J.M., Rookus, M.A., Oosterwijk, J.C., Tihomirova, L., Tung, N., Hamann, U., Isacacs, C., Tischkowitz, M., Imyanitov, E.N., Caligo, M.A., Campbell, I.G., Hogervorst, F.B., Olah, E., Diez, O., Blanco, I., Brunet, J., Lazaro, C., Pujana, M.A., Jakubowska, A., Gronwald, J., Lubinski, J., Sukiennicki, G., Barkardottir, R.B., Plante, M., Simard, J., Soucy, P., Montagna, M., Tognazzo, S., Teixeira, M.R., Pankratz, V.S., Wang, X., Lindor, N., Szabo, C.I., Kauff, N., Vijai, J., Aghajanian, C.A., Pfeiler, G., Berger, A., Singer, C.F., Tea, M.K., Phelan, C.M., Greene, M.H., Mai, P.L., Rennert, G., Mulligan, A.M., Tchatchou, S., Andrulis, I.L., Glendon, G., Toland, A.E., Jensen, U.B., Kruse, T.A., Thomassen, M., Bojesen, A., Zidan, J., Friedman, E., Laitman, Y., Soller, M., Liljegren, A., Arver, B., Einbeigi, Z., Stenmark-Askmal, M., Olopade, O.I., Nussbaum, R.L., Rebbeck, T.R., Nathanson, K.L., Domchek, S.M., Lu, K.H., Karlan, B.Y., Walsh, C., Lester, J., Hein, A., Ekici, A.B., Beckmann, M.W., Fasching, P.A., Lambrechts, D., Van Nieuwenhuysen, E., Vergote, I., Lambrechts, S., Dicks,

- E., Doherty, J.A., Wicklund, K.G., Rossing, M.A., Rudolph, A., Chang-Claude, J., Wang-Gohrke, S., Eilber, U., Moysich, K.B., Odunsi, K., Sucheston, L., Lele, S., Wilkens, L.R., Goodman, M.T., Thompson, P.J., Shvetsov, Y.B., Runnebaum, I.B., Durst, M., Hillemanns, P., Dork, T., Antonenkova, N., Bogdanova, N., Leminen, A., Pelttari, L.M., Butzow, R., Modugno, F., Kelley, J.L., Edwards, R.P., Ness, R.B., du Bois, A., Heitz, F., Schwaab, I., Harter, P., Matsuo, K., Hosono, S., Orsulic, S., Jensen, A., Kjaer, S.K., Hogdall, E., Hasmad, H.N., Azmi, M.A., Teo, S.H., Woo, Y.L., Fridley, B.L., Goode, E.L., Cunningham, J.M., Vierkant, R.A., Bruinsma, F., Giles, G.G., Liang, D., Hildebrandt, M.A., Wu, X., Levine, D.A., Bisogna, M., Berchuck, A., Iversen, E.S., Schildkraut, J.M., Concannon, P., Weber, R.P., Cramer, D.W., Terry, K.L., Poole, E.M., Tworoger, S.S., Bandera, E.V., Orlow, I., Olson, S.H., Krakstad, C., Salvesen, H.B., Tangen, I.L., Bjorge, L., van Altena, A.M., Aben, K.K., Kiemeny, L.A., Massuger, L.F., Kellar, M., Brooks-Wilson, A., Kelemen, L.E., Cook, L.S., Le, N.D., Cybulski, C., Yang, H., Lissowska, J., Brinton, L.A., Wentzensen, N., Hogdall, C., Lundvall, L., Nedergaard, L., Baker, H., Song, H., Eccles, D., McNeish, I., Paul, J., Carty, K., Siddiqui, N., Glasspool, R., Whittemore, A.S., Rothstein, J.H., McGuire, V., Sieh, W., Ji, B.T., Zheng, W., Shu, X.O., Gao, Y.T., Rosen, B., Risch, H.A., McLaughlin, J.R., Narod, S.A., Monteiro, A.N., Chen, A., Lin, H.Y., Permuth-Wey, J., Sellers, T.A., Tsai, Y.Y., Chen, Z., Ziogas, A., Anton-Culver, H., Gentry-Maharaj, A., Menon, U., Harrington, P., Lee, A.W., Wu, A.H., Pearce, C.L., Coetzee, G., Pike, M.C., Dansonka-Mieszkowska, A., Timorek, A., Rzepecka, I.K., Kupryjanczyk, J., Freedman, M., Noushmehr, H., Easton, D.F., Offit, K., Couch, F.J., Gayther, S., Pharoah, P.P., Antoniou, A.C., Chenevix-Trench, G. "Identification of Six New Susceptibility Loci for Invasive Epithelial Ovarian Cancer." *Nat Genet* 47, no. 2 (2015): 164-71.
63. Hoffmann, K., Berger, H., Kulbe, H., Thillainadarasan, S., Mollenkopf, H.-J., Zemojtel, T., Taube, E., Darb-Esfahani, S., Mangler, M., Sehouli, J., Chekerov, R., Braicu, E.I., Meyer, T.F., Kessler, M. "Stable Expansion of High-Grade Serous Ovarian Cancer Organoids Requires a Low-Wnt Environment." *The EMBO Journal* 39, no. 6 (2020): e104013.
64. Sheta, R., Bachvarova, M., Macdonald, E., Gobeil, S., Vanderhyden, B., Bachvarov, D. "The Polypeptide Galnt6 Displays Redundant Functions Upon Suppression of Its Closest Homolog Galnt3 in Mediating Aberrant O-Glycosylation, Associated with Ovarian Cancer Progression." *Int J Mol Sci* 20, no. 9 (2019).
65. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr and the  $2^{-\Delta\delta ct}$  Method." *methods* 25, no. 4 (2001): 402-08.

## **2.9 Caractérisation du phénomène de résistance au carboplatine des souris injectées par les cellules SKOV3 en EMT (résultats non publiés)**

Dans le but de comprendre le phénomène de résistance au carboplatine des souris injectées avec les cellules SKOV3-M et SKOV3-E/M (hybrides), nous avons vérifié par immunohistochimie l'expression des marqueurs de dommage à l'ADN (Rad51 et  $\gamma$ -H2AX), de l'apoptose (PUMA et Caspase 3 activée), le marqueur de prolifération ki67, ainsi que les protéines p53, MDM2 et p21 dans les tumeurs extraites des souris injectées par SKOV3-M et SKOV3-E/M traitées au carboplatine (60mg/kg/jour). La figure 2.6 montre que suite au traitement, les souris SKOV3-M et SKOV3-E/M expriment les marqueurs de dommage RAD51 et  $\gamma$ -H2AX, de même que les protéines d'apoptose. Cependant l'expression de Ki67 et p53 est plus forte et soutenue dans les souris SKOV3-E/M et ce malgré la forte expression de l'ubiquitine MDM2 qui est l'antagoniste de p53. Nous constatons également une forte expression nucléaire et cytoplasmique de la protéine du cycle cellulaire p21 dans les souris SKOV3-E/M alors que son expression est nucléaire dans les souris SKOV3-M caractérisées par l'expression de LY75.





**Figure 2. 6:** Vérification de la résistance au carboplatine des cellules SKOV3 en EMT.

L'expression des marqueurs des dommages/réparation de l'ADN et de l'apoptose: γ-H2AX, RAD51, P53, MDM2, caspase3, PUMA, Ki67, et p21 est vérifiée par immunohistochimie en triplicata dans des tumeurs extraites des souris injectées par voie IB par les cellules SKOV3-M et SKOV3-E/M/ et qui sont traitées par voie IP avec le carboplatine (Images prises à grossissement 40X).

## Chapitre 3

### Discussion générale

#### 3.1 Profil de la méthylation de l'ADN au cours de l'EMT

L'EMT est initialement décrite dans le contexte de la différenciation cellulaire normale au cours du développement précoce lors de l'organisation de systèmes tissulaires [455]. En effet, le développement embryonnaire des organes dépend du basculement des cellules entre EMT et MET comme observé lors de la gastrulation [456], lors de formation de la crête neuronale [457], lors de la formation de la valve cardiaque [458] en néphrogénèse [459] et en myogénèse [460]. À l'instar du développement embryonnaire, les changements dans les phénotypes cellulaires observés suite à l'EMT sont aussi en lien avec des pathologies, la tumorigénèse et la progression tumorale [461, 462]. L'EMT est aussi influencée par les mécanismes épigénétiques dont la méthylation de l'ADN qui contrôle le programme transcriptionnel des gènes. En effet, durant l'EMT les gènes suppresseurs de tumeurs sont hyperméthylés donc fermés à la transcription alors que les oncogènes se trouvent ouverts à la transcription car ils sont souvent hypométhylés [463, 464]. Ces programmes épigénétiques et transcriptionnels définissent ainsi les réseaux des gènes régulateurs et des voies de signalisation contrôlant chaque étape de cette transition.

Il a toujours été considéré que l'EMT est responsable de la dissémination du CEO [465], toutefois, les mécanismes moléculaires de cette dissémination restent encore mal élucidés. Lors de l'étude portant sur le chapitre 1, nous nous sommes intéressés aux modifications survenant dans la méthylation de l'ADN lors de l'EMT des cellules du CEO médiée par la modulation d'expression du gène LY75. Les données de RRBS affichent que 6666 gènes présentent une marque de méthylation de l'ADN inversée entre les cellules SKOV3-M et SKOV3-E. En effet, les gènes retrouvés hypométhylés dans SKOV3-M sont hyperméthylés dans SKOV3-E et inversement. Cette observation démontre que l'EMT est un processus caractérisé par une grande plasticité cellulaire et qui implique plusieurs fonctions biologiques. Parmi ces gènes perturbés épigénétiquement durant l'EMT, nous nous sommes attardés sur une dizaine dont le profil de méthylation est fortement dérégulé. Il s'agit des gènes *HOOK1*, *RAMP2*, *WNT3* et *JMJD8* qui apparaissent hypométhylés et surexprimés dans SKOV3-M alors que les gènes *CEND1*, *CLDN5*, *EVX2*, *KLF4*, *APC2* et *IIF01* sont

hyperméthylés et sous exprimés dans ces mêmes cellules à phénotype mésenchymateux. Ces 10 gènes présentent un profil de méthylation de l'ADN inversé dans SKOV3-E (Figure A.1). Le profil de méthylation des gènes sélectionnés a été validé par BSP dans le modèle de l'EMT de SKOV3. Les niveaux d'expression des ARNm et des protéines correspondantes sont validés par q-PCR et en immunobuvardage respectivement dans les deux modèles de l'EMT: SKOV3 et OVCAR8 (Figure 1.2). Ces gènes candidats sont tous connus pour leur implication dans le cancer, la méthylation de l'ADN et/ou dans l'EMT où ils peuvent avoir des rôles controversés dépendamment du type de cancer et du contexte cellulaire. Des exemples d'études pour chaque gène sont bien discutés dans la discussion du chapitre 1. En résumé, ces 10 gènes candidats pourraient constituer des biomarqueurs potentiels dans le diagnostic du CEO précoce afin de prévenir les métastases. Leurs rôles fonctionnels pourront être étudiés en profondeur dans le contexte du CEO.

### **3.2 Identification de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine comme voie dominante dans l'EMT médiée par la suppression de LY75 dans le CEO**

L'analyse IPA des 6666 gènes différemment méthylés découlant de RRBS a révélé leur implication dans plusieurs fonctions biologiques en plus de la régulation de l'EMT (Figure 1.3). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine et la voie TGF- $\beta$  sont sorties comme deux voies régulatrices de ce changement phénotypique médié par LY75. Ces voies figurent parmi celles connues dans la régulation de l'EMT où elles activent l'expression des EMT-TFs dont le rôle principal est la répression de la E-cad et autres marqueurs épithéliaux [466]. Cependant, l'analyse IPA révèle aussi que l'EMT partage plus de gènes en commun avec la voie Wnt/ $\beta$ -caténine que la voie TGF- $\beta$  (Tableau 1.A1 du chapitre 1). Ces résultats suggèrent en effet que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine serait la voie activée lors de l'EMT des cellules du CEO médiée par la modulation d'expression de LY75. Le traitement des cellules SKOV3-M/SKOV3-E et OVCAR8-M/OVCAR8-E par les inhibiteurs chimiques XAV939 et AB4568 des voies Wnt et TGF- $\beta$  respectivement montre que les cellules M traitées avec XAV939 affichent un changement de morphologie semblable au phénotype des clones épithéliaux accompagné d'une baisse de  $\beta$ -cat et N-cad et un enrichissement de E-cad. Alors que l'inhibition de la voie TGF- $\beta$  ne semble pas concurrencer la voie Wnt dans cette transformation phénotypique, ce qui fait de la voie Wnt, la voie dominante dans l'EMT des cellules du CEO médiée par

LY75. Comme exposé dans l'introduction, la voie Wnt s'active suite au recrutement du ligand Wnt par le complexe FZD/LPR. Le complexe GSK-3 $\beta$ /Axin/APC2 destructeur de la  $\beta$ -caténine est réprimé suite à l'intervention de la protéine DVL. La  $\beta$ -caténine s'accumule alors dans le cytoplasme et transloque vers le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles dont les EMT-TF [467] (Figure II.5). Le statut de cette voie dominante a par la suite été vérifié dans les deux modèles de l'EMT où on constate en effet, l'enrichissement et la localisation nucléaire de la  $\beta$ -cat en présence de LY75 accompagnée de la baisse des protéines destructrices APC2 et Axin (Supplementary figure 1.S2 dans chapitre 1). La perturbation de la signalisation Wnt a été rapportée dans plusieurs cancers incluant le cancer colorectal [468], le cancer de la prostate [469] et le cancer de sein [470]. Dans le cancer de l'ovaire il a été rapporté que le gène de la  $\beta$ -caténine (CTNNB1) est muté dans 16 à 54% des cancers endométrioïdes de l'ovaire [471]. Ces mutations peuvent aussi concerner les autres membres de cette voie comme c'est déjà observé pour les gènes APC et Axin1 dans les CEOs [408]. En dehors des mutations, la voie Wnt est toujours observée active dans les CEOs de type séreux représentée par la localisation cytoplasmique et nucléaire de la  $\beta$ -cat [472-474]. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est finement régulée par un ensemble d'antagonistes. On cite à titre d'exemples les protéines sécrétées liants les récepteurs FZD (SFRPs : *secreted Frizzled-related proteins*), le facteur 1 inhibiteur de Wnt (*WIF1: Wnt inhibitor factor 1*), la cuticule nue 1 (*NKDI; Naked cuticle 1*) qui s'associe aux protéines DVLs et la protéine dickkopf (DKK) qui se lie au récepteur LPR. Comme on vient de voir que la voie Wnt est promotrice de l'EMT on pourrait penser que les antagonistes de cette voie seraient aussi des inhibiteurs de l'EMT. En effet, la restauration de WIF1 dans les cellules du cancer de la prostate inhibe la progression du cancer en inversant l'EMT [475], de même, une récente étude a montré que l'activation d'expression de DKK1 et SFRPs bloque l'EMT dans le CEO [476]. En outre, nos résultats ont montré que LY75 maintient la voie Wnt active et donc le statut mésenchymateux des cellules du CEO. Nous nous sommes donc questionnés sur le rôle que jouerait LY75 dans le maintien de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans un statut actif et donc le maintien de l'EMT. Ce récepteur du système immunitaire interagirait-il avec les antagonistes de cette voie ou de l'EMT? Nous avons donc procédé à la recherche des partenaires d'interaction de LY75 dans les cellules du CEO. Les résultats de l'immunoprécipitation suivis par une analyse en spectrométrie de masse nous ont révélé 23 nouveaux partenaires de

LY75. Ces partenaires sont identifiés dans l'organisation du cytosquelette d'actine et/ou dans les interactions cellules/cellules (Tableau 1.2 chapitre 1). La desmoplakine (DSP), AHNAK (*Neuroblast differentiation-associated protein* : protéine associée à la différenciation des neuroblastes et aussi à la plaque desmosomale) ainsi que la SPTBN1 (chaîne de spectrine- $\beta$ ) figurent parmi les partenaires de LY75. Il est intéressant de mentionner que ces trois partenaires sont identifiés comme des inhibiteurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, bien que le mécanisme d'action soit incertain, la protéine AHNAK est associée à la dégradation de la  $\beta$ -caténine [477]. Une toute récente étude dans le cancer gastrique a rapporté que la répression de AHNAK par le miR-93-5p favorise l'EMT via l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine [478]. La protéine SPTBN1 maintient la kallistatine et participe ainsi dans la dégradation de la  $\beta$ -caténine donc dans l'inhibition de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine [479]. La DSP maintient l'expression de la plakoglobine (également appelée  $\gamma$ -caténine) qui est une protéine desmosomale homologue de la  $\beta$ -caténine (46). La plakoglobine et la  $\beta$ -caténine partagent les mêmes partenaires d'interaction. La plakoglobine module la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et peut rivaliser la  $\beta$ -caténine dans l'interaction avec le TCF/LEF. Tenant compte de toutes ces informations, nous proposons que la mécanistique de LY75 dans le maintien de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine active serait via ses partenaires d'interaction. D'un côté, LY75 réorganiserait le cytosquelette d'actine et les interactions cellules-cellules via son interaction avec entre-autre la desmoplakine et autres protéines régulatrices des jonctions cellulaires. La rupture de ces interactions conduirait à la libération de  $\beta$ -caténine membranaire. D'un autre côté, LY75 séquestre les inhibiteurs de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (AHNAK, DSP et SPTBN1) et protège ainsi la  $\beta$ -caténine de la dégradation et favorise son enrichissement et sa translocation au noyau pour induire l'expression des EMT-TFs. La figure A.2 illustre le modèle que nous proposons pour la régulation de l'EMT par LY75. En résumé, LY75 exprimée par les cellules mésenchymateuses interagit avec ses partenaires dont les protéines desmoplakine, AHNK et spectrine- $\beta$  connues pour leur régulation négative de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Or, nous avons montré précédemment que LY75 maintient cette voie active dans les cellules mésenchymateuses du CEO. Dans cet ordre d'idées nous pensons que LY75 séquestre ces inhibiteurs potentiels de la voie Wnt afin de la maintenir active. En présence de LY75, la voie Wnt étant active dans la cellule mésenchymateuse, la protéine  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme et transloque au noyau pour finir par activer la transcription des gènes

impliqués dans l'EMT, comme par exemple *SNAIL*, *TWIST* et *ZEB*. Ces gènes ont pour rôle la répression des protéines épithéliales. La répression principalement de la E-cad va libérer d'avantage la  $\beta$ -caténine emprisonnée dans la membrane plasmique pour transloquer de nouveau vers le noyau et maintenir la voie Wnt active qui à son tour va promouvoir l'EMT. Nous assistons donc à un profil mésenchymateux. À l'inverse, la déplétion de LY75, lève la séquestration sur les partenaires inhibiteurs de la voie Wnt. Il en résulte alors l'inactivation de Wnt/ $\beta$ -caténine. Les gènes cibles de cette voie ne s'expriment plus. La répression des EMT-FTs (*SNAIL*, *ZEB* et *TWIST*) engendre d'un côté l'arrêt d'expression des marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine, fibronectine...) et d'un autre côté, la réexpression de la E-cadhérine et autres marqueurs épithéliaux. La  $\beta$ -caténine va se relocaliser à la membrane plasmique pour être impliquée dans les jonctions cellulaires avec la E-cadhérine. Pour maintenir cet équilibre, l'excès de  $\beta$ -caténine est dégradé constamment par le complexe destructeur Axin/APC/GSK-3 $\beta$ . La nouvelle cellule réorganise alors son cytosquelette et ses interactions avec les cellules voisines via l'apparition des jonctions adhérentes et des desmosomes pour finaliser sa transition mésenchymato-épithéliale.

### **3.3 Étude *in vivo* du potentiel métastatique et de la résistance au traitement des cellules SKOV3 en EMT**

Dans l'étude portant sur le chapitre 2 nous avons utilisé le modèle SKOV3 de l'EMT/MET (SKOV3-M/SKOV3-E) médié par la modulation de l'expression du gène LY75 pour étudier *in vivo* le potentiel métastatique et la résistance au carboplatine des cellules SKOV3 en EMT. Pour ce faire, dans une première phase de l'étude, nous avons injecté par voie orthotopique IB les cellules SKOV3-M, SKOV3-E ou un mix (1:1) SKOV3-M/E dans trois groupes de 5 souris SCID immunodéficientes tel que décrit dans le schéma expérimental (Figure A.3). Les résultats de cette première phase (Figure 2.1A) montrent que les cellules SKOV3-E et les cellules Mix (SKOV3-M+SKOV3-E) seraient plus susceptibles de développer des tumeurs que les cellules mésenchymateuses SKOV3-M. En effet, les cellules SKOV3-M prennent le double de temps nécessaire aux cellules SKOV3-E et mix pour induire les tumeurs et métastases observées qui aboutissent à la mort de l'animal. Ces résultats n'étaient pas attendus. En effet, on s'attendait est ce que les cellules SKOV3-E forment plus rapidement les tumeurs aux sites primaires (ovaires injectés) mais on ne s'attendait pas à ce que ces cellules épithéliales causent plus rapidement les métastases observées. En effet, l'EMT est

un processus réversible par lequel les cellules épithéliales perdent leur polarité apicale -basale et leur adhérence cellule-cellule pour devenir des cellules mésenchymateuses plus fusiformes avec des capacités migratoires accrues. Au cours de ce processus, la E-cadhérine, un composant important des jonctions adhérentes, est réprimée ainsi que les occludines, les claudines, l'EpCAM, l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$ , la famille des miR200s et différentes cytokératines qui sont importantes pour la stabilisation des desmosomes. Simultanément, la vimentine, la fibronectine, la N-cadhérine, les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  et les MMPs sont régulées à la hausse [480]. La régulation négative des gènes épithéliaux et positive des gènes mésenchymateux observée est principalement due à un réseau complexe de facteurs de transcription de l'EMT comme par exemple ZEB1/ZEB2, SNAIL SLUG et TWIST1/2 [319, 480, 481]. Comme mentionné auparavant, ces différents facteurs répriment principalement la E-cadhérine en la liant directement [329, 333]. Or, comme nous avons déjà montré auparavant, les cellules SKOV3-M présentent une forte expression des marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, fibronectine, SNAIL et TWIST) et une répression des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, EpCAM), alors que les cellules SKOV3-E issues de la répression de LY75 sont quant à elles dotées de plus de marqueurs épithéliaux par exemple la E-cadhérine, EpCAM mais manquent de marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, fibronectine et SNAIL) [239]. Le rôle de l'EMT dans les métastases est remis en question [482, 483]. En effet, la suppression des facteurs de transcription de l'EMT: SNAIL et TWIST dans un modèle murin génétiquement modifié d'adénocarcinome pancréatique n'a pas entraîné de changements significatifs quant à la progression tumorale et aux métastases [484]. De plus, dans un autre modèle de cancer de poumon, la surexpression des miR-200s ne ralentit pas le développement de métastases pulmonaires [485].

### **3.4 Caractérisation du phénotype hybride des cellules SKOV3 en EMT**

L'EMT a toujours été considérée comme un processus binaire avec deux populations cellulaires bien distinctes: épithéliale et mésenchymateuse et qui est caractérisée par la perte d'expression du marqueur épithélial: la E-cadhérine et le gain d'expression des marqueurs mésenchymateux: la N-cadhérine et la vimentine [444, 481]. Cependant, de plus en plus d'études rapportent que l'EMT se fait de manière progressive, et les cellules passent par des états exprimant des caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses et présentant des caractéristiques morphologiques transcriptionnelles et épigénétiques intermédiaires entre les

cellules épithéliales et mésenchymateuses. Ces états intermédiaires entre le phénotype épithélial et complètement mésenchymateux sont appelés EMT hybride, partielle ou incomplète [296, 299, 452, 486-488]. De plus, d'autres études rapportent que dans différents cancers incluant le cancer de l'ovaire que les cellules hybrides en culture *in vitro* présentent des caractéristiques plus prolifératives et invasives [392, 452, 489, 490]. Il a été aussi montré que les IHCs de CEO de type séreux (le type le plus agressif) sont souvent positives aux deux marqueurs : la E-cadhérine et la vimentine [451]. Les cellules SKOV3-E en effet, expriment fortement et simultanément la vimentine et la E-cadhérine (Figure 2.3). Les IHCs de souris SKOV3-E et Mix montrent également cet état hybride justifié par l'expression forte et simultanée de la vimentine et de la E-cadhérine par comparaison au souris SKOV3-M (Figure 2.4). De plus, les tumeurs des animaux injectés par SKOV3-E et Mix montrent une expression soutenue des gènes *OVOL2* et *GRHL2* connus comme des facteurs de stabilité phénotypique (FSPs). Ces FSPs répriment ZEB1 pour empêcher la progression de l'EMT à un état mésenchymateux complet et ainsi stabilisent les cellules dans un état hybride tel que démontré auparavant par d'autres études [296, 487, 491]. Les tumeurs extraites des souris de la phase 1 (Figure 2.5) montrent également une plus forte expression de GRHL2 et OVOL2 par rapport aux souris contrôles (SKOV3-M). De plus, les rapports de OVOL2/ZEB1 ou GRHL2/ZEB1 sont plus élevés dans les cellules SKOV3-E et mix en comparaison aux souris contrôles SKOV3-M ce qui renseigne sur l'état hybride des cellules SKOV3-E. Nous pouvons donc considérer maintenant les cellules SKOV3-E comme étant des cellules SKOV3-E/M (hybrides).

### **3.5 Lien entre l'EMT hybride et le caractère souche des cellules cancéreuses**

Il a été observé que les cellules hybrides sont plus agressives que les cellules avec un état mésenchymateux complet. Ce fait indique que l'EMT-partielle pourrait conduire à la formation d'ascite et au développement de métastases péritonéales observées dans le CEO. En effet, dans le CEO, les cellules hybrides (E/M) présentent des caractéristiques de CSCs et peuvent stimuler la croissance tumorale [453]. La nouvelle théorie des CSCs affirme que les cancers sont constitués de populations cellulaires avec des phénotypes différents. Ces cellules possèdent un potentiel tumorigène élevé. Ces populations de cellules hiérarchiques sont soutenues par des cellules initiatrices de tumeur appelées les CSCs [492, 493]. Ces CSCs ont la capacité de s'autorenouveler et de donner naissances à plusieurs lignées différenciées



établissant ainsi une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle dans l'organisation hiérarchique des tumeurs [494, 495]. Dans le cas du cancer de l'ovaire, les CSCs sont isolées des tumeurs et de l'ascite grâce à des marqueurs spécifiques qu'elles expriment comme par exemples ALDH, CD133 (PROM1), CD44, EpCAM, CD24, CD117 (C-KIT), LGR5, ABCG2, NANOG, OCT4 et LY6A [493, 496]. Tous ces marqueurs sont associés à l'initiation et à la progression tumorale. Les cellules SKOV3-E/M expriment en effet les marqueurs des CSCs qui sont derrière les caractéristiques invasives et de résistances aux traitements observées *in vivo*. En effet, parmi les marqueurs des CSCs, ALDH1/2 (aldéhyde déshydrogénase) est fortement exprimée dans les CEOs les plus agressifs. Il a été démontré que les cellules ALDH<sup>+</sup> sont plus invasives et résistantes aux traitements que les cellules ALDH<sup>-</sup> [497]. De même, le marqueur ABCG2 (*ATP-binding cassette, subfamily G, member 2*) est également associé au phénomène de résistance du CEO au cis-diamminedichloroplatinum (cisplatine/DDP) grâce à sa fonction d'oxydoréduction [498, 499]. PROM1 (*prominin-1*) aussi appelé CD133 est aussi connu pour ses rôles dans le CEO en lien avec la tumorigenèse, les métastases et la résistance aux traitements. Une étude récente dans un modèle *in vivo* du cancer de l'ovaire a démontré que CD133 favorise l'attachement des cellules cancéreuses métastatiques au mésothéliome, et que l'abolition de CD133 augmente le temps de survie des animaux [500]. EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecules*) est un autre marqueur des CSCs surexprimé dans les CEOs et étroitement lié à l'invasion des cellules malignes issues de l'ascite, à la chimiorésistance et à la réduction de la survie des patientes avec un cancer de l'ovaire [501]. EpCAM semble aussi compromettre les traitements de chimiothérapie chez les patientes atteintes de CEO via la régulation négative de l'apoptose. De plus, il a été montré dans un modèle *in vivo* de souris, que les agents de platine éliminent préférentiellement les cellules EpCAM<sup>-</sup>, ce qui suggère que la sous population de cellules EpCAM<sup>+</sup> restante contribuerait à la récurrence du CEO après traitement [502]. Le gène de pluripotence et d'auto-renouvellement *BM1* (*B lymphoma mouse Moloney leukemia virus insertion region 1*) est surexprimé dans plusieurs cancers incluant le cancer du sein [503], du poumon [504] et de l'ovaire [505] où il joue un rôle dans l'invasion et les métastases des tumeurs suite à son activité promotrice de l'EMT. Récemment, *BM1* a aussi été identifié comme étant surexprimé dans le cancer endométrioïde où sa suppression est accompagnée par la répression de vimentine et l'expression de E-

cadhérine affectant ainsi l'EMT. La répression de BMI1 est aussi corrélée avec la répression des facteurs de pluripotence et de chimiorésistance tels que KLF4, SOX2 et MRP-1 [506]. Le cluster de différenciation CD44 est largement utilisé en combinaison avec d'autres marqueurs pour isoler les CSCs des tumeurs solides [507, 508]. CD44 est un récepteur membranaire de l'acide hyaluronique impliqué dans l'EMT en maintenant le niveau d'expression de ZEB1 [509]. CD44 est largement utilisé comme marqueur de surface pour isoler les CSCs des cancers du sein, de la prostate, du pancréas, du colon et de l'ovaire [510, 511]. Dans le cancer de l'ovaire, CD44 en combinaison avec d'autres marqueurs de surface peut également distinguer plusieurs sous-ensembles de tumeurs en différenciant notamment les phénotypes [392]. Cependant, il existe une contradiction dans la corrélation du niveau d'expression de CD44 et le pronostic des différents cancers. En effet, dans plusieurs cancers, CD44 joue un rôle majeur dans l'initiation [512], les métastases [494, 513, 514] et la promotion de la tumorigenèse [515]. Ces observations sont toutefois controversées dans d'autres cancers comme par exemple dans le cancer du sein [516] et de la prostate [517], où la forte expression de CD44 n'est pas associée à la carcinogenèse [518]. De plus, CD44 est exprimé dans presque toutes les cellules normales et cancéreuses ce qui conduit à des divergences et ambiguïtés concernant les aspects fonctionnels du CD44 dans le pronostic de la maladie et dans le maintien des CSCs [511]. La corrélation entre l'expression des marqueurs de surface des CSCs et le développement du cancer (initiation, progression et métastases) est remise en question et semble différer d'un type de cancer à un autre. En effet, chaque marqueur montre un niveau d'expression indépendant et semble avoir une coordination avec d'autres marqueurs dans le développement des cancers à différents stades. Ainsi, plusieurs études ont rapporté que les cellules CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> ont le potentiel d'initier le CEO [409, 519, 520]. Le potentiel tumorigénique de ces cellules semble s'accroître avec l'expression additionnelle de CD133 [507]. D'autres études rapportent aussi que les cellules ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/EpCAM<sup>+</sup> ont le potentiel d'initiation, de propagation, de métastase et de résistance au traitement dans le CEO [521, 522]. Les cellules CSCs sont également caractérisées par l'expression des gènes de pluripotence et dédifférenciation cellulaire tels que *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* et *KLF4* [523, 524]. Il a été rapporté que les CSCs isolées de tumeurs primaires de l'ovaire, contiennent des niveaux élevés de NANOG et de OC3/4 et corrélerent avec les CEOs de type séreux de haut grade et à la résistance au traitement. NANOG

est suggéré comme biomarqueur pronostique pour la détection des CEOs de stades I et II [525, 526].

Dans leur ensemble, nos résultats montrent que les cellules SKOV3-E/M (hybrides) sont ALDH<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/EpCAM<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup>/OCT3/4<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup>/BMI<sup>-</sup> par comparaison aux cellules SKOV3-M qui sont CD44<sup>+</sup>/BMI<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/NANOG<sup>+</sup>/OCT3/4<sup>+</sup>/ALDH<sup>-</sup>/EpCAM<sup>-</sup>. Les cellules SKOV3-M présentent aussi les caractéristiques de CSCs. Cependant, ces caractéristiques sont plus accentuées dans les cellules SKOV3-E/M (Figure 2.5) ce qui explique le potentiel d'initiation, de métastase, et de résistance au carboplatine observé dans notre modèle *in vivo*. Le phénomène de résistance au traitement observé dans le CEO est corrélé en partie avec la voie Wnt/ $\beta$ -caténine qui est une voie active et promotrice de l'EMT. Il est aussi démontré que la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine maintient les CSCs dans le cancer de l'ovaire [527-529]. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine régule la prolifération cellulaire, la polarité, la survie et le devenir des cellules souches dans l'homéostasie des tissus embryonnaires et adultes [530]. La  $\beta$ -caténine est le médiateur clé de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine. En l'absence du ligand Wnt, la  $\beta$ -caténine est dégradée après sa phosphorylation par le complexe de destruction composé principalement des protéines Axin1, APC et de la kinase GSK3 $\beta$ . En présence du ligand Wnt, le complexe de destruction est inhibé ce qui permet la translocation de  $\beta$ -caténine au noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles via le complexe TCF-LEF [530, 531]. De plus en plus de preuves montrent que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine régule de nombreux aspects clés dans le développement du cancer incluant le maintien des CSCs, des métastases et la chimiorésistance [412, 413]. Dans l'article précédent (Chapitre 1) nous avons montré que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine pouvait être épigénétiquement régulée durant l'EMT médiée par LY75. En effet, LY75 maintient cette voie active et à son tour elle soutient le statut mésenchymateux des cellules SKOV3-M, tandis que dans les cellules SKOV3-E la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est inactive [1]. Dans notre modèle *in vivo*, contrairement aux souris SKOV3-M, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine semble aussi inactive dans les souris SKOV3-E/M pourtant ce sont ces cellules SKOV3-E/M qui affichent le plus les caractéristiques des CSCs et de résistance au traitement. Une récente étude suggère que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine compromet l'évolution du CEO de haut grade en changeant le microenvironnement tumoral entre-autre en réprimant les marqueurs de CSCs dont CD133 et en provoquant la différenciation cellulaire. En effet, cette étude rapporte que le CEO de haut grade progresse

plus agressivement dans un milieu riche en marqueurs de pluripotency cellulaire et exempt de Wnt [415]. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine est en effet fermée dans les cellules SKOV3-E/M. Ces cellules hybrides expriment un niveau plus haut des marqueurs de CSCs et sont les plus agressives pour la formation et les métastases des tumeurs.

### **3.6 Analyse du mécanisme de résistance des cellules hybrides SKOV3-E/M au carboplatine**

Les IHCs des souris SKOV3-E/M montrent que les cellules SKOV3 hybrides sont les plus résistantes au carboplatine. En effet, elles présentent une forte expression des marqueurs de dommage et de réparation de l'ADN ( $\gamma$ -H2AX, RAD51). Cependant, malgré la forte expression des protéines d'apoptose (PUMA, caspase3 activée) et de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire P21, nous constatons une plus forte expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les souris SKOV3-E/M par comparaison aux souris SKOV3-M. Ceci serait en lien avec l'expression forte et soutenue du suppresseur de tumeur p53 dans les souris SKOV3-E/M. En effet, il est rapporté que p53 est mutée dans au moins 50% des cancers humains [532, 533]. En l'absence du stress cellulaire, l'expression de p53 de type sauvage (p53wt) est maintenue à un niveau minimum par l'ubiquitine ligase MDM2. Suite à un stress, p53 se stabilise et s'active pour induire l'expression des gènes de plusieurs mécanismes cellulaires incluant les gènes d'arrêt du cycle cellulaire, d'apoptose, de sénescence, de suppresseur de tumeurs, de réparation de l'ADN, d'autophagie ainsi que des gènes impliqués dans les mécanismes qui s'opposent à la reprogrammation oncogénique [534]. Le mutant p53 est caractérisé par la perte de ces fonctions suppressives de tumeurs et un gain de fonctions oncogéniques. Dans le CEO, il est généralement admis dans la littérature qu'une très forte expression, une très faible expression ou une expression totalement absente de p53 est corrélée avec la forme mutée de la protéine, alors qu'une expression intermédiaire entre ces extrêmes concernerait p53 wt [535, 536]. p53 mutée (p53mt) présente une plus grande stabilité que p53wt du fait que cette forme mutée est incapable de se lier à l'ubiquitine ligase MDM2 grâce à l'interaction de P53mt avec les protéines chaperonnes HSP40\90 ce qui conduit à l'accumulation de p53mt dans les cellules cancéreuses [537]. La protéine p53mt devient la gardienne des cellules cancéreuses et veille au maintien de leur métabolisme et leur homéostasie [538]. La résistance au traitement est la principale cause de l'échec de la chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire. Les mécanismes de résistance impliquant la

protéine P21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) figurent parmi les études réalisées afin de percer le mystère de l'échec du traitement observé dans le CEO. Sous le contrôle de p53, la protéine P21 est surtout connue pour son rôle inhibitrice des kinases dépendantes des cyclines (CDK) permettant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire [539]. P21 peut toutefois favoriser la survie cellulaire via la voie des PI3/AKT [540]. P21 peut donc réguler positivement ou négativement le cycle cellulaire. Sous l'effet du cisplatine, P21 est surexprimée dans les cellules du cancer de l'ovaire sous l'induction de la voie PI3/AKT [541]. En effet, PI3/AKT phosphoryle directement la thréonine 145 et la sérine 146 dans la partie C-terminale de P21 et stimule ainsi la prolifération cellulaire [542] en compromettant l'association P21 et CDK d'une part et en favorisant la stabilité de P21 d'autre part [542]. Ces événements de phosphorylation induisent aussi la relocalisation cytoplasmique de P21 [543]. La relation entre la localisation cytoplasmique de P21 et la résistance au cisplatine a été rapportée dans plusieurs cancers comme par exemple le cancer testiculaire [544], le cancer du foie [545] et le cancer du sein [546]. Dans le cancer de l'ovaire, l'expression de P21 cytoplasmique est corrélée avec la progression tumorale et est considérée comme un biomarqueur de la résistance au cisplatine [547]. P21 cytoplasmique peut aussi se lier aux protéines apoptotiques telles que pro-caspase 3, caspase 8, caspase 9 et caspase 10 et inhiber leur action. P21 peut également inhiber les kinases régulatrices de l'apoptose SAPK (*stress-activated protein kinase*) et ASK1 (*apoptosis signalregulating kinase 1*) protégeant ainsi les cellules cancéreuses de l'apoptose [548, 549]. De plus, il est connu dans la littérature que l'EMT et le cycle cellulaire sont couplés à différents stades et peuvent être spécifiques à certains types cellulaires. Il est rapporté notamment que certains facteurs régulent l'EMT et le cycle cellulaire différemment. Plus précisément, il a été démontré que SNAIL initialise l'EMT et augmente l'expression de P21 alors que TWIST est activé à un stade ultérieur pour maintenir l'EMT et réprimer P21 [550]. Une récente étude suggère que les cellules présentant une expression soutenue et forte de P21 subissent un arrêt du cycle cellulaire et favorisent l'EMT hybride [551]. Dans notre étude, suite au traitement par carboplatine, nous constatons dans les souris SKOV3-E/M que l'expression de p53 est soutenue ce qui suggère que cette protéine est mutée et donc protégée de la dégradation par l'ubiquitine MDM2, et que les protéines apoptotiques sont fortement exprimées quoique le marqueur de prolifération Ki67 affiche un fort marquage témoignant d'un indice mitotique élevé. Nous remarquons aussi que

la protéine P21 est fortement exprimée dans les souris SKOV3-E/M par comparaison aux souris SKOV3-M. De plus, cette protéine du cycle cellulaire est de localisation cytoplasmique et nucléaire dans les souris SKOV3-E/M ce qui explique la résistance au traitement observée. Cette résistance au traitement est aussi constatée par la forte expression de Ki67 dans les tumeurs isolées des souris SKOV3-E/M (figure 2.6).

La figure A.4 illustre le modèle de la résistance des cellules hybrides au carboplatine. En résumé, dans une cellule normale, suite à un dommage à l'ADN, la protéine p53 s'exprime en réponse à ces dommages et induit l'expression des gènes de signalment et de réparation de l'ADN (RAD51, DNAPkc et Ku70) de même que les gènes d'apoptose (puma et bax) et d'arrêt du cycle cellulaire (p21) et dirige ainsi la cellule vers la réparation si les dommages ne sont pas très importants ou vers l'apoptose dans le cas où la réparation n'est pas possible. p53 induit également l'expression de la protéine MDM2 responsable de sa rétro-régulation par un mécanisme d'ubiquitination suivi de dégradation par le protéasome. La protéine p53 ainsi est considérée la gardienne du génome. Dans le cas d'une cellule cancéreuse (dans 50% des cancers y compris le cancer de l'ovaire) suite au dommage généré par le traitement (carboplatine dans ce cas), cette cellule induit l'expression de p53 mutée (mt-p53). Cette forme mutée assure la survie de la cellule cancéreuse en induisant notamment l'expression des protéines de choc thermique et chaperonnes HSP90/40 (*Heat shock proteins 90/40*) afin de bloquer son association avec la protéine régulatrice MDM2. Cette p53-mt provoque aussi l'expulsion de p21 du noyau au cytoplasme suite à sa phosphorylation afin de contrer l'arrêt du cycle cellulaire. Une fois dans le cytoplasme, p21 s'associe à la caspase 3 afin de bloquer l'apoptose et de favoriser la prolifération de la cellule et sa résistance au traitement. La protéine p53 mutée est donc la gardienne de la cellule cancéreuse (figure A.4).

Les cellules SKOV3-M sont tout aussi métastatiques et résistantes au traitement que les cellules SKOV3-E/M (hybrides). Toutefois, les cellules SKOV3-M nécessitent plus de temps pour induire les métastases que les cellules SKOV3-E/M. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine semble être au cœur de cette plasticité cellulaire lors de l'EMT faisant de LY75 un marqueur à la fois oncogénique et suppresseur de tumeur selon l'état de la cellule.

## Conclusion et perspectives

L'EMT a toujours été considéré comme un évènement déclencheur des métastases dans différents types de cancers. On a toujours pensé que les cellules épithéliales subissent une transformation radicale mais réversible à travers le MET faisant de cette transition un processus binaire. Les cellules sortantes de l'EMT sont de morphologie fusiforme et ne présentent aucun contact avec les autres cellules. Elles jouissent de l'expression de marqueurs dits mésenchymateux leur conférant la mobilité et le potentiel migratoire et invasif qui les caractérisent. Ce processus binaire est aussi associé au cancer de l'ovaire. Basé sur nos modèles de l'EMT médiée par la modulation d'expression de LY75, nous avons émis l'hypothèse que les cellules du CEO à phénotype mésenchymateux (SKOV3-M/OVCAR8-M exprimant LY75) seraient en effet plus agressives et plus chimiorésistantes que leurs clones à phénotype épithélial (SKOV3-E/OVCAR8-E) générés par LY75-KD. Ce potentiel tumorigène des cellules M du CEO serait expliqué par les modifications épigénétiques affectant principalement la méthylation de l'ADN des gènes impliqués dans les mécanismes d'initiation, de propagation et de résistance aux traitements du CEO. L'analyse de méthylation des cellules SKOV3 en EMT par RRBS nous a révélé effectivement que la méthylation de l'ADN est perturbée dans 6666 gènes dont le statut de méthylation est inversé entre SKOV3-M vs SKOV3-E. Parmi ces gènes, un groupe de 10 candidats dont la méthylation des CpGs et régions promotrices sont hautement perturbées (+ de 70%) a été sélectionné. Il s'agit des gènes *HOOK1*, *RAMP2*, *WNT3* et *JMJD8* qui sont hypométhylés dans SKOV3-M mais hyperméthylés dans SKOV3-E et des gènes: *KLF4*, *CLDN5*, *IFFO1*, *CEND1*, *EVX2* et *APC2* qui sont hyperméthylés dans SKOV3-M mais hypométhylés dans SKOV3-E. Le profil de méthylation et d'expression de ces gènes candidats a été validé par plusieurs approches alternatives (BSP, qPCR et Western blot). Ces gènes constitueraient de potentiels biomarqueurs dans la détection précoce ou dans la thérapeutique du CEO. L'analyse IPA des gènes différemment méthylés nous a renseigné sur la signalisation orchestrant cette EMT médiée par LY75 dans les cellules SKOV3. En effet, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine semble dominer et gouverner cette transition dans les cellules SKOV3 et OVCAR8. Cette voie métastatique est en effet active dans les cellules M et inactive dans les cellules E en corrélation avec la présence de LY75. En effet, nous pensons que le récepteur LY75 maintient cette voie active en séquestrant ses inhibiteurs. LY75 s'associe à la voie Wnt pour

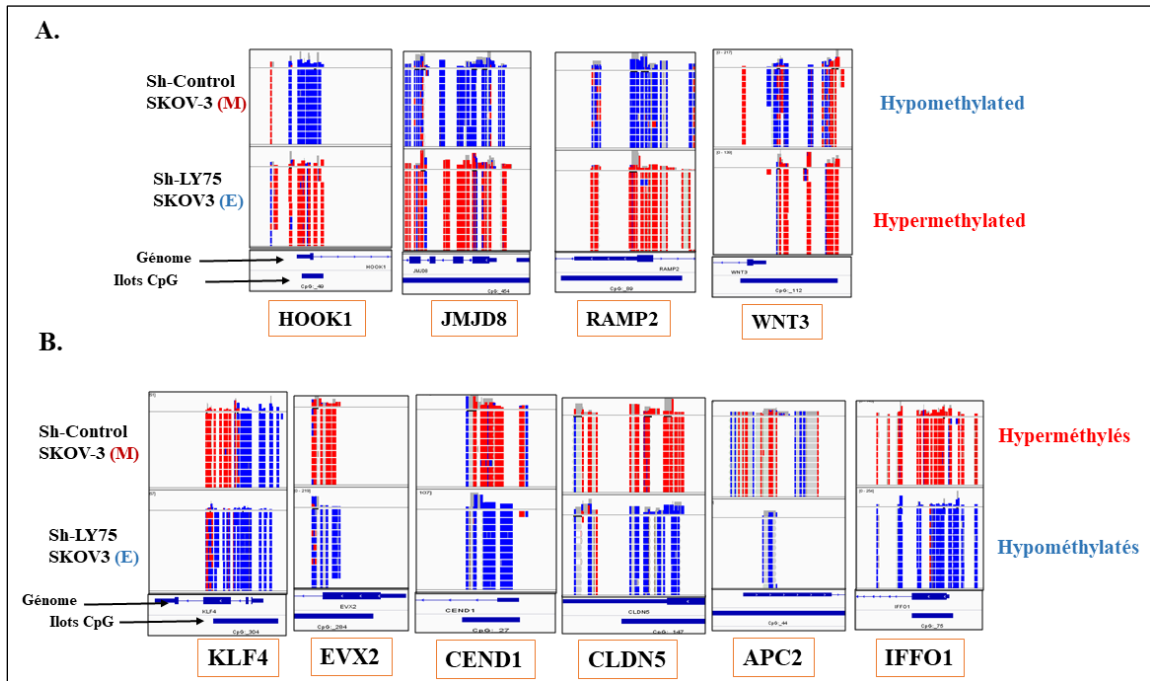
garder les cellules dans leur état mésenchymateux via ses interactions avec les protéines du cytosquelette d'actine. Contrairement à notre hypothèse, l'injection orthotopique IB des cellules SKOV3-M et E dans un modèle de souris SCID nous a révélé que les cellules SKOV3-E sont en effet plus agressives quant à l'initiation, la propagation et la résistance au carboplatine que leur forme parentale M. La caractérisation des cellules SKOV3-E a divulgué leur nature hybride caractérisée par une grande plasticité et une vive analogie aux cellules souches cancéreuses. Cette constatation a éclairé le mystère derrière leur agressivité face à la formation, aux métastases et à la résistance au carboplatine observée dans le modèle animal à l'étude. Bien que les cellules mésenchymateuses (SKOV3-M) possèdent un potentiel métastatique élevé probablement via la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, elles demeurent nettement moins agressives devant ces cellules issues d'une EMT-partielle. En effet, les cellules complètement mésenchymateuses nécessiteraient beaucoup plus de temps que les cellules hybrides dans la genèse des tumeurs et des métastases observées. Il est donc imminent de mieux caractériser cet état hybride qui semble être derrière la dissémination du CEO. Bien que LY75 soit un gène cible pour l'immunothérapie dans différents cancers, son inhibition dans le CEO semble générer des cellules hybrides avec des caractéristiques de CSCs beaucoup plus dangereuses que les cellules en EMT totale.

Il serait intéressant d'étudier le rôle de LY75 dans d'autres types de cancers. Les résultats préliminaires de sa déplétion dans les cellules H383 du cancer de poumons prédisent que ce récepteur des cellules dendritiques pourrait jouer le même rôle que celui observé dans le CEO. Toutefois, ce rôle n'est pas confirmé dans les cellules MDA231 du cancer du sein (Figure A.5). Afin de mieux comprendre la mécanistique de LY75 dans le maintien du profil mésenchymateux et de la voie Wnt, il serait intéressant d'identifier ses autres rôles dans la cellule en lien avec sa localisation et son interaction avec des protéines nucléolaires qui sont observées dans les cellules du CEO (Figure 1.5D et Table 1.2), du sein et de poumon (Figure A.6). En effet, LY75 pourrait accomplir d'autres missions en lien avec la formation et/ou le transport des ARN ribosomiaux (ARNr).



# Annexes

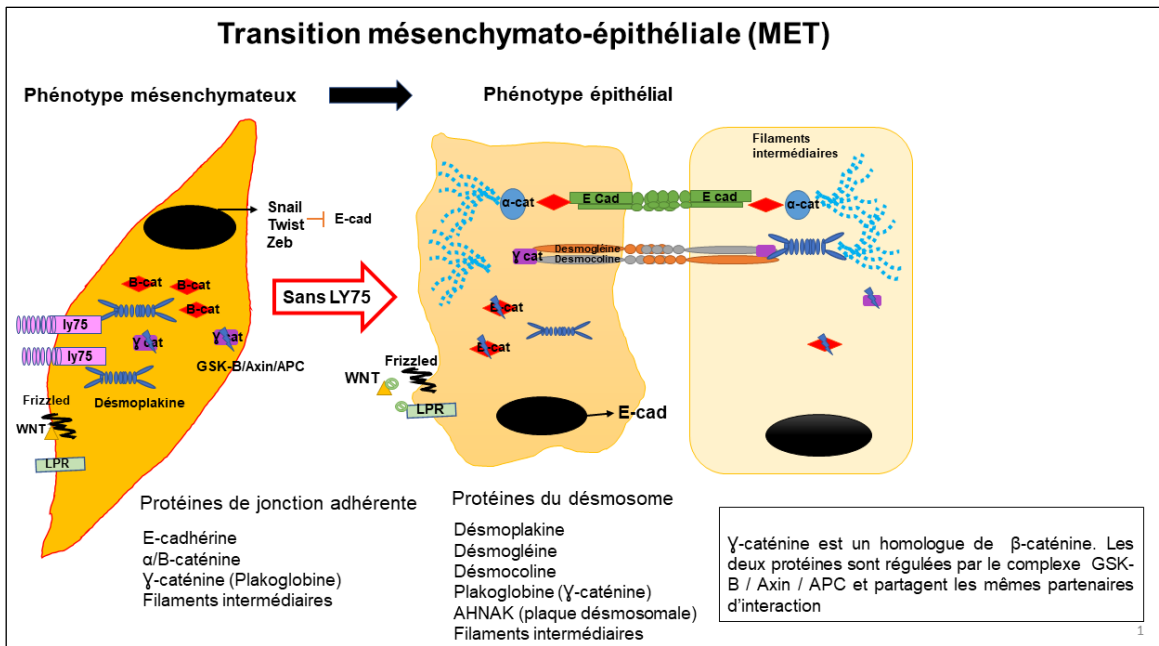
## Annexe 1



**Figure A. 1 :** Représentation des gènes dont la région promotrice affiche une méthylation aberrante suite au MET médiée par LY75 dans les cellules SKOV3.

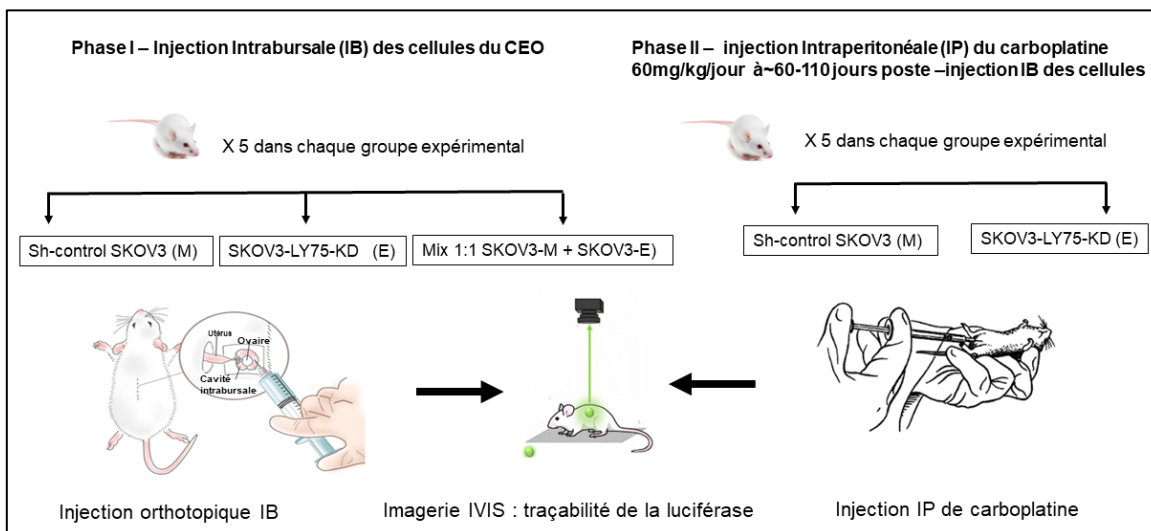
**A)** Profil IGV des quatre gènes sélectionnés hyperméthylés dans SKOV3-E par comparaison à SKOV3-M. **B)** Profil IGV des six gènes sélectionnés hypométhylés dans SKOV3-E par comparaison à SKOV3-M.

## Annexe 2



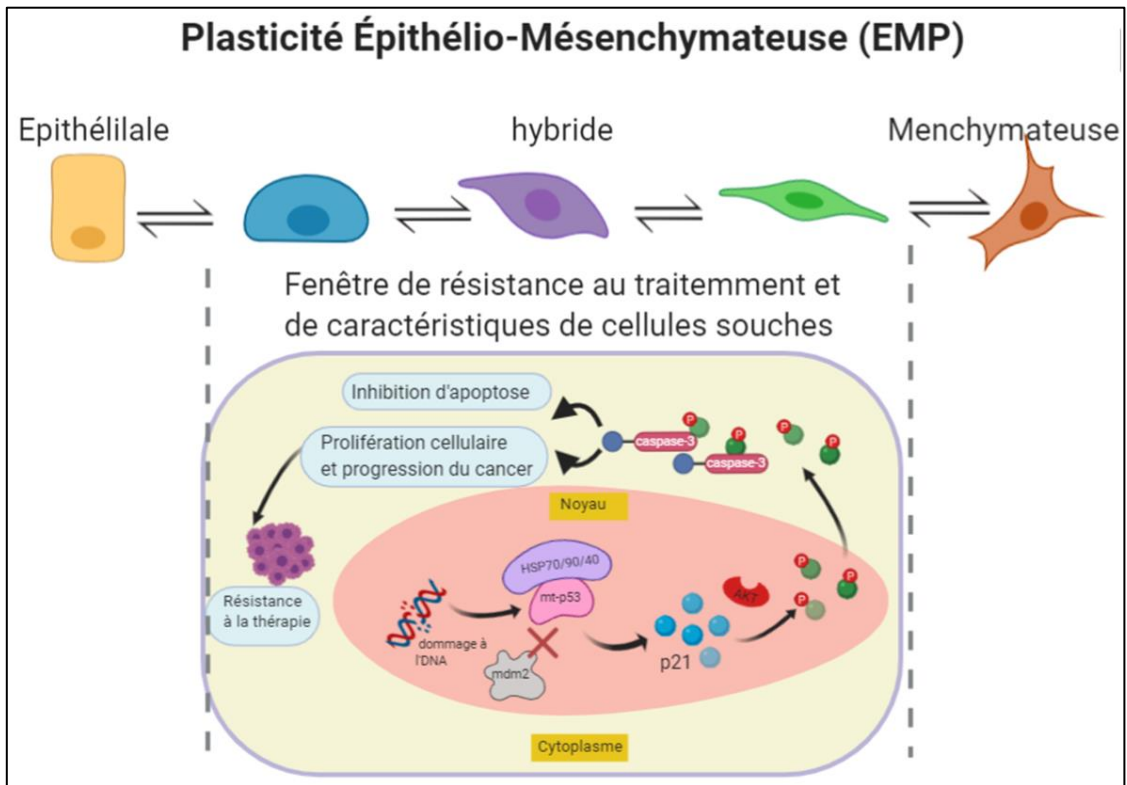
**Figure A. 2 :** Illustration du modèle de la régulation du MET et la voie Wnt/β-caténine par LY75.

### Annexe 3



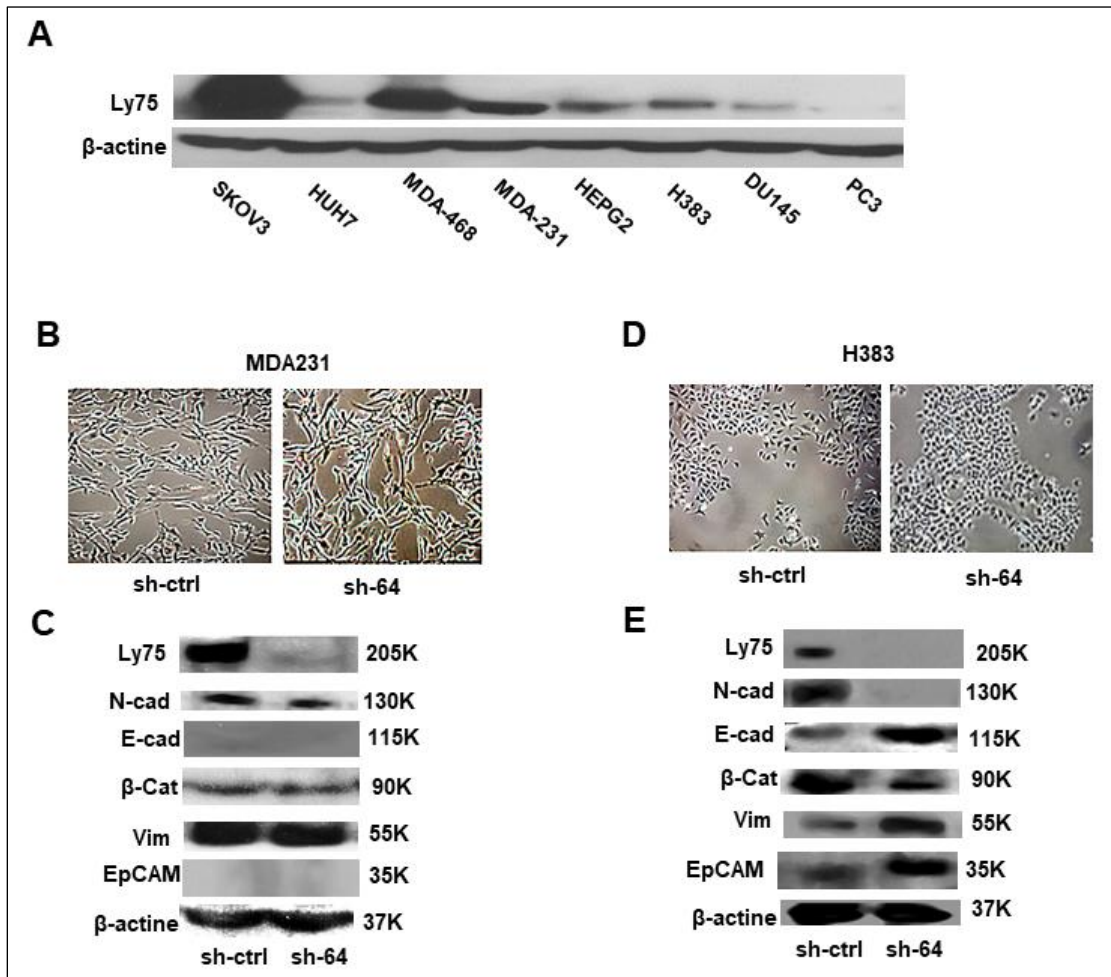
**Figure A. 3:** Schéma expérimental de l'étude *in vivo* du rôle de l'EMT dans la dissémination du CEO et la réponse au traitement.

## Annexe 4



**Figure A. 4:** Modèle moléculaire hypothétique de la résistance des cellules SKOV3-E/M Au traitement.

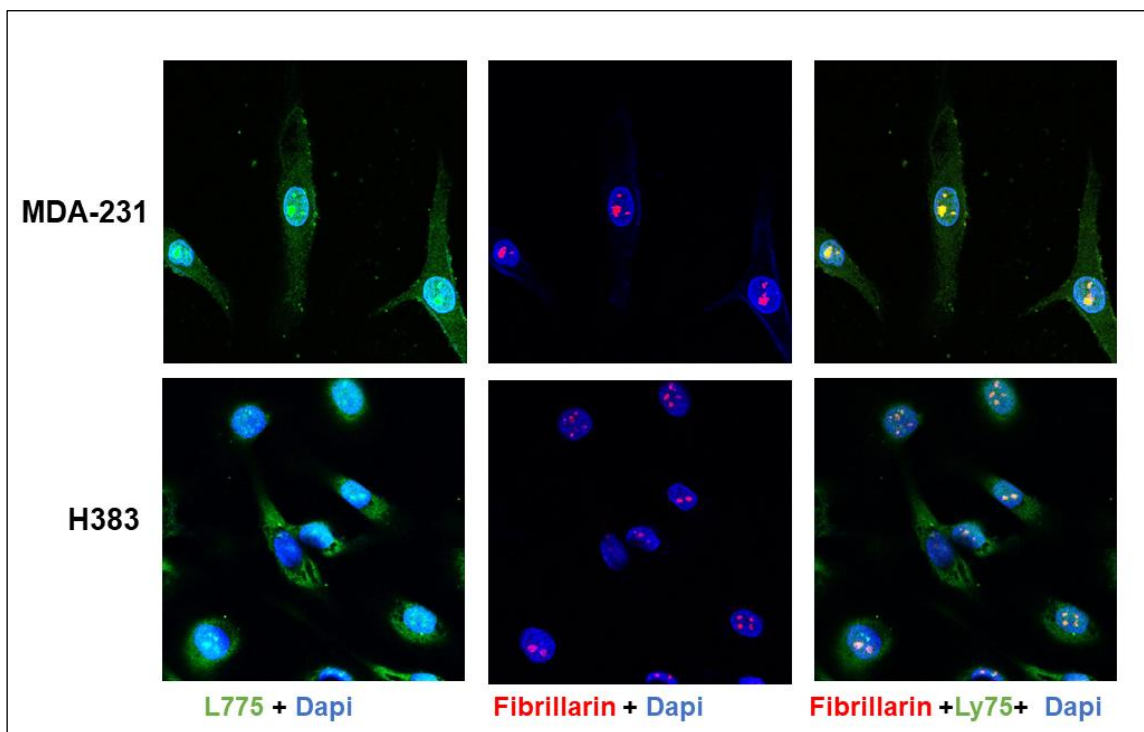
## Annexe 5



**Figure A. 5:** Analyse du rôle de LY75 dans d'autres cancers.

**A)** vérification par Western blot du niveau d'expression de LY75 dans différents types de cancer. **B)** Images représentatives des cellules du cancer du sein MDA231 sh-ctrl et le clone sh-64 (ly75-KD). **C)** Quantification par immuobuvardage (Western blot) des protéines LY75, N-cad, E-cad, B-cat, Vim, EpCAM dans les cellules MDA-231 control et LY75-KD. β-caténine est utilisé comme un contrôle de chargement. **D)** Images représentatives des cellules du cancer de poumon H383 sh-ctrl et le clone sh-64 (ly75-KD). **E)** Quantification par immuobuvardage (Western blot) des protéines LY75, N-cad, E-cad, B-cat, Vim, EpCAM dans les cellules MDA-231 control et LY75-KD. β-caténine est utilisé comme un contrôle de chargement.

## Annexe 6



**Figure A. 6:** Analyse par immunofluorescence de la colocalisation nucléolaire de Ly75 et fibrillarin dans les cellules du cancer du sein MDA-231 et les cellules du cancer de poumon H383.

## Bibliographie

1. Mehdi, S., Bachvarova, M., Scott-Boyer, M.-P., Droit, A., Bachvarov, D. "Ly75 Ablation Mediates Mesenchymal-Epithelial Transition (Met) in Epithelial Ovarian Cancer (Eoc) Cells Associated with DNA Methylation Alterations and Suppression of the Wnt/B-Catenin Pathway." *International Journal of Molecular Sciences* 21, no. 5 (2020): 1848.
2. Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. "Global Cancer Statistics." *CA Cancer J Clin* 61, no. 2 (2011): 69-90.
3. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in Globocan 2012." *Int J Cancer* 136, no. 5 (2015): 9.
4. Berns, E.M., Bowtell, D.D. "The Changing View of High-Grade Serous Ovarian Cancer." *Cancer Res* 72, no. 11 (2012): 2701-4.
5. Auersperg, N. "The Origin of Ovarian Cancers--Hypotheses and Controversies." *Front Biosci* 5 (2013): 709-19.
6. Vaughan, S., Coward, J.I., Bast, R.C., Jr., Berchuck, A., Berek, J.S., Brenton, J.D., Coukos, G., Crum, C.C., Drapkin, R., Etamadmoghadam, D., Friedlander, M., Gabra, H., Kaye, S.B., Lord, C.J., Lengyel, E., Levine, D.A., McNeish, I.A., Menon, U., Mills, G.B., Nephew, K.P., Oza, A.M., Sood, A.K., Stronach, E.A., Walczak, H., Bowtell, D.D., Balkwill, F.R. "Rethinking Ovarian Cancer: Recommendations for Improving Outcomes." *Nat Rev Cancer* 11, no. 10 (2011): 719-25.
7. Auersperg, N., Wong, A.S., Choi, K.C., Kang, S.K., Leung, P.C. "Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology." *Endocr Rev* 22, no. 2 (2001): 255-88.
8. Périer, C. *Anatomie Et Physiologie De L'ovaire*: P. Asselin, 1866.
9. Feki, A., Berardi, P., Bellingan, G., Major, A., Krause, K.H., Petignat, P., Zehra, R., Pervaiz, S., Irminger-Finger, I. "Dissemination of Intraperitoneal Ovarian Cancer: Discussion of Mechanisms and Demonstration of Lymphatic Spreading in Ovarian Cancer Model." *Crit Rev Oncol Hematol* 72, no. 1 (2009): 1-9.
10. Nicosia, S.V., Saunders, B.O., Acevedo-Duncan, M.E., Setrakian, S., Degregorio, R. "Biopathology of Ovarian Mesothelium." In *Ultrastructure of the Ovary*, edited by Giuseppe Familiari, Sayoko Makabe and Pietro M. Motta, 287-310. Boston, MA: Springer US, 1991.
11. Auersperg, N., Wong, A.S.T., Choi, K.-C., Kang, S.K., Leung, P.C.K. "Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology\*." *Endocrine Reviews* 22, no. 2 (2001): 255-88.
12. Okamura, H., Katabuchi, H. "Pathophysiological Dynamics of Human Ovarian Surface Epithelial Cells in Epithelial Ovarian Carcinogenesis." In *International Review of Cytology*, 1-54: Academic Press, 2004.
13. Brewer, M.A., Johnson, K., Follen, M., Gershenson, D., Bast, R. "Prevention of Ovarian Cancer: Intraepithelial Neoplasia." *Clinical cancer research* 9, no. 1 (2003): 20-30.
14. Rodriguez, G.C., Walmer, D.K., Cline, M., Krigman, H., Lessey, B.A., Whitaker, R.S., Dodge, R., Hughes, C.L. "Effect of Progestin on the Ovarian Epithelium of Macaques: Cancer Prevention through Apoptosis?" *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 5, no. 5 (1998): 271-76.
15. Rodriguez, G.C., Nagarsheth, N.P., Lee, K.L., Bentley, R.C., Walmer, D.K., Cline, M., Whitaker, R.S., Isner, P., Berchuck, A., Dodge, R.K. "Progestin-Induced Apoptosis in the Macaque Ovarian Epithelium: Differential Regulation of Transforming Growth Factor-B." *Journal of the National Cancer Institute* 94, no. 1 (2002): 50-60.
16. Yang, D.-H., Smith, E.R., Cohen, C., Wu, H., Patriotis, C., Godwin, A.K., Hamilton, T.C., Xu, X.-X. "Molecular Events Associated with Dysplastic Morphologic Transformation and Initiation of Ovarian Tumorigenicity." *Cancer* 94, no. 9 (2002): 2380-92.

17. Plaxe, S.C., Deligdisch, L., Dottino, P.R., Cohen, C.J. "Ovarian Intraepithelial Neoplasia Demonstrated in Patients with Stage I Ovarian Carcinoma." *Gynecol Oncol* 38, no. 3 (1990): 367-72.
18. Schildkraut, J.M., Bastos, E., Berchuck, A. "Relationship between Lifetime Ovulatory Cycles and Overexpression of Mutant P53 in 932 Epithelial Ovarian Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 89, no. 13 (1997): 932-38.
19. Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., Henderson, B.E. "Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer." *Cancer Res* 50, no. 23 (1990): 7415-21.
20. Cancer, Control, S.H.S.o.t.C.f.D., Health, t.N.I.o.C., Development\*, H. "The Reduction in Risk of Ovarian Cancer Associated with Oral-Contraceptive Use." *New England Journal of Medicine* 316, no. 11 (1987): 650-55.
21. Rosenberg, L., Palmer, J.R., Zauber, A.G., Warshauer, M.E., Lewis Jr, J.L., Strom, B.L., Harlap, S., Shapiro, S. "A Case-Control Study of Oral Contraceptive Use and Invasive Epithelial Ovarian Cancer." *American journal of epidemiology* 139, no. 7 (1994): 654-61.
22. Cramer, D.W., Welch, W.R. "Determinants of Ovarian Cancer Risk. Ii. Inferences Regarding Pathogenesis." *J Natl Cancer Inst* 71, no. 4 (1983): 717-21.
23. Mosgaard, B.J., Lidegaard, ø., Andersen, A.N. "The Impact of Parity, Infertility and Treatment with Fertility Drugs on the Risk of Ovarian Cancer: A Survey." *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 76, no. 2 (1997): 89-95.
24. Hakim, A.A., Barry, C.P., Barnes, H.J., Anderson, K.E., Petite, J., Whitaker, R., Lancaster, J.M., Wenham, R.M., Carver, D.K., Turbov, J., Berchuck, A., Kopelovich, L., Rodriguez, G.C. "Ovarian Adenocarcinomas in the Laying Hen and Women Share Similar Alterations in P53, Ras, and Her-2/Neu." *Cancer Prev Res (Phila)* 2, no. 2 (2009): 114-21.
25. Ng, A., Barker, N. "Ovary and Fimbrial Stem Cells: Biology, Niche and Cancer Origins." *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, no. 10 (2015): 625-38.
26. Keyvani, V., Farshchian, M., Esmaili, S.-A., Yari, H., Moghbeli, M., Nezhad, S.-R.K., Abbaszadegan, M.R. "Ovarian Cancer Stem Cells and Targeted Therapy." *Journal of Ovarian Research* 12, no. 1 (2019): 120.
27. Medeiros, F., Muto, M.G., Lee, Y., Elvin, J.A., Callahan, M.J., Feltmate, C., Garber, J.E., Cramer, D.W., Crum, C.P. "The Tubal Fimbria Is a Preferred Site for Early Adenocarcinoma in Women with Familial Ovarian Cancer Syndrome." *The American journal of surgical pathology* 30, no. 2 (2006): 230-36.
28. Piek, J.M., Kenemans, P., Verheijen, R.H. "Intraperitoneal Serous Adenocarcinoma: A Critical Appraisal of Three Hypotheses on Its Cause." *American journal of obstetrics and gynecology* 191, no. 3 (2004): 718-32.
29. Crum, C.P., Drapkin, R., Kindelberger, D., Medeiros, F., Miron, A., Lee, Y. "Lessons from Brca: The Tubal Fimbria Emerges as an Origin for Pelvic Serous Cancer." *Clinical medicine & research* 5, no. 1 (2007): 35-44.
30. Kindelberger, D.W., Lee, Y., Miron, A., Hirsch, M.S., Feltmate, C., Medeiros, F., Callahan, M.J., Garner, E.O., Gordon, R.W., Birch, C. "Intraepithelial Carcinoma of the Fimbria and Pelvic Serous Carcinoma: Evidence for a Causal Relationship." *The American journal of surgical pathology* 31, no. 2 (2007): 161-69.
31. Chivukula, M., Niemeier, L.A., Edwards, R., Nikiforova, M., Mantha, G., McManus, K., Carter, G. "Carcinomas of Distal Fallopian Tube and Their Association with Tubal Intraepithelial Carcinoma: Do They Share a Common "Precursor" Lesion? Loss of Heterozygosity and Immunohistochemical Analysis Using Pax 2, Wt-1, and P53 Markers." *ISRN obstetrics and gynecology* 2011 (2010).
32. Coan, M., Rampioni Vinciguerra, G.L., Cesaratto, L., Gardenal, E., Bianchet, R., Dassi, E., Vecchione, A., Baldassarre, G., Spizzo, R., Nicoloso, M.S. "Exploring the Role of Fallopian Ciliated Cells in the Pathogenesis of High-Grade Serous Ovarian Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 19, no. 9 (2018): 2512.



33. Zweemer, R.P., van Diest, P.J., Verheijen, R.H., Ryan, A., Gille, J.J., Sijmons, R.H., Jacobs, I.J., Menko, F.H., Kenemans, P. "Molecular Evidence Linking Primary Cancer of the Fallopian Tube to Brca1 Germline Mutations." *Gynecol Oncol* 76, no. 1 (2000): 45-50.
34. Paley, P.J., Swisher, E.M., Garcia, R.L., Agoff, S.N., Greer, B.E., Peters, K.L., Goff, B.A. "Occult Cancer of the Fallopian Tube in Brca-1 Germline Mutation Carriers at Prophylactic Oophorectomy: A Case for Recommending Hysterectomy at Surgical Prophylaxis." *Gynecol Oncol* 80, no. 2 (2001): 176-80.
35. Finch, A.P., Lubinski, J., Møller, P., Singer, C.F., Karlan, B., Senter, L., Rosen, B., Maehle, L., Ghadirian, P., Cybulski, C., Huzarski, T., Eisen, A., Foulkes, W.D., Kim-Sing, C., Ainsworth, P., Tung, N., Lynch, H.T., Neuhausen, S., Metcalfe, K.A., Thompson, I., Murphy, J., Sun, P., Narod, S.A. "Impact of Oophorectomy on Cancer Incidence and Mortality in Women with a Brca1 or Brca2 Mutation." *J Clin Oncol* 32, no. 15 (2014): 1547-53.
36. Hartmann, L.C., Lindor, N.M. "The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer." *N Engl J Med* 374, no. 5 (2016): 454-68.
37. Walker, J.L., Powell, C.B., Chen, L.M., Carter, J., Bae Jump, V.L., Parker, L.P., Borowsky, M.E., Gibb, R.K. "Society of Gynecologic Oncology Recommendations for the Prevention of Ovarian Cancer." *Cancer* 121, no. 13 (2015): 2108-20.
38. Piek, J.M., Van Diest, P.J., Zweemer, R.P., Jansen, J.W., Poort-Keesom, R.J., Menko, F.H., Gille, J.J., Jongsma, A.P., Pals, G., Kenemans, P. "Dysplastic Changes in Prophylactically Removed Fallopian Tubes of Women Predisposed to Developing Ovarian Cancer." *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 195, no. 4 (2001): 451-56.
39. Barakat, R.R., Federici, M.G., Saigo, P.E., Robson, M.E., Offit, K., Boyd, J. "Absence of Premalignant Histologic, Molecular, or Cell Biologic Alterations in Prophylactic Oophorectomy Specimens from Brca1 Heterozygotes." *Cancer* 89, no. 2 (2000): 383-90.
40. Visvanathan, K., Vang, R., Shaw, P., Gross, A., Soslow, R., Parkash, V., Shih Ie, M., Kurman, R.J. "Diagnosis of Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma Based on Morphologic and Immunohistochemical Features: A Reproducibility Study." *Am J Surg Pathol* 35, no. 12 (2011): 1766-75.
41. Jarboe, E., Folkins, A., Nucci, M.R., Kindelberger, D., Drapkin, R., Miron, A., Lee, Y., Crum, C.P. "Serous Carcinogenesis in the Fallopian Tube: A Descriptive Classification." *Int J Gynecol Pathol* 27, no. 1 (2008): 1-9.
42. Xiang, L., Rong, G., Zhao, J., Wang, Z., Shi, F. "Identification of Candidate Genes Associated with Tubal Origin of High-Grade Serous Ovarian Cancer." *Oncol Lett* 15, no. 5 (2018): 7769-75.
43. Zheng, G., Yu, H., Kanerva, A., Försti, A., Sundquist, K., Hemminki, K. "Familial Risks of Ovarian Cancer by Age at Diagnosis, Proband Type and Histology." *PLoS One* 13, no. 10 (2018): e0205000-e00.
44. Koch, M., Gaedke, H., Jenkins, H. "Family History of Ovarian Cancer Patients: A Case-Control Study." *International journal of epidemiology* 18, no. 4 (1989): 782-85.
45. Sogaard, M., Kjaer, S.K., Gayther, S. "Ovarian Cancer and Genetic Susceptibility in Relation to the Brca1 and Brca2 Genes. Occurrence, Clinical Importance and Intervention." *Acta Obstet Gynecol Scand* 85, no. 1 (2006): 93-105.
46. Schildkraut, J.M., Risch, N., Thompson, W.D. "Evaluating Genetic Association among Ovarian, Breast, and Endometrial Cancer: Evidence for a Breast/Ovarian Cancer Relationship." *American journal of human genetics* 45, no. 4 (1989): 521-29.
47. O'Donovan, P.J., Livingston, D.M. "Brca1 and Brca2: Breast/Ovarian Cancer Susceptibility Gene Products and Participants in DNA Double-Strand Break Repair." *Carcinogenesis* 31, no. 6 (2010): 961-7.

48. Taylor, N., Mutch, D.G. "Gynecologic Manifestations of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. From Inherited to Sporadic Disease." *Oncology (Williston Park)* 20, no. 1 (2006): 85-94; discussion 94-6, 100.
49. Offit, K., Kauff, N.D. "Reducing the Risk of Gynecologic Cancer in the Lynch Syndrome." *N Engl J Med* 354, no. 3 (2006): 293-5.
50. Lu, K.H., Dinh, M., Kohlmann, W., Watson, P., Green, J., Syngal, S., Bandipalliam, P., Chen, L.M., Allen, B., Conrad, P., Terdiman, J., Sun, C., Daniels, M., Burke, T., Gershenson, D.M., Lynch, H., Lynch, P., Broaddus, R.R. "Gynecologic Cancer as a "Sentinel Cancer" for Women with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome." *Obstet Gynecol* 105, no. 3 (2005): 569-74.
51. Hildreth, N.G., Kelsey, J.L., LiVolsi, V.A., Fischer, D.B., Holford, T.R., Mostow, E.D., Schwartz, P.E., White, C. "An Epidemiologic Study of Epithelial Carcinoma of the Ovary." *Am J Epidemiol* 114, no. 3 (1981): 398-405.
52. Cramer, D.W., Hutchison, G.B., Welch, W.R., Scully, R.E., Ryan, K.J. "Determinants of Ovarian Cancer Risk. I. Reproductive Experiences and Family History." *J Natl Cancer Inst* 71, no. 4 (1983): 711-6.
53. Whiteman, D.C., Siskind, V., Purdie, D.M., Green, A.C. "Timing of Pregnancy and the Risk of Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, no. 1 (2003): 42-6.
54. Rostgaard, K., Wohlfahrt, J., Andersen, P.K., Hjalgrim, H., Frisch, M., Westergaard, T., Melbye, M. "Does Pregnancy Induce the Shedding of Premalignant Ovarian Cells?" *Epidemiology* 14, no. 2 (2003): 168-73.
55. Rossing, M.A., Tang, M.T., Flagg, E.W., Weiss, L.K., Wicklund, K.G. "A Case-Control Study of Ovarian Cancer in Relation to Infertility and the Use of Ovulation-Inducing Drugs." *Am J Epidemiol* 160, no. 11 (2004): 1070-8.
56. Mahdavi, A., Pejovic, T., Nezhat, F. "Induction of Ovulation and Ovarian Cancer: A Critical Review of the Literature." *Fertil Steril* 85, no. 4 (2006): 819-26.
57. Tworoger, S.S., Fairfield, K.M., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Hankinson, S.E. "Association of Oral Contraceptive Use, Other Contraceptive Methods, and Infertility with Ovarian Cancer Risk." *Am J Epidemiol* 166, no. 8 (2007): 894-901.
58. Beral, V., Doll, R., Hermon, C., Peto, R., Reeves, G. "Ovarian Cancer and Oral Contraceptives: Collaborative Reanalysis of Data from 45 Epidemiological Studies Including 23,257 Women with Ovarian Cancer and 87,303 Controls." *Lancet* 371, no. 9609 (2008): 303-14.
59. Danforth, K.N., Tworoger, S.S., Hecht, J.L., Rosner, B.A., Colditz, G.A., Hankinson, S.E. "Breastfeeding and Risk of Ovarian Cancer in Two Prospective Cohorts." *Cancer Causes Control* 18, no. 5 (2007): 517-23.
60. Titus-Ernstoff, L., Rees, J.R., Terry, K.L., Cramer, D.W. "Breast-Feeding the Last Born Child and Risk of Ovarian Cancer." *Cancer causes & control : CCC* 21, no. 2 (2010): 201-07.
61. Jordan, S.J., Siskind, V., A, C.G., Whiteman, D.C., Webb, P.M. "Breastfeeding and Risk of Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer Causes Control* 21, no. 1 (2010): 109-16.
62. Risch, H.A. "Hormonal Etiology of Epithelial Ovarian Cancer, with a Hypothesis Concerning the Role of Androgens and Progesterone." *J Natl Cancer Inst* 90, no. 23 (1998): 1774-86.
63. Ness, R.B., Cottreau, C. "Possible Role of Ovarian Epithelial Inflammation in Ovarian Cancer." *J Natl Cancer Inst* 91, no. 17 (1999): 1459-67.
64. Shan, W., Liu, J. "Inflammation: A Hidden Path to Breaking the Spell of Ovarian Cancer." *Cell cycle* 8, no. 19 (2009): 3107-11.
65. Jammal, M.P., Martins-Filho, A., Silveira, T.P., Murta, E.F.C., Nomelini, R.S. "Cytokines and Prognostic Factors in Epithelial Ovarian Cancer." *Clinical Medicine Insights. Oncology* 10 (2016): 71-76.

66. McSorley, M.A., Alberg, A.J., Allen, D.S., Allen, N.E., Brinton, L.A., Dorgan, J.F., Pollak, M., Tao, Y., Helzlsouer, K.J. "C-Reactive Protein Concentrations and Subsequent Ovarian Cancer Risk." *Obstet Gynecol* 109, no. 4 (2007): 933-41.
67. Toriola, A.T., Grankvist, K., Agborsangaya, C.B., Lukanova, A., Lehtinen, M., Surcel, H.-M. "Changes in Pre-Diagnostic Serum C-Reactive Protein Concentrations and Ovarian Cancer Risk: A Longitudinal Study." *Annals of Oncology* 22, no. 8 (2011): 1916-21.
68. Clendenen, T.V., Lundin, E., Zeleniuch-Jacquotte, A., Koenig, K.L., Berrino, F., Lukanova, A., Lokshin, A.E., Idahl, A., Ohlson, N., Hallmans, G., Krogh, V., Sieri, S., Muti, P., Marrangoni, A., Nolen, B.M., Liu, M., Shore, R.E., Arslan, A.A. "Circulating Inflammation Markers and Risk of Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20, no. 5 (2011): 799-810.
69. Hankinson, S.E., Hunter, D.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rosner, B., Hennekens, C.H., Speizer, F.E. "Tubal Ligation, Hysterectomy, and Risk of Ovarian Cancer: A Prospective Study." *JAMA* 270, no. 23 (1993): 2813-18.
70. Cibula, D., Widschwendter, M., Majek, O., Dusek, L. "Tubal Ligation and the Risk of Ovarian Cancer: Review and Meta-Analysis." *Hum Reprod Update* 17, no. 1 (2011): 55-67.
71. Narod, S.A., Sun, P., Ghadirian, P., Lynch, H., Isaacs, C., Garber, J., Weber, B., Karlan, B., Fishman, D., Rosen, B., Tung, N., Neuhausen, S.L. "Tubal Ligation and Risk of Ovarian Cancer in Carriers of Brca1 or Brca2 Mutations: A Case-Control Study." *Lancet* 357, no. 9267 (2001): 1467-70.
72. Olsen, C.M., Green, A.C., Whiteman, D.C., Sadeghi, S., Kolahdooz, F., Webb, P.M. "Obesity and the Risk of Epithelial Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Eur J Cancer* 43, no. 4 (2007): 690-709.
73. Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., Thun, M.J. "Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults." *N Engl J Med* 348, no. 17 (2003): 1625-38.
74. La Vecchia, C., Decarli, A., Negri, E., Parazzini, F., Gentile, A., Cecchetti, G., Fasoli, M., Franceschi, S. "Dietary Factors and the Risk of Epithelial Ovarian Cancer." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 79, no. 4 (1987): 663-69.
75. Kushi, L.H., Mink, P.J., Folsom, A.R., Anderson, K.E., Zheng, W., Lazovich, D., Sellers, T.A. "Prospective Study of Diet and Ovarian Cancer." *Am J Epidemiol* 149, no. 1 (1999): 21-31.
76. Koushik, A., Hunter, D.J., Spiegelman, D., Anderson, K.E., Arslan, A.A., Beeson, W.L., van den Brandt, P.A., Buring, J.E., Cerhan, J.R., Colditz, G.A., Fraser, G.E., Freudenheim, J.L., Genkinger, J.M., Goldbohm, R.A., Hankinson, S.E., Koenig, K.L., Larsson, S.C., Leitzmann, M., McCullough, M.L., Miller, A.B., Patel, A., Rohan, T.E., Schatzkin, A., Smit, E., Willett, W.C., Wolk, A., Zhang, S.M., Smith-Warner, S.A. "Fruits and Vegetables and Ovarian Cancer Risk in a Pooled Analysis of 12 Cohort Studies." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, no. 9 (2005): 2160-7.
77. Schulz, M., Lahmann, P.H., Boeing, H., Hoffmann, K., Allen, N., Key, T.J., Bingham, S., Wirfalt, E., Berglund, G., Lundin, E., Hallmans, G., Lukanova, A., Martinez Garcia, C., Gonzalez, C.A., Tormo, M.J., Quiros, J.R., Ardanaz, E., Larranaga, N., Lund, E., Gram, I.T., Skeie, G., Peeters, P.H., van Gils, C.H., Bueno-de-Mesquita, H.B., Buchner, F.L., Pasanisi, P., Galasso, R., Palli, D., Tumino, R., Vineis, P., Trichopoulou, A., Kalapothaki, V., Trichopoulos, D., Chang-Claude, J., Linseisen, J., Boutron-Ruault, M.C., Touillaud, M., Clavel-Chapelon, F., Olsen, A., Tjonneland, A., Overvad, K., Tetsche, M., Jenab, M., Norat, T., Kaaks, R., Riboli, E. "Fruit and Vegetable Consumption and Risk of Epithelial Ovarian Cancer: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, no. 11 Pt 1 (2005): 2531-5.

78. Chandran, U., Bandera, E.V., Williams-King, M.G., Paddock, L.E., Rodriguez-Rodriguez, L., Lu, S.-E., Faulkner, S., Pulick, K., Olson, S.H. "Healthy Eating Index and Ovarian Cancer Risk." *Cancer causes & control : CCC* 22, no. 4 (2011): 563-71.
79. Tavani, A., Gallus, S., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Negri, E., Pelucchi, C., Montella, M., Conti, E., Carbone, A., Franceschi, S. "Physical Activity and Risk of Ovarian Cancer: An Italian Case-Control Study." *Int J Cancer* 91, no. 3 (2001): 407-11.
80. Bertone, E.R., Newcomb, P.A., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Egan, K.M. "Recreational Physical Activity and Ovarian Cancer in a Population-Based Case-Control Study." *Int J Cancer* 99, no. 3 (2002): 431-6.
81. Bertone, E.R., Willett, W.C., Rosner, B.A., Hunter, D.J., Fuchs, C.S., Speizer, F.E., Colditz, G.A., Hankinson, S.E. "Prospective Study of Recreational Physical Activity and Ovarian Cancer." *J Natl Cancer Inst* 93, no. 12 (2001): 942-8.
82. Abbott, S.E., Camacho, F., Peres, L.C., Alberg, A.J., Bandera, E.V., Bondy, M., Cote, M.L., Funkhouser, E., Moorman, P.G., Peters, E.S., Qin, B., Schwartz, A.G., Barnholtz-Sloan, J., Terry, P., Schildkraut, J.M. "Recreational Physical Activity and Survival in African-American Women with Ovarian Cancer." *Cancer Causes & Control* 29, no. 1 (2018): 77-86.
83. Marchbanks, P.A., Wilson, H., Bastos, E., Cramer, D.W., Schildkraut, J.M., Peterson, H.B. "Cigarette Smoking and Epithelial Ovarian Cancer by Histologic Type." *Obstet Gynecol* 95, no. 2 (2000): 255-60.
84. Jordan, S.J., Whiteman, D.C., Purdie, D.M., Green, A.C., Webb, P.M. "Does Smoking Increase Risk of Ovarian Cancer? A Systematic Review." *Gynecol Oncol* 103, no. 3 (2006): 1122-9.
85. Zenzes, M.T., Reed, T.E., Casper, R.F. "Effects of Cigarette Smoking and Age on the Maturation of Human Oocytes." *Hum Reprod* 12, no. 8 (1997): 1736-41.
86. Westhoff, C., Gentile, G., Lee, J., Zacur, H., Helbig, D. "Predictors of Ovarian Steroid Secretion in Reproductive-Age Women." *Am J Epidemiol* 144, no. 4 (1996): 381-8.
87. Khaw, K.T., Tazuke, S., Barrett-Connor, E. "Cigarette Smoking and Levels of Adrenal Androgens in Postmenopausal Women." *N Engl J Med* 318, no. 26 (1988): 1705-9.
88. McKinlay, S.M. "The Normal Menopause Transition: An Overview." *Maturitas* 23, no. 2 (1996): 137-45.
89. Garland, C.F., Mohr, S.B., Gorham, E.D., Grant, W.B., Garland, F.C. "Role of Ultraviolet B Irradiance and Vitamin D in Prevention of Ovarian Cancer." *Am J Prev Med* 31, no. 6 (2006): 512-4.
90. Jiang, F., Bao, J., Li, P., Nicosia, S.V., Bai, W. "Induction of Ovarian Cancer Cell Apoptosis by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 through the Down-Regulation of Telomerase." *J Biol Chem* 279, no. 51 (2004): 53213-21.
91. Salazar-Martinez, E., Lazcano-Ponce, E.C., Gonzalez Lira-Lira, G., Escudero-De los Rios, P., Hernandez-Avila, M. "Nutritional Determinants of Epithelial Ovarian Cancer Risk: A Case-Control Study in Mexico." *Oncology* 63, no. 2 (2002): 151-7.
92. Guo, H., Guo, J., Xie, W., Yuan, L., Sheng, X. "The Role of Vitamin D in Ovarian Cancer: Epidemiology, Molecular Mechanism and Prevention." *Journal of ovarian research* 11, no. 1 (2018): 71-71.
93. Diaz-Padilla, I., Malpica, A.L., Minig, L., Chiva, L.M., Gershenson, D.M., Gonzalez-Martin, A. "Ovarian Low-Grade Serous Carcinoma: A Comprehensive Update." *Gynecol Oncol* 126, no. 2 (2012): 279-85.
94. Shahrzad Ehdavand, M. "Pathology Outlines – Who Classification of Ovarian Neoplasms." (2016).
95. Tewari, K.S., Monk, B.J. *The 21st Century Handbook of Clinical Ovarian Cancer*: Springer, 2015.

96. Nogales, F.F., Schuldt, M. "Germ Cell Tumors of the Female Genital Tract." In *Pathology and Biology of Human Germ Cell Tumors*, edited by Francisco F. Nogales and Rafael E. Jimenez, 195-266. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017.
97. Ray-Coquard, I., Brown, J., Harter, P., Provencher, D.M., Fong, P.C., Maenpaa, J., Ledermann, J.A., Emons, G., Rigaud, D.B., Glasspool, R.M., Mezzaninica, D., Colombo, N. "Gynecologic Cancer Intergroup (Gcig) Consensus Review for Ovarian Sex Cord Stromal Tumors." *International Journal of Gynecologic Cancer* 24, no. Supp 3 (2014): S42-S47.
98. Prat, J. "Ovarian Carcinomas: Five Distinct Diseases with Different Origins, Genetic Alterations, and Clinicopathological Features." *Virchows Arch* 460, no. 3 (2012): 237-49.
99. Kurman, R.J., Carcangiu, M.L., Herrington, S., Young, R.H. *Who Classification of Tumours of Female Reproductive Organs: IARC*, 2014.
100. Silverberg, S.G. "Toward the Development of a Universal Grading System for Ovarian Epithelial Carcinoma." *Gynecol Oncol* 73, no. 1 (1999): 170-1.
101. Meinhold-Heerlein, I., Fotopoulou, C., Harter, P., Kurzeder, C., Mustea, A., Wimberger, P., Hauptmann, S., Sehouli, J., Kommission Ovar of the, A.G.O. "Statement by the Kommission Ovar of the Ago: The New Figo and Who Classifications of Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer." *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 75, no. 10 (2015): 1021-27.
102. Shih Ie, M., Kurman, R.J. "Ovarian Tumorigenesis: A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis." *Am J Pathol* 164, no. 5 (2004): 1511-8.
103. Kurman, R.J., Shih Ie, M. "The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded." *Am J Pathol* 186, no. 4 (2016): 733-47.
104. Horiuchi, A., Itoh, K., Shimizu, M., Nakai, I., Yamazaki, T., Kimura, K., Suzuki, A., Shiozawa, I., Ueda, N., Konishi, I. "Toward Understanding the Natural History of Ovarian Carcinoma Development: A Clinicopathological Approach." *Gynecologic Oncology* 88, no. 3 (2003): 309-17.
105. Yamaguchi, K., Mandai, M., Toyokuni, S., Hamanishi, J., Higuchi, T., Takakura, K., Fujii, S. "Contents of Endometriotic Cysts, Especially the High Concentration of Free Iron, Are a Possible Cause of Carcinogenesis in the Cysts through the Iron-Induced Persistent Oxidative Stress." *Clin Cancer Res* 14, no. 1 (2008): 32-40.
106. Coquelle, A., Toledo, F., Stern, S., Bieth, A., Debatisse, M. "A New Role for Hypoxia in Tumor Progression: Induction of Fragile Site Triggering Genomic Rearrangements and Formation of Complex Dms and Hsrs." *Molecular Cell* 2, no. 2 (1998): 259-65.
107. Van Gorp, T., Amant, F., Neven, P., Vergote, I., Moerman, P. "Endometriosis and the Development of Malignant Tumours of the Pelvis. A Review of Literature." *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 18, no. 2 (2004): 349-71.
108. Abou-Taleb, H., Yamaguchi, K., Matsumura, N., Murakami, R., Nakai, H., Higasa, K., Amano, Y., Abiko, K., Yoshioka, Y., Hamanishi, J. "Comprehensive Assessment of the Expression of the Swi/Snf Complex Defines Two Distinct Prognostic Subtypes of Ovarian Clear Cell Carcinoma." *Oncotarget* 7, no. 34 (2016): 54758.
109. Woodruff, J., BIE, L.S., SHERMAN, R.J. "Mucinous Tumors of the Ovary." *Obstetrics & Gynecology* 16, no. 6 (1960): 699-712.
110. Mandai, M., Konishi, I., Kuroda, H., Komatsu, T., Yamamoto, S., Nanbu, K., Matsushita, K., Fukumoto, M., Yamabe, H., Mori, T. "Heterogeneous Distribution of K-Ras-Mutated Epithelia in Mucinous Ovarian Tumors with Special Reference to Histopathology." *Human Pathology* 29, no. 1 (1998): 34-40.
111. Enomoto, T., Weghorst, C., Inoue, M., Tanizawa, O., Rice, J. "K-Ras Activation Occurs Frequently in Mucinous Adenocarcinomas and Rarely in Other Common Epithelial Tumors of the Human Ovary." *The American journal of pathology* 139, no. 4 (1991): 777.
112. Gemignani, M.L., Schlaerth, A.C., Bogomolny, F., Barakat, R.R., Lin, O., Soslow, R., Venkatraman, E., Boyd, J. "Role of Kras and Braf Gene Mutations in Mucinous Ovarian Carcinoma." *Gynecol Oncol* 90, no. 2 (2003): 378-81.

113. Pradhan, M., Davidson, B., Tropé, C.G., Danielsen, H.E., Abeler, V.M., Risberg, B. "Gross Genomic Alterations Differ between Serous Borderline Tumors and Serous Adenocarcinomas—an Image Cytometric DNA Ploidy Analysis of 307 Cases with Histogenetic Implications." *Virchows Archiv* 454, no. 6 (2009): 677-83.
114. Kuo, K.-T., Guan, B., Feng, Y., Mao, T.-L., Chen, X., Jinawath, N., Wang, Y., Kurman, R.J., Shih, I.-M., Wang, T.-L. "Analysis of DNA Copy Number Alterations in Ovarian Serous Tumors Identifies New Molecular Genetic Changes in Low-Grade and High-Grade Carcinomas." *Cancer Res* 69, no. 9 (2009): 4036-42.
115. Singer, G., Stöhr, R., Cope, L., Dehari, R., Hartmann, A., Cao, D.-F., Wang, T.-L., Kurman, R.J., Shih, I.-M. "Patterns of P53 Mutations Separate Ovarian Serous Borderline Tumors and Low-and High-Grade Carcinomas and Provide Support for a New Model of Ovarian Carcinogenesis: A Mutational Analysis with Immunohistochemical Correlation." *The American journal of surgical pathology* 29, no. 2 (2005): 218-24.
116. Dubeau, L. "The Cell of Origin of Ovarian Epithelial Tumours." *The lancet oncology* 9, no. 12 (2008): 1191-97.
117. Li, J., Abushahin, N., Pang, S., Xiang, L., Chambers, S.K., Fadare, O., Kong, B., Zheng, W. "Tubal Origin of 'Ovarian'low-Grade Serous Carcinoma." *Modern Pathology* 24, no. 11 (2011): 1488-99.
118. Koshiyama, M., Konishi, I., Mandai, M., Komatsu, T., Yamamoto, S., Nanbu, K., Mori, T. "Immunohistochemical Analysis of P53 Protein and 72 Kda Heat Shock Protein (Hsp72) Expression in Ovarian Carcinomas." *Virchows Archiv* 425, no. 6 (1995): 603-09.
119. Salani, R., Kurman, R.J., Giuntoli, R., Gardner, G., Bristow, R., WANG, T.L., SHIH, I.M. "Assessment of Tp53 Mutation Using Purified Tissue Samples of Ovarian Serous Carcinomas Reveals a Higher Mutation Rate Than Previously Reported and Does Not Correlate with Drug Resistance." *International Journal of Gynecological Cancer* 18, no. 3 (2008): 487-91.
120. Cho, K.R., Shih, I.-M. "Ovarian Cancer." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 4 (2009): 287-313.
121. Christie, M., Oehler, M.K. "Molecular Pathology of Epithelial Ovarian Cancer." *British Menopause Society Journal* 12, no. 2 (2006): 57-63.
122. Carcangiu, M.L., Radice, P., Manoukian, S., Spatti, G., Gobbo, M., Pensotti, V., Crucianelli, R., Pasini, B. "Atypical Epithelial Proliferation in Fallopian Tubes in Prophylactic Salpingo-Oophorectomy Specimens from Brca1 and Brca2 Germline Mutation Carriers." *International Journal of Gynecological Pathology* 23, no. 1 (2004): 35-40.
123. Seidman, J.D., Yemelyanova, A., Zaino, R.J., Kurman, R.J. "The Fallopian Tube-Peritoneal Junction: A Potential Site of Carcinogenesis." *International Journal of Gynecological Pathology* 30, no. 1 (2011): 4-11.
124. Fitch, M., Deane, K., Howell, D., Gray, R.E. "Women's Experiences with Ovarian Cancer: Reflections on Being Diagnosed." *Can Oncol Nurs J* 12, no. 3 (2002): 152-68.
125. Bankhead, C.R., Collins, C., Stokes-Lampard, H., Rose, P., Wilson, S., Clements, A., Mant, D., Kehoe, S.T., Austoker, J. "Identifying Symptoms of Ovarian Cancer: A Qualitative and Quantitative Study." *Bjog* 115, no. 8 (2008): 1008-14.
126. Hamilton, W., Peters, T.J., Bankhead, C., Sharp, D. "Risk of Ovarian Cancer in Women with Symptoms in Primary Care: Population Based Case-Control Study." *Bmj* 339 (2009): b2998.
127. Goff, B.A., Mandel, L., Muntz, H.G., Melancon, C.H. "Ovarian Carcinoma Diagnosis." *Cancer* 89, no. 10 (2000): 2068-75.
128. Goff, B.A., Mandel, L.S., Drescher, C.W., Urban, N., Gough, S., Schurman, K.M., Patras, J., Mahony, B.S., Andersen, M.R. "Development of an Ovarian Cancer Symptom Index: Possibilities for Earlier Detection." *Cancer* 109, no. 2 (2007): 221-7.

129. Andersen, M.R., Goff, B.A., Lowe, K.A., Scholler, N., Bergan, L., Drescher, C.W., Paley, P., Urban, N. "Use of a Symptom Index, Ca125, and He4 to Predict Ovarian Cancer." *Gynecol Oncol* 116, no. 3 (2010): 378-83.
130. Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Hallett, R., Ryan, A., Burnell, M., Sharma, A., Lewis, S., Davies, S., Philpott, S., Lopes, A., Godfrey, K., Oram, D., Herod, J., Williamson, K., Seif, M.W., Scott, I., Mould, T., Woolas, R., Murdoch, J., Dobbs, S., Amso, N.N., Leeson, S., Cruickshank, D., McGuire, A., Campbell, S., Fallowfield, L., Singh, N., Dawney, A., Skates, S.J., Parmar, M., Jacobs, I. "Sensitivity and Specificity of Multimodal and Ultrasound Screening for Ovarian Cancer, and Stage Distribution of Detected Cancers: Results of the Prevalence Screen of the Uk Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (Ukctocs)." *Lancet Oncol* 10, no. 4 (2009): 327-40.
131. Aguirre, A., Guo, P., Gamelin, J., Yan, S., Sanders, M.M., Brewer, M., Zhu, Q. "Coregistered Three-Dimensional Ultrasound and Photoacoustic Imaging System for Ovarian Tissue Characterization." *J Biomed Opt* 14, no. 5 (2009): 054014.
132. Lao, Y., Xing, D., Yang, S., Xiang, L. "Noninvasive Photoacoustic Imaging of the Developing Vasculature During Early Tumor Growth." *Phys Med Biol* 53, no. 15 (2008): 4203-12.
133. Zukotynski, K.A., Kim, C.K. "Molecular Imaging and Precision Medicine in Uterine and Ovarian Cancers." *PET Clin* 12, no. 4 (2017): 393-405.
134. Woolas, R.P., Xu, F.J., Jacobs, I.J., Yu, Y.H., Daly, L., Berchuck, A., Soper, J.T., Clarke-Pearson, D.L., Oram, D.H., Bast, R.C., Jr. "Elevation of Multiple Serum Markers in Patients with Stage I Ovarian Cancer." *J Natl Cancer Inst* 85, no. 21 (1993): 1748-51.
135. Jacobs, I., Bast Jr, R.C. "The Ca 125 Tumour-Associated Antigen: A Review of the Literature." *Human reproduction* 4, no. 1 (1989): 1-12.
136. Clarke-Pearson, D.L. "Clinical Practice. Screening for Ovarian Cancer." *N Engl J Med* 361, no. 2 (2009): 170-7.
137. Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R., Krull, N. "A Major Human Epididymis-Specific Cdna Encodes a Protein with Sequence Homology to Extracellular Proteinase Inhibitors." *Biol Reprod* 45, no. 2 (1991): 350-7.
138. Bingle, L., Singleton, V., Bingle, C.D. "The Putative Ovarian Tumour Marker Gene He4 (Wfdc2), Is Expressed in Normal Tissues and Undergoes Complex Alternative Splicing to Yield Multiple Protein Isoforms." *Oncogene* 21, no. 17 (2002): 2768-73.
139. Galgano, M.T., Hampton, G.M., Frierson, H.F., Jr. "Comprehensive Analysis of He4 Expression in Normal and Malignant Human Tissues." *Mod Pathol* 19, no. 6 (2006): 847-53.
140. Hellstrom, I., Hellstrom, K.E. "Smrp and He4 as Biomarkers for Ovarian Carcinoma When Used Alone and in Combination with Ca125 and/or Each Other." *Adv Exp Med Biol* 622 (2008): 15-21.
141. Ono, K., Tanaka, T., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kihara, C., Okamoto, A., Ochiai, K., Takagi, T., Nakamura, Y. "Identification by Cdna Microarray of Genes Involved in Ovarian Carcinogenesis." *Cancer Res* 60, no. 18 (2000): 5007-11.
142. Hellström, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J.A., Schummer, M., McIntosh, M., Drescher, C., Urban, N., Hellström, K.E. "The He4 (Wfdc2) Protein Is a Biomarker for Ovarian Carcinoma." *Cancer Research* 63, no. 13 (2003): 3695-700.
143. Scholler, N., Lowe, K.A., Bergan, L.A., Kampani, A.V., Ng, V., Forrest, R.M., Thorpe, J.D., Gross, J.A., Garvik, B.M., Drapkin, R., Anderson, G.L., Urban, N. "Use of Yeast-Secreted in Vivo Biotinylated Recombinant Antibodies (Biobodies) in Bead-Based Elisa." *Clin Cancer Res* 14, no. 9 (2008): 2647-55.
144. Schummer, M., Ng, W.V., Bumgarner, R.E., Nelson, P.S., Schummer, B., Bednarski, D.W., Hassell, L., Baldwin, R.L., Karlan, B.Y., Hood, L. "Comparative Hybridization of an Array of 21,500 Ovarian Cdnas for the Discovery of Genes Overexpressed in Ovarian Carcinomas." *Gene* 238, no. 2 (1999): 375-85.

145. Lowe, K.A., Shah, C., Wallace, E., Anderson, G., Paley, P., McIntosh, M., Andersen, M.R., Scholler, N., Bergan, L., Thorpe, J., Urban, N., Drescher, C.W. "Effects of Personal Characteristics on Serum Ca125, Mesothelin, and He4 Levels in Healthy Postmenopausal Women at High-Risk for Ovarian Cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, no. 9 (2008): 2480-7.
146. Moore, R.G., Miller, M.C., Steinhoff, M.M., Skates, S.J., Lu, K.H., Lambert-Messerlian, G., Bast, R.C., Jr. "Serum He4 Levels Are Less Frequently Elevated Than Ca125 in Women with Benign Gynecologic Disorders." *Am J Obstet Gynecol* 206, no. 4 (2012): 351.e1-8.
147. Qu, W., Gao, Q., Chen, H., Tang, Z., Zhu, X., Jiang, S.W. "He4-Test of Urine and Body Fluids for Diagnosis of Gynecologic Cancer." *Expert Rev Mol Diagn* 17, no. 3 (2017): 239-44.
148. Xu, F., Yu, Y., Li, B., Moradi, M., Elg, S., Lane, C., Carson, L., Ramakrishnan, S. "Development of Two New Monoclonal Antibodies Reactive to a Surface Antigen Present on Human Ovarian Epithelial Cancer Cells." *Cancer Research* 51, no. 15 (1991): 4012-19.
149. van Haaften-Day, C., Shen, Y., Xu, F., Yu, Y., Berchuck, A., Havrilesky, L.J., de Bruijn, H.W., van der Zee, A.G., Bast, R.C., Jr., Hacker, N.F. "Ovx1, Macrophage-Colony Stimulating Factor, and Ca-125-Ii as Tumor Markers for Epithelial Ovarian Carcinoma: A Critical Appraisal." *Cancer* 92, no. 11 (2001): 2837-44.
150. Ordóñez, N.G. "Application of Mesothelin Immunostaining in Tumor Diagnosis." *Am J Surg Pathol* 27, no. 11 (2003): 1418-28.
151. Lv, J., Li, P. "Mesothelin as a Biomarker for Targeted Therapy." *Biomarker Research* 7, no. 1 (2019): 18.
152. Chang, K., Pastan, I. "Molecular Cloning of Mesothelin, a Differentiation Antigen Present on Mesothelium, Mesotheliomas, and Ovarian Cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, no. 1 (1996): 136-40.
153. Scholler, N., Fu, N., Yang, Y., Ye, Z., Goodman, G.E., Hellström, K.E., Hellström, I. "Soluble Member(S) of the Mesothelin/Megakaryocyte Potentiating Factor Family Are Detectable in Sera from Patients with Ovarian Carcinoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, no. 20 (1999): 11531-36.
154. Servais, E.L., Colovos, C., Rodriguez, L., Bograd, A.J., Nitadori, J., Sima, C., Rusch, V.W., Sadelain, M., Adusumilli, P.S. "Mesothelin Overexpression Promotes Mesothelioma Cell Invasion and Mmp-9 Secretion in an Orthotopic Mouse Model and in Epithelioid Pleural Mesothelioma Patients." *Clin Cancer Res* 18, no. 9 (2012): 2478-89.
155. Rump, A., Morikawa, Y., Tanaka, M., Minami, S., Umesaki, N., Takeuchi, M., Miyajima, A. "Binding of Ovarian Cancer Antigen Ca125/Muc16 to Mesothelin Mediates Cell Adhesion." *J Biol Chem* 279, no. 10 (2004): 9190-8.
156. Gubbels, J.A., Belisle, J., Onda, M., Rancourt, C., Migneault, M., Ho, M., Bera, T.K., Connor, J., Sathyanarayana, B.K., Lee, B., Pastan, I., Patankar, M.S. "Mesothelin-Muc16 Binding Is a High Affinity, N-Glycan Dependent Interaction That Facilitates Peritoneal Metastasis of Ovarian Tumors." *Mol Cancer* 5, no. 1 (2006): 50.
157. Coelho, R., Marcos-Silva, L., Ricardo, S., Ponte, F., Costa, A., Lopes, J.M., David, L. "Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer: Role of Muc16-Mesothelin Interaction and Implications for Treatment." *Expert Rev Anticancer Ther* 18, no. 2 (2018): 177-86.
158. Cheng, W.F., Huang, C.Y., Chang, M.C., Hu, Y.H., Chiang, Y.C., Chen, Y.L., Hsieh, C.Y., Chen, C.A. "High Mesothelin Correlates with Chemoresistance and Poor Survival in Epithelial Ovarian Carcinoma." *Br J Cancer* 100, no. 7 (2009): 1144-53.
159. Chang, K., Pastan, I., Willingham, M.C. "Isolation and Characterization of a Monoclonal Antibody, K1, Reactive with Ovarian Cancers and Normal Mesothelium." *Int J Cancer* 50, no. 3 (1992): 373-81.
160. Wang, H., Kachman, M.T., Schwartz, D.R., Cho, K.R., Lubman, D.M. "Comprehensive Proteome Analysis of Ovarian Cancers Using Liquid Phase Separation, Mass Mapping and



- Tandem Mass Spectrometry: A Strategy for Identification of Candidate Cancer Biomarkers." *PROTEOMICS* 4, no. 8 (2004): 2476-95.
161. Zhang, Z., Bast, R.C., Yu, Y., Li, J., Sokoll, L.J., Rai, A.J., Rosenzweig, J.M., Cameron, B., Wang, Y.Y., Meng, X.-Y., Berchuck, A., van Haaften-Day, C., Hacker, N.F., de Bruijn, H.W.A., van der Zee, A.G.J., Jacobs, I.J., Fung, E.T., Chan, D.W. "Three Biomarkers Identified from Serum Proteomic Analysis for the Detection of Early Stage Ovarian Cancer." *Cancer Research* 64, no. 16 (2004): 5882-90.
  162. Xu, F.J., Ramakrishnan, S., Daly, L., Soper, J.T., Berchuck, A., Clarke-Pearson, D., Bast, R.C., Jr. "Increased Serum Levels of Macrophage Colony-Stimulating Factor in Ovarian Cancer." *Am J Obstet Gynecol* 165, no. 5 Pt 1 (1991): 1356-62.
  163. Kim, J.H., Skates, S.J., Uede, T., Wong, K.K., Schorge, J.O., Feltmate, C.M., Berkowitz, R.S., Cramer, D.W., Mok, S.C. "Osteopontin as a Potential Diagnostic Biomarker for Ovarian Cancer." *JAMA* 287, no. 13 (2002): 1671-9.
  164. Luo, L.Y., Katsaros, D., Scorilas, A., Fracchioli, S., Bellino, R., van Gramberen, M., de Bruijn, H., Henrik, A., Stenman, U.H., Massobrio, M., van der Zee, A.G., Vergote, I., Diamandis, E.P. "The Serum Concentration of Human Kallikrein 10 Represents a Novel Biomarker for Ovarian Cancer Diagnosis and Prognosis." *Cancer Res* 63, no. 4 (2003): 807-11.
  165. Baron, A.T., Cora, E.M., Lafky, J.M., Boardman, C.H., Buenafe, M.C., Rademaker, A., Liu, D., Fishman, D.A., Podratz, K.C., Maihle, N.J. "Soluble Epidermal Growth Factor Receptor (Segfr/Serbb1) as a Potential Risk, Screening, and Diagnostic Serum Biomarker of Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 12, no. 2 (2003): 103-13.
  166. Dieplinger, H., Ankerst, D.P., Burges, A., Lenhard, M., Lingenhel, A., Fineder, L., Buchner, H., Stieber, P. "Afamin and Apolipoprotein a-Iv: Novel Protein Markers for Ovarian Cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, no. 4 (2009): 1127-33.
  167. Zhang, Z., Barnhill, S.D., Zhang, H., Xu, F., Yu, Y., Jacobs, I., Woolas, R.P., Berchuck, A., Madyastha, K.R., Bast, R.C., Jr. "Combination of Multiple Serum Markers Using an Artificial Neural Network to Improve Specificity in Discriminating Malignant from Benign Pelvic Masses." *Gynecol Oncol* 73, no. 1 (1999): 56-61.
  168. Visintin, I., Feng, Z., Longton, G., Ward, D.C., Alvero, A.B., Lai, Y., Tenthorey, J., Leiser, A., Flores-Saaib, R., Yu, H., Azori, M., Rutherford, T., Schwartz, P.E., Mor, G. "Diagnostic Markers for Early Detection of Ovarian Cancer." *Clinical cancer research* 14, no. 4 (2008): 1065-72.
  169. Edgell, T., Martin-Roussety, G., Barker, G., Autelitano, D.J., Allen, D., Grant, P., Rice, G.E. "Phase II Biomarker Trial of a Multimarker Diagnostic for Ovarian Cancer." *J Cancer Res Clin Oncol* 136, no. 7 (2010): 1079-88.
  170. Montagnana, M., Benati, M., Danese, E. "Circulating Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer Diagnosis: From Present to Future Perspective." *Ann Transl Med* 5, no. 13 (2017): 276.
  171. Singh, A., Gupta, S., Sachan, M. "Epigenetic Biomarkers in the Management of Ovarian Cancer: Current Prospectives." *Front Cell Dev Biol* 7 (2019): 182.
  172. Schumer, S.T., Cannistra, S.A. "Granulosa Cell Tumor of the Ovary." *Journal of Clinical Oncology* 21, no. 6 (2003): 1180-89.
  173. Bristow, R.E., Tomacruz, R.S., Armstrong, D.K., Trimble, E.L., Montz, F.J. "Survival Effect of Maximal Cytoreductive Surgery for Advanced Ovarian Carcinoma During the Platinum Era: A Meta-Analysis." *Journal of Clinical Oncology* 20, no. 5 (2002): 1248-59.
  174. Kehoe, S., Shafi, M., Luesley, D. "Interval Cytoreduction in Ovarian Cancer." *N Engl J Med* 333, no. 4 (1995): 254; author reply 55.
  175. Lopresti, M.L., Bandera, C.A., Miner, T.J. "New Approaches to Improving Survival after Neoadjuvant Chemotherapy: The Role of Intraperitoneal Therapy and Heated Intraperitoneal

- Chemotherapy in Ovarian Cancer." *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, no. 39 (2019): 19-23.
176. Ferron, G., Narducci, F., Pouget, N., Touboul, C. "[Surgery for Advanced Stage Ovarian Cancer: Article Drafted from the French Guidelines in Oncology Entitled "Initial Management of Patients with Epithelial Ovarian Cancer" Developed by Francogyn, Cngof, Sfog, Gineco-Arcagy under the Aegis of Cngof and Endorsed by Inca]." *Gynecol Obstet Fertil Senol* 47, no. 2 (2019): 197-213.
  177. Pignata, S., Pisano, C., Di Napoli, M., Cecere, S.C., Tambaro, R., Attademo, L. "Treatment of Recurrent Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer* 125, no. S24 (2019): 4609-15.
  178. Ho, G.Y., Woodward, N., Coward, J.I.G. "Cisplatin Versus Carboplatin: Comparative Review of Therapeutic Management in Solid Malignancies." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 102 (2016): 37-46.
  179. Kumar, S., Mahdi, H., Bryant, C., Shah, J.P., Garg, G., Munkarah, A. "Clinical Trials and Progress with Paclitaxel in Ovarian Cancer." *Int J Womens Health* 2 (2010): 411-27.
  180. Hsu, Y., Sood, A.K., Sorosky, J.I. "Docetaxel Versus Paclitaxel for Adjuvant Treatment of Ovarian Cancer: Case-Control Analysis of Toxicity." *Am J Clin Oncol* 27, no. 1 (2004): 14-8.
  181. Dasari, S., Tchounwou, P.B. "Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action." *European journal of pharmacology* 740 (2014): 364-78.
  182. Mikuła-Pietrasik, J., Witucka, A., Pakuła, M., Uruski, P., Begier-Kraśńska, B., Niklas, A., Tykarski, A., Książek, K. "Comprehensive Review on How Platinum- and Taxane-Based Chemotherapy of Ovarian Cancer Affects Biology of Normal Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences* 76, no. 4 (2019): 681-97.
  183. Wheate, N.J., Walker, S., Craig, G.E., Oun, R. "The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials." *Dalton Trans* 39, no. 35 (2010): 8113-27.
  184. Sousa, G.F.d., Włodarczyk, S.R., Monteiro, G. "Carboplatin: Molecular Mechanisms of Action Associated with Chemoresistance." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 50, no. 4 (2014): 693-701.
  185. Morris, P.G., Fornier, M.N. "Microtubule Active Agents: Beyond the Taxane Frontier." *Clinical Cancer Research* 14, no. 22 (2008): 7167-72.
  186. Weaver, B.A. "How Taxol/Paclitaxel Kills Cancer Cells." *Mol Biol Cell* 25, no. 18 (2014): 2677-81.
  187. Chan, D.L., Morris, D.L., Rao, A., Chua, T.C. "Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer: A Review of Tolerance and Efficacy." *Cancer Manag Res* 4 (2012): 413-22.
  188. Corrado, G., Salutari, V., Palluzzi, E., Distefano, M.G., Scambia, G., Ferrandina, G. "Optimizing Treatment in Recurrent Epithelial Ovarian Cancer." *Expert Rev Anticancer Ther* 17, no. 12 (2017): 1147-58.
  189. Burger, R.A., Brady, M.F., Bookman, M.A., Fleming, G.F., Monk, B.J., Huang, H., Mannel, R.S., Homesley, H.D., Fowler, J., Greer, B.E., Boente, M., Birrer, M.J., Liang, S.X. "Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer." *N Engl J Med* 365, no. 26 (2011): 2473-83.
  190. Perren, T.J., Swart, A.M., Pfisterer, J., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M.S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., du Bois, A., Sehouli, J., Kimmig, R., Stähle, A., Collinson, F., Essapen, S., Gourley, C., Lortholary, A., Selle, F., Mirza, M.R., Leminen, A., Plante, M., Stark, D., Qian, W., Parmar, M.K., Oza, A.M. "A Phase 3 Trial of Bevacizumab in Ovarian Cancer." *N Engl J Med* 365, no. 26 (2011): 2484-96.
  191. Pignata, S., Lorusso, D., Joly, F., Gallo, C., Colombo, N., Sessa, C. "Chemotherapy Plus or Minus Bevacizumab for Platinum-Sensitive Ovarian Cancer Patients Recurring after a Bevacizumab Containing First Line Treatment: The Randomized Phase 3 Trial Mito16b-Mango Ov2b-Engot Ov17." *Journal of Clinical Oncology* 36, no. 15 (2018).

192. Pfisterer, J., Dean, A., Baumann, K., Rau, J., Harter, P., Joly, F., Sehouli, J., Canzler, U., Schmalfeldt, B., Shannon, C. "9330 Carboplatin/Pegylated Liposomal Doxorubicin/Bevacizumab (Cd-Bev) Vs. Carboplatin/Gemcitabine/Bevacizumab (Cg-Bev) in Patients with Recurrent Ovarian Cancer: A Prospective Randomized Phase Iii Engot/Gcig-Intergroup Study (Ago Study Group, Ago-Austria, Anzgg, Gineco, Sgctg)." *Annals of Oncology* 29, no. suppl\_8 (2018): mdy285. 142.
193. Stockler, M.R., Hilpert, F., Friedlander, M., King, M.T., Wenzel, L., Lee, C.K., Joly, F., de Gregorio, N., Arranz, J.A., Mirza, M.R., Sorio, R., Freudensprung, U., Sneller, V., Hales, G., Pujade-Lauraine, E. "Patient-Reported Outcome Results from the Open-Label Phase Iii Aurelia Trial Evaluating Bevacizumab-Containing Therapy for Platinum-Resistant Ovarian Cancer." *J Clin Oncol* 32, no. 13 (2014): 1309-16.
194. Della Pepa, C., Banerjee, S. "Bevacizumab in Combination with Chemotherapy in Platinum-Sensitive Ovarian Cancer." *OncoTargets and therapy* 7 (2014): 1025-32.
195. Mahner, S., Woelber, L., Mueller, V., Witzel, I., Prieske, K., Grimm, D., Keller-V Amsberg, G., Trillsch, F. "Beyond Bevacizumab: An Outlook to New Anti-Angiogenics for the Treatment of Ovarian Cancer." *Front Oncol* 5 (2015): 211-11.
196. Banerjee, S., Kaye, S.B. "New Strategies in the Treatment of Ovarian Cancer: Current Clinical Perspectives and Future Potential." *Clin Cancer Res* 19, no. 5 (2013): 961-8.
197. Zeineldin, R., Muller, C.Y., Stack, M.S., Hudson, L.G. "Targeting the Egf Receptor for Ovarian Cancer Therapy." *Journal of oncology* 2010 (2010): 414676-76.
198. Buechel, M., Herzog, T.J., Westin, S.N., Coleman, R.L., Monk, B.J., Moore, K.N. "Treatment of Patients with Recurrent Epithelial Ovarian Cancer for Whom Platinum Is Still an Option." *Ann Oncol* 30, no. 5 (2019): 721-32.
199. Mirza, M.R., Pignata, S., Ledermann, J.A. "Latest Clinical Evidence and Further Development of Parp Inhibitors in Ovarian Cancer." *Ann Oncol* 29, no. 6 (2018): 1366-76.
200. Wefers, C., Lambert, L.J., Torensma, R., Hato, S.V. "Cellular Immunotherapy in Ovarian Cancer: Targeting the Stem of Recurrence." *Gynecol Oncol* 137, no. 2 (2015): 335-42.
201. Yang, S., Yin, X., Yue, Y., Wang, S. "Application of Adoptive Immunotherapy in Ovarian Cancer." *OncoTargets and therapy* 12 (2019): 7975-91.
202. Phillips, J.H., Lanier, L.L. "Dissection of the Lymphokine-Activated Killer Phenomenon. Relative Contribution of Peripheral Blood Natural Killer Cells and T Lymphocytes to Cytolysis." *J Exp Med* 164, no. 3 (1986): 814-25.
203. Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T., et al. "Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer." *N Engl J Med* 313, no. 23 (1985): 1485-92.
204. Lafreniere, R., Rosenberg, S.A. "Successful Immunotherapy of Murine Experimental Hepatic Metastases with Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin 2." *Cancer Res* 45, no. 8 (1985): 3735-41.
205. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S. "Functions of Natural Killer Cells." *Nat Immunol* 9, no. 5 (2008): 503-10.
206. Carlsten, M., Björkström, N.K., Norell, H., Bryceson, Y., van Hall, T., Baumann, B.C., Hanson, M., Schedvins, K., Kiessling, R., Ljunggren, H.G., Malmberg, K.J. "Dnax Accessory Molecule-1 Mediated Recognition of Freshly Isolated Ovarian Carcinoma by Resting Natural Killer Cells." *Cancer Res* 67, no. 3 (2007): 1317-25.
207. Hermanson, D.L., Bendzick, L., Kaufman, D.S. "Mouse Xenograft Model for Intraperitoneal Administration of Nk Cell Immunotherapy for Ovarian Cancer." *Methods Mol Biol* 1441 (2016): 277-84.
208. Klapdor, R., Wang, S., Hacker, U., Büning, H., Morgan, M., Dörk, T., Hillemanns, P., Schambach, A. "Improved Killing of Ovarian Cancer Stem Cells by Combining a Novel

- Chimeric Antigen Receptor–Based Immunotherapy and Chemotherapy." *Human gene therapy* 28, no. 10 (2017): 886-96.
209. Liu, J., Li, H., Cao, S., Zhang, X., Yu, J., Qi, J., An, X., Yu, W., Ren, X., Hao, X. "Maintenance Therapy with Autologous Cytokine-Induced Killer Cells in Patients with Advanced Epithelial Ovarian Cancer after First-Line Treatment." *Journal of immunotherapy* 37, no. 2 (2014): 115-22.
  210. Zhang, C., Zhang, Z., Wang, L., Han, J., Li, F., Shen, C., Li, H., Huang, L., Zhao, X., Yue, D. "Pseudomonas Aeruginosa-Mannose Sensitive Hemagglutinin Injection Treated Cytokine-Induced Killer Cells Combined with Chemotherapy in the Treatment of Malignancies." *International immunopharmacology* 51 (2017): 57-65.
  211. Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., Rubin, S.C., Coukos, G. "Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer." *N Engl J Med* 348, no. 3 (2003): 203-13.
  212. Karapetsas, A., Giannakakis, A., Dangaj, D., Lanitis, E., Kynigopoulos, S., Lambropoulou, M., Tanyi, J.L., Galanis, A., Kakolyris, S., Trypsianis, G., Coukos, G., Sandaltzopoulos, R. "Overexpression of Gpc6 and Tmem132d in Early Stage Ovarian Cancer Correlates with Cd8+ T-Lymphocyte Infiltration and Increased Patient Survival." *Biomed Res Int* 2015 (2015): 712438.
  213. Li, J., Wang, J., Chen, R., Bai, Y., Lu, X. "The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating T Lymphocytes in Ovarian Cancer." *Oncotarget* 8, no. 9 (2017): 15621-31.
  214. Rodriguez-Garcia, A., Minutolo, N.G., Robinson, J.M., Powell, D.J. "T-Cell Target Antigens across Major Gynecologic Cancers." *Gynecologic Oncology* 145, no. 3 (2017): 426-35.
  215. Spear, P., Wu, M.-R., Sentman, M.-L., Sentman, C.L. "Nkg2d Ligands as Therapeutic Targets." *Cancer Immunity Archive* 13, no. 2 (2013): 8.
  216. Kandalaf, L.E., Powell, D.J., Coukos, G. "A Phase I Clinical Trial of Adoptive Transfer of Folate Receptor-Alpha Redirected Autologous T Cells for Recurrent Ovarian Cancer." *Journal of Translational Medicine* 10, no. 1 (2012): 157.
  217. Fife, B.T., Bluestone, J.A. "Control of Peripheral T-Cell Tolerance and Autoimmunity Via the Ctl4 and Pd-1 Pathways." *Immunological reviews* 224, no. 1 (2008): 166-82.
  218. Fan, C., Reader, J., Roque, D.M. "Review of Immune Therapies Targeting Ovarian Cancer." *Current Treatment Options in Oncology* 19, no. 12 (2018): 74.
  219. Disis, M.L., Patel, M.R., Pant, S., Hamilton, E.P., Lockhart, A.C., Kelly, K., Beck, J.T., Gordon, M.S., Weiss, G.J., Taylor, M.H., Chaves, J., Mita, A.C., Chin, K.M., Heydebreck, A.v., Cuillerot, J.-M., Gulley, J.L. "Avelumab (Msb0010718c; Anti-Pd-L1) in Patients with Recurrent/Refractory Ovarian Cancer from the Javelin Solid Tumor Phase Ib Trial: Safety and Clinical Activity." *Journal of Clinical Oncology* 34, no. 15\_suppl (2016): 5533-33.
  220. Matulonis, U.A., Shapira-Frommer, R., Santin, A.D., Lisyanskaya, A.S., Pignata, S., Vergote, I., Raspagliesi, F., Sonke, G.S., Birrer, M., Provencher, D.M., Sehouli, J., Colombo, N., González-Martín, A., Oaknin, A., Ottevanger, P.B., Rudaitis, V., Katchar, K., Wu, H., Keefe, S., Ruman, J., Ledermann, J.A. "Antitumor Activity and Safety of Pembrolizumab in Patients with Advanced Recurrent Ovarian Cancer: Results from the Phase II Keynote-100 Study." *Ann Oncol* 30, no. 7 (2019): 1080-87.
  221. Konstantinopoulos, P.A., Waggoner, S., Vidal, G.A., Mita, M., Moroney, J.W., Holloway, R., Van Le, L., Sachdev, J.C., Chapman-Davis, E., Colon-Otero, G., Penson, R.T., Matulonis, U.A., Kim, Y.B., Moore, K.N., Swisher, E.M., Färkkilä, A., D'Andrea, A., Stringer-Reaser, E., Wang, J., Buerstatte, N., Arora, S., Graham, J.R., Bobilev, D., Dezube, B.J., Munster, P. "Single-Arm Phases 1 and 2 Trial of Niraparib in Combination with Pembrolizumab in Patients with Recurrent Platinum-Resistant Ovarian Carcinoma." *JAMA Oncol* 5, no. 8 (2019): 1141-9.

222. Temkin, S.M., Mallen, A., Bellavance, E., Rubinsak, L., Wenham, R.M. "The Role of Menopausal Hormone Therapy in Women with or at Risk of Ovarian and Breast Cancers: Misconceptions and Current Directions." *Cancer* 125, no. 4 (2019): 499-514.
223. Biliatis, I., Thomakos, N., Rodolakis, A., Akrivos, N., Zacharakis, D., Antsaklis, A. "Safety of Hormone Replacement Therapy in Gynaecological Cancer Survivors." *J Obstet Gynaecol* 32, no. 4 (2012): 321-5.
224. Saeai, N., Peeyanjarassri, K., Liabsuetrakul, T., Buhachat, R., Myriokefalitaki, E. "Hormone Replacement Therapy after Surgery for Epithelial Ovarian Cancer." *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017, no. 2 (2017): CD012559.
225. Lowe, K.A., Chia, V.M., Taylor, A., O'Malley, C., Kelsh, M., Mohamed, M., Mowat, F.S., Goff, B. "An International Assessment of Ovarian Cancer Incidence and Mortality." *Gynecol Oncol* 130, no. 1 (2013): 107-14.
226. Paleari, L., Gandini, S., Provinciali, N., Puntoni, M., Colombo, N., DeCensi, A. "Clinical Benefit and Risk of Death with Endocrine Therapy in Ovarian Cancer: A Comprehensive Review and Meta-Analysis." *Gynecol Oncol* 146, no. 3 (2017): 504-13.
227. Pearce, C.L., Chung, K., Pike, M.C., Wu, A.H. "Increased Ovarian Cancer Risk Associated with Menopausal Estrogen Therapy Is Reduced by Adding a Progestin." *Cancer* 115, no. 3 (2009): 531-39.
228. Engelberth, S.A., Hempel, N., Bergkvist, M. "Development of Nanoscale Approaches for Ovarian Cancer Therapeutics and Diagnostics." *Critical reviews in oncogenesis* 19, no. 3-4 (2014): 281-315.
229. Sawan, C., Vaissière, T., Murr, R., Herceg, Z. "Epigenetic Drivers and Genetic Passengers on the Road to Cancer." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 642, no. 1 (2008): 1-13.
230. Widschwendter, M., Jiang, G., Woods, C., Müller, H.M., Fiegl, H., Goebel, G., Marth, C., Müller-Holzner, E., Zeimet, A.G., Laird, P.W., Ehrlich, M. "DNA Hypomethylation and Ovarian Cancer Biology." *Cancer Res* 64, no. 13 (2004): 4472-80.
231. Grady, W.M., Willis, J., Guilford, P.J., Dunbier, A.K., Toro, T.T., Lynch, H., Wiesner, G., Ferguson, K., Eng, C., Park, J.G., Kim, S.J., Markowitz, S. "Methylation of the Cdh1 Promoter as the Second Genetic Hit in Hereditary Diffuse Gastric Cancer." *Nature genetics* 26, no. 1 (2000): 16-7.
232. Pattamadilok, J., Huapai, N., Rattanatanyong, P., Vasurattana, A., Triratanachat, S., Tresukosol, D., Mutirangura, A. "Line-1 Hypomethylation Level as a Potential Prognostic Factor for Epithelial Ovarian Cancer." *Int J Gynecol Cancer* 18, no. 4 (2008): 711-7.
233. Press, J.Z., De Luca, A., Boyd, N., Young, S., Troussard, A., Ridge, Y., Kaurah, P., Kalloger, S.E., Blood, K.A., Smith, M., Spellman, P.T., Wang, Y., Miller, D.M., Horsman, D., Faham, M., Gilks, C.B., Gray, J., Huntsman, D.G. "Ovarian Carcinomas with Genetic and Epigenetic Brca1 Loss Have Distinct Molecular Abnormalities." *BMC Cancer* 8 (2008): 17.
234. Milde-Langosch, K., Ocon, E., Becker, G., Löning, T. "P16/Mts1 Inactivation in Ovarian Carcinomas: High Frequency of Reduced Protein Expression Associated with Hyper-Methylation or Mutation in Endometrioid and Mucinous Tumors." *Int J Cancer* 79, no. 1 (1998): 61-5.
235. Terasawa, K., Sagae, S., Toyota, M., Tsukada, K., Ogi, K., Satoh, A., Mita, H., Imai, K., Tokino, T., Kudo, R. "Epigenetic Inactivation of Tms1/Asc in Ovarian Cancer." *Clin Cancer Res* 10, no. 6 (2004): 2000-6.
236. Yuecheng, Y., Hongmei, L., Xiaoyan, X. "Clinical Evaluation of E-Cadherin Expression and Its Regulation Mechanism in Epithelial Ovarian Cancer." *Clinical & Experimental Metastasis* 23, no. 1 (2006): 65.
237. Keita, M., Wang, Z.Q., Pelletier, J.F., Bachvarova, M., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.C., Mes-Masson, A.M., Paquet, E.R., Bachvarov, D. "Global Methylation Profiling in Serous Ovarian Cancer Is Indicative for Distinct Aberrant DNA Methylation Signatures

- Associated with Tumor Aggressiveness and Disease Progression." *Gynecol Oncol* 128, no. 2 (2013): 356-63.
238. Sheta, R., Bachvarova, M., Macdonald, E., Gobeil, S., Vanderhyden, B., Bachvarov, D. "The Polypeptide Galnt6 Displays Redundant Functions Upon Suppression of Its Closest Homolog Galnt3 in Mediating Aberrant O-Glycosylation, Associated with Ovarian Cancer Progression." *Int J Mol Sci* 20, no. 9 (2019).
  239. Faddaoui, A., Bachvarova, M., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.C., Sebastianelli, A., Gobeil, S., Morin, C., Macdonald, E., Vanderhyden, B., Bachvarov, D. "The Mannose Receptor Ly75 (Dec205/Cd205) Modulates Cellular Phenotype and Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells." *Oncotarget* 7, no. 12 (2016): 14125-42.
  240. Sheta, R., Wang, Z.-Q., Bachvarova, M., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.-C., Sebastianelli, A., Gobeil, S., Morin, C., Macdonald, E., Vanderhyden, B., Bachvarov, D. "Hic-5 Regulates Epithelial to Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cells in a Tgfβ1-Independent Manner." *Oncotarget* 8, no. 47 (2017): 82506-30.
  241. Faddaoui, A., Sheta, R., Bachvarova, M., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.-C., Sebastianelli, A., Gobeil, S., Morin, C., Ghani, K., Bachvarov, D. "Suppression of the Grainyhead Transcription Factor 2 Gene (Grhl2) Inhibits the Proliferation, Migration, Invasion and Mediates Cell Cycle Arrest of Ovarian Cancer Cells." *Cell Cycle* 16, no. 7 (2017): 693-706.
  242. Chung, V.Y., Tan, T.Z., Ye, J., Huang, R.-L., Lai, H.-C., Kappei, D., Wollmann, H., Guccione, E., Huang, R.Y.-J. "The Role of Grhl2 and Epigenetic Remodeling in Epithelial–Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Cells." *Communications Biology* 2, no. 1 (2019): 272.
  243. Wang, Z.-Q., Keita, M., Bachvarova, M., Gobeil, S., Morin, C., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.-C., Sebastianelli, A., Trinh, X.B. "Inhibition of Runx2 Transcriptional Activity Blocks the Proliferation, Migration and Invasion of Epithelial Ovarian Carcinoma Cells." *PLoS one* 8, no. 10 (2013): e74384.
  244. Keita, M., Bachvarova, M., Morin, C., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.-C., Sebastianelli, A., Trinh, X.B., Bachvarov, D. "The Runx1 Transcription Factor Is Expressed in Serous Epithelial Ovarian Carcinoma and Contributes to Cell Proliferation, Migration and Invasion." *Cell cycle* 12, no. 6 (2013): 972-86.
  245. Li, Q., Lai, Q., He, C., Fang, Y., Yan, Q., Zhang, Y., Wang, X., Gu, C., Wang, Y., Ye, L., Han, L., Lin, X., Chen, J., Cai, J., Li, A., Liu, S. "Runx1 Promotes Tumour Metastasis by Activating the Wnt/B-Catenin Signalling Pathway and Emt in Colorectal Cancer." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38, no. 1 (2019): 334.
  246. Li, F., Wan, M., Zhang, B., Peng, Y., Zhou, Y., Pi, C., Xu, X., Ye, L., Zhou, X., Zheng, L. "Bivalent Histone Modifications and Development." *Current stem cell research & therapy* 13, no. 2 (2018): 83-90.
  247. He, W.P., Li, Q., Zhou, J., H, Z.S., Kung, H.F., Guan, X.Y., Xie, D., Yang, G.F. "Decreased Expression of H3k27me3 in Human Ovarian Carcinomas Correlates with More Aggressive Tumor Behavior and Poor Patient Survival." *Neoplasma* 62, no. 6 (2015): 932-7.
  248. Balch, C., Fang, F., Matei, D.E., Huang, T.H.M., Nephew, K.P. "Minireview: Epigenetic Changes in Ovarian Cancer." *Endocrinology* 150, no. 9 (2009): 4003-11.
  249. Magnotti, E., Marasco, W.A. "The Latest Animal Models of Ovarian Cancer for Novel Drug Discovery." *Expert Opinion on Drug Discovery* 13, no. 3 (2018): 249-57.
  250. Khanna, C., Hunter, K. "Modeling Metastasis in Vivo." *Carcinogenesis* 26, no. 3 (2005): 513-23.
  251. Rendi, M.H., Muehlenbachs, A., Garcia, R.L., Boyd, K.L. "17 - Female Reproductive System." In *Comparative Anatomy and Histology*, edited by Piper M. Treuting and Suzanne M. Dintzis, 253-84. San Diego: Academic Press, 2012.

252. Shaw, T.J., Senterman, M.K., Dawson, K., Crane, C.A., Vanderhyden, B.C. "Characterization of Intraperitoneal, Orthotopic, and Metastatic Xenograft Models of Human Ovarian Cancer." *Mol Ther* 10, no. 6 (2004): 1032-42.
253. Lengyel, E. "Ovarian Cancer Development and Metastasis." *Am J Pathol* 177, no. 3 (2010): 1053-64.
254. Cordero, A.B., Kwon, Y., Hua, X., Godwin, A.K. "In Vivo Imaging and Therapeutic Treatments in an Orthotopic Mouse Model of Ovarian Cancer." *J Vis Exp*, no. 42 (2010).
255. Zhang, Y., Luo, L., Zheng, X., Yu, T. "An Advanced Orthotopic Ovarian Cancer Model in Mice for Therapeutic Trials." *Biomed Res Int* 2016 (2016): 2585787.
256. Arauchi, A., Yang, C.H., Cho, S., Jarboe, E.A., Peterson, C.M., Bae, Y.H., Okano, T., Janát-Amsbury, M.M. "An Immunocompetent, Orthotopic Mouse Model of Epithelial Ovarian Cancer Utilizing Tissue Engineered Tumor Cell Sheets." *Tissue Eng Part C Methods* 21, no. 1 (2015): 23-34.
257. Yi, C., Zhang, L., Zhang, F., Li, L., Ling, S., Wang, X., Liu, X., Liang, W. "Methodologies for the Establishment of an Orthotopic Transplantation Model of Ovarian Cancer in Mice." *Front Med* 8, no. 1 (2014): 101-5.
258. Domcke, S., Sinha, R., Levine, D.A., Sander, C., Schultz, N. "Evaluating Cell Lines as Tumour Models by Comparison of Genomic Profiles." *Nat Commun* 4 (2013): 2126.
259. Rygaard, J., Poulsen, C.O. "Heterotransplantation of a Human Malignant Tumour to "Nude" Mice." *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 77, no. 4 (1969): 758-60.
260. Fu, X., Hoffman, R.M. "Human Ovarian Carcinoma Metastatic Models Constructed in Nude Mice by Orthotopic Transplantation of Histologically-Intact Patient Specimens." *Anticancer Res* 13, no. 2 (1993): 283-6.
261. Paine-Murrieta, G.D., Taylor, C.W., Curtis, R.A., Lopez, M.H., Dorr, R.T., Johnson, C.S., Funk, C.Y., Thompson, F., Hersh, E.M. "Human Tumor Models in the Severe Combined Immune Deficient (Scid) Mouse." *Cancer Chemother Pharmacol* 40, no. 3 (1997): 209-14.
262. Ito, R., Takahashi, T., Katano, I., Ito, M. "Current Advances in Humanized Mouse Models." *Cell Mol Immunol* 9, no. 3 (2012): 208-14.
263. Ricci, F., Bizzaro, F., Cesca, M., Guffanti, F., Ganzinelli, M., Decio, A., Ghilardi, C., Perego, P., Fruscio, R., Buda, A., Milani, R., Ostano, P., Chiorino, G., Bani, M.R., Damia, G., Giavazzi, R. "Patient-Derived Ovarian Tumor Xenografts Recapitulate Human Clinicopathology and Genetic Alterations." *Cancer Res* 74, no. 23 (2014): 6980-90.
264. Heo, E.J., Cho, Y.J., Cho, W.C., Hong, J.E., Jeon, H.K., Oh, D.Y., Choi, Y.L., Song, S.Y., Choi, J.J., Bae, D.S., Lee, Y.Y., Choi, C.H., Kim, T.J., Park, W.Y., Kim, B.G., Lee, J.W. "Patient-Derived Xenograft Models of Epithelial Ovarian Cancer for Preclinical Studies." *Cancer Res Treat* 49, no. 4 (2017): 915-26.
265. Topp, M.D., Hartley, L., Cook, M., Heong, V., Boehm, E., McShane, L., Pyman, J., McNally, O., Ananda, S., Harrell, M., Etemadmoghadam, D., Galletta, L., Alsop, K., Mitchell, G., Fox, S.B., Kerr, J.B., Hutt, K.J., Kaufmann, S.H., Australian Ovarian Cancer, S., Swisher, E.M., Bowtell, D.D., Wakefield, M.J., Scott, C.L. "Molecular Correlates of Platinum Response in Human High-Grade Serous Ovarian Cancer Patient-Derived Xenografts." *Mol Oncol* 8, no. 3 (2014): 656-68.
266. Dobbin, Z.C., Katre, A.A., Steg, A.D., Erickson, B.K., Shah, M.M., Alvarez, R.D., Conner, M.G., Schneider, D., Chen, D., Landen, C.N. "Using Heterogeneity of the Patient-Derived Xenograft Model to Identify the Chemoresistant Population in Ovarian Cancer." *Oncotarget* 5, no. 18 (2014): 8750-64.
267. Weroha, S.J., Becker, M.A., Enderica-Gonzalez, S., Harrington, S.C., Oberg, A.L., Maurer, M.J., Perkins, S.E., AlHilli, M., Butler, K.A., McKinstry, S., Fink, S., Jenkins, R.B., Hou, X., Kalli, K.R., Goodman, K.M., Sarkaria, J.N., Karlan, B.Y., Kumar, A., Kaufmann, S.H., Hartmann, L.C., Haluska, P. "Tumorgrafts as in Vivo Surrogates for Women with Ovarian Cancer." *Clin Cancer Res* 20, no. 5 (2014): 1288-97.

268. Meggetto, F., Muller, C., Henry, S., Selves, J., Mariamé, B., Brousset, P., Saati, T.A., Delsol, G. "Epstein-Barr Virus (Ebv)-Associated Lymphoproliferations in Severe Combined Immunodeficient Mice Transplanted with Hodgkin's Disease Lymph Nodes: Implications of Ebv-Positive Bystander B Lymphocytes Rather Than Ebv-Infected Reed-Sternberg Cells." *Blood* 87, no. 6 (1996): 2435-42.
269. Bondarenko, G., Ugolkov, A., Rohan, S., Kulesza, P., Dubrovskiy, O., Gursel, D., Mathews, J., O'Halloran, T.V., Wei, J.J., Mazar, A.P. "Patient-Derived Tumor Xenografts Are Susceptible to Formation of Human Lymphocytic Tumors." *Neoplasia* 17, no. 9 (2015): 735-41.
270. Butler, K.A., Hou, X., Becker, M.A., Zanfagnin, V., Enderica-Gonzalez, S., Visscher, D., Kalli, K.R., Tienchaianada, P., Haluska, P., Weroha, S.J. "Prevention of Human Lymphoproliferative Tumor Formation in Ovarian Cancer Patient-Derived Xenografts." *Neoplasia* 19, no. 8 (2017): 628-36.
271. Bankert, R.B., Balu-Iyer, S.V., Odunsi, K., Shultz, L.D., Kelleher, R.J., Jr., Barnas, J.L., Simpson-Abelson, M., Parsons, R., Yokota, S.J. "Humanized Mouse Model of Ovarian Cancer Recapitulates Patient Solid Tumor Progression, Ascites Formation, and Metastasis." *PLoS One* 6, no. 9 (2011): e24420.
272. Koneru, M., Purdon, T.J., Spriggs, D., Koneru, S., Brentjens, R.J. "Il-12 Secreting Tumor-Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells Eradicate Ovarian Tumors in Vivo." *Oncoimmunology* 4, no. 3 (2015): e994446.
273. Van Dyke, T., Jacks, T. "Cancer Modeling in the Modern Era: Progress and Challenges." *Cell* 108, no. 2 (2002): 135-44.
274. Lyons, S.K. "Advances in Imaging Mouse Tumour Models in Vivo." *The Journal of Pathology* 205, no. 2 (2005): 194-205.
275. Choy, G., O'Connor, S., Diehn, F.E., Costouros, N., Alexander, H.R., Choyke, P., Libutti, S.K. "Comparison of Noninvasive Fluorescent and Bioluminescent Small Animal Optical Imaging." *Biotechniques* 35, no. 5 (2003): 1022-6, 28-30.
276. Nelson, A.L., Algon, S.A., Munasinghe, J., Graves, O., Goumnerova, L., Burstein, D., Pomeroy, S.L., Kim, J.Y.H. "Magnetic Resonance Imaging of Patched Heterozygous and Xenografted Mouse Brain Tumors." *Journal of Neuro-Oncology* 62, no. 3 (2003): 259-67.
277. Puaux, A.L., Ong, L.C., Jin, Y., Teh, I., Hong, M., Chow, P.K., Golay, X., Abastado, J.P. "A Comparison of Imaging Techniques to Monitor Tumor Growth and Cancer Progression in Living Animals." *Int J Mol Imaging* 2011 (2011): 321538.
278. Yang, H., Berger, F., Tran, C., Gambhir, S.S., Sawyers, C.L. "Micropet Imaging of Prostate Cancer in Lncap-Sr39tk-Gfp Mouse Xenografts." *The Prostate* 55, no. 1 (2003): 39-47.
279. Green, A.A., McElroy, W.D. "Crystalline Firefly Luciferase." *Biochimica et Biophysica Acta* 20 (1956): 170-76.
280. Hosseinkhani, S. "Molecular Enigma of Multicolor Bioluminescence of Firefly Luciferase." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, no. 7 (2011): 1167-82.
281. Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger, A.L. *Principles of Biochemistry*: Freeman New York, 2008.
282. Sato, A., Klaunberg, B., Tolwani, R. "In Vivo Bioluminescence Imaging." *Comparative medicine* 54, no. 6 (2004): 631-34.
283. Kuo, C., Coquoz, O., Troy, T.L., Xu, H., Rice, B.W. "Three-Dimensional Reconstruction of in Vivo Bioluminescent Sources Based on Multispectral Imaging." *J Biomed Opt* 12, no. 2 (2007): 024007.
284. Kalluri, R., Neilson, E.G. "Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Implications for Fibrosis." *The Journal of clinical investigation* 112, no. 12 (2003): 1776-84.
285. Hay, E.D. "An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation." *Acta Anat (Basel)* 154, no. 1 (1995): 8-20.



286. Rothenpieler, U.W., Dressler, G.R. "Pax-2 Is Required for Mesenchyme-to-Epithelium Conversion During Kidney Development." *Development* 119, no. 3 (1993): 711-20.
287. Odish H, B.A., Zipursky SL, . *Molecular Cell Biology. 4th Edition.* New York ed, 2000.
288. Thiery, J.P., Sleeman, J.P. "Complex Networks Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, no. 2 (2006): 131-42.
289. Liu, Y. "Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention." *Journal of the American Society of Nephrology* 15, no. 1 (2004): 1-12.
290. Meulemans, D., Bronner-Fraser, M. "Gene-Regulatory Interactions in Neural Crest Evolution and Development." *Dev Cell* 7, no. 3 (2004): 291-9.
291. Kalluri, R., Weinberg, R.A. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *J Clin Invest* 119, no. 6 (2009): 1420-8.
292. Arvelo, F., Sojo, F., Cotte, C. "Tumour Progression and Metastasis." *Ecancermedicalscience* 10 (2016): 617-17.
293. Zeisberg, M., Neilson, E.G. "Biomarkers for Epithelial-Mesenchymal Transitions." *The Journal of clinical investigation* 119, no. 6 (2009): 1429-37.
294. Grigore, A.D., Jolly, M.K., Jia, D., Farach-Carson, M.C., Levine, H. "Tumor Budding: The Name Is Emt. Partial Emt." *J Clin Med* 5, no. 5 (2016).
295. Liao, T.-T., Yang, M.-H. "Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis: Clinical Significance and Regulatory Mechanisms." *Cells* 9, no. 3 (2020): 623.
296. Jolly, M.K., Tripathi, S.C., Jia, D., Mooney, S.M., Celiktas, M., Hanash, S.M., Mani, S.A., Pienta, K.J., Ben-Jacob, E., Levine, H. "Stability of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype." *Oncotarget* 7, no. 19 (2016): 27067-84.
297. Bocci, F., Jolly, M.K., Tripathi, S.C., Aguilar, M., Hanash, S.M., Levine, H., Onuchic, J.N. "Numb Prevents a Complete Epithelial-Mesenchymal Transition by Modulating Notch Signalling." *J R Soc Interface* 14, no. 136 (2017).
298. Roca, H., Hernandez, J., Weidner, S., McEachin, R.C., Fuller, D., Sud, S., Schumann, T., Wilkinson, J.E., Zaslavsky, A., Li, H., Maher, C.A., Daignault-Newton, S., Healy, P.N., Pienta, K.J. "Transcription Factors *Ovol1* and *Ovol2* Induce the Mesenchymal to Epithelial Transition in Human Cancer." *PLoS One* 8, no. 10 (2013): e76773-e73.
299. Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S. "Identification of the Tumour Transition States Occurring During Emt." *Nature* 556, no. 7702 (2018): 463-68.
300. Perrais, M., Chen, X., Perez-Moreno, M., Gumbiner, B.M. "E-Cadherin Homophilic Ligation Inhibits Cell Growth and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Independently of Other Cell Interactions." *Mol Biol Cell* 18, no. 6 (2007): 2013-25.
301. Hay, E.D., Zuk, A. "Transformations between Epithelium and Mesenchyme: Normal, Pathological, and Experimentally Induced." *Am J Kidney Dis* 26, no. 4 (1995): 678-90.
302. Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A. "Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis Via Multiple Downstream Transcriptional Pathways." *Cancer research* 68, no. 10 (2008): 3645-54.
303. Bates, R.C., Bellovin, D.I., Brown, C., Maynard, E., Wu, B., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Oettgen, P., Mercurio, A.M. "Transcriptional Activation of Integrin Beta6 During the Epithelial-Mesenchymal Transition Defines a Novel Prognostic Indicator of Aggressive Colon Carcinoma." *The Journal of clinical investigation* 115, no. 2 (2005): 339-47.
304. Davidson, L.A., Marsden, M., Keller, R., Desimone, D.W. "Integrin Alpha5beta1 and Fibronectin Regulate Polarized Cell Protrusions Required for Xenopus Convergence and Extension." *Curr Biol* 16, no. 9 (2006): 833-44.
305. White, L.R., Blanchette, J.B., Ren, L., Awn, A., Trpkov, K., Muruve, D.A. "The Characterization of Alpha5-Integrin Expression on Tubular Epithelium During Renal Injury." *Am J Physiol Renal Physiol* 292, no. 2 (2007): F567-76.

306. Qian, F., Zhang, Z.C., Wu, X.F., Li, Y.P., Xu, Q. "Interaction between Integrin Alpha(5) and Fibronectin Is Required for Metastasis of B16f10 Melanoma Cells." *Biochem Biophys Res Commun* 333, no. 4 (2005): 1269-75.
307. Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F., Pawson, T. "The Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinases Are Activated by Collagen." *Mol Cell* 1, no. 1 (1997): 13-23.
308. Evtimova, V., Zeillinger, R., Weidle, U.H. "Identification of Genes Associated with the Invasive Status of Human Mammary Carcinoma Cell Lines by Transcriptional Profiling." *Tumour Biol* 24, no. 4 (2003): 189-98.
309. Toivola, D.M., Tao, G.Z., Habtezion, A., Liao, J., Omary, M.B. "Cellular Integrity Plus: Organelle-Related and Protein-Targeting Functions of Intermediate Filaments." *Trends Cell Biol* 15, no. 11 (2005): 608-17.
310. Nisticò, P., Bissell, M.J., Radisky, D.C. "Epithelial-Mesenchymal Transition: General Principles and Pathological Relevance with Special Emphasis on the Role of Matrix Metalloproteinases." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, no. 2 (2012).
311. Mendez, M.G., Kojima, S., Goldman, R.D. "Vimentin Induces Changes in Cell Shape, Motility, and Adhesion During the Epithelial to Mesenchymal Transition." *Faseb j* 24, no. 6 (2010): 1838-51.
312. Raymond, W.A., Leong, A.S. "Vimentin--a New Prognostic Parameter in Breast Carcinoma?" *J Pathol* 158, no. 2 (1989): 107-14.
313. Kidd, M.E., Shumaker, D.K., Ridge, K.M. "The Role of Vimentin Intermediate Filaments in the Progression of Lung Cancer." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 50, no. 1 (2014): 1-6.
314. Du, L., Li, J., Lei, L., He, H., Chen, E., Dong, J., Yang, J. "High Vimentin Expression Predicts a Poor Prognosis and Progression in Colorectal Cancer: A Study with Meta-Analysis and Tcga Database." *Biomed Res Int* 2018 (2018): 6387810-10.
315. Bodnar, L., Stanczak, A., Cierniak, S., Smoter, M., Cichowicz, M., Kozłowski, W., Szczylik, C., Wieczorek, M., Lamparska-Przybysz, M. "Wnt/B-Catenin Pathway as a Potential Prognostic and Predictive Marker in Patients with Advanced Ovarian Cancer." *Journal of Ovarian Research* 7 (2014): 16-16.
316. Tan, R.J., Zhou, D., Zhou, L., Liu, Y. "Wnt/B-Catenin Signaling and Kidney Fibrosis." *Kidney International Supplements* 4, no. 1 (2014): 84-90.
317. Sánchez-Tilló, E., de Barrios, O., Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., Postigo, A. "B-Catenin/Tcf4 Complex Induces the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (Emt)-Activator Zeb1 to Regulate Tumor Invasiveness." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. 48 (2011): 19204-09.
318. Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A. "Snail, Zeb and Bhlh Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype?" *Nat Rev Cancer* 7, no. 6 (2007): 415-28.
319. De Craene, B., Berx, G. "Regulatory Networks Defining Emt During Cancer Initiation and Progression." *Nature Reviews Cancer* 13, no. 2 (2013): 97-110.
320. Barrallo-Gimeno, A., Nieto, M.A. "The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival: Implications in Development and Cancer." *Development* 132, no. 14 (2005): 3151-61.
321. Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., García De Herreros, A. "The Transcription Factor Snail Is a Repressor of E-Cadherin Gene Expression in Epithelial Tumour Cells." *Nat Cell Biol* 2, no. 2 (2000): 84-9.
322. Dong, C., Wu, Y., Yao, J., Wang, Y., Yu, Y., Rychahou, P.G., Evers, B.M., Zhou, B.P. "G9a Interacts with Snail and Is Critical for Snail-Mediated E-Cadherin Repression in Human Breast Cancer." *The Journal of clinical investigation* 122, no. 4 (2012): 1469-86.
323. Zhu, L.-F., Hu, Y., Yang, C.-C., Xu, X.-H., Ning, T.-Y., Wang, Z.-L., Ye, J.-H., Liu, L.-K. "Snail Overexpression Induces an Epithelial to Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell-Like Properties in Scc9 Cells." *Laboratory Investigation* 92, no. 5 (2012): 744-52.

324. Wu, Y., Evers, B.M., Zhou, B.P. "Small C-Terminal Domain Phosphatase Enhances Snail Activity through Dephosphorylation." *J Biol Chem* 284, no. 1 (2009): 640-8.
325. Wang, S.P., Wang, W.L., Chang, Y.L., Wu, C.T., Chao, Y.C., Kao, S.H., Yuan, A., Lin, C.W., Yang, S.C., Chan, W.K., Li, K.C., Hong, T.M., Yang, P.C. "P53 Controls Cancer Cell Invasion by Inducing the Mdm2-Mediated Degradation of Slug." *Nat Cell Biol* 11, no. 6 (2009): 694-704.
326. Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., Wu, K.-J. "Direct Regulation of Twist by Hif-1 $\alpha$  Promotes Metastasis." *Nature cell biology* 10, no. 3 (2008): 295-305.
327. Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J.H., Raman, V. "Twist Is a Transcriptional Repressor of E-Cadherin Gene Expression in Breast Cancer." *Biochem Biophys Res Commun* 367, no. 2 (2008): 235-41.
328. Hong, J., Zhou, J., Fu, J., He, T., Qin, J., Wang, L., Liao, L., Xu, J. "Phosphorylation of Serine 68 of Twist1 by Mapks Stabilizes Twist1 Protein and Promotes Breast Cancer Cell Invasiveness." *Cancer Res* 71, no. 11 (2011): 3980-90.
329. Sanchez-Tillo, E., Lazaro, A., Torrent, R., Cuatrecasas, M., Vaquero, E., Castells, A., Engel, P., Postigo, A. "Zeb1 Represses E-Cadherin and Induces an Emt by Recruiting the Swi/Snf Chromatin-Remodeling Protein Brg1." *Oncogene* 29, no. 24 (2010): 3490-500.
330. Lindner, P., Paul, S., Eckstein, M., Hampel, C., Muenzner, J.K., Erlenbach-Wuensch, K., Ahmed, H.P., Mahadevan, V., Brabletz, T., Hartmann, A., Vera, J., Schneider-Stock, R. "Emt Transcription Factor Zeb1 Alters the Epigenetic Landscape of Colorectal Cancer Cells." *Cell death & disease* 11, no. 2 (2020): 147.
331. Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, À., Beltran, M., Peiró, S., de Herreros, A.G. "Functional Cooperation between Snail1 and Twist in the Regulation of Zeb1 Expression During Epithelial to Mesenchymal Transition." *J Biol Chem* 286, no. 14 (2011): 12024-32.
332. Yang, X., Li, L., Huang, Q., Xu, W., Cai, X., Zhang, J., Yan, W., Song, D., Liu, T., Zhou, W., Li, Z., Yang, C., Dang, Y., Xiao, J. "Wnt Signaling through Snail1 and Zeb1 Regulates Bone Metastasis in Lung Cancer." *American journal of cancer research* 5, no. 2 (2015): 748-55.
333. Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R. "Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, no. 3 (2014): 178-96.
334. Gong, Z., Yu, J., Yang, S., Lai, P.B.S., Chen, G.G. "Fox Transcription Factor Family in Hepatocellular Carcinoma." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1874, no. 1 (2020): 188376.
335. Yu, S., Jiang, X., Li, J., Li, C., Guo, M., Ye, F., Zhang, M., Jiao, Y., Guo, B. "Comprehensive Analysis of the Gata Transcription Factor Gene Family in Breast Carcinoma Using Gene Microarrays, Online Databases and Integrated Bioinformatics." *Scientific reports* 9, no. 1 (2019): 4467.
336. Campbell, K., Whissell, G., Franch-Marro, X., Batlle, E., Casanova, J. "Specific Gata Factors Act as Conserved Inducers of an Endodermal-Emt." *Dev Cell* 21, no. 6 (2011): 1051-61.
337. Shao, S., Zhao, X., Zhang, X., Luo, M., Zuo, X., Huang, S., Wang, Y., Gu, S., Zhao, X. "Notch1 Signaling Regulates the Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion of Breast Cancer in a Slug-Dependent Manner." *Molecular cancer* 14, no. 1 (2015): 28-28.
338. Villarronga, M.A., Bevan, C.L., Belandia, B. "Notch Signaling: A Potential Therapeutic Target in Prostate Cancer." *Current Cancer Drug Targets* 8, no. 7 (2008): 566-80.
339. Ceccarelli, S., Megiorni, F., Bellavia, D., Marchese, C., Screpanti, I., Checquolo, S. "Notch3 Targeting: A Novel Weapon against Ovarian Cancer Stem Cells." *Stem Cells International* 2019 (2019): 6264931.
340. Leong, K.G., Niessen, K., Kulic, I., Raouf, A., Eaves, C., Pollet, I., Karsan, A. "Jagged1-Mediated Notch Activation Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Slug-

- Induced Repression of E-Cadherin." *Journal of Experimental Medicine* 204, no. 12 (2007): 2935-48.
341. Xie, M., Zhang, L., He, C.S., Xu, F., Liu, J.L., Hu, Z.H., Zhao, L.P., Tian, Y. "Activation of Notch-1 Enhances Epithelial-Mesenchymal Transition in Gefitinib-Acquired Resistant Lung Cancer Cells." *J Cell Biochem* 113, no. 5 (2012): 1501-13.
342. Yang, Y., Ahn, Y.H., Gibbons, D.L., Zang, Y., Lin, W., Thilaganathan, N., Alvarez, C.A., Moreira, D.C., Creighton, C.J., Gregory, P.A., Goodall, G.J., Kurie, J.M. "The Notch Ligand Jagged2 Promotes Lung Adenocarcinoma Metastasis through a Mir-200-Dependent Pathway in Mice." *The Journal of clinical investigation* 121, no. 4 (2011): 1373-85.
343. Hao, Y., Baker, D., Ten Dijke, P. "Tgf-B-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis." *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 11 (2019): 2767.
344. Xu, J., Lamouille, S., Derynck, R. "Tgf-Beta-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition." *Cell Res* 19, no. 2 (2009): 156-72.
345. Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.J., Ten Dijke, P. "Signaling of Transforming Growth Factor-Beta Family Members through Smad Proteins." *Eur J Biochem* 267, no. 24 (2000): 6954-67.
346. Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R. "Bone Morphogenetic Proteins." *Growth Factors* 22, no. 4 (2004): 233-41.
347. Gordon, K.J., Kirkbride, K.C., How, T., Blobe, G.C. "Bone Morphogenetic Proteins Induce Pancreatic Cancer Cell Invasiveness through a Smad1-Dependent Mechanism That Involves Matrix Metalloproteinase-2." *Carcinogenesis* 30, no. 2 (2009): 238-48.
348. Zeisberg, M., Shah, A.A., Kalluri, R. "Bone Morphogenic Protein-7 Induces Mesenchymal to Epithelial Transition in Adult Renal Fibroblasts and Facilitates Regeneration of Injured Kidney." *J Biol Chem* 280, no. 9 (2005): 8094-100.
349. Niehrs, C. "The Complex World of Wnt Receptor Signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, no. 12 (2012): 767-79.
350. Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., Bradley, A. "Requirement for Wnt3 in Vertebrate Axis Formation." *Nat Genet* 22, no. 4 (1999): 361-5.
351. García-Castro, M.I., Marcelle, C., Bronner-Fraser, M. "Ectodermal Wnt Function as a Neural Crest Inducer." *Science* 297, no. 5582 (2002): 848-51.
352. Krishnamurthy, N., Kurzrock, R. "Targeting the Wnt/Beta-Catenin Pathway in Cancer: Update on Effectors and Inhibitors." *Cancer Treatment Reviews* 62 (2018): 50-60.
353. Menezes, M.E. "The Wnt/B-Catenin Signaling Pathway in Epithelial Mesenchymal Transition." *J Postdoctoral Res* 1 (2014): 12.
354. Gulhati, P., Bowen, K.A., Liu, J., Stevens, P.D., Rychahou, P.G., Chen, M., Lee, E.Y., Weiss, H.L., O'Connor, K.L., Gao, T., Evers, B.M. "Mtorc1 and Mtorc2 Regulate Emt, Motility, and Metastasis of Colorectal Cancer Via Rhoa and Rac1 Signaling Pathways." *Cancer Res* 71, no. 9 (2011): 3246-56.
355. Makrodouli, E., Oikonomou, E., Koc, M., Andera, L., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Pintzas, A. "Braf and Ras Oncogenes Regulate Rho Gtpase Pathways to Mediate Migration and Invasion Properties in Human Colon Cancer Cells: A Comparative Study." *Mol Cancer* 10 (2011): 118.
356. Navandar, M., Garding, A., Sahu, S.K., Pataskar, A., Schick, S., Tiwari, V.K. "Erk Signalling Modulates Epigenome to Drive Epithelial to Mesenchymal Transition." *Oncotarget* 8, no. 17 (2017): 29269-81.
357. Billottet, C., Tuefferd, M., Gentien, D., Rapinat, A., Thiery, J.P., Broët, P., Jouanneau, J. "Modulation of Several Waves of Gene Expression During Fgf-1 Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of Carcinoma Cells." *J Cell Biochem* 104, no. 3 (2008): 826-39.
358. Ciruna, B., Rossant, J. "Fgf Signaling Regulates Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak." *Dev Cell* 1, no. 1 (2001): 37-49.

359. Al Moustafa, A.-E., Achkhar, A., Yasmeen, A. "Egf-Receptor Signaling and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Carcinomas." *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* (2012), <http://europepmc.org/abstract/MED/22202084>  
<https://doi.org/10.2741/s292>.
360. Rangel, M.C., Karasawa, H., Castro, N.P., Nagaoka, T., Salomon, D.S., Bianco, C. "Role of Cripto-1 During Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Development and Cancer." *Am J Pathol* 180, no. 6 (2012): 2188-200.
361. Heisenberg, C.P., Solnica-Krezel, L. "Back and Forth between Cell Fate Specification and Movement During Vertebrate Gastrulation." *Curr Opin Genet Dev* 18, no. 4 (2008): 311-6.
362. Uttamsingh, S., Bao, X., Nguyen, K.T., Bhanot, M., Gong, J., Chan, J.L., Liu, F., Chu, T.T., Wang, L.H. "Synergistic Effect between Egf and Tgf-Beta1 in Inducing Oncogenic Properties of Intestinal Epithelial Cells." *Oncogene* 27, no. 18 (2008): 2626-34.
363. Zavadil, J., Böttinger, E.P. "Tgf-Beta and Epithelial-to-Mesenchymal Transitions." *Oncogene* 24, no. 37 (2005): 5764-74.
364. Yang, J., Dai, C., Liu, Y. "A Novel Mechanism by Which Hepatocyte Growth Factor Blocks Tubular Epithelial to Mesenchymal Transition." *J Am Soc Nephrol* 16, no. 1 (2005): 68-78.
365. Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A., Shimoyama, Y., Sugimura, T., Hirohashi, S. "Silencing of the E-Cadherin Invasion-Suppressor Gene by Cpg Methylation in Human Carcinomas." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, no. 16 (1995): 7416-19.
366. Graff, J.R., Herman, J.G., Lapidus, R.G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D.F., Isaacs, W.B., Pitha, P.M., Davidson, N.E., Baylin, S.B. "E-Cadherin Expression Is Silenced by DNA Hypermethylation in Human Breast and Prostate Carcinomas." *Cancer Res* 55, no. 22 (1995): 5195-99.
367. Lombaerts, M., Van Wezel, T., Philippo, K., Dierssen, J., Zimmerman, R., Oosting, J., Van Eijk, R., Eilers, P., van De Water, B., Cornelisse, C. "E-Cadherin Transcriptional Downregulation by Promoter Methylation but Not Mutation Is Related to Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cell Lines." *British journal of cancer* 94, no. 5 (2006): 661-71.
368. Fukagawa, A., Ishii, H., Miyazawa, K., Saitoh, M. "Deltaef1 Associates with Dnmt1 and Maintains DNA Methylation of the E-Cadherin Promoter in Breast Cancer Cells." *Cancer Med* 4, no. 1 (2015): 125-35.
369. Xiao, X., Tang, W., Yuan, Q., Peng, L., Yu, P. "Epigenetic Repression of Krüppel-Like Factor 4 through Dnmt1 Contributes to Emt in Renal Fibrosis." *International Journal of Molecular Medicine* 35, no. 6 (2015): 1596-602.
370. Deng, Z., Wang, L., Hou, H., Zhou, J., Li, X. "Epigenetic Regulation of Iqgap2 Promotes Ovarian Cancer Progression Via Activating Wnt/B-Catenin Signaling." *International journal of oncology* 48, no. 1 (2016): 153-60.
371. Momparler, R.L. "Epigenetic Therapy of Cancer with 5-Aza-2'-Deoxycytidine (Decitabine)." Paper presented at the Seminars in oncology 2005.
372. Ateeq, B., Unterberger, A., Szyf, M., Rabbani, S.A. "Pharmacological Inhibition of DNA Methylation Induces Proinvasive and Prometastatic Genes in Vitro and in Vivo." *Neoplasia* 10, no. 3 (2008): 266-78.
373. Lu, A., Wang, W., Wang-Renault, S.-F., Ring, B.Z., Tanaka, Y., Weng, J., Su, L. "5-Aza-2'-Deoxycytidine Advances Emt of Breast Cancer Cells by Demethylating Sipal Promoter-Proximal Elements." *Journal of Cell Science* (2020).
374. Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., Cano, A. "Snail Mediates E-Cadherin Repression by the Recruitment of the Sin3a/Histone Deacetylase 1 (Hdac1)/Hdac2 Complex." *Mol Cell Biol* 24, no. 1 (2004): 306-19.

375. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi, Y. "Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog Lsd1." *Cell* 119, no. 7 (2004): 941-53.
376. Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B.K., Lu, J. "Requirement of the Histone Demethylase Lsd1 in Snai1-Mediated Transcriptional Repression During Epithelial-Mesenchymal Transition." *Oncogene* 29, no. 35 (2010): 4896-904.
377. Brabletz, S., Brabletz, T. "The Zeb/Mir-200 Feedback Loop--a Motor of Cellular Plasticity in Development and Cancer?" *EMBO Rep* 11, no. 9 (2010): 670-7.
378. Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., Peter, M.E. "The Mir-200 Family Determines the Epithelial Phenotype of Cancer Cells by Targeting the E-Cadherin Repressors Zeb1 and Zeb2." *Genes Dev* 22, no. 7 (2008): 894-907.
379. Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., Brunton, V.G., Morton, J., Sansom, O., Schüler, J., Stemmler, M.P., Herzberger, C., Hopt, U., Keck, T., Brabletz, S., Brabletz, T. "The Emt-Activator Zeb1 Promotes Tumorigenicity by Repressing Stemness-Inhibiting Micrnas." *Nat Cell Biol* 11, no. 12 (2009): 1487-95.
380. Ceppi, P., Mudduluru, G., Kumarswamy, R., Rapa, I., Scagliotti, G.V., Papotti, M., Allgayer, H. "Loss of Mir-200c Expression Induces an Aggressive, Invasive, and Chemoresistant Phenotype in Non-Small Cell Lung Cancer." *Mol Cancer Res* 8, no. 9 (2010): 1207-16.
381. Shindo, T., Niinuma, T., Nishiyama, N., Shinkai, N., Kitajima, H., Kai, M., Maruyama, R., Tokino, T., Masumori, N., Suzuki, H. "Epigenetic Silencing of Mir-200b Is Associated with Cisplatin Resistance in Bladder Cancer." *Oncotarget* 9, no. 36 (2018): 24457-69.
382. Castilla, M.Á., Díaz-Martín, J., Sarrió, D., Romero-Pérez, L., López-García, M.Á., Vieites, B., Biscuola, M., Ramiro-Fuentes, S., Isacke, C.M., Palacios, J. "MicroRNA-200 Family Modulation in Distinct Breast Cancer Phenotypes." *PLoS One* 7, no. 10 (2012): e47709-e09.
383. Qiu, M.T., Hu, J.W., Yin, R., Xu, L. "Long Noncoding Rna: An Emerging Paradigm of Cancer Research." *Tumour Biol* 34, no. 2 (2013): 613-20.
384. Wang, L., Zhao, Z., Feng, W., Ye, Z., Dai, W., Zhang, C., Peng, J., Wu, K. "Long Non-Coding Rna Tug1 Promotes Colorectal Cancer Metastasis Via Emt Pathway." *Oncotarget* 7, no. 32 (2016): 51713-19.
385. Wang, Y., Liu, Z., Yao, B., Dou, C., Xu, M., Xue, Y., Ding, L., Jia, Y., Zhang, H., Li, Q., Tu, K., Jiao, Y., Liu, Q., Guo, C. "Long Non-Coding Rna Tusc7 Acts a Molecular Sponge for Mir-10a and Suppresses Emt in Hepatocellular Carcinoma." *Tumor Biology* 37, no. 8 (2016): 11429-41.
386. Xu, S., Sui, S., Zhang, J., Bai, N., Shi, Q., Zhang, G., Gao, S., You, Z., Zhan, C., Liu, F., Pang, D. "Downregulation of Long Noncoding Rna Malat1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition Via the Pi3k-Akt Pathway in Breast Cancer." *International journal of clinical and experimental pathology* 8, no. 5 (2015): 4881-91.
387. Klymenko, Y., Kim, O., Loughran, E., Yang, J., Lombard, R., Alber, M., Stack, M.S. "Cadherin Composition and Multicellular Aggregate Invasion in Organotypic Models of Epithelial Ovarian Cancer Intraperitoneal Metastasis." *Oncogene* 36, no. 42 (2017): 5840-51.
388. Klymenko, Y., Kim, O., Stack, M.S. "Complex Determinants of Epithelial: Mesenchymal Phenotypic Plasticity in Ovarian Cancer." *Cancers* 9, no. 8 (2017).
389. Kenda Suster, N., Smrkolj, S., Virant-Klun, I. "Putative Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition Revealed in Sections of Ovarian Tumor in Patients with Serous Ovarian Carcinoma Using Immunohistochemistry for Vimentin and Pluripotency-Related Markers." *Journal of ovarian research* 10, no. 1 (2017): 11.
390. Abubaker, K., Latifi, A., Luwor, R., Nazaretian, S., Zhu, H., Quinn, M.A., Thompson, E.W., Findlay, J.K., Ahmed, N. "Short-Term Single Treatment of Chemotherapy Results in the Enrichment of Ovarian Cancer Stem Cell-Like Cells Leading to an Increased Tumor Burden." *Mol Cancer* 12 (2013): 24.

391. Loret, N., Denys, H., Tummers, P., Berx, G. "The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance." *Cancers* 11, no. 6 (2019): 838.
392. Strauss, R., Li, Z.Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Moller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P., Drescher, C., Urban, N., Bartek, J., Lieber, A. "Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity." *PloS one* 6, no. 1 (2011): e16186.
393. Alwosaibai, K., Abedini, A., Al-Hujaily, E.M., Tang, Y., Garson, K., Collins, O., Vanderhyden, B.C. "Pax2 Maintains the Differentiation of Mouse Oviductal Epithelium and Inhibits the Transition to a Stem Cell-Like State." *Oncotarget* 8, no. 44 (2017): 76881-97.
394. Newsted, D., Banerjee, S., Watt, K., Nersesian, S., Truesdell, P., Blazer, L.L., Cardarelli, L., Adams, J.J., Sidhu, S.S., Craig, A.W. "Blockade of Tgf-B Signaling with Novel Synthetic Antibodies Limits Immune Exclusion and Improves Chemotherapy Response in Metastatic Ovarian Cancer Models." *Oncoimmunology* 8, no. 2 (2019): e1539613.
395. Vergara, D., Merlot, B., Lucot, J.P., Collinet, P., Vinatier, D., Fournier, I., Salzet, M. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer." *Cancer Lett* 291, no. 1 (2010): 59-66.
396. Kajiyama, H., Hosono, S., Terauchi, M., Shibata, K., Ino, K., Yamamoto, E., Nomura, S., Nawa, A., Kikkawa, F. "Twist Expression Predicts Poor Clinical Outcome of Patients with Clear Cell Carcinoma of the Ovary." *Oncology* 71, no. 5-6 (2006): 394-401.
397. Takai, M., Terai, Y., Kawaguchi, H., Ashihara, K., Fujiwara, S., Tanaka, T., Tsunetoh, S., Tanaka, Y., Sasaki, H., Kanemura, M., Tanabe, A., Ohmichi, M. "The Emt (Epithelial-Mesenchymal-Transition)-Related Protein Expression Indicates the Metastatic Status and Prognosis in Patients with Ovarian Cancer." *Journal of ovarian research* 7 (2014): 76.
398. Chen, D., Wang, J., Zhang, Y., Chen, J., Yang, C., Cao, W., Zhang, H., Liu, Y., Dou, J. "Effect of Down-Regulated Transcriptional Repressor Zeb1 on the Epithelial-Mesenchymal Transition of Ovarian Cancer Cells." *Int J Gynecol Cancer* 23, no. 8 (2013): 1357-66.
399. Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., Kikkawa, F. "Chemoresistance to Paclitaxel Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Enhances Metastatic Potential for Epithelial Ovarian Carcinoma Cells." *Int J Oncol* 31, no. 2 (2007): 277-83.
400. Latifi, A., Abubaker, K., Castrechini, N., Ward, A.C., Liongue, C., Dobill, F., Kumar, J., Thompson, E.W., Quinn, M.A., Findlay, J.K., Ahmed, N. "Cisplatin Treatment of Primary and Metastatic Epithelial Ovarian Carcinomas Generates Residual Cells with Mesenchymal Stem Cell-Like Profile." *J Cell Biochem* 112, no. 10 (2011): 2850-64.
401. Rohnalter, V., Roth, K., Finkernagel, F., Adhikary, T., Obert, J., Dorzweiler, K., Bensberg, M., Müller-Brüsselbach, S., Müller, R. "A Multi-Stage Process Including Transient Polyploidization and Emt Precedes the Emergence of Chemoresistent Ovarian Carcinoma Cells with a Dedifferentiated and Pro-Inflammatory Secretory Phenotype." *Oncotarget* 6, no. 37 (2015): 40005-25.
402. Haslehurst, A.M., Koti, M., Dharsee, M., Nuin, P., Evans, K., Geraci, J., Childs, T., Chen, J., Li, J., Weberpals, J., Davey, S., Squire, J., Park, P.C., Feilotter, H. "Emt Transcription Factors Snail and Slug Directly Contribute to Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer." *BMC Cancer* 12, no. 1 (2012): 91.
403. Davidson, B., Holth, A., Hellesylt, E., Tan, T.Z., Huang, R.Y., Trope, C., Nesland, J.M., Thiery, J.P. "The Clinical Role of Epithelial-Mesenchymal Transition and Stem Cell Markers in Advanced-Stage Ovarian Serous Carcinoma Effusions." *Hum Pathol* 46, no. 1 (2015): 1-8.
404. Kurrey, N.K., Jalgaonkar, S.P., Joglekar, A.V., Ghanate, A.D., Chaskar, P.D., Doiphode, R.Y., Bapat, S.A. "Snail and Slug Mediate Radioresistance and Chemoresistance by

- Antagonizing P53-Mediated Apoptosis and Acquiring a Stem-Like Phenotype in Ovarian Cancer Cells." *Stem Cells* 27, no. 9 (2009): 2059-68.
405. Roane, B.M., Arend, R.C., Birrer, M.J. "Review: Targeting the Transforming Growth Factor-Beta Pathway in Ovarian Cancer." *Cancers* 11, no. 5 (2019): 668.
406. Gupta, N., Xu, Z., El-Sehemy, A., Steed, H., Fu, Y. "Notch3 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Carboplatin-Induced Apoptosis in Ovarian Cancer Cells." *Gynecol Oncol* 130, no. 1 (2013): 200-6.
407. Yue, P., Zhang, X., Paladino, D., Sengupta, B., Ahmad, S., Holloway, R.W., Ingersoll, S.B., Turkson, J. "Hyperactive Egf Receptor, Jaks and Stat3 Signaling Promote Enhanced Colony-Forming Ability, Motility and Migration of Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cells." *Oncogene* 31, no. 18 (2012): 2309-22.
408. Teeuwssen, M., Fodde, R. "Wnt Signaling in Ovarian Cancer Stemness, Emt, and Therapy Resistance." *Journal of clinical medicine* 8, no. 10 (2019): 1658.
409. Zhang, S., Balch, C., Chan, M.W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J.M., Yan, P.S., Huang, T.H., Nephew, K.P. "Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors." *Cancer Res* 68, no. 11 (2008): 4311-20.
410. Bapat, S.A., Mali, A.M., Koppikar, C.B., Kurrey, N.K. "Stem and Progenitor-Like Cells Contribute to the Aggressive Behavior of Human Epithelial Ovarian Cancer." *Cancer Res* 65, no. 8 (2005): 3025-9.
411. Lobo, N.A., Shimono, Y., Qian, D., Clarke, M.F. "The Biology of Cancer Stem Cells." *Annu Rev Cell Dev Biol* 23 (2007): 675-99.
412. Nagaraj, A.B., Joseph, P., Kovalenko, O., Singh, S., Armstrong, A., Redline, R., Resnick, K., Zanotti, K., Waggoner, S., DiFeo, A. "Critical Role of Wnt/B-Catenin Signaling in Driving Epithelial Ovarian Cancer Platinum Resistance." *Oncotarget* 6, no. 27 (2015): 23720.
413. Arend, R.C., Londoño-Joshi, A.I., Straughn, J.M., Buchsbaum, D.J. "The Wnt/B-Catenin Pathway in Ovarian Cancer: A Review." *Gynecol Oncol* 131, no. 3 (2013): 772-79.
414. Kuchenbaecker, K.B., Ramus, S.J., Tyrer, J., Lee, A., Shen, H.C., Beesley, J., Lawrenson, K., McGuffog, L., Healey, S., Lee, J.M., Spindler, T.J., Lin, Y.G., Pejovic, T., Bean, Y., Li, Q., Coetzee, S., Hazelett, D., Miron, A., Southey, M., Terry, M.B., Goldgar, D.E., Buys, S.S., Janavicius, R., Dorfling, C.M., van Rensburg, E.J., Neuhausen, S.L., Ding, Y.C., Hansen, T.V.O., Jønson, L., Gerdes, A.-M., Ejlersen, B., Barrowdale, D., Dennis, J., Benitez, J., Osorio, A., Garcia, M.J., Komenaka, I., Weitzel, J.N., Ganschow, P., Peterlongo, P., Bernard, L., Viel, A., Bonanni, B., Peissel, B., Manoukian, S., Radice, P., Papi, L., Ottini, L., Fostira, F., Konstantopoulou, I., Garber, J., Frost, D., Perkins, J., Platte, R., Ellis, S., Embrace, Godwin, A.K., Schmutzler, R.K., Meindl, A., Engel, C., Sutter, C., Sinilnikova, O.M., Collaborators, G.S., Damiola, F., Mazoyer, S., Stoppa-Lyonnet, D., Claes, K., De Leener, K., Kirk, J., Rodriguez, G.C., Piedmonte, M., O'Malley, D.M., de la Hoya, M., Caldes, T., Aittomäki, K., Nevanlinna, H., Collée, J.M., Rookus, M.A., Oosterwijk, J.C., Breast Cancer Family, R., Tihomirova, L., Tung, N., Hamann, U., Isacs, C., Tischkowitz, M., Imyanitov, E.N., Caligo, M.A., Campbell, I.G., Hogervorst, F.B.L., Hebon, Olah, E., Diez, O., Blanco, I., Brunet, J., Lazaro, C., Pujana, M.A., Jakubowska, A., Gronwald, J., Lubinski, J., Sukiennicki, G., Barkardottir, R.B., Plante, M., Simard, J., Soucy, P., Montagna, M., Tognazzo, S., Teixeira, M.R., Investigators, K.C., Pankratz, V.S., Wang, X., Lindor, N., Szabo, C.I., Kauff, N., Vijai, J., Aghajanian, C.A., Pfeiler, G., Berger, A., Singer, C.F., Tea, M.-K., Phelan, C.M., Greene, M.H., Mai, P.L., Rennert, G., Mulligan, A.M., Tchatchou, S., Andrulis, I.L., Glendon, G., Toland, A.E., Jensen, U.B., Kruse, T.A., Thomassen, M., Bojesen, A., Zidan, J., Friedman, E., Laitman, Y., Soller, M., Liljegren, A., Arver, B., Einbeigi, Z., Stenmark-Askmal, M., Olopade, O.I., Nussbaum, R.L., Rebbeck, T.R., Nathanson, K.L., Domchek, S.M., Lu, K.H., Karlan, B.Y., Walsh, C., Lester, J., Australian Cancer, S., Australian Ovarian Cancer Study, G., Hein, A., Ekici, A.B., Beckmann, M.W., Fasching, P.A., Lambrechts, D., Van Nieuwenhuysen, E., Vergote, I., Lambrechts, S., Dicks,



- E., Doherty, J.A., Wicklund, K.G., Rossing, M.A., Rudolph, A., Chang-Claude, J., Wang-Gohrke, S., Eilber, U., Moysich, K.B., Odunsi, K., Sucheston, L., Lele, S., Wilkens, L.R., Goodman, M.T., Thompson, P.J., Shvetsov, Y.B., Runnebaum, I.B., Dürst, M., Hillemanns, P., Dörk, T., Antonenkova, N., Bogdanova, N., Leminen, A., Pelttari, L.M., Butzow, R., Modugno, F., Kelley, J.L., Edwards, R.P., Ness, R.B., du Bois, A., Heitz, F., Schwaab, I., Harter, P., Matsuo, K., Hosono, S., Orsulic, S., Jensen, A., Kjaer, S.K., Hogdall, E., Hasmad, H.N., Azmi, M.A.N., Teo, S.-H., Woo, Y.-L., Fridley, B.L., Goode, E.L., Cunningham, J.M., Vierkant, R.A., Bruinsma, F., Giles, G.G., Liang, D., Hildebrandt, M.A.T., Wu, X., Levine, D.A., Bisogna, M., Berchuck, A., Iversen, E.S., Schildkraut, J.M., Concannon, P., Weber, R.P., Cramer, D.W., Terry, K.L., Poole, E.M., Tworoger, S.S., Bandera, E.V., Orlow, I., Olson, S.H., Krakstad, C., Salvesen, H.B., Tangen, I.L., Bjorge, L., van Altena, A.M., Aben, K.K.H., Kiemeny, L.A., Massuger, L.F.A.G., Kellar, M., Brooks-Wilson, A., Kelemen, L.E., Cook, L.S., Le, N.D., Cybulski, C., Yang, H., Lissowska, J., Brinton, L.A., Wentzensen, N., Hogdall, C., Lundvall, L., Nedergaard, L., Baker, H., Song, H., Eccles, D., McNeish, I., Paul, J., Carty, K., Siddiqui, N., Glasspool, R., Whittemore, A.S., Rothstein, J.H., McGuire, V., Sieh, W., Ji, B.-T., Zheng, W., Shu, X.-O., Gao, Y.-T., Rosen, B., Risch, H.A., McLaughlin, J.R., Narod, S.A., Monteiro, A.N., Chen, A., Lin, H.-Y., Permuth-Wey, J., Sellers, T.A., Tsai, Y.-Y., Chen, Z., Ziogas, A., Anton-Culver, H., Gentry-Maharaj, A., Menon, U., Harrington, P., Lee, A.W., Wu, A.H., Pearce, C.L., Coetzee, G., Pike, M.C., Dansonka-Mieszkowska, A., Timorek, A., Rzepecka, I.K., Kupryjanczyk, J., Freedman, M., Noushmehr, H., Easton, D.F., Offit, K., Couch, F.J., Gayther, S., Pharoah, P.P., Antoniou, A.C., Chenevix-Trench, G., Consortium of Investigators of Modifiers of, B., Brca. "Identification of Six New Susceptibility Loci for Invasive Epithelial Ovarian Cancer." *Nature genetics* 47, no. 2 (2015): 164-71.
415. Hoffmann, K., Berger, H., Kulbe, H., Thillainadarasan, S., Mollenkopf, H.-J., Zemojtel, T., Taube, E., Darb-Esfahani, S., Mangler, M., Sehouli, J., Chekerov, R., Braicu, E.I., Meyer, T.F., Kessler, M. "Stable Expansion of High-Grade Serous Ovarian Cancer Organoids Requires a Low-Wnt Environment." *The EMBO Journal* 39, no. 6 (2020): e104013.
416. Makarla, P.B., Saboorian, M.H., Ashfaq, R., Toyooka, K.O., Toyooka, S., Minna, J.D., Gazdar, A.F., Schorge, J.O. "Promoter Hypermethylation Profile of Ovarian Epithelial Neoplasms." *Clinical Cancer Research* 11, no. 15 (2005): 5365-69.
417. Su, H.-Y., Lai, H.-C., Lin, Y.-W., Liu, C.-Y., Chen, C.-K., Chou, Y.-C., Lin, S.-P., Lin, W.-C., Lee, H.-Y., Yu, M.-H. "Epigenetic Silencing of Sfrp5 Is Related to Malignant Phenotype and Chemoresistance of Ovarian Cancer through Wnt Signaling Pathway." *Int J Cancer* 127, no. 3 (2010): 555-67.
418. Bendoraite, A., Knouf, E.C., Garg, K.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., O'Briant, K.C., Ventura, A.P., Godwin, A.K., Karlan, B.Y., Drescher, C.W. "Regulation of Mir-200 Family Micrnas and Zeb Transcription Factors in Ovarian Cancer: Evidence Supporting a Mesothelial-to-Epithelial Transition." *Gynecologic Oncology* 116, no. 1 (2010): 117-25.
419. Zhou, B., Xu, H., Xia, M., Sun, C., Li, N., Guo, E., Guo, L., Shan, W., Lu, H., Wu, Y. "Overexpressed Mir-9 Promotes Tumor Metastasis Via Targeting E-Cadherin in Serous Ovarian Cancer." *Front Med* 11, no. 2 (2017): 214-22.
420. Ye, Z., Zhao, L., Li, J., Chen, W., Li, X. "Mir-30d Blocked Transforming Growth Factor B1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition by Targeting Snail in Ovarian Cancer Cells." *International Journal of Gynecologic Cancer* 25, no. 9 (2015): 1574-81.
421. Qiu, J.-j., Lin, Y.-y., Ye, L.-c., Ding, J.-x., Feng, W.-w., Jin, H.-y., Zhang, Y., Li, Q., Hua, K.-q. "Overexpression of Long Non-Coding Rna Hotair Predicts Poor Patient Prognosis and Promotes Tumor Metastasis in Epithelial Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 134, no. 1 (2014): 121-28.

422. Bidarra, S., Oliveira, P., Rocha, S., Saraiva, D., Oliveira, C., Barrias, C. "A 3d in Vitro Model to Explore the Inter-Conversion between Epithelial and Mesenchymal States During Emt and Its Reversion." *Scientific reports* 6, no. 1 (2016): 1-14.
423. Bonnomet, A., Syne, L., Brysse, A., Feyereisen, E., Thompson, E.W., Noël, A., Foidart, J.M., Birembaut, P., Polette, M., Gilles, C. "A Dynamic in Vivo Model of Epithelial-to-Mesenchymal Transitions in Circulating Tumor Cells and Metastases of Breast Cancer." *Oncogene* 31, no. 33 (2012): 3741-53.
424. Jia, D., Jolly, M.K., Boareto, M., Parsana, P., Mooney, S.M., Pienta, K.J., Levine, H., Ben-Jacob, E. "Ovol Guides the Epithelial-Hybrid-Mesenchymal Transition." *Oncotarget* 6, no. 17 (2015): 15436-48.
425. Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C. "The Receptor Dec-205 Expressed by Dendritic Cells and Thymic Epithelial Cells Is Involved in Antigen Processing." *Nature* 375, no. 6527 (1995): 151-5.
426. Witmer-Pack, M.D., Swiggard, W.J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M. "Tissue Distribution of the Dec-205 Protein That Is Detected by the Monoclonal Antibody Nldc-145. Ii. Expression in Situ in Lymphoid and Nonlymphoid Tissues." *Cell Immunol* 163, no. 1 (1995): 157-62.
427. Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., Steinman, R.M. "The Dendritic Cell Receptor for Endocytosis, Dec-205, Can Recycle and Enhance Antigen Presentation Via Major Histocompatibility Complex Class Ii-Positive Lysosomal Compartments." *J Cell Biol* 151, no. 3 (2000): 673-84.
428. Hossain, M.K., Wall, K.A. "Use of Dendritic Cell Receptors as Targets for Enhancing Anti-Cancer Immune Responses." *Cancers* 11, no. 3 (2019): 418.
429. Dhodapkar, M.V., Sznol, M., Zhao, B., Wang, D., Carvajal, R.D., Keohan, M.L., Chuang, E., Sanborn, R.E., Lutzky, J., Powderly, J., Kluger, H., Tejwani, S., Green, J., Ramakrishna, V., Crocker, A., Vitale, L., Yellin, M., Davis, T., Keler, T. "Induction of Antigen-Specific Immunity with a Vaccine Targeting Ny-Eso-1 to the Dendritic Cell Receptor Dec-205." *Sci Transl Med* 6, no. 232 (2014): 3008068.
430. Wang, B., Kuroiwa, J.M.Y., He, L.-Z., Charalambous, A., Keler, T., Steinman, R.M. "The Human Cancer Antigen Mesothelin Is More Efficiently Presented to the Mouse Immune System When Targeted to the Dec-205/Cd205 Receptor on Dendritic Cells." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1174 (2009): 6-17.
431. Merlino, G., Fiascarelli, A., Bigioni, M., Bressan, A., Carrisi, C., Bellarosa, D., Salerno, M., Bugianesi, R., Manno, R., Bernadó Morales, C., Arribas, J., Dusek, R.L., Ackroyd, J.E., Pham, P.H., Awdew, R., Aud, D., Trang, M., Lynch, C.M., Terrett, J., Wilson, K.E., Rohlf, C., Manzini, S., Pellacani, A., Binaschi, M. "Men1309/Obt076, a First-in-Class Antibody-Drug Conjugate (Adc) Targeting Cd205 in Solid Tumors." *Molecular Cancer Therapeutics* (2019): molcanther.0624.2018.
432. al-Tubuly, A.A., Luqmani, Y.A., Shousha, S., Melcher, D., Ritter, M.A. "Differential Expression of Gp200-Mr6 Molecule in Benign Hyperplasia and Down-Regulation in Invasive Carcinoma of the Breast." *Br J Cancer* 74, no. 7 (1996): 1005-11.
433. Al-Tubuly, A.A., Spijker, R., Pignatelli, M., Kirkland, S.C., Ritter, M.A. "Inhibition of Growth and Enhancement of Differentiation of Colorectal Carcinoma Cell Lines by Mab Mr6 and Il-4." *Int J Cancer* 71, no. 4 (1997): 605-11.
434. Huarte, E., Cubillos-Ruiz, J.R., Nesbeth, Y.C., Scarlett, U.K., Martinez, D.G., Buckanovich, R.J., Benencia, F., Stan, R.V., Keler, T., Sarobe, P., Sentman, C.L., Conejo-Garcia, J.R. "Depletion of Dendritic Cells Delays Ovarian Cancer Progression by Boosting Antitumor Immunity." *Cancer Res* 68, no. 18 (2008): 7684-91.
435. Giridhar, P.V., Funk, H.M., Gallo, C.A., Porollo, A., Mercer, C.A., Plas, D.R., Drew, A.F. "Interleukin-6 Receptor Enhances Early Colonization of the Murine Omentum by

- Upregulation of a Mannose Family Receptor, Ly75, in Ovarian Tumor Cells." *Clin Exp Metastasis* 28, no. 8 (2011): 887-97.
436. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. "Cancer Statistics, 2018." *CA Cancer J Clin* 68, no. 1 (2018): 7-30.
437. Bast, R.C., Jr., Hennessy, B., Mills, G.B. "The Biology of Ovarian Cancer: New Opportunities for Translation." *Nat Rev Cancer* 9, no. 6 (2009): 415-28.
438. Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E., Thun, M.J. "Cancer Statistics, 2003." *CA Cancer J Clin* 53, no. 1 (2003): 5-26.
439. Fruscio, R., Corso, S., Ceppi, L., Garavaglia, D., Garbi, A., Floriani, I., Franchi, D., Cantu, M.G., Bonazzi, C.M., Milani, R., Mangioni, C., Colombo, N. "Conservative Management of Early-Stage Epithelial Ovarian Cancer: Results of a Large Retrospective Series." *Ann Oncol* 24, no. 1 (2013): 138-44.
440. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. "Cancer Statistics, 2014." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 64, no. 1 (2014): 9-29.
441. Nieto, M.A. "The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27, no. 1 (2011): 347-76.
442. Nieto, M.A. "The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 27 (2011): 347-76.
443. Shintani, Y., Okimura, A., Sato, K., Nakagiri, T., Kadota, Y., Inoue, M., Sawabata, N., Minami, M., Ikeda, N., Kawahara, K., Matsumoto, T., Matsuura, N., Ohta, M., Okumura, M. "Epithelial to Mesenchymal Transition Is a Determinant of Sensitivity to Chemoradiotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer." *Ann Thorac Surg* 92, no. 5 (2011): 1794-804.
444. Nieto, M.A., Huang, R.Y., Jackson, R.A., Thiery, J.P. "Emt: 2016." *Cell* 166, no. 1 (2016): 21-45.
445. Dongre, A., Rashidian, M., Reinhardt, F., Bagnato, A., Keckesova, Z., Ploegh, H.L., Weinberg, R.A. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Immunosuppression in Breast Carcinomas." *Cancer research* 77, no. 15 (2017): 3982-89.
446. Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M. "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells." *Cell* 133, no. 4 (2008): 704-15.
447. Smith, B.N., Bhowmick, N.A. "Role of Emt in Metastasis and Therapy Resistance." *Journal of clinical medicine* 5, no. 2 (2016): 17.
448. Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., Kirchner, T. "Migrating Cancer Stem Cells— an Integrated Concept of Malignant Tumour Progression." *Nature Reviews Cancer* 5, no. 9 (2005): 744-49.
449. Seeber, L.M., van Diest, P.J. "Epigenetics in Ovarian Cancer." *Methods Mol Biol* 863 (2012): 253-69.
450. Aiello, N.M., Maddipati, R., Norgard, R.J., Balli, D., Li, J., Yuan, S., Yamazoe, T., Black, T., Sahmoud, A., Furth, E.E. "Emt Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration." *Developmental cell* 45, no. 6 (2018): 681-95. e4.
451. Hudson, L.G., Zeineldin, R., Stack, M.S. "Phenotypic Plasticity of Neoplastic Ovarian Epithelium: Unique Cadherin Profiles in Tumor Progression." *Clinical & experimental metastasis* 25, no. 6 (2008): 643-55.
452. Huang, R.Y., Wong, M., Tan, T., Kuay, K., Ng, A., Chung, V., Chu, Y., Matsumura, N., Lai, H., Lee, Y. "An Emt Spectrum Defines an Anoikis-Resistant and Spheroidogenic Intermediate Mesenchymal State That Is Sensitive to E-Cadherin Restoration by a Src-Kinase Inhibitor, Saracatinib (Azd0530)." *Cell death & disease* 4, no. 11 (2013): e915-e15.
453. Klymenko, Y., Johnson, J., Bos, B., Lombard, R., Campbell, L., Loughran, E., Stack, M.S. "Heterogeneous Cadherin Expression and Multicellular Aggregate Dynamics in Ovarian Cancer Dissemination." *Neoplasia* 19, no. 7 (2017): 549-63.

454. Strauss, R., Li, Z.-Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Möller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P. "Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity." *PLoS one* 6, no. 1 (2011).
455. Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., Ford, H.L. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels between Normal Development and Tumor Progression." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, no. 2 (2010): 117-34.
456. Solnica-Krezel, L. "Conserved Patterns of Cell Movements During Vertebrate Gastrulation." *Curr Biol* 15, no. 6 (2005): R213-28.
457. Tucker, R.P. "Neural Crest Cells: A Model for Invasive Behavior." *Int J Biochem Cell Biol* 36, no. 2 (2004): 173-7.
458. Mercado-Pimentel, M.E., Runyan, R.B. "Multiple Transforming Growth Factor-Beta Isoforms and Receptors Function During Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart." *Cells Tissues Organs* 185, no. 1-3 (2007): 146-56.
459. Chaffer, C.L., Thompson, E.W., Williams, E.D. "Mesenchymal to Epithelial Transition in Development and Disease." *Cells Tissues Organs* 185, no. 1-3 (2007): 7-19.
460. Birchmeier, C., Brohmann, H. "Genes That Control the Development of Migrating Muscle Precursor Cells." *Curr Opin Cell Biol* 12, no. 6 (2000): 725-30.
461. Lopez-Novoa, J.M., Nieto, M.A. "Inflammation and EMT: An Alliance Towards Organ Fibrosis and Cancer Progression." *EMBO Mol Med* 1, no. 6-7 (2009): 303-14.
462. Thiery, J.P. "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Tumour Progression." *Nat Rev Cancer* 2, no. 6 (2002): 442-54.
463. Portela, A., Esteller, M. "Epigenetic Modifications and Human Disease." *Nat Biotechnol* 28, no. 10 (2010): 1057-68.
464. Nickel, A., Stadler, S.C. "Role of Epigenetic Mechanisms in Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells." *Transl Res* 165, no. 1 (2015): 126-42.
465. Davidson, B., Trope, C.G., Reich, R. "Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Carcinoma." *Front Oncol* 2, no. 33 (2012).
466. Gonzalez, D.M., Medici, D. "Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition." *Science Signaling* 7, no. 344 (2014): re8-re8.
467. Kimelman, D., Xu, W. "Beta-Catenin Destruction Complex: Insights and Questions from a Structural Perspective." *Oncogene* 25, no. 57 (2006): 7482-91.
468. Christie, M., Jorissen, R.N., Mouradov, D., Sakthianandeswaren, A., Li, S., Day, F., Tsui, C., Lipton, L., Desai, J., Jones, I.T., McLaughlin, S., Ward, R.L., Hawkins, N.J., Ruzkiewicz, A.R., Moore, J., Burgess, A.W., Busam, D., Zhao, Q., Strausberg, R.L., Simpson, A.J., Tomlinson, I.P., Gibbs, P., Sieber, O.M. "Different Apc Genotypes in Proximal and Distal Sporadic Colorectal Cancers Suggest Distinct Wnt/B-Catenin Signalling Thresholds for Tumorigenesis." *Oncogene* 32, no. 39 (2013): 4675-82.
469. Kypta, R.M., Waxman, J. "Wnt/B-Catenin Signalling in Prostate Cancer." *Nat Rev Urol* 9, no. 8 (2012): 418-28.
470. Lin, S.Y., Xia, W., Wang, J.C., Kwong, K.Y., Spohn, B., Wen, Y., Pestell, R.G., Hung, M.C. "Beta-Catenin, a Novel Prognostic Marker for Breast Cancer: Its Roles in Cyclin D1 Expression and Cancer Progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 8 (2000): 4262-6.
471. Wu, R., Zhai, Y., Fearon, E.R., Cho, K.R. "Diverse Mechanisms of Beta-Catenin Dereglulation in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas." *Cancer Res* 61, no. 22 (2001): 8247-55.
472. Lee, C.M., Shvartsman, H., Deavers, M.T., Wang, S.C., Xia, W., Schmandt, R., Bodurka, D.C., Atkinson, E.N., Malpica, A., Gershenson, D.M., Hung, M.C., Lu, K.H. "Beta-Catenin Nuclear Localization Is Associated with Grade in Ovarian Serous Carcinoma." *Gynecol Oncol* 88, no. 3 (2003): 363-8.

473. Kildal, W., Risberg, B., Abeler, V.M., Kristensen, G.B., Sudbø, J., Nesland, J.M., Danielsen, H.E. "Beta-Catenin Expression, DNA Ploidy and Clinicopathological Features in Ovarian Cancer: A Study in 253 Patients." *Eur J Cancer* 41, no. 8 (2005): 1127-34.
474. Rask, K., Nilsson, A., Brännström, M., Carlsson, P., Hellberg, P., Janson, P.O., Hedin, L., Sundfeldt, K. "Wnt-Signalling Pathway in Ovarian Epithelial Tumours: Increased Expression of Beta-Catenin and Gsk3beta." *Br J Cancer* 89, no. 7 (2003): 1298-304.
475. Yee, D.S., Tang, Y., Li, X., Liu, Z., Guo, Y., Ghaffar, S., McQueen, P., Atreya, D., Xie, J., Simoneau, A.R., Hoang, B.H., Zi, X. "The Wnt Inhibitory Factor 1 Restoration in Prostate Cancer Cells Was Associated with Reduced Tumor Growth, Decreased Capacity of Cell Migration and Invasion and a Reversal of Epithelial to Mesenchymal Transition." *Molecular cancer* 9 (2010): 162-62.
476. Duan, H., Yan, Z., Chen, W., Wu, Y., Han, J., Guo, H., Qiao, J. "Tet1 Inhibits Emt of Ovarian Cancer Cells through Activating Wnt/B-Catenin Signaling Inhibitors Dkk1 and Sfrp2." *Gynecol Oncol* 147, no. 2 (2017): 408-17.
477. Chen, B., Wang, J., Dai, D., Zhou, Q., Guo, X., Tian, Z., Huang, X., Yang, L., Tang, H., Xie, X. "Ahnak Suppresses Tumour Proliferation and Invasion by Targeting Multiple Pathways in Triple-Negative Breast Cancer." *J Exp Clin Cancer Res* 36, no. 1 (2017): 65.
478. Shen, E., Wang, X., Liu, X., Lv, M., Zhang, L., Zhu, G., Sun, Z. "MicroRNA-93-5p Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer by Repressing Tumor Suppressor Ahnak Expression." *Cancer Cell International* 20, no. 1 (2020): 76.
479. Zhi, X., Lin, L., Yang, S., Bhuvaneshwar, K., Wang, H., Gusev, Y., Lee, M.-H., Kallakury, B., Shivapurkar, N., Cahn, K., Tian, X., Marshall, J.L., Byers, S.W., He, A.R. "Bii-Spectrin (Sptbn1) Suppresses Progression of Hepatocellular Carcinoma and Wnt Signaling by Regulation of Wnt Inhibitor Kallistatin." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61, no. 2 (2015): 598-612.
480. Dongre, A., Weinberg, R.A. "New Insights into the Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition and Implications for Cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, no. 2 (2019): 69-84.
481. Puisieux, A., Brabletz, T., Caramel, J. "Oncogenic Roles of Emt-Inducing Transcription Factors." *Nature cell biology* 16, no. 6 (2014): 488-94.
482. Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A., Weinberg, R.A. "Emt in Cancer." *Nat Rev Cancer* 18, no. 2 (2018): 128-34.
483. Diepenbruck, M., Christofori, G. "Epithelial-Mesenchymal Transition (Emt) and Metastasis: Yes, No, Maybe?" *Curr Opin Cell Biol* 43 (2016): 7-13.
484. Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S., Kalluri, R. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer." *Nature* 527, no. 7579 (2015): 525-30.
485. Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R.F., Vahdat, L.T., Altorki, N.K., Mittal, V., Gao, D. "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Is Not Required for Lung Metastasis but Contributes to Chemoresistance." *Nature* 527, no. 7579 (2015): 472-6.
486. Zhang, J., Tian, X.J., Zhang, H., Teng, Y., Li, R., Bai, F., Elankumaran, S., Xing, J. "Tgf-Beta-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Proceeds through Stepwise Activation of Multiple Feedback Loops." *Sci Signal* 7, no. 345 (2014): ra91.
487. Hong, T., Watanabe, K., Ta, C.H., Villarreal-Ponce, A., Nie, Q., Dai, X. "An Ovol2-Zeb1 Mutual Inhibitory Circuit Governs Bidirectional and Multi-Step Transition between Epithelial and Mesenchymal States." *PLoS Comput Biol* 11, no. 11 (2015): e1004569.
488. Jordan, N.V., Johnson, G.L., Abell, A.N. "Tracking the Intermediate Stages of Epithelial-Mesenchymal Transition in Epithelial Stem Cells and Cancer." *Cell cycle* 10, no. 17 (2011): 2865-73.
489. Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Trevor, K.T. "Experimental Co-Expression of Vimentin and Keratin Intermediate Filaments in Human Breast Cancer Cells Results in

- Phenotypic Interconversion and Increased Invasive Behavior." *Am J Pathol* 150, no. 2 (1997): 483-95.
490. Schliekelman, M.J., Taguchi, A., Zhu, J., Dai, X., Rodriguez, J., Celiktas, M., Zhang, Q., Chin, A., Wong, C.H., Wang, H., McFerrin, L., Selamat, S.A., Yang, C., Kroh, E.M., Garg, K.S., Behrens, C., Gazdar, A.F., Laird-Offringa, I.A., Tewari, M., Wistuba, II, Thiery, J.P., Hanash, S.M. "Molecular Portraits of Epithelial, Mesenchymal, and Hybrid States in Lung Adenocarcinoma and Their Relevance to Survival." *Cancer Res* 75, no. 9 (2015): 1789-800.
  491. Jolly, M.K., Jia, D., Boareto, M., Mani, S.A., Pienta, K.J., Ben-Jacob, E., Levine, H. "Coupling the Modules of Emt and Stemness: A Tunable 'Stemness Window' Model." *Oncotarget* 6, no. 28 (2015): 25161-74.
  492. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. "Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells." *Nature* 414, no. 6859 (2001): 105-11.
  493. Foster, R., Buckanovich, R.J., Rueda, B.R. "Ovarian Cancer Stem Cells: Working Towards the Root of Stemness." *Cancer Lett* 338, no. 1 (2013): 147-57.
  494. Visvader, J.E., Lindeman, G.J. "Cancer Stem Cells in Solid Tumours: Accumulating Evidence and Unresolved Questions." *Nat Rev Cancer* 8, no. 10 (2008): 755-68.
  495. Ahmed, N., Abubaker, K., Findlay, J.K. "Ovarian Cancer Stem Cells: Molecular Concepts and Relevance as Therapeutic Targets." *Mol Aspects Med* 39 (2014): 110-25.
  496. Garson, K., Vanderhyden, B.C. "Epithelial Ovarian Cancer Stem Cells: Underlying Complexity of a Simple Paradigm." *Reproduction* 149, no. 2 (2015): R59-70.
  497. Li, Y., Chen, T., Zhu, J., Zhang, H., Jiang, H., Sun, H. "High Aldh Activity Defines Ovarian Cancer Stem-Like Cells with Enhanced Invasiveness and Emt Progress Which Are Responsible for Tumor Invasion." *Biochem Biophys Res Commun* 495, no. 1 (2018): 1081-88.
  498. Li, X., Zou, Z., Tang, J., Zheng, Y., Liu, Y., Luo, Y., Liu, Q., Wang, Y. "Nos1 Upregulates Abcg2 Expression Contributing to Ddp Chemoresistance in Ovarian Cancer Cells." *Oncology letters* 17, no. 2 (2019): 1595-602.
  499. Zhang, W., Yu, F., Wang, Y., Zhang, Y., Meng, L., Chi, Y. "Rab23 Promotes the Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer Via the Shh-Gli-Abcg2 Signaling Pathway." *Oncology letters* 15, no. 4 (2018): 5155-60.
  500. Roy, L., Bobbs, A., Sattler, R., Kurkewich, J.L., Dausinas, P.B., Nallathamby, P., Cowden Dahl, K.D. "Cd133 Promotes Adhesion to the Ovarian Cancer Metastatic Niche." *Cancer Growth Metastasis* 11 (2018): 1179064418767882.
  501. Tsikouras, P., Tsagias, N., Pinidis, P., Csorba, R., Vrachnis, N., Dafopoulos, A., Bouchlariotou, S., Liberis, A., Teichmann, A.T., von Tempelhoff, G.F. "The Contribution of Catumaxomab in the Treatment of Malignant Ascites in Patients with Ovarian Cancer: A Review of the Literature." *Arch Gynecol Obstet* 288, no. 3 (2013): 581-5.
  502. Tayama, S., Motohara, T., Narantuya, D., Li, C., Fujimoto, K., Sakaguchi, I., Tashiro, H., Saya, H., Nagano, O., Katabuchi, H. "The Impact of Epcam Expression on Response to Chemotherapy and Clinical Outcomes in Patients with Epithelial Ovarian Cancer." *Oncotarget* 8, no. 27 (2017): 44312-25.
  503. Guo, B.H., Feng, Y., Zhang, R., Xu, L.H., Li, M.Z., Kung, H.F., Song, L.B., Zeng, M.S. "Bmi-1 Promotes Invasion and Metastasis, and Its Elevated Expression Is Correlated with an Advanced Stage of Breast Cancer." *Mol Cancer* 10, no. 1 (2011): 10.
  504. Vonlanthen, S., Heighway, J., Altermatt, H., Gugger, M., Kappeler, A., Borner, M., Van Lohuizen, M., Betticher, D. "The Bmi-1 Oncoprotein Is Differentially Expressed in Non-Small Cell Lung Cancer and Correlates with Ink4a-Arf Locus Expression." *British journal of cancer* 84, no. 10 (2001): 1372-76.
  505. Zhang, F., Sui, L., Xin, T. "Correlations of Bmi-1 Expression and Telomerase Activity in Ovarian Cancer Tissues." *Exp Oncol* 30, no. 1 (2008): 70-4.

506. Dong, P., Kaneuchi, M., Watari, H., Hamada, J., Sudo, S., Ju, J., Sakuragi, N. "MicroRNA-194 Inhibits Epithelial to Mesenchymal Transition of Endometrial Cancer Cells by Targeting Oncogene Bmi-1." *Molecular cancer* 10 (2011): 99-99.
507. Slomiany, M.G., Dai, L., Tolliver, L.B., Grass, G.D., Zeng, Y., Toole, B.P. "Inhibition of Functional Hyaluronan-Cd44 Interactions in Cd133-Positive Primary Human Ovarian Carcinoma Cells by Small Hyaluronan Oligosaccharides." *Clinical Cancer Research* 15, no. 24 (2009): 7593-601.
508. Lee, H.J., Choe, G., Jheon, S., Sung, S.-W., Lee, C.-T., Chung, J.-H. "Cd24, a Novel Cancer Biomarker, Predicting Disease-Free Survival of Non-Small Cell Lung Carcinomas: A Retrospective Study of Prognostic Factor Analysis from the Viewpoint of Forthcoming (Seventh) New Tnm Classification." *Journal of Thoracic Oncology* 5, no. 5 (2010): 649-57.
509. Jolly, M.K., Preca, B.-T., Tripathi, S.C., Jia, D., George, J.T., Hanash, S.M., Brabletz, T., Stemmler, M.P., Maurer, J., Levine, H. "Interconnected Feedback Loops among Esrp1, Has2, and Cd44 Regulate Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer." *APL bioengineering* 2, no. 3 (2018): 031908-08.
510. Bapat, S.A. "Human Ovarian Cancer Stem Cells." *Reproduction (Cambridge, England)* 140, no. 1 (2010): 33-41.
511. Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., Jin, H., Cahuzac, N., Mehrpour, M., Lu, Y. "Cd44 Is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells." *Clinical Cancer Research* 14, no. 21 (2008): 6751-60.
512. Leung, E.L.-H., Fiscus, R.R., Tung, J.W., Tin, V.P.-C., Cheng, L.C., Sihoe, A.D.-L., Fink, L.M., Ma, Y., Wong, M.P. "Non-Small Cell Lung Cancer Cells Expressing Cd44 Are Enriched for Stem Cell-Like Properties." *PloS one* 5, no. 11 (2010).
513. Weber, G.F., Bronson, R.T., Ilagan, J., Cantor, H., Schmits, R., Mak, T.W. "Absence of the Cd44 Gene Prevents Sarcoma Metastasis." *Cancer Res* 62, no. 8 (2002): 2281-86.
514. Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haußmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., Herrlich, P. "A New Variant of Glycoprotein Cd44 Confers Metastatic Potential to Rat Carcinoma Cells." *Cell* 65, no. 1 (1991): 13-24.
515. Godar, S., Ince, T.A., Bell, G.W., Feldser, D., Donaher, J.L., Bergh, J., Liu, A., Miu, K., Watnick, R.S., Reinhardt, F. "Growth-Inhibitory and Tumor-Suppressive Functions of P53 Depend on Its Repression of Cd44 Expression." *Cell* 134, no. 1 (2008): 62-73.
516. Lopez, J.I., Camenisch, T.D., Stevens, M.V., Sands, B.J., McDonald, J., Schroeder, J.A. "Cd44 Attenuates Metastatic Invasion During Breast Cancer Progression." *Cancer Res* 65, no. 15 (2005): 6755-63.
517. Gao, A.C., Lou, W., Dong, J.-T., Isaacs, J.T. "Cd44 Is a Metastasis Suppressor Gene for Prostatic Cancer Located on Human Chromosome 11p13." *Cancer Res* 57, no. 5 (1997): 846-49.
518. Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L., Faitelson, Y. "Cd44 in Cancer." *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 39, no. 6 (2002): 527-79.
519. Di, J., Yigit, R., Figdor, C.G., Duiveman-de Boer, T., Massuger, L.F., Torensma, R. "Expression Compilation of Several Putative Cancer Stem Cell Markers by Primary Ovarian Carcinoma." (2010).
520. Alvero, A.B., Chen, R., Fu, H.-H., Montagna, M., Schwartz, P.E., Rutherford, T., Silasi, D.-A., Steffensen, K.D., Waldstrom, M., Visintin, I. "Molecular Phenotyping of Human Ovarian Cancer Stem Cells Unravels the Mechanisms for Repair and Chemoresistance." *Cell cycle* 8, no. 1 (2009): 158-66.
521. Silva, I.A., Bai, S., McLean, K., Yang, K., Griffith, K., Thomas, D., Ginestier, C., Johnston, C., Kueck, A., Reynolds, R.K., Wicha, M.S., Buckanovich, R.J. "Aldehyde Dehydrogenase in Combination with Cd133 Defines Angiogenic Ovarian Cancer Stem Cells That Portend Poor Patient Survival." *Cancer Res* 71, no. 11 (2011): 3991-4001.

522. Deng, J., Wang, L., Chen, H., Hao, J., Ni, J., Chang, L., Duan, W., Graham, P., Li, Y. "Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells for Chemoresistant Ovarian Cancer." *Oncotarget* 7, no. 34 (2016).
523. Malecki, M., Anderson, M., Beauchaine, M., Seo, S., Tombokan, X., Malecki, R. "Tra-1-60(+), Ssea-4(+), Oct4a(+), Nanog(+) Clones of Pluripotent Stem Cells in the Embryonal Carcinomas of the Ovaries." *Journal of stem cell research & therapy* 2, no. 5 (2012): 130.
524. Friedmann-Morvinski, D., Verma, I.M. "Dedifferentiation and Reprogramming: Origins of Cancer Stem Cells." *EMBO Rep* 15, no. 3 (2014): 244-53.
525. Pan, Y., Jiao, J., Zhou, C., Cheng, Q., Hu, Y., Chen, H. "Nanog Is Highly Expressed in Ovarian Serous Cystadenocarcinoma and Correlated with Clinical Stage and Pathological Grade." *Pathobiology* 77, no. 6 (2010): 283-88.
526. Lee, M., Nam, E.J., Kim, S.W., Kim, S., Kim, J.H., Kim, Y.T. "Prognostic Impact of the Cancer Stem Cell-Related Marker Nanog in Ovarian Serous Carcinoma." *International Journal of Gynecologic Cancer* 22, no. 9 (2012): 1489-96.
527. Wei, C., Zhang, X., He, S., Liu, B., Han, H., Sun, X. "MicroRNA-219-5p Inhibits the Proliferation, Migration, and Invasion of Epithelial Ovarian Cancer Cells by Targeting the Twist/Wnt/B-Catenin Signaling Pathway." *Gene* 637 (2017): 25-32.
528. Raghavan, S., Mehta, P., Xie, Y., Lei, Y.L., Mehta, G. "Ovarian Cancer Stem Cells and Macrophages Reciprocally Interact through the Wnt Pathway to Promote Pro-Tumoral and Malignant Phenotypes in 3d Engineered Microenvironments." *Journal for immunotherapy of cancer* 7, no. 1 (2019): 190.
529. Ruan, X., Liu, A., Zhong, M., Wei, J., Zhang, W., Rong, Y., Liu, W., Li, M., Qing, X., Chen, G. "Silencing Lgr6 Attenuates Stemness and Chemoresistance Via Inhibiting Wnt/B-Catenin Signaling in Ovarian Cancer." *Molecular Therapy-Oncolytics* 14 (2019): 94-106.
530. Logan, C.Y., Nusse, R. "The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 (2004): 781-810.
531. Clevers, H., Nusse, R. "Wnt/B-Catenin Signaling and Disease." *Cell* 149, no. 6 (2012): 1192-205.
532. Oren, M., Rotter, V. "Mutant P53 Gain-of-Function in Cancer." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, no. 2 (2010): a001107.
533. Muller, P.A., Vousden, K.H. "Mutant P53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities." *Cancer cell* 25, no. 3 (2014): 304-17.
534. Bieganski, K.T., Mello, S.S., Attardi, L.D. "Unravelling Mechanisms of P53-Mediated Tumour Suppression." *Nature Reviews Cancer* 14, no. 5 (2014): 359-70.
535. Havrilesky, L., Darcy, K.M., Hamdan, H., Priore, R.L., Leon, J., Bell, J., Berchuck, A. "Prognostic Significance of P53 Mutation and P53 Overexpression in Advanced Epithelial Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study." *Journal of Clinical Oncology* 21, no. 20 (2003): 3814-25.
536. Köbel, M., Reuss, A., Bois, A.d., Kommoss, S., Kommoss, F., Gao, D., Kalloger, S.E., Huntsman, D.G., Gilks, C.B. "The Biological and Clinical Value of P53 Expression in Pelvic High-Grade Serous Carcinomas." *The Journal of Pathology* 222, no. 2 (2010): 191-98.
537. Muller, P., Hrstka, R., Coomber, D., Lane, D.P., Vojtesek, B. "Chaperone-Dependent Stabilization and Degradation of P53 Mutants." *Oncogene* 27, no. 24 (2008): 3371-83.
538. Mantovani, F., Collavin, L., Del Sal, G. "Mutant P53 as a Guardian of the Cancer Cell." *Cell Death & Differentiation* 26, no. 2 (2019): 199-212.
539. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. "P21 Is a Universal Inhibitor of Cyclin Kinases." *Nature* 366, no. 6456 (1993): 701-04.
540. Lawlor, M.A., Rotwein, P. "Insulin-Like Growth Factor-Mediated Muscle Cell Survival: Central Roles for Akt and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P21." *Molecular and Cellular Biology* 20, no. 23 (2000): 8983-95.



541. Mitsuuchi, Y., Johnson, S.W., Selvakumaran, M., Williams, S.J., Hamilton, T.C., Testa, J.R. "The Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway Plays a Critical Role in the Expression of P21waf1/Cip1/Sdi1 Induced by Cisplatin and Paclitaxel." *Cancer Res* 60, no. 19 (2000): 5390-4.
542. Li, Y., Dowbenko, D., Lasky, L.A. "Akt/Pkb Phosphorylation of P21cip/Waf1 Enhances Protein Stability of P21cip/Waf1 and Promotes Cell Survival." *Journal of Biological Chemistry* 277, no. 13 (2002): 11352-61.
543. Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.-H., Hung, M.-C. "Cytoplasmic Localization of P21 Cip1/Waf1 by Akt-Induced Phosphorylation in Her-2/Neu-Overexpressing Cells." *Nature cell biology* 3, no. 3 (2001): 245-52.
544. Koster, R., di Pietro, A., Timmer-Bosscha, H., Gibcus, J.H., van den Berg, A., Suurmeijer, A.J., Bischoff, R., Gietema, J.A., de Jong, S. "Cytoplasmic P21 Expression Levels Determine Cisplatin Resistance in Human Testicular Cancer." *The Journal of clinical investigation* 120, no. 10 (2010): 3594-605.
545. Shiraki, K., Wagayama, H. "Cytoplasmic P21waf1/Cip1 Expression in Human Hepatocellular Carcinomas." *Liver International* 26, no. 8 (2006): 1018-19.
546. Pérez-Tenorio, G., Berglund, F., Esguerra Merca, A., Nordenskjöld, B., Rutqvist, L.E., Skoog, L., Stål, O. "Cytoplasmic P21waf1/Cip1 Correlates with Akt Activation and Poor Response to Tamoxifen in Breast Cancer." *Int J Oncol* 28, no. 5 (2006): 1031-42.
547. Xia, X., Ma, Q., Li, X., Ji, T., Chen, P., Xu, H., Li, K., Fang, Y., Weng, D., Weng, Y., Liao, S., Han, Z., Liu, R., Zhu, T., Wang, S., Xu, G., Meng, L., Zhou, J., Ma, D. "Cytoplasmic P21 Is a Potential Predictor for Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer." *BMC Cancer* 11, no. 1 (2011): 399.
548. Karimian, A., Ahmadi, Y., Yousefi, B. "Multiple Functions of P21 in Cell Cycle, Apoptosis and Transcriptional Regulation after DNA Damage." *DNA Repair* 42 (2016): 63-71.
549. Piccolo, M.T., Crispi, S. "The Dual Role Played by P21 May Influence the Apoptotic or Anti-Apoptotic Fate in Cancer." *Journal of Cancer Research Updates* 1, no. 2 (2012): 189-202.
550. Tran, D.D., Corsa, C.A., Biswas, H., Aft, R.L., Longmore, G.D. "Temporal and Spatial Cooperation of Snail1 and Twist1 During Epithelial-Mesenchymal Transition Predicts for Human Breast Cancer Recurrence." *Mol Cancer Res* 9, no. 12 (2011): 1644-57.
551. Xing, J., Tian, X.-J. "Investigating Epithelial-to-Mesenchymal Transition with Integrated Computational and Experimental Approaches." *Physical biology* 16, no. 3 (2019): 031001.