

PIERRE-LUC MERCIER

***L'HYPERMÉTHYLATION DE DOK1 N'A PAS  
D'EFFET SUR SON NIVEAU D'EXPRESSION DANS  
LES TUMEURS OVARIENNES : CORRÉLATION DU  
NIVEAU D'EXPRESSION DE DOK1 AVEC LA SURVIE  
DES PATIENTES DU CANCER OVARIEN***

Mémoire présenté à  
la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de Maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2010

## Résumé

Les bases moléculaires de l'initiation et de la progression du cancer ovarien épithélial (COE) sont pauvrement comprises. Un élément pathogénique clé dans le cancer est l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, fréquemment due à l'hyperméthylation de leur région promotrice. Dans ce contexte, nous avons utilisé une approche épigénomique pour trouver des gènes hyperméthylés dans le COE. Nous avons employé un agent déméthylant, 5-aza-dC, pour réactiver les gènes hyperméthylés dans quatre lignées cellulaires du COE (SKOV3, OVCAR3, TOV112 et TOV21). Nous avons trouvé plusieurs cibles potentielles d'hyperméthylation qui pourraient jouer un rôle fonctionnel dans la suppression tumorale, l'apoptose ou la réparation de l'ADN. Nous avons évalué leur statut de méthylation par MSP (methylation-specific PCR) et BSP (bisulfite-sequencing PCR) avec des échantillons normaux et tumoraux et deux lignées cellulaires du COE. Parmi ces cibles, le gène DOK1 a démontré une évidence de méthylation de la région promotrice des échantillons tumoraux comparativement à celle de ceux qui sont normaux. Des clones surexprimant et d'autres sous-exprimant DOK1 ont été construits et validés. Son rôle potentiel dans la prolifération cellulaire, dans la sensibilité au taxol et au cisplatine, et dans le cycle cellulaire a été évalué par des études fonctionnelles et une légère implication a été détectée dans ces fonctions. Les changements d'expressions globales reliés à l'expression de ce gène ont également été analysés par la technologie de micropuces de l'ADN. Nos données montrent que DOK1 est touché par une hyperméthylation de sa région promotrice potentielle dans les tumeurs du COE. Par contre, cette hyperméthylation ne semble pas influencer son niveau d'expression. Au contraire, son expression augmente dans le cancer ovarien. Cette augmentation serait reliée à une diminution des risques de progression du COE. Cette observation confirme le rôle potentiel de suppresseur de tumeur de DOK1 dans le COE.

## Abstract

The molecular basis of the epithelial ovarian cancer (EOC) initiation and progression are still poorly understood. A key pathogenic element in cancer is the inactivation of tumours suppressor genes, frequently due to the hypermethylation of their promoter sequence. In this context, we used an epigenomic approach to identify hypermethylated genes in the EOC. We used the demethylating agent, 5-aza-dC, to reactivate hypermethylated genes in four cells lines of EOC (SKOV3, OVCAR3, TOV112 and TOV21). We identified several targets genes potentially hypermethylated that could play a functional role in ovarian tumorigenesis suppression, apoptosis or DNA repair. We evaluated their methylation status by MSP (methylation-specific PCR) and BSP (bisulfite-sequencing PCR) within normal and tumoral ovarian samples and in two EOC cells lines. Among these targets, the DOK1 gene showed an evidence of methylation of the promoter region in the tumour samples compared to the normal ones. Clones over-expressing and others under-expressing DOK1 were built and validated. The potential role of this gene in cellular proliferation, sensitivity to taxol and cisplatin, and in the cell cycle was evaluated by functional studies and a little implication of the DOK1 gene was detected in these functions. The global expression changes connected to the expression of the DOK1 gene were also analyzed by the microarray genomics technology. Our data show that DOK1 is affected by hypermethylation of its potential promoter region in EOC tumors. This hypermethylation do seems not to influence its expression levels. On the contrary, its expression level increases in ovarian cancer. This increase would be connected to a reduction in the risks of progression of the COE. Moreover, this observation confirms the potential role of DOK1 as tumor suppressor in EOC.

## **Avant-Propos**

Dans les prochaines pages, vous allez découvrir les résultats de mes deux années de travail dans le laboratoire du Dr. Dimcho Bachvarov. J'aimerais tout d'abord le remercier de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir permis de développer mon expertise en science et d'avoir partagé avec moi un grand nombre de ses connaissances.

Ensuite, j'aimerais remercier quelques membres du laboratoire qui ont marqué mon passage; Magdalena Bachvarova, Sylvain L'Espérance et Kether Guerrero. Merci Magdalena pour tout le temps que tu m'as consacré et pour tout ce que tu m'as appris. Le travail de laboratoire fut très agréable en ta compagnie. Merci Kether pour tous les bons moments; grâce à toi, ces deux années furent bien agréables, mais surtout remplies d'humour. Merci Sylvain d'avoir partagé ton expérience, tu as été une sorte de guide dans ce périple.

Finalement, j'aimerais remercier les membres de ma famille. Mes parents, Joanne Fleury et François Mercier, qui m'ont toujours appuyé et encouragé lors de mes études et qui m'ont donné les moyens de me rendre aussi loin. Ma sœur Anne-Julie qui était toujours là quand j'avais besoin de relâcher un peu de pression. Mes deux amours, ma conjointe Émilie Hins, qui a été et est d'un soutien extraordinaire tous les jours de ma vie, et ma fille Emma, qui me remplit de bonheur tous les jours par sa bonne humeur contagieuse.

*Face à la roche, le ruisseau l'emporte  
toujours, non pas par la force, mais par la  
persévérance. [H. Jackson Brown]*

# Table des matières

Résumé.....	i
Avant-Propos .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des Abréviations .....	ix
1 Introduction.....	11
1.1 Le cancer.....	11
1.2 Le cancer de l’ovaire.....	11
1.2.1 Anatomie et physiologie de l’ovaire .....	11
1.2.2 Transformation néoplasique .....	15
1.2.3 Causes .....	17
1.2.4 Symptômes du cancer ovarien .....	18
1.2.5 Classification et histotypes de cancer ovarien .....	18
1.2.6 Traitements .....	20
1.3 Modification épigénomique.....	21
1.3.1 Méthylation de l’ADN.....	21
1.4 La famille DOK .....	28
1.4.1 DOK1 .....	29
2 Hypothèse et objectifs.....	31
3 Matériel et méthodes.....	32
3.1 Extraction d’acides nucléiques .....	32
3.1.1 Extraction d’ADN.....	32
3.1.2 Extraction d’ARN.....	32
3.2 Identification de cibles potentielles de méthylation .....	32
3.2.1 Micropuces à ADN .....	33
3.3 Conversion au bisulfite .....	35
3.4 Analyse du statut de méthylation par « Methylation specific PCR » (MSP) .....	36
3.5 Analyse du statut de méthylation par « Bisulfite sequencing PCR» .....	37
3.6 Modulation de l’expression du gène DOK1 dans la lignée cellulaire TOV112 ...	38
3.6.1 Surexpression du gène DOK1.....	38
3.6.2 Sous-expression du gène DOK1 dans la lignée cellulaire TOV112 par interférence à l’ARN.....	39
3.6.3 Validation du niveau d’expression de DOK1 des différents clones .....	41
3.7 Études fonctionnelles .....	43
3.7.1 Analyse de l’effet de l’expression de DOK1 sur la migration cellulaire.....	43
3.7.2 Analyse de l’effet de l’expression de DOK1 sur la formation de colonies .....	43
3.7.3 Analyse de l’effet de l’expression de DOK1 sur le cycle cellulaire par cytométrie de flux (FACS) .....	44
3.7.4 Analyse de l’effet de l’expression de DOK1 sur la sensibilité aux drogues.....	44
3.8 Évaluation des changements d’expression génique reliés à l’expression de DOK1 45	
3.9 Évaluation de l’expression de DOK1 dans les tissus par immunohistochimie.....	45
4 Résultats.....	47

4.1	Sélection de gènes candidats.....	47
4.2	Validation par RT-PCR de l'expression différentielle des sept gènes candidats de méthylation .....	48
4.3	Analyse du statut de méthylation par « Methylation specific PCR » (MSP) .....	49
4.4	Analyse du statut de méthylation par « Bisulfite sequencing PCR » (BSP).....	50
4.5	Évaluation de l'expression de DOK1 dans les clones surexprimant et sous-exprimant le gène DOK1 dans la lignée cellulaire TOV112 .....	52
4.5.1	Du point de vue des protéines par immunobuvardage ( <i>Western Blot</i> ) .....	52
4.5.2	Du point de vue de l'ARNm par RT-PCR.....	53
4.6	Études fonctionnelles.....	53
4.6.1	Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la migration cellulaire.....	53
4.6.2	Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la formation de colonie.....	55
4.6.3	Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur le cycle cellulaire par cytométrie de flux (FACS) .....	56
4.6.4	Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la sensibilité au taxol et au cisplatine.....	57
4.7	Évaluation des changements d'expression génique reliés à l'expression de DOK1 60	
4.7.1	Analyse de la liste de gènes .....	60
4.7.2	Analyse avec le logiciel IPA.....	63
4.8	Évaluation de l'expression de DOK1 dans les tissus par Immunohistochimie ....	64
5	Discussion.....	67
6	Conclusion.....	73
	Bibliographie .....	76

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1-1</b> : Stades de développement des tumeurs ovariennes classifiées selon le système FIGO .....	19
<b>Tableau 1-2</b> : Différents histotypes de cancer ovarien et leur incidence.....	20
<b>Tableau 3-1</b> : Liste des amorces pour RT-PCR.....	35
<b>Tableau 3-2</b> : Conditions PCR.....	37
<b>Tableau 3-3</b> : Composition en réactifs d'une réaction PCR.....	37
<b>Tableau 3-4</b> : Liste d'amorces pour les analyses MSP et BSP du gène DOK1.....	38
<b>Tableau 4-1</b> : Liste des sept gènes candidats cibles d'une méthylation du promoteur spécifique au cancer de l'ovaire.....	48
<b>Tableau 4-2</b> : Liste des gènes dont l'expression est modifiée d'au moins 2 fois après la surexpression du gène DOK1. ....	61
<b>Tableau 4-3</b> : Liste des gènes dont l'expression est modifiée d'au moins 2 fois après la suppression du gène DOK1. ....	62
<b>Tableau 4-4</b> : L'expression de DOK1 en fonction du type de tissu .....	66



## Liste des figures

<b>Figure 1-1</b> : Le système reproducteur de la femme .....	14
<b>Figure 1-2</b> : Structure de l'ovaire.....	15
<b>Figure 1-3</b> : Section d'un cortex ovarien adulte. ....	17
<b>Figure 1-4</b> : Processus épigénomique impliqué dans la malignité. ....	24
<b>Figure 1-5</b> : Protéines de la famille DOK.....	29
<b>Figure 3-1</b> : Principe de marquage de l'ARN au Cy3 et au Cy5 .....	33
<b>Figure 3-2</b> : Représentation du plasmide pCMV-ENTRY .....	39
<b>Figure 3-3</b> : Représentation du vecteur viral pLKO .....	41
<b>Figure 4-1</b> : Confirmation par RT-PCR des changements d'expression des 7 gènes identifiés dans l'analyse par micropuces de l'ADN après traitement au 5-aza-dC. ....	49
<b>Figure 4-2</b> : « Methylation specific PCR » des lignées cellulaires SKOV3 et TOV21, de 7 tumeurs ovariennes et de 4 tissus ovariens normaux après conversion au bisulfite de sodium.....	50
<b>Figure 4-3</b> : Fragment PCR spécifique au MSP situé dans la région promotrice du gène DOK1 en position -41 pb à + 95pb du début du premier exon.....	50
<b>Figure 4-4</b> : Fragment PCR spécifique au BSP situé dans la région promotrice du gène DOK1 en position -1085 pb à -777 pb du premier exon. ....	51
<b>Figure 4-5</b> : « Bisulfite sequencing PCR » des lignées cellulaires SKOV3 et TOV21, de 7 tumeurs ovariennes et 4 tissus ovariens normaux après conversion au bisulfite de sodium.....	51
<b>Figure 4-6</b> : Évaluation de l'expression protéique du gène DOK1 des clones.....	52
<b>Figure 4-7</b> : Analyse de l'expression du gène DOK1 dans les clones par RT-PCR.....	53
<b>Figure 4-8</b> : Essai de réparation de blessure sur les différents clones. ....	54
<b>Figure 4-9</b> : Essai de formation de colonie.....	55
<b>Figure 4-10</b> : Étude du cycle cellulaire par cytométrie de flux (FACS) réalisée sur les différents clones modulant l'expression de DOK1.....	56
<b>Figure 4-11</b> : Effet de l'expression de DOK1 sur la sensibilité au taxol par essai MTT.....	58
<b>Figure 4-12</b> : Effet de l'expression de DOK1 sur la sensibilité au cisplatine par essai MTT. .....	59
<b>Figure 4-13</b> : Fonctions biologiques les plus touchées par les gènes dont l'expression a été modifiée de 1,5 fois. ....	64
<b>Figure 4-14</b> : Analyse de l'expression de DOK1 par IHC dans des TMAs. ....	65
<b>Figure 4-15</b> : Analyse de survie Kaplan-Meier – association de l'expression de DOK1 avec la progression de la maladie dans des patientes du COE (n = 58).....	66

## Liste des Abréviations

% :	pourcentage
5-aza-dC :	5-aza-deoxy-cytidine
5mC :	5'-Méthyl-Cytosine
A :	adénine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
al. :	collaborateurs
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
BSA :	bovine serum albumin
BSP :	<i>bisulfite sequencing PCR</i>
C :	cytosine
CaCl <sub>2</sub> :	chlorure de calcium
CO <sub>2</sub> :	dioxyde de carbone
COE :	cancer ovarien épithélial
CuSO <sub>4</sub> :	sulfate de cuivre
Cy3 :	cyanine-3
Cy5 :	cyanine-5
DNMT :	méthyltransférase de l'ADN
dNTP :	2'deoxynucléoside 5' -triphosphate
DOK :	<i>downstream of tyrosine kinase</i>
dT :	2' déoxythymidine
DTT :	Dithiothreitol
EDTA :	acide (éthylènedinitriolo) tetracétique
EMT ,	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
FACS :	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FBS :	<i>fetal bovine serum</i>
FIGO :	fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
G :	Guanine
GAPDH :	glycéraldéhyde-3-phosphate-deshydrogénase
h :	heure
H <sub>2</sub> O :	eau
HDAC:	déacétylases d'histones
IgG :	immunoglobuline G
IHC:	immunohistochimie
IPA :	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
Kda:	kilodalton
LMC:	leucémie myéloïde chronique
M :	molaire
mA :	milliampère
mg :	milligramme
mg/ml :	milligramme par millilitre

mg/μl :	milligramme par microlitre
min :	minute
ml :	millilitre
mM :	millimolaire
mm:	millimetre
MSP :	<i>méthylation specific PCR</i>
MTT:	methyl-thiazol-tetrazolium
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> :	carbonate de sodium
NaCl :	Chlorure de sodium
NaK :	alliage de sodium et de potassium
NaOH :	hydroxyde de sodium
ng/μl:	nanogramme par microlitre
ng:	nanogramme
nm:	nanomètre
NOSE :	<i>normal ovarian surface epithelium</i>
°C :	degré Celsius
OSE :	<i>ovarian surface epithelium</i>
pb :	paire de bases
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i>
pH :	potentiel d'hydrogène
PTK:	protéines tyrosine kinase
PVDF:	<i>polyvinylidene difluoride</i>
RPM :	révolutions par minute
RT-PCR:	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS :	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE :	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
shRNA :	short hairpin ribonucleotide acid
T :	thymine
TMA :	microarrays de tissus
<i>Taq</i> :	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE :	Tris-borate/EDTA
U :	unité
U/ml :	unité par millilitre
V :	volt
β :	bêta
μg/ml :	microgramme par millilitre
μg/μl :	microgramme par microlitre
μg:	microgramme
μl :	microlitre
μM :	micromolaire

# **1 Introduction**

## **1.1 Le cancer**

Le cancer est une maladie bien présente qui touche de plus en plus de personnes, et ce, principalement à cause de la croissance démographique et du vieillissement de la population. En 2009 au Canada, le nombre de nouveau cas est estimé à 171 000 et 75 300 décès seront causés par cette maladie; une augmentation de 4 600 cas diagnostiqués et de 1 500 décès par rapport à l'année 2008. Chez la femme, 81 700 nouveaux cas sont estimés et parmi ceux-ci, 39 600 se termineront par un décès. Les taux de mortalité actuels indiquent qu'environ 1 Canadienne sur 4 mourra du cancer (Comité directeur de la Société canadienne du cancer 2009). Chez la femme, les cancers gynécologiques occupent un rang important parmi les cancers les plus mortels. De plus, malgré tous les efforts mis dans l'amélioration des procédés médicaux et chirurgicaux, la survie à long terme des patientes avec un diagnostic avancé reste décevante. Ainsi, l'amélioration du dépistage précoce du cancer est un enjeu important pour augmenter la probabilité de survie des femmes atteintes.

## **1.2 Le cancer de l'ovaire**

Le cancer de l'ovaire touchera 2 500 femmes en 2009 et 1750 en mourront (Comité directeur de la Société canadienne du cancer 2009). Malgré une faible incidence, il est le cancer gynécologique le plus mortel. Un des problèmes majeurs est qu'il démontre très peu de symptômes précoces; c'est pourquoi une maladie de stade avancé avec un taux de survie sur 5 ans de moins de 20 % est diagnostiquée à la majorité des patientes (>70 %) (Jemal, Siegel et al. 2009).

### **1.2.1 Anatomie et physiologie de l'ovaire**

Le système reproducteur interne de la femme comprend trois organes principaux : les trompes de Fallope, l'utérus et les ovaires (figure 1.1-B). Ce système est situé dans la cavité intrapéritonéale, un espace virtuel délimité par le pelvis, le diaphragme et le péritoine viscéral (figure 1.1-A). L'ovaire assure deux fonctions bien précises. D'un côté, il est

responsable de la croissance et de la maturation des ovules, et de l'autre, il est responsable de la sécrétion des hormones sexuelles féminines (œstrogène et progestérone).

La maturation des cellules reproductrices féminines s'effectue en deux étapes distinctes, mais étroitement liées : la folliculogénèse et l'ovogénèse. La folliculogénèse se caractérise par la croissance et la maturation du follicule (petit sac sacciforme enfoui dans le tissu conjonctif du cortex de l'ovaire) et de l'ovocyte (cellule reproductrice féminine située dans les follicules), et se termine par l'ovulation (libération par l'ovaire de l'ovocyte). Contrairement à l'ovogénèse qui se produit par cycle, la folliculogénèse est un processus continu qui s'amorce à la 20<sup>e</sup> semaine du développement des fœtus féminins, et se poursuit sans interruption jusqu'à la ménopause. Au cours de ce processus, le follicule passe de follicule primordial à follicule de De Graaf en plusieurs étapes de maturation (voir figure 1.2). Dès la naissance, les ovaires contiennent un grand nombre de follicules en quantité prédéterminée contenant chacun un ovule en cours de maturation. L'ovogénèse, quant à elle, se caractérise par la production cyclique d'ovules. Elle consiste en la maturation d'un ovocyte en ovule à chaque cycle ovarien. Ce processus de maturation est régulé, entre autres, par la sécrétion d'hormones comme la FSH (hormone folliculostimulante). Ces hormones sont sécrétées par l'adénohypophyse et ce sont leurs variations durant le cycle qui conditionnent l'ovulation de même que l'arrivée des règles. À chaque cycle ovarien, un follicule se rompt à la surface de l'ovaire libérant ainsi l'ovule qu'il contient, c'est l'ovulation. S'il y a fécondation, le follicule se transforme en corps jaune, ou sinon, il s'atrophie laissant une cicatrice blanche. C'est dans le corps jaune que sont synthétisées des hormones comme la progestérone, l'estrogène, la relaxine et l'inhibine. Dès la naissance, les ovaires d'une petite fille contiennent déjà les follicules et les ovocytes qu'elle produira durant sa vie. C'est à partir de la puberté qu'une fois par mois, un ovule arrive à maturation et est expulsé de l'ovaire. (Tortora G.J. 1993; Marieb E.N. 2005).

L'ovaire est constitué de trois couches différentes de cellules; les cellules du stroma, qui constituent le tissu conjonctif (le soutien), les cellules germinales, qui forment les ovules

situés dans l'ovaire, et les cellules épithéliales, qui forment la couche externe de l'ovaire, l'épithélium. Cette couche de cellules est appelée épithélium de surface ovarien (*ovarian surface epithelium*, OSE (figure 1-3)) et est la source d'environ 90 % des cancers ovariens humains (Auersperg, Wong et al. 2001). L'OSE est composé d'une seule couche de cellules pseudo-épithéliales de forme aplaties à cuboïdales (voir figure 1.3). Il possède des fonctions dans le transport de matériels de et vers la cavité péritonéale, dans le cycle ovarien et dans la sécrétion hormonale (Auersperg, Wong et al. 2001). L'OSE est physiologiquement impliqué dans la rupture folliculaire et dans la réparation subséquente du follicule durant les années reproductives de la femme. Pour provoquer la rupture, il libère, entre autres, des enzymes lysosomales pour détruire les tissus qui constituent la paroi des follicules matures. Après l'ovulation, il y a prolifération et migration cellulaire pour couvrir l'ouverture créée. Il joue un rôle indispensable dans le réseau d'hormones et d'autres facteurs régissant la physiologie ovarienne. NOSE (*normal ovarian surface epithelium*) secrète et possède des récepteurs pour des agents avec des capacités régulatrices de croissance et de régulation. Ces produits pourraient faire partie du réseau de facteurs de croissance/cytokines et stéroïdes sexuels qui régule la physiologie de l'ovaire (Katabuchi and Okamura 2003). L'OSE chez une femme mature est un simple mesothélium qui exprime un phénotype mixte épithélial mésenchymale : les caractéristiques épithéliales incluent kératine, mucine, desmosomes, microvilli apicaux, et une lamina basale, mais comme les cellules mésenchymales ou stromales, il contient vimentine et N-cadherine et ne possède pas les marqueurs de différenciation CA-125 et E-cadherine qui sont présents dans l'épithélium normal de l'oviducte et de l'endomètre, et également dans celui des carcinomes ovariens (Auersperg, Ota et al. 2002).

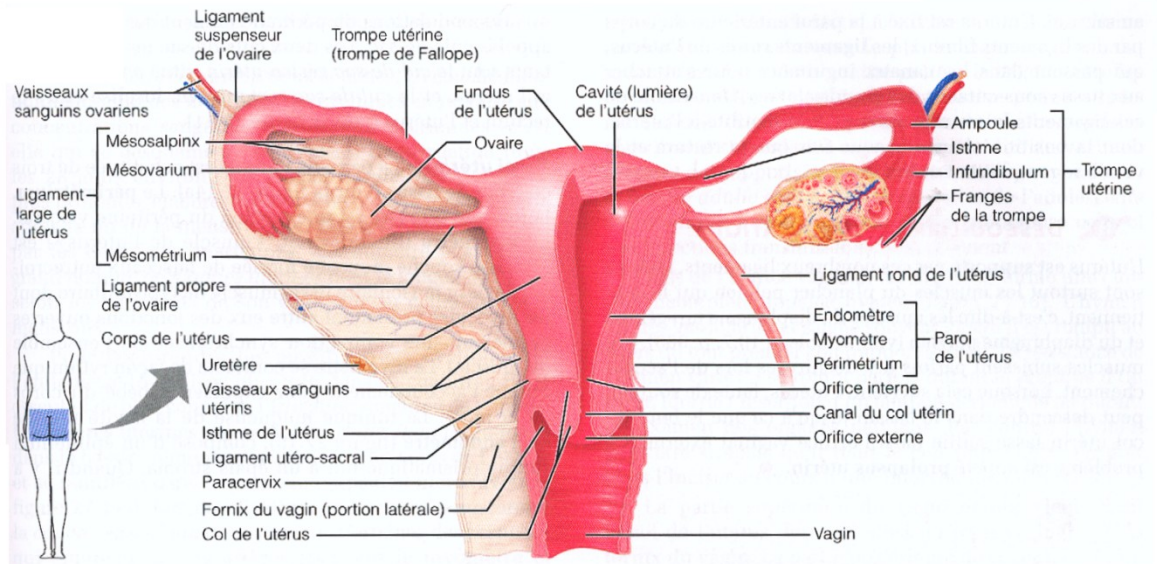


Figure tirée du livre *Anatomie et physiologie humaine* d'E.N. Marieb, 2005

**A : Vue postérieure du système reproducteur de la femme**

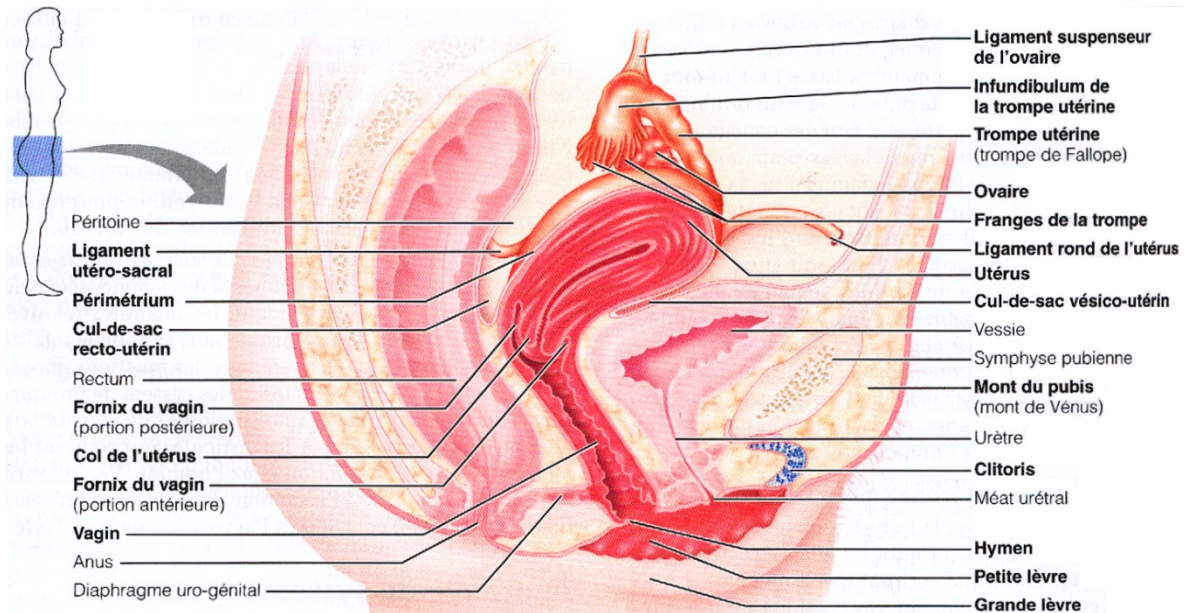


Figure tirée du livre *Anatomie et physiologie humaine* d'E.N. Marieb, 2005

**B : Coupe sagittale médiane du système reproducteur de la femme**

**Figure 1-1 : Le système reproducteur de la femme**

**A.** Vue postérieure montrant les différentes parties internes du système reproducteur de la femme. **B.** Coupe sagittale médiane montrant la zone pelvienne de la femme.

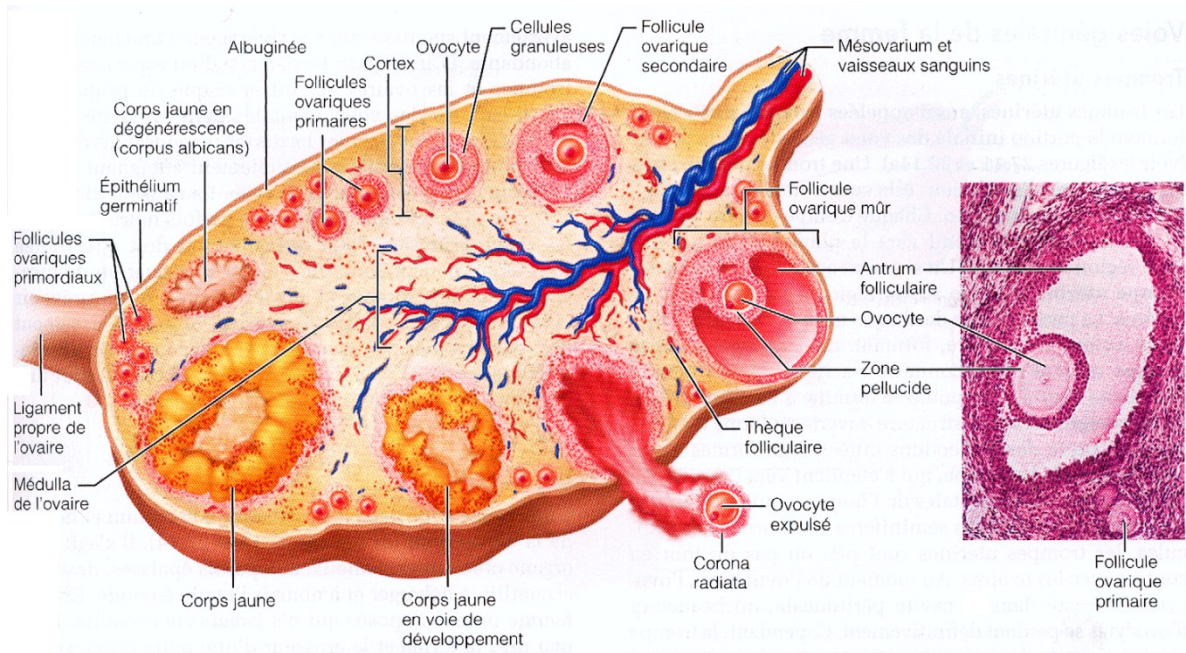


Figure tirée du livre *Anatomie et physiologie humaine* d'E.N. Marieb, 2005

**Figure 1-2 :** Structure de l'ovaire.

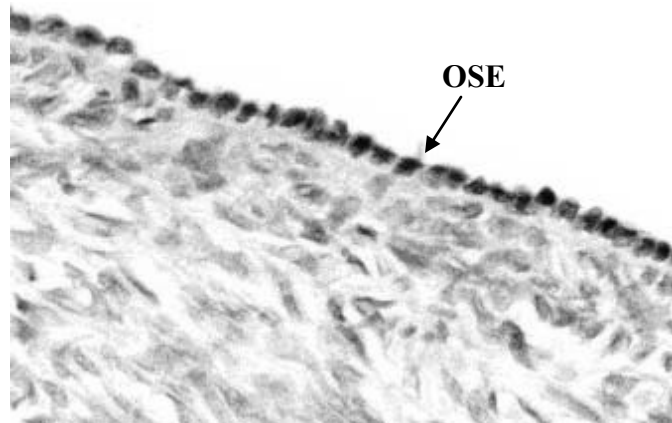
## 1.2.2 Transformation néoplasique

Les cellules épithéliales de l'OSE sont souvent considérées comme étant de type mésothélial puisqu'elles partagent une origine embryonnaire similaire au péritoine et ont des caractéristiques en commun avec les cellules péritonéales mésothéliales (Sundfeldt 2003). De plus, l'OSE est un descendant direct de l'épithélium cœlomique de la crête génitale qui donne également naissance au canal müllérien (épithélium des trompes de Fallopes, de l'endothélium, du col de l'utérus et de la portion supérieure du vagin). Même après la naissance, l'OSE a encore le potentiel pour changer vers une autre lignée de l'épithélium müllérien (Katabuchi and Okamura 2003). L'OSE est donc une monocouche moins différenciée avec un phénotype « non engagé » qui maintient la possibilité de se différencier en un phénotype stromal ou épithélial en réponse à des signaux environnementaux (Ahmed, Thompson et al. 2007). D'ailleurs, lors de la réparation post-ovulatoire, les cellules de l'OSE subissent une transition épithéliale mésenchymateuse (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*) en réponse à des stimuli post-ovulatoires. Cette transition procure des avantages aux cellules en altérant la motilité et la réponse



proliférative. Ainsi, elles peuvent fournir la réponse requise pour le remodelage de la matrice extracellulaire (Ahmed, Thompson et al. 2007). Par contre, cet état immature pourrait être en partie responsable de l'inclinaison vers une transformation néoplasique (Auersperg, Wong et al. 2001).

Effectivement, dans le cas d'une progression néoplasique, la couche simple de cellules épithéliales de l'OSE surmontant le stroma subit un changement de différenciation causant une perte des composantes stromales et une acquisition des caractéristiques de différenciation d'épithéliums dérivants du canal müllérien. Ce changement pourrait être la base de l'initiation du cancer de l'ovaire et constitue la base de la classification des sous-types de cancers; séreux (ressemblant aux trompes de Fallope), mucineux (ressemblant au col de l'utérus), endométrioïdes (ressemblant à l'endometrium) et cellules claires (ressemblant aux cellules claires) (Ahmed, Thompson et al. 2007). Avec la progression néoplasique, la tendance de l'OSE à subir une EMT diminue et les cellules commencent à devenir de plus en plus engagées envers un phénotype épithélial complexe. De plus, la molécule d'adhésion E-cadherine fait son apparition et l'expression du récepteur c-met (hepatocyte growth factor) est augmentée. L'E-cadherine pourrait agir en tant que facteur de survie, tandis que c-met contribue à la croissance et à l'invasion dans plusieurs formes de cancer. Finalement, la stabilité de ces phénotypes épithéliaux sous une variété de conditions *in vivo* et en culture reflète une forme d'autonomie, c'est-à-dire une absence de réponse aux contrôles environnementaux, une caractéristique typique des cellules néoplasiques (Auersperg, Ota et al. 2002). Une augmentation de l'autonomie en réponse aux facteurs de croissance, une augmentation de l'engagement envers les phénotypes épithéliaux, et/ou une réduction de la réponse aux signaux environnementaux pourrait être les premiers changements dans la carcinogenèse ovarienne (Auersperg, Ota et al. 2002).



Adaptée de (Auersperg, Ota et al. 2002)

**Figure 1-3** : Section d'un cortex ovarien adulte.

### 1.2.3 Causes

Il y a plusieurs facteurs qui pourraient pousser l'OSE vers une transformation néoplasique. Un de ceux-ci est la fréquence d'ovulation. En effet, une ovulation fréquente augmente le risque de transformation puisqu'une rupture et une réparation répétée de la surface épithéliale de l'ovaire aux sites d'ovulation augmentent les opportunités d'aberrations génétiques. Ce risque est aussi amplifié par la division cellulaire rapide et par le ratio élevé de prolifération impliqué dans la réparation après l'ovulation (Katabuchi and Okamura 2003). Parallèlement à ceci, il y a des preuves convaincantes qui démontrent que les traitements d'hyperovulation pour l'infertilité et la nulliparité augmentent les risques de cancer, tandis que les contraceptifs oraux et les grossesses les diminuent (Auersperg, Wong et al. 2001). Dans un même ordre d'idée, l'apparition des règles à un jeune âge et une ménopause tardive pourrait également augmenter les risques. D'une manière plus indirecte, une diète grasse, l'obésité, de l'œstrogène pris en tant que thérapie de remplacement hormonal, une exposition péritonéale à des agents chimiques et à des polluants industriels et des conditions inflammatoires pelviennes sont d'autres facteurs de risques (Okamura and Katabuchi 2001). Enfin, l'hérédité constitue également un risque majeur. Elle est impliquée dans 5 à 10 % des cas (Auersperg, Wong et al. 2001). Les femmes qui ont des prédispositions aux mutations, plus particulièrement sur les gènes BRCA1 et BRCA2, ont de hauts risques de développer un COE. (Auersperg, Ota et al. 2002). Pour ce qui est de

celles qui possèdent une mutation chez BRCA1, elles ont approximativement 15 à 60 % de chance de développer un cancer de l’ovaire au cours de leur vie (Okamura and Katabuchi 2001).

#### **1.2.4 Symptômes du cancer ovarien**

Le cancer de l’ovaire est décrit comme une maladie sournoise et silencieuse qui n’offre pas beaucoup d’indices (Smith, Morris et al. 2005). La principale raison est que les carcinomes ovariens ne produisent pas beaucoup de symptômes spécifiques, lorsque présents. À des stades précoces de la maladie, les patientes peuvent se plaindre d’urination fréquente ou de constipation conséquemment à la croissance de la tumeur et occasionnellement à de la distension abdominale, à de la pression et à de la douleur. À des stades avancés, les patientes présentent le plus souvent des symptômes comme la distension abdominale, des ballonnements, de la constipation, des nausées, de l’anorexie ou une sensation de satiété précoce reliée à l’implication des ascites, de l’intestin et de l’épiploon (Colombo, Van Gorp et al. 2006). La recherche se tourne donc plutôt vers la détermination de marqueurs cliniques associés à la détection précoce de ce type de cancer. En ce moment, le marqueur de progression le plus utilisé est le CA125. L’augmentation de son niveau corrèle avec la progression du cancer. Cependant, son utilité se limite à l’évaluation de la réponse à la chimiothérapie et au suivi des patientes (Moore, MacLaughlan et al. 2010).

#### **1.2.5 Classification et histotypes de cancer ovarien**

Le cancer de l’ovaire épithélial est associé à différents types histologiques. Cette classification histologique permet de regrouper les cellules cancéreuses selon leur apparence et leur comportement. En plus, chaque tumeur possède un grade et un stade (tableau 1.1). Le grade se base sur la vitesse de croissance et le degré de différenciation de la cellule, c’est-à-dire la différence entre les cellules cancéreuses et les cellules normales en termes d’apparence et de fonction. Un haut grade se caractérise par un faible niveau de différenciation et une haute vitesse de croissance, l’inverse pour un bas grade. Le stade, quant à lui, classe le cancer selon l’étendue de la maladie dans l’organisme, soit la taille de la tumeur et son degré de propagation.

**Tableau 1-1** : Stades de développement des tumeurs ovariennes classifiées selon le système FIGO

STADES	DESCRIPTIONS
1	Croissance limitée aux ovaires
1A	Croissance limitée aux ovaires, sans ascite. Aucune tumeur sur la surface externe de l'ovaire. Capsule intacte
1B	Croissance limitée sur les deux ovaires, sans ascites. Aucune tumeur sur la surface externe de l'ovaire. Capsule intacte
1C	Tumeur de stade 1A ou 1B, mais avec des tumeurs sur la surface d'un ou des deux ovaires ou présentant une capsule rompue
2	Croissance tumorale impliquant un ou les deux ovaires avec la présence d'extensions pelviennes.
2A	Extensions et/ou métastases sur l'utérus ou les trompes de Fallope
2B	Extensions et/ou métastases sur d'autres tissus pelviens
2C	Tumeur de stade 2A ou 2B, mais avec des tumeurs sur la surface d'un ou des deux ovaires ou présentant une capsule rompue ou la présence d'ascites contenant des cellules cancéreuses
3	Tumeurs impliquant un ou deux ovaires et/ou présence de nodules rétro-péritonéaux ou inguinaux.
3A	Croissance tumorale impliquant des implants confinés à la région pelvienne
3B	Présence d'implants abdominaux
3C	Présence d'implants abdominaux plus grands que 2 cm de diamètre
4	Croissance tumorale impliquant un ou deux ovaires avec présence de métastases à distance.

Comme mentionnée précédemment, la classification des différents histotypes de cancer est basée sur leur ressemblance (type de différenciation); séreux (trompes de Fallope), mucineux (col de l'utérus), endométrioïdes (endometrium) et tumeur à cellules claires (aux cellules claires).

**Tableau 1-2 :** Différents histotypes de cancer ovarien et leur incidence

<b>Histotypes</b>	<b>Incidence</b>
Séreux	40-50%
Mucineux	12-15%
Endométrioïde	25%
Tumeur à cellules claires	10%

### 1.2.6 Traitements

À la suite d'un diagnostic de cancer ovarien épithélial, la stratégie de traitements consiste habituellement en une chirurgie cytoréductive suivie d'une chimiothérapie. La première étape est la chirurgie. Elle est importante pour deux raisons principales. Premièrement, elle est essentielle pour établir une bonne stadification du cancer (bas et haut risque) et pour déterminer le traitement subséquent le plus adapté et le plus efficace possible. Deuxièmement, elle permet de réduire le plus possible la tumeur afin d'optimiser l'efficacité des traitements subséquents de chimiothérapie. En effet, les grosses tumeurs ont une alimentation en sang moindre en leur centre ce qui diminue leur approvisionnement en drogues et diminuent leur croissance ce qui les protège des agents chimiothérapeutiques. Ensuite, la deuxième étape dans la stratégie de traitement est la chimiothérapie. Elle consiste normalement en un mélange de taxane (paclitaxel) et de platine (cisplatine ou carboplatine) donné toutes les 3 semaines pour 6 cycles. Il y a une réponse positive au traitement pour approximativement 80% des patientes cependant, la majorité d'entre elles vont avoir une récurrence à l'intérieur de 3 ans après le traitement. Lors de cette récurrence, les patientes avec des tumeurs sensibles au platine peuvent être retraitées avec du platine et/ou du paclitaxel. Par contre, celles avec des tumeurs résistantes au platine

(chiomiorésistant) ont un faible pronostic et le traitement est souvent palliatif. Une option de traitement pour ces patientes peut être soit du topotecan ou d'autres drogues, soit un enrôlement dans des essais cliniques (Eltabbakh and Awtrey 2001; Ozols 2002; Guppy, Nathan et al. 2005; Fader and Rose 2007; Markman 2008).

### **1.3 Modification épigénomique**

Les modifications épigénomiques sont des modifications héréditaires qui n'entraînent pas d'altération du génome au niveau de la séquence nucléotidique. Les progrès récents dans le domaine ont mis en évidence les rôles fondamentaux des mécanismes épigénétiques dans le bon contrôle des processus biologiques essentiels, tels que l'empreinte génomique, l'inactivation du chromosome X, ou l'établissement et le maintien de l'identité de la cellule (Guil and Esteller 2009). Cependant, ces modifications peuvent arriver de façons aberrantes. D'ailleurs, leurs implications dans le développement et la progression du cancer de l'ovaire sont bien établies, et leurs accumulations progressives sont liées à l'avancement du stade de la maladie et au grade. Ces aberrations épigénétiques comprennent la méthylation de l'ADN, la modification des histones et le dérèglement des micro-ARN. Elles sont relativement stables, associées à des sous-types distincts de la maladie et présentes dans le sérum en circulation. Elles représentent ainsi des biomarqueurs prometteurs de diagnostiques et de pronostiques (Balch, Fang et al. 2009).

#### **1.3.1 Méthylation de l'ADN**

La modification épigénétique la plus étudiée est la méthylation de l'ADN. Elle représente une marque stable et réversible qui est généralement associée à la répression, soit parce qu'elle recrute des protéines de liaison au CpG méthylé (methyl-CpG binding proteins :MeCPs et MBDS) couplées à des molécules corépressives ou parce qu'elle inhibe la liaison de facteurs à leurs séquences d'ADN apparentées. Cette inhibition est principalement due à l'influence que la méthylation de l'ADN apporte à la condensation de la chromatine. Cette dernière est la structure responsable de l'empaquetage du génome humain. Elle est compacte, complexe et principalement composée d'ADN et de protéines nommées histones. Elle comprend deux conformations : ouverte et transcriptionnellement

compétente (euchromatine) ou fermée, dense et transcriptionnellement silencieuse (hétérochromatine). Le passage d'une conformation à une autre est largement sous le contrôle épigénétique des histones et de l'ADN. La méthylation de l'ADN conjointement avec la modification des histones et le remodelage du nucleosome établissent une structure chromatinienne fermée bloquant ainsi la machinerie transcriptionnelle. Les gènes présents dans cette structure ne sont donc pas exprimés (figure 1-4 B) (Gal-Yam, Saito et al. 2008; Guil and Esteller 2009).

La méthylation de l'ADN est catalysée par au moins 3 méthyltransférases de l'ADN (DNMTs) : DNMT3A, DNMT3B et DNMT1. DNMT1 est responsable du maintien du modèle de méthylation parentale tandis que DNMT3A et DNMT3B peuvent ajouter de nouveaux groupements méthyles où il n'y en avait pas (méthylation *de novo*). Les DNMTs ajoutent un groupement méthyl à l'extrémité 5' de l'anneau de la cytosine par le donneur S-adenosyl méthionine pour former une 5' -méthyl-cytosine (figure 1.4A). Chez les mammifères, ces modifications se produisent pratiquement exclusivement sur les résidus cytosines qui précèdent une guanine, c.-à-d., sur les dinucléotides CpG. Le terme CpG se réfère à la liaison d'un desoxycytosine et d'un desoxyguanosine par un phosphate. Environ 1 % du génome est composé de régions qui possèdent un pourcentage élevé en G+C et riche en CpG. Ces régions sont appelées îlots CpG. Ils sont le plus souvent rencontrés dans la région 5' régulatrice des gènes et environ 60 % des promoteurs de gènes sont composés d'îlots CpG (Gal-Yam, Saito et al. 2008; Sharma, Kelly et al. 2010)

### **1.3.1.1 La méthylation de l'ADN dans les cellules normales**

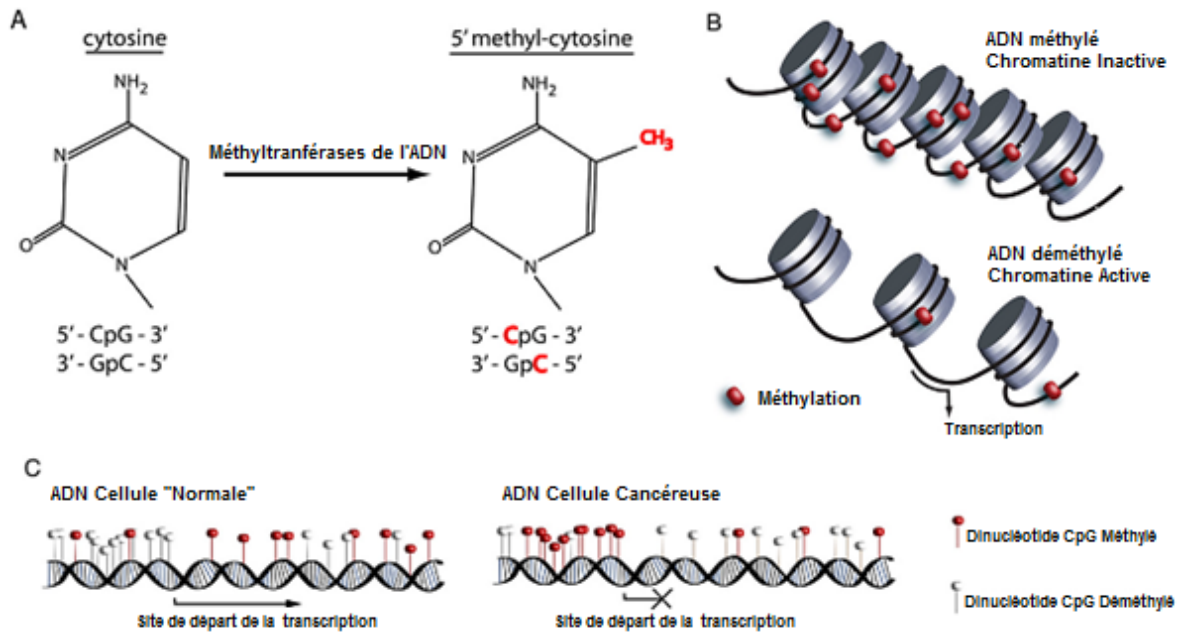
Dans les cellules normales, la méthylation permet de réguler le fonctionnement du génome en régulant l'accessibilité de celui-ci par altération de la condensation de la chromatine. Les différents changements créés par ces modifications permettent à certains gènes d'être exprimés et à d'autres non, à différents moments. Ils permettent ainsi l'établissement de diverses identités qui régulent la façon dont le génome se manifeste dans les différents types cellulaires et sont vitaux pour mettre en place les différents modèles de transcription requis lors de la vie embryonnaire, du développement ou dans la vie adulte (Guil and

Esteller 2009; Sharma, Kelly et al. 2010). La méthylation de l'ADN est donc essentielle au développement normal et, en tant que mécanisme de répression, elle joue un rôle dans la répression transcriptionnelle normale de régions répétitives et centromériques, dans l'inactivation du chromosome X chez la femme et dans l'empreinte génomique (Gal-Yam, Saito et al. 2008).

### **1.3.1.2 La méthylation de l'ADN dans les cellules tumorales**

Comme dans les autres cancers, les altérations épigénétiques, incluant la méthylation des îlots CpG de l'ADN, sont communes dans le cancer ovarien (Barton, Hacker et al. 2008). L'initiation et la progression du cancer sont accompagnées par de profonds changements de la méthylation de l'ADN. D'ailleurs, elle fut la première altération épigénétique identifiée dans le cancer, et le génome des cellules tumorales montre une hypométhylation globale et une hyperméthylation spécifique d'îlots CpG de promoteurs. Par contre, les mécanismes responsables de l'initiation de ces changements globaux sont encore à l'étude (Sharma, Kelly et al. 2010). Malgré tout, il est très probable que les mécanismes qui programment la méthylation de l'ADN lors du développement soient aussi responsables de l'établissement des modèles de méthylation aberrante dans les cellules tumorales (Bonifer and Bowen 2010). En plus, de récentes études ont démontré que certains changements se produisent très tôt dans le développement du cancer et pourraient contribuer à l'initiation de celui-ci (Sharma, Kelly et al. 2010). Cette contribution pourrait s'effectuer de plusieurs façons. Dans un premier cas, une cytosine méthylée pourrait altérer les régions codantes de gènes en induisant une mutation ponctuelle (déamination spontanée de la cytosine en thymidine). Dans un deuxième cas, l'appauvrissement général de 5' cytosines méthylées dans le génome (hypométhylation globale) peut en causer son instabilité. Et dans un dernier cas, l'hyperméthylation de promoteurs de gènes pourrait inactiver la transcription de gènes (figure 1-4C)(Gronbaek, Hother et al. 2007).





Adapté de (Barton, Hacker et al. 2008)

**Figure 1-4** : Processus épigénomique impliqué dans la malignité.

**A.** Méthylation de l'ADN : les méthyltransférases de l'ADN ajoutent un groupement méthyle au carbone en 5' de la cytosine au niveau du dinucléotide CpG. **B.** Structure de la chromatine : la méthylation de l'ADN est associée avec la forme inactive de la chromatine; la déméthylation relaxe la structure de la chromatine permettant au complexe de transcription de lier et amorcer la transcription du gène. **C.** En comparaison avec les cellules normales, les cellules tumorales démontrent une distribution altérée des 5'-methylcytosines, en particulier avec une hyperméthylation de l'îlot CpG associé au promoteur, qui conduit à l'inactivation du gène.

#### 1.3.1.2.1 L'hypométhylation

Les cellules cancéreuses exposent une hypométhylation globale de leur génome. Celle-ci joue un rôle significatif dans la tumorigénèse en plus de se produire sur une variété de séquences génomiques (Sharma, Kelly et al. 2010). L'hypométhylation de l'ADN peut mener à la surexpression de certains gènes, à la perte de l'empreinte génomique, à la transcription de séquences parasites (ADN viral et transposons) ou à la surexpression de microARNs oncogéniques. Par contre, l'effet cancérogène principal de l'hypométhylation est causé par son habilité à créer une instabilité génomique. Un génome instable peut faciliter la recombinaison mitotique illégitime menant à des bris chromosomiques, à des translocations et/ou à des pertes alléliques. Par exemple, la perte de la méthylation dans les

régions péricentromériques du chromosome est une caractéristique de plusieurs cancers et peut mener au bris de cette région (Gronbaek, Hother et al. 2007). En bref, l'hypométhylation de l'ADN mène à l'activation aberrante de gènes et de régions non-codantes par une variété de mécanismes qui accroissent l'instabilité du génome et activent des proto-oncogènes, ce qui contribue au développement et à la progression du cancer (Sharma, Kelly et al. 2010).

#### *1.3.1.2.2 L'hyperméthylation*

La cellule possède plusieurs mécanismes protecteurs qui préviennent l'hyperméthylation des îlots CpG. Ils impliquent une transcription et une déméthylation actives, une synchronisation de la réplication et une structure chromatinienne qui prévient l'accès des méthyltransférases de l'ADN. Malgré tout, l'hyperméthylation est présente dans le cancer et est beaucoup plus répertoriée dans la littérature que l'hypométhylation (Das and Singal 2004). L'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs par l'hyperméthylation des îlots CpG de leur promoteur est l'un des événements épigénétiques le plus fondamental dans la cancérogenèse et c'est probablement le mécanisme le plus commun dans l'inactivation de suppresseurs de tumeurs dans le cancer (Gronbaek, Hother et al. 2007). D'ailleurs, les effets biologiques de la perte de fonctions des gènes causés par l'hyperméthylation du promoteur sont similaires à ceux causés par la mutation des régions codantes (Herman and Baylin 2003). En plus, l'extinction épigénétique de gènes suppresseurs de tumeurs peut mener à l'initiation du cancer en servant de deuxième coup dans le modèle des deux coups de Knudson (Sharma, Kelly et al. 2010). En suivant les principes de ce modèle sur l'inactivation de suppresseur de tumeurs, les deux allèles peuvent être inactivés par hyperméthylation ou par une combinaison de méthylation et de délétion. En principe, toutes les combinaisons d'événements génétiques et épigénétiques peuvent mener à l'inactivation de suppresseurs de tumeurs (Gronbaek, Hother et al. 2007).

Un nombre important de gènes subissent une hyperméthylation dans le cancer et un grand nombre ont été identifiés dans le cancer ovarien. (Barton, Hacker et al. 2008). En effet, depuis la découverte initiale de l'hyperméthylation de l'îlot CpG du promoteur du gène Rb

(un gène suppresseur de tumeur associé au retinoblastome), plusieurs autres gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p16, MLH1 et BRCA1, ont également démontré une hyperméthylation propre aux tumeurs. Ces gènes, cibles potentielles d'hyperméthylation, sont des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, associés à la réparation de l'ADN, à l'adhésion cellulaire, à l'apoptose, à la résistance aux drogues, à la détoxification, à la différenciation, à l'angiogenèse et à la formation de métastase. Ils sont impliqués dans des processus cellulaires qui font partie intégrante du développement et de la progression du cancer. (Das and Singal 2004; Sharma, Kelly et al. 2010). Certains de ces gènes sont hyperméthylés dans une variété de cancers, et d'autres le sont spécifiquement à un type de cancer. Leur profil d'hyperméthylation varie selon le type de tumeur et la fréquence de méthylation varie aussi souvent beaucoup d'une étude à l'autre. L'inhibition de ces gènes suppresseurs de tumeurs par hyperméthylation des îlots CpG est également accompagnée par un profil de modifications épigénétiques qui se caractérise par une hypoacétylation et une méthylation globale des histones. Cependant, les mécanismes impliqués dans le ciblage de la méthylation propre à certains gènes restent à déterminer (Das and Singal 2004; Esteller 2007; Barton, Hacker et al. 2008). Une des possibilités serait que l'inhibition spécifique d'un gène par hyperméthylation lui procure une croissance cellulaire avantageuse, entraînant sa sélection clonale et sa prolifération (Sharma, Kelly et al. 2010).

L'hyperméthylation de l'ADN n'agit pas que directement sur l'inactivation d'un gène, elle peut également le faire de façon indirecte par l'inactivation de facteurs de transcription et de gènes de réparation de l'ADN. En effet, l'inhibition induite par l'hyperméthylation de promoteur de facteurs de transcription mène à l'inactivation de leurs gènes cibles et l'extinction de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN permet aux cellules d'accumuler plus de lésions génétiques menant à la progression rapide du cancer (Sharma, Kelly et al. 2010).

### 1.3.1.3 Potentiel thérapeutique de la méthylation

Comme mentionnées plus haut, les altérations épigénétiques jouent un rôle important dans l'initiation et la progression du cancer et contrairement aux altérations génétiques, elles sont potentiellement réversibles. Elles sont donc de bonnes cibles thérapeutiques. Présentement, les recherches sont tournées vers les inhibiteurs de DNMTs et d'HDACs (déacétylases d'histones); les deux principales cibles épigénétiques. Les inhibiteurs de DNMTs (DNMTi) consistent principalement en des analogues nucléosidiques tels que le 5-aza-deoxy-cytidine (5-aza-dC) et la zebularine. Ces inhibiteurs, incorporés à l'ADN à la place de la cytidine, trappent de façon covalente les DNMTs lors de la division cellulaire. Après quelques divisions, il y a une déméthylation et une réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs. Le 5-aza-dC est en essais cliniques et est même approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement des syndromes myélodysplasiques. Par contre, les analogues nucléosidiques possèdent des désavantages majeurs. Ils sont, pour la plupart, instables en solutions aqueuses neutres et sont toxiques. Les inhibiteurs d'HDACs (HDACi), telle la trichostatine A (TSA), jouent sur la conformation de la chromatine. L'inhibition des déacétylases provoque une accumulation d'histones acétylées amenant la chromatine dans une conformation ouverte. La transcription des gènes précédemment éteints est ainsi augmentée. De plus, étant donné que ces deux traitements touchent deux altérations épigénétiques étroitement liées, la combinaison de ces deux traitements peut représenter une bonne alternative. D'ailleurs, cette combinaison est à l'essai et des effets synergiques ont été démontrés dans plusieurs études. Cette synergie est prometteuse pour une thérapie épigénétique et, en plus, elle pourrait permettre de réduire la toxicité en diminuant la dose individuelle de chaque drogue. Par contre, il reste la possibilité que l'hypométhylation induite par les analogues nucléosidiques et/ou les inhibiteurs d'HDAC puisse mener à l'activation de gènes pro-métastatiques (Szyf 2006; Hellebrekers, Griffioen et al. 2007; Kristensen, Nielsen et al. 2009; Mai and Altucci 2009; Szyf 2009).

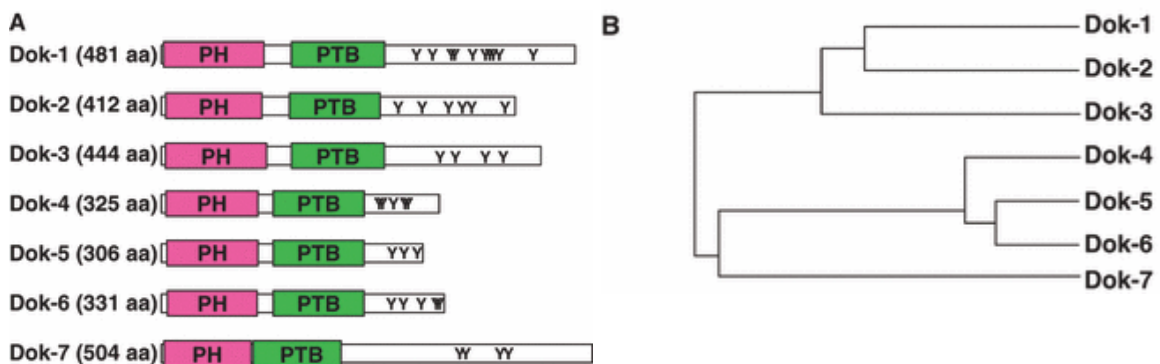
### 1.3.1.4 Biomarqueurs basés sur la méthylation de l'ADN

La méthylation aberrante est un des premiers changements moléculaires dans la cancérogenèse et la progression des tumeurs dans le cancer ovarien et est caractérisée par beaucoup de combinaisons d'altérations épigénétiques qui lui sont propres. Conséquemment, ces séquences d'ADN méthylées possèdent un bon potentiel pour devenir des biomarqueurs dans le diagnostique, la stadification, le pronostique et le suivie de la réponse après chimiothérapie. Ces biomarqueurs basés sur la méthylation de l'ADN possèdent beaucoup d'avantages comme moyen de détection et de classification comparativement aux autres types de biomarqueurs, comme les protéines, l'expression génique et les mutations géniques. Ils offrent une meilleure stabilité, ils sont plus faciles à amplifier (plus grande sensibilité), les coûts impliqués sont bas et ils se restreignent à une région amplifiable (îlot CpG) plutôt qu'au gène entier. En plus, la méthylation de l'ADN peut être détectée dans les tissus, dans le sérum/plasma et dans le fluide péritonéal. Par contre, parmi les biomarqueurs actuels, aucun n'a été identifié comme méthylé dans plus d'une relativement petite proportion de cancers ovariens et ceux-ci possèdent plusieurs limitations, notamment dans la sensibilité et dans la spécificité. Par conséquent, l'évaluation de la méthylation basée sur un seul gène n'est pas assez spécifique pour le diagnostic du cancer ovarien. Cependant, plusieurs biomarqueurs de méthylation permettraient d'atteindre la précision nécessaire. Ainsi, on pourrait augmenter la spécificité du biomarqueur CA-125, par exemple. Le défi réside dans l'identification d'une combinaison de marqueurs méthylés qui est communément retrouvée chez les patientes atteintes du cancer ovarien et qui serait utilisable à des fins de diagnostics et/ou autres. (Barton, Hacker et al. 2008; Balch, Fang et al. 2009).

## 1.4 La famille DOK

La famille DOK (*Downstream of tyrosine kinase*) comprend sept membres, DOK 1 à 7 où DOK1, DOK2 et DOK3 constituent une sous-famille étroitement liée (figure 1-5 B) (Berger, Niki et al. 2010). Ces protéines contiennent un domaine PH (*pleckstrin homology*) en N-terminale, un domaine PTB (*phosphotyrosine binding*) central et en C-terminale,

plusieurs tyrosines, sérines et prolines (motifs PXXP) offrant de multiples motifs de liaison pour des domaines SH2 (*Src homology 2*) et SH3 (*Src homology 3*)(figure 1-5 A) (Di Cristofano, Niki et al. 2001; Niki, Di Cristofano et al. 2004; Niu, Roy et al. 2006; Zhang, Fu et al. 2009). Ces protéines adaptatrices servent de substrats communs pour des protéines tyrosines kinases (PTKs) et jouent un rôle important dans la régulation de la transduction du signal impliqué dans plusieurs fonctions biologiques, telles que la prolifération cellulaire, la transformation et la tumorigenèse, la motilité cellulaire et la différenciation (Boulay, Nemorin et al. 2005; Zhang, Fu et al. 2009).



Figures tirées de (Mashima, Hishida et al. 2009)

### Figure 1-5 : Protéines de la famille DOK

A. Représentation schématique B. Arbre phylogénétique des protéines DOK chez la souris.

#### 1.4.1 DOK1

DOK1 est une protéine de 62 kDa aussi connu sous p62<sup>dok</sup> dont la région codante est située sur le chromosome 2 en position p13 (Lee, Huang et al. 2007). Elle est le membre prototypique de la famille DOK. Elle a été clonée comme le substrat majeur de phosphorylation de l'oncoprotéine p210<sup>bcr-abl</sup> dans le chromosome Philadelphie positif de blastes de leucémie myéloïde chronique. Elle est phosphorylée suivant l'activation de plusieurs récepteurs et tyrosines kinases cytoplasmiques. Cette phosphorylation est nécessaire pour sa fonction d'adaptateur de signalisation. Une fois phosphorylée, DOK1 interagit par ses domaines de liaisons SH2 avec un certain nombre de molécules de

signalisation, ce qui la place à la croisée de plusieurs voies de transduction de signal. La phosphorylation de DOK1 après activation de plusieurs kinases cruciales démontre un rôle potentiellement important de ce dernier dans de multiples événements de signalisation. D'ailleurs, elle se manifeste comme un régulateur négatif clé en aval de plusieurs cascades de tyrosines kinases réceptrices et non-réceptrices. Elle régule négativement la prolifération cellulaire et la signalisation des lymphocytes, empêche l'activité MAP (mitogen-activated protein) kinase et sert d'intermédiaire dans l'apoptose induite par l'activine. En plus de ces effets inhibiteurs sur diverses fonctions cellulaires, DOK1 joue des rôles positifs dans l'adhérence cellulaire, la propagation et la migration cellulaire. C'est pourquoi il est cru que sa fonction consiste en une boucle de rétroaction négative qui module étroitement la durée et l'intensité de la signalisation par les facteurs de croissance (Di Cristofano, Niki et al. 2001; Niu, Roy et al. 2006; Berger, Niki et al. 2010).

En ce qui concerne le cancer, il a été démontré dans le poumon que DOK1 agit en tant que suppresseur de tumeurs. En effet, il y a développement d'adénocarcinome chez la souris avec la suppression de DOK1 et il y a un effet combinatoire lorsque les gènes DOK2 et/ou DOK3 sont également supprimés (Berger, Niki et al. 2010). En plus, en ce qui concerne la leucémie myéloïde chronique (LMC), il a été démontré que DOK1 et DOK2 sont essentiels pour une homéostasie myéloïde et pour la suppression de la leucémie. Une simple perte de DOK1 et/ou de DOK2 induit la transformation blastique de la phase chronique de maladie de type LMC chez les souris portant le gène bcr-abl, une cause de la LMC (Yasuda, Shirakata et al. 2004).

## 2 Hypothèse et objectifs

L'hyperméthylation des îlots CpG de la région promotrice de gènes est un processus qui provoque l'inactivation de la transcription de gènes. Ce processus est présent dans le cancer et contribue à l'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs.

L'hypothèse de recherche est que l'initiation et la progression de tumeurs ovariennes sont, au moins en partie, influencées par une inhibition épigénomique locale (par l'hyperméthylation de leur région contrôle) de gènes impliqués dans la suppression de la tumorigenèse ovarienne.

Le premier objectif a été de trouver des cibles potentielles de méthylation dans le COE par la technologie de micropuces à ADN en opposant quatre lignées cellulaires du COE traitées avec l'agent déméthylant 5-aza-dC aux mêmes lignées non traitées. De cette démarche, le gène DOK1 a été identifié comme un candidat potentiellement modulé par une hyperméthylation de sa région promotrice.

Par la suite, le deuxième objectif a été de confirmer le statut de méthylation du gène DOK1 dans des échantillons tumoraux et normaux, et dans des lignées cellulaires du COE.

Le dernier objectif a été d'identifier le rôle potentiel du gène DOK1 dans l'étiologie du COE par des études fonctionnelles *in vitro*, dans la lignée cellulaire du COE, TOV112, et par analyse de son niveau d'expression dans les tissus tumoraux de nombreuses patientes du cancer ovarien avec données cliniques complètes connues.



## 3 Matériel et méthodes

### 3.1 Extraction d'acides nucléiques

#### 3.1.1 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique des lignées cellulaires, des tumeurs et des tissus normaux s'est fait selon le protocole du kit DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue (juillet 2006) de Qiagen. Les morceaux de tissus ont été laissés toute la nuit à 56 °C dans 20 µl de protéinase K pour la lyse. La concentration a été déterminée par lecture au spectrophotomètre Nanodrop ND-1000.

#### 3.1.2 Extraction d'ARN

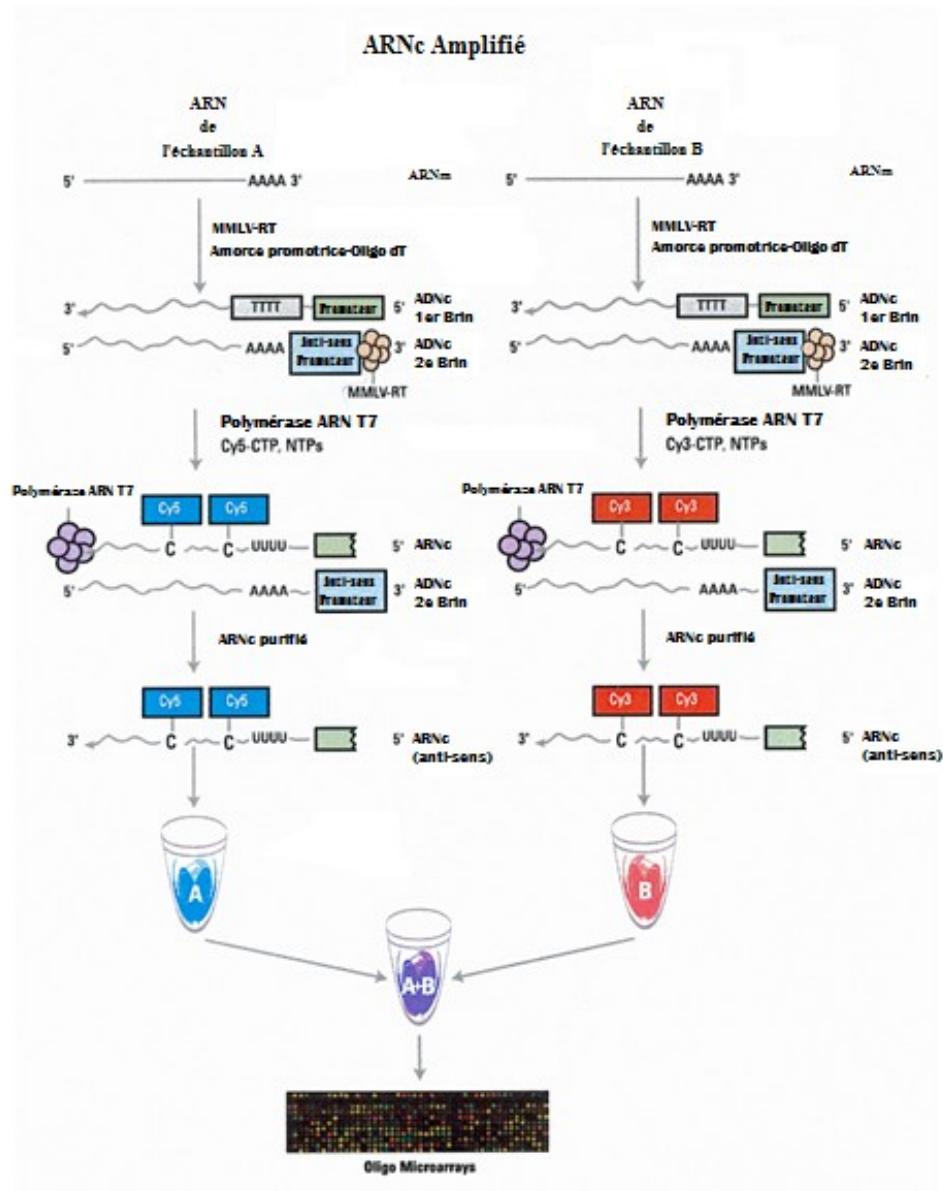
L'extraction de l'ARN des lignées cellulaires, des tumeurs et des tissus normaux s'est faite selon le protocole du kit RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini (Octobre 2005) de Qiagen. Les morceaux de tissus ont été gelés avec de l'azote liquide, égrainés avec un mortier et un pilon, mélangés avec le tampon de lyse RLT et homogénéisés avec une seringue et une aiguille de 0,9 mm. La concentration a été déterminée par lecture au spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 et la qualité a été vérifiée par électrophorèse par capillarité en utilisant un Agilent 2100 Bioanalyzer.

### 3.2 Identification de cibles potentielles de méthylation

Pour trouver des cibles potentielles de méthylation, une analyse d'expression génique globale (44 000 gènes) a été réalisée pour trouver des gènes surexprimés à la suite d'un traitement avec l'agent déméthylant 5-aza-dC. Quatre lignées cellulaires du cancer ovarien épithélial (TOV21, TOV112, SKOV3 et OVCAR3) ont été traitées avec 2,5 µM de 5-aza-dC pendant 6 jours. Une analyse globale de l'expression génique a ensuite été effectuée avec la technologie des micropuces de l'ADN en opposant les cellules traitées au 5-aza-dC à des cellules contrôles non traitées.

### 3.2.1 Micropuces à ADN

Pour effectuer l'analyse globale de l'expression génique par la technologie des micropuces de l'ADN, nous avons extrait l'ARN total des quatre lignées cellulaires traitées et non traitées (voir section 3.1.2). Ces ARNs sont marqués avec du Cy3 et du Cy5 avec le « Quick Amp Labeling Kit, Two-Color » (Agilent) (figure 3-1).



**Figure 3-1 :** Principe de marquage de l'ARN au Cy3 et au Cy5 Selon le « Quick Amp Labeling Kit, Two-Color » d'Agilent Technologies

Une fois marqués, les échantillons ont été hybridés sur une biopuce d'ADN (Agilent 44K Human Whole Genome Oligo Microarray) avec le « Gene Expression Hybridization Kit » (Agilent) et ensuite lavés avec le « Gene Expression Wash Buffer 1 et 2 » (Agilent). Par la suite, la biopuce d'ADN a été « scannée » en utilisant un Agilent DNA microarray Laser Scanner et les données d'expression ont été extraites grâce au logiciel Feature Extraction (Agilent). Finalement, le logiciel GeneSpring (Agilent) a été utilisé pour générer des listes de gènes.

### **3.2.1.1 Validation de l'expression différentielle par RT-PCR**

Pour valider l'expression différentielle de ces sept gènes, une RT-PCR a été effectuée. Premièrement, pour obtenir de l'ADNc, une réaction de transcriptase inverse s'est faite comme suit; 5 µg d'ARN extrait des quatre lignées cellulaires traitées et non traitées solubilisés dans un volume total de 10 µl d'eau sans RNase a été mélangé à 1 µl d'oligonucléotide dT<sub>15</sub> (50ng/µl). Ce mélange a été incubé à 70 °C pendant 10 minutes, suivi de 2-3 minutes sur glace et d'une légère agitation au vortex. 4 µl de 5x First Strand buffer (Invitrogen), 2 µl de 0.1 M de DTT (Invitrogen) et 1 µl de RNA guard (Amersham Biosciences) ont été ajoutés. Le mélange a été incubé 2 minutes à 42 °C et 1 µl (200 U) de SuperScript RT (Invitrogen) a été ajouté. Ce mélange a été incubé 1 heure à 42 °C, inactivé à 70 °C pendant 14 minutes, suivi de 2-3 minutes sur glace.

Deuxièmement, l'amplification PCR subséquente s'est faite comme suit; 5 µl de la réaction de transcriptase inverse a été mélangé à 2,5 µl de 1mM de dNTP, 5 µl de 10x PCR buffer (Feldan), 2,5 µl d'amorce sens du gène désiré (50ng/µl) (voir tableau 3-1), 2,5 µl d'amorce anti-sens du gène désiré (50ng/µl) (voir tableau 3-1), 2,5 µl d'amorce sens β-actine (10ng/µl) (voir tableau 3-1), 2,5 µl d'amorce anti-sens β-actine (10ng/µl) (voir tableau 3-1), 0,25 µl de Taq polymérase (Feldan) et complété à 50 µl avec de l'eau. Cette réaction a été incubée 1 minute 30 secondes à 94°C, suivi de 22 cycles d'incubation de 1 minute à 94 °C, 1 minute à 60 °C et 1 minute à 72 °C et d'une dernière incubation de 10 minutes à 72 °C. Le résultat de l'amplification (10 µl de la réaction PCR avec un ajout de 2 µl de loading dye 6x (Fermentas)) a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5 %, tampon TBE 1X

(89mM Tris, 89mM acide borique, 2,5 mM EDTA) avec bromure d'éthidium (BrEt, 0,5 µg/ml), pendant ~ 1 heure 15 minutes à 100 V avec le marqueur de poids moléculaire 25 pb (Invitrogen).

**Tableau 3-1** : Liste des amorces pour RT-PCR

<b>Gène</b>	<b>Amorce</b>	
DOK1	Sens	CCCTATACTCAGACCCCTTGG
	Anti-Sens	GGGTTGTAGGGGAGCTCATAG
SIM2	Sens	CGTCTCATCCAGCAGATTAGC
	Anti-Sens	TGGGATCTGGGGTAGAGAGAT
TSRC1	Sens	CGGAGTTCAACGTGACTTCTC
	Anti-Sens	GAGAGCTGTCCTTGCATTGAT
ITPR1	Sens	CACTTTTGCTGACCTGAGGAG
	Anti-Sens	CAATGACATGGCTCTCATCCT
LOXL4	Sens	AGGCATTACCACAGCATTGAG
	Anti-Sens	GGTTCACAATCACCTGGAAGA
HDAC4	Sens	GAAACGAGCTTGATCCTCTCC
	Anti-Sens	GGCTCCTCATCTGGTCTCTTT
CA12	Sens	CTTACTGGGAGGTGCAAGACA
	Anti-Sens	CACCACAGTACTGGCATCCTT
β-ACTINE (contrôle)	Sens	GAGCTCAGTGACCTGCACCT
	Anti-Sens	AACAGGTTCTCTGGAAAAGG

### 3.3 Conversion au bisulfite

La conversion au bisulfite de sodium est un procédé qui permet de distinguer la cytosine (C) de la 5'-Méthyl-Cytosine (5mC). Le traitement au bisulfite de sodium de l'ADN produit la déamination des résidus cytosine en uracile, mais laisse les résidus 5mC intacts. Avec une amplification subséquente, les C deviennent donc des thymines (T) et les 5mC restent des C. Il est ainsi possible de déterminer si les résidus cytosine à l'étude sont méthylés ou non.

La conversion de 1 µg d'ADN génomique par traitement au bisulfite de sodium s'est faite selon le protocole de MethylDetector<sup>TM</sup> Bisulfite Modification Kit (BioLynx inc.) avec

quelques petites modifications. La dilution de la première PCR effectuée à l'étape 4.1 a été de 1:100 (2 µl dans 198 µl d'H<sub>2</sub>O stérile sans DNase et RNase) au lieu de 1:500. À l'étape 5, le marqueur de poids moléculaire utilisé est celui de 25 pb (Invitrogen) contrairement à ceux de 50 ou de 100pb suggérés. Le tampon est du TBE 1X et non du TAE 1X et le témoin avec de l'eau n'a pas été réalisé. Finalement, la conversion des échantillons a été confirmée avec le contrôle p16.

### **3.4 Analyse du statut de méthylation par « Methylation specific PCR » (MSP)**

Les deux paires d'amorces prévues par la stratégie MSP pour une même séquence, soit une pour reconnaître la séquence méthylée (M) et une autre pour reconnaître celle non méthylée (NM), ont été construites (voir tableau 3-4). Le choix de ces amorces s'est fait grâce au programme Methyl Primer Express® v1.0 (Applied Biosystems). Par la suite, de l'ADN génomique traité au bisulfite de sodium subit une première réaction PCR selon la composition en réactifs du tableau 3-3 et des conditions du tableau 3-2 avec une température d'appariement de 60 °C et une durée de cycle de 60 secondes. Avec cette première amplification, une dilution 1:100 (2 µl dans 198 µl d'H<sub>2</sub>O stérile sans RNase et DNase) a été effectuée afin d'exécuter une deuxième réaction PCR (PCR imbriquée) pour obtenir un fragment PCR spécifique. Cette PCR s'est faite de la même manière que la première à la différence des amorces, du gabarit d'ADN, d'une température d'appariement de 61 °C et d'une durée de cycle de 45 secondes.

**Tableau 3-3 :** Composition en réactifs d'une réaction PCR

Réactifs	
ADN	4.0 µl
Amorces sens M ou NM	2.5 µl
Amorces anti-sens M ou NM	2.5 µl
10 X Tampon PCR	5.0 µl
1 mM dNTPs	2.5 µl
Taq polymérase (5 U/ml)	0.25 µl
H <sub>2</sub> O stérile sans RNase et DNase	33.25 µl
TOTAL :	50 µl

**Tableau 3-2 :** Conditions PCR

Température	Durée	Nombre de cycles
94 °C	3 min	1
94 °C	45 à 60 secs	30
59 à 61 °C	45 à 60 secs	
72 °C	45 à 60 secs	
72 °C	4 min	1
4 °C	pause	1

La visualisation des résultats PCR s'est faite par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5 % à 100V pendant ~ 1heure avec du tampon TBE 1X contenant du bromure d'éthidium. Le marqueur de poids moléculaire est le 25 pb (Invitrogen). Dans les puits, 10 µl de réaction PCR avec 2 µl d'agarose dye sont déposés.

### 3.5 Analyse du statut de méthylation par « Bisulfite sequencing PCR »

Les amorces utilisées pour la stratégie BSP ont été construites avec le programme Methyl Primer Express® v1.0 de la compagnie Applied Biosystems (voir tableau 3-4). Les amorces ne contiennent pas d'îlot CpG. Ensuite, de l'ADN génomique traité au bisulfite de sodium subit une réaction PCR selon la composition en réactifs du tableau 3-3 et des conditions du tableau 3-2 avec une température d'appariement de 59 °C et une durée de cycle de 60 secondes. Avec cette première amplification, une dilution 1:100 (2 µl dans 198 µl d'H<sub>2</sub>O stérile sans RNase et DNase) a été effectuée afin d'exécuter une deuxième réaction PCR (PCR imbriquée) pour intensifier le signal. Ce PCR s'est fait de la même manière que le premier à la différence des amorces et du gabarit d'ADN.

**Tableau 3-4** : Liste d'amorces pour les analyses MSP et BSP du gène DOK1

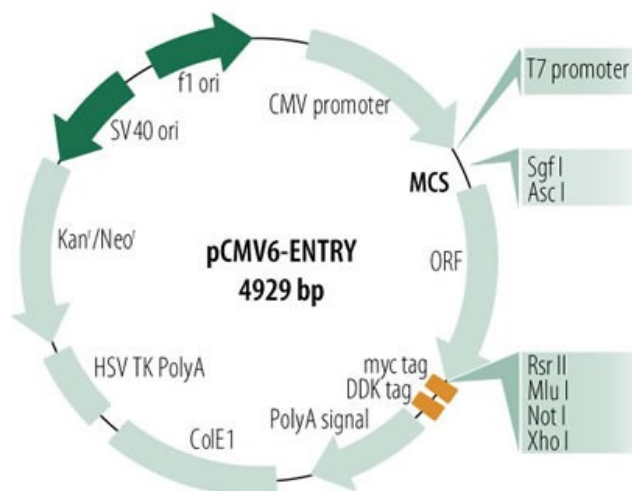
<b>MSP</b>	Amorces Méthylés (M)	Sens	CGTCGTAGGGTTAGGAAGC
		Anti-Sens	AAACGCTTCCCGAAAATATAC
	Amorces Non-Méthylés(NM)	Sens	TTTTGTTGTAGGGTTAGGAAGT
		Anti-Sens	ACAAACACTTCCCAAAAATATACA
<b>MSP (imbriqué)</b>	Amorces Méthylés (M)	Sens	CGTCGTAGGGTTAGGAAGC
		Anti-Sens	CCCGAATAAAATTCGACATC
	Amorces Non-Méthylés (NM)	Sens	TTTTGTTGTAGGGTTAGGAAGT
		Anti-Sens	AACCCAAATAAAATTCAACATCC
<b>BSP</b>	Sens	TTTTTTTGTTTAGGGTTGAGAA	
	Anti-Sens	AATCTCCAAAACCAACTCT	
<b>BSP (imbriqué)</b>	Sens	AGGTAGTTTTGTTTTGGGTTG	
	Anti-Sens	CCCAACCCTTAAAATCCTACT	

### 3.6 Modulation de l'expression du gène DOK1 dans la lignée cellulaire TOV112

#### 3.6.1 Surexpression du gène DOK1

##### 3.6.1.1 Transformation

Le plasmide pCMV Entry (étiqueté Myc/DDK) contenant l'ADN complémentaire du gène DOK1 ainsi que le plasmide pCMV Entry (figure 3-2) seul (ORIGENE) ont été transformés selon le protocole d'*E. coli*<sup>®</sup> EXPRESS Chemically competent cells (Lucigen) pour augmenter leur quantité. L'antibiotique utilisé est la kanamycine à 50 µg/ml. L'ADN plasmidique a été isolé selon le protocole Plasmid Maxi kit (QIAGEN)



**Figure 3-2** : Représentation du plasmide pCMV-ENTRY

### 3.6.1.2 Transfection et isolation de transfectants DOK1 stable

Les plasmides pCMV et pCMV-DOK1 ont été transfectés dans la lignée cellulaire TOV112. Tout d'abord, dans une plaque à 6 puits, 100 000 cellules ont été déposées dans chaque puits. Ensuite, 2 µg d'ADN ont été dilués dans un volume de 190 µl de NaCl 150mM, auquel 10 µl de Exgen 500 (Fermentas) a par la suite été ajouté. Ce mélange de 200 µl a été incubé 10 minutes à température pièce, incorporé à 1,8 ml de milieu de culture OSE [50 % *medium* 199 (Gibco BRL), 50 % *medium* 105 (Sigma), 10 % FBS, 0,5 µg/ml fongisone (Biomedica), 50 µg/ml gentamicine (Gibco BRL)] frais et ajouté dans chacun des puits après l'établissement des cellules. La plaque a alors été centrifugée 5 min à 1500 RPM et incubée à 37 °C avec 5 % CO<sub>2</sub> pendant 2-3 jours. Finalement, les clones ont été sélectionnés par traitement au G418 sulfate (Multicell) à 1,0 mg/µl

### 3.6.2 Sous-expression du gène DOK1 dans la lignée cellulaire TOV112 par interférence à l'ARN

Afin de supprimer le plus possible l'expression du gène DOK1, l'interférence à l'ARN a été utilisée. Le principe de cette technique consiste à introduire l'expression d'un shARN ciblant le gène d'intérêt par infection avec un lentivirus. Le shARN ainsi produit se liera à l'ARN messager du gène DOK1 et empêchera la production de la protéine.



### 3.6.2.1 Préparation des lentivirus

La transfection des plasmides lentiviraux a été effectuée avec le  $\text{CaCl}_2$  dans des cellules HEK-293T. Chacun des plasmides (plasmide gag-pol, plasmide d'enveloppe, le plasmide vecteur et un plasmide contenant Rev) a été transfecté afin de produire des lentivirus. Deux plasmides ont servi à la préparation de virus : un vecteur contrôle (MISSION® pLKO.1-puro Control Vector (Sigma)) et un vecteur pLKO.1 contenant le shRNA ciblant le gène d'intérêt, DOK1 (TRCN0000037628 (Sigma)) avec la séquence suivante : CCGGG AGGGA GTACA ACGGA AGAAA CTCGA GTTTC TTCCG TTGTA CTCCC TCTTT TTG (Sigma). La figure 3-3 illustre la séquence du plasmide pLKO.1 utilisée pour la création du virus contrôle et pour celui contenant la séquence du shRNA. Ensuite, les milieux comprenant les virus ont été récupérés après 72 heures et l'efficacité de la transfection a été vérifiée par titration.

### 3.6.2.2 Infection

Le jour avant l'infection,  $5 \times 10^4$  cellules TOV112 ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits. Les cellules ont été infectées avec les particules virales du pLKO ou du sh-DOK1 en présence d'une concentration finale de 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de polybrène. Ce dernier est un polymère cationique permettant d'augmenter l'efficacité de l'infection en neutralisant la charge de répulsion entre les virions et la surface de la cellule. La lignée cellulaire a subi une infection et, 48 heures après, les cellules ont été lavées avec du PBS et sélectionnées avec 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de puromycine pour obtenir des clones stables. Finalement, des clones stables ont été sélectionnés pour vérifier le niveau d'expression de DOK1 et pour des études fonctionnelles.

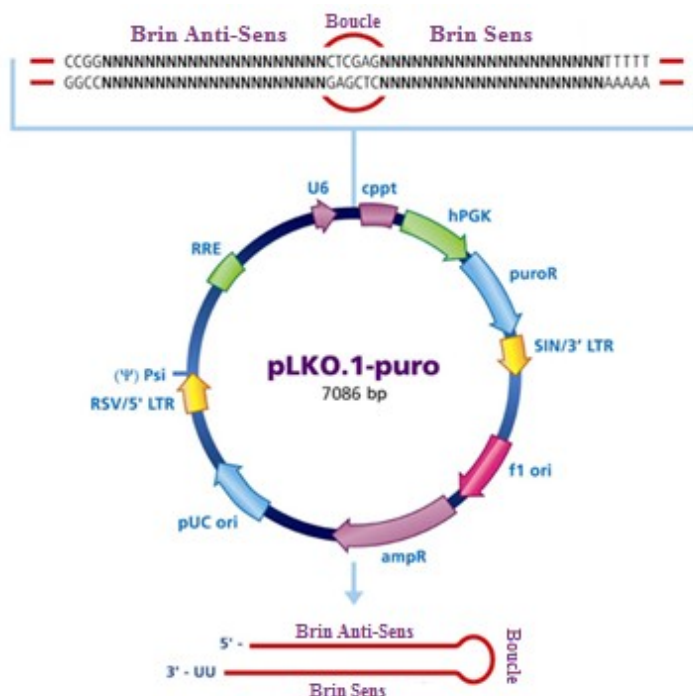


Figure 3-3 : Représentation du vecteur viral pLKO

### 3.6.3 Validation du niveau d'expression de DOK1 des différents clones

Pour vérifier que les différents clones stables modulaient l'expression du gène DOK1, le niveau d'ARNm et de protéine a été évalué par RT-PCR et par immunobuvardage (*Western Blot*) respectivement.

#### 3.6.3.1 Vérification du niveau d'expression protéique de DOK1 par immunobuvardage (*Western Blot*)

Les extraits cellulaires totaux ont été préparés à partir de cultures cellulaires de chacun des clones et de la lignée cellulaire TOV112. Les cellules ont d'abord été lavées avec du PBS 1X deux fois. Elles ont ensuite été traitées avec 300 µl de solution LEAMMLY 2X (12,5 mM Tris base, 13,8 mM SDS, 20 % glycérol, 3 % β-mercaptoéthanol, H<sub>2</sub>O), une solution permettant la lyse cellulaire et l'extraction des protéines totales des échantillons. La récupération des cellules a été effectuée avec un grattoir et les lysats récupérés ont été incubés 15 minutes à 95 °C dans des tubes de 1,5 ml. Finalement, les lysats ont été laissés à température pièce quelques minutes avant de les entreposer à -20 °C.

### 3.6.3.1.1 *Dosage des protéines (Méthode de Lowry)*

La concentration en protéines des lysats protéiques a été établie en utilisant la méthode de Lowry. Tout d'abord, une partie de chaque lysat (20 µl) a été précipitée avec 100 µl d'acide trichloracétique (TCA [20 %]), incubée à température pièce pendant 20 minutes et centrifugée à vitesse maximum pour 10 minutes. Les culots ont été récupérés et dissouts dans 100 µl de NaOH [0,1 N]. Ensuite, les échantillons ont été colorés par traitement avec 1 ml réactif de Lowry ([1 %] CuSO<sub>4</sub>, [2%] NaK Tartrate, [2%] Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (dans NaOH [0,1N])), incubés 10 minutes à température pièce, on y ajouta 100 µl de Folin [50 %] et il s'en suivi une incubation de 20 minutes à température pièce. Finalement, la densité optique des échantillons a été évaluée à 650 nm et leur concentration a été déterminée grâce à une courbe standard de BSA.

### 3.6.3.1.2 *Immunobuvardage (Western Blot) en condition dénaturante*

Pour analyser le contenu en protéines des échantillons, les lysats (25 µg) ont premièrement été déposés sur un gel SDS-PAGE 6 % pour séparer les protéines par électrophorèse. La migration a pris 1 heure à 150V dans un tampon de Migration (25 mM de Tris base (pH 8,3), 192 mM de glycine, 0,1 % SDS, H<sub>2</sub>O). Deuxièmement, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (Immobilon-P, Millipore), préalablement immergée dans du méthanol, pendant 1 heure 30 minutes à 300 mA dans un tampon de transfert (25 mM de Tris base, 192 mM de glycine, H<sub>2</sub>O). Les sites non spécifiques ont été bloqués par incubation de la membrane dans une solution de blocage PBS/TWEEN-lait (0,1 % TWEEN 20, 10 % PBS 1X, 4 % lait, H<sub>2</sub>O) pendant 1 heure. Troisièmement, la membrane a été incubée toute une nuit avec l'anticorps anti-DOK1 (IgG monoclonale de souris (Santa Cruz)) à une dilution 1 : 500 dans la solution de blocage à 4 °C avec rotation. Par la suite, la membrane a été lavée 3 fois 10 minutes avec la solution de lavage PBS/TWEEN (0,1 % TWEEN 20, 10 % PBS 1X, H<sub>2</sub>O), incubée 45 minutes avec l'anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Santa-Cruz) à une dilution 1 : 5000 dans la solution de blocage, puis de nouveau lavée 3 fois 10 minutes avec la solution de lavage. Finalement, la détection a été réalisée grâce au système ECL (Amersham, GE), suivie d'une exposition sur un film autoradiographique. Une seconde détection a également été entreprise afin de visualiser les

niveaux protéiques de  $\beta$ -actine, le standard interne, avec l'anticorps de souris anti- $\beta$ -actine (Santa Cruz) à une dilution de 1/8000 dans la solution de blocage.

### **3.6.3.1 Vérification du niveau d'expression d'ARNm de DOK1 par RT-PCR**

La RT-PCR a été réalisée de la même manière qu'à la section 3.2.2.1, sauf que le gène contrôle est GAPDH et seul le gène DOK1 a été étudié. Les amorces du gène contrôle GAPDH, sont CAT GGG TGT GAA CCA TGA GA (sens) et GTC TTC TGG GTG GCA GTG AT (anti-sens).

## **3.7 Études fonctionnelles**

### **3.7.1 Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la migration cellulaire**

Pour évaluer l'effet de l'expression du gène DOK1 sur la migration cellulaire, un essai de réparation de blessure a été effectué. Pour ce faire, un pétri porté à grande confluence de chaque clone a été utilisé. Une égratignure en forme de croix a été réalisée dans tous les pétris. Cette marque a par la suite été observée à différents temps, pour voir la capacité des cellules à proliférer et à combler le trou. Pour s'assurer du résultat, deux essais ont été réalisés.

### **3.7.2 Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la formation de colonies**

Pour évaluer l'effet de l'expression du gène DOK1 sur la formation de colonies, 1500 cellules de chaque clone ont été déposées, en triplicata, dans un pétri de 6 cm de diamètre et incubées 14 jours à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Ensuite, les cellules ont été fixées 10 minutes dans le pétri avec du méthanol froid, colorées avec du bleu de coomassie pendant 5 minutes, lavées avec de l'eau, puis asséchées.

### **3.7.3 Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur le cycle cellulaire par cytométrie de flux (FACS)**

Pour évaluer l'effet de l'expression de DOK1 sur la progression du cycle cellulaire, 750 000 cellules de chacun des clones ont été déposées dans un pétri de 10 cm de diamètre avec du milieu OSE. Quand les cellules étaient bien établies, de la thymidine (Sigma) a été ajoutée pour obtenir une concentration finale de 2mM dans le pétri afin de synchroniser les cellules. Ensuite, les cellules ont été incubées 40 heures à 37 °C avec 5 % CO<sub>2</sub>, ont été lavées trois fois avec du PBS 1X et ont été retournées à 37 °C avec 5 % CO<sub>2</sub> pour 0, 3, 6 et 9 heures. Après ces temps d'incubation, les cellules ont été récoltées avec de la trypsine-EDTA 1X (Sigma), centrifugées à 1200 RPM pendant 5 minutes, resuspendues dans 1 ml de PBS 1X, fixées avec 1 ml d'éthanol 95 % et gardées à 4 °C. La coloration des cellules fixées a commencé par une centrifugation de 5 minutes à 1200 RPM après ajout de PBS 1X. Par la suite, les cellules ont été resuspendues dans du tampon de coloration PI (0,1 % de sodium citrate, 0,02 mg/ml de RNase, 0,3 % de NP40), vortexées 10 secondes et incubées 30 minutes à 4 °C à la noirceur. Finalement, une cytométrie de flux a été réalisée avec les cellules sur un cytomètre epics XL-MCL (Coulter). Cette procédure a été répétée pour s'assurer des résultats.

### **3.7.4 Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la sensibilité aux drogues**

Pour évaluer l'effet de l'expression de DOK1 sur la sensibilité à la première ligne de traitement de chimiothérapie du cancer ovarien, un essai MTT a été réalisé en triplicata. Tout d'abord, dans une plaque à 96 puits, 3000 cellules ont été déposées par puits. Quand les cellules étaient bien établies, elles ont été traitées avec différentes concentrations de drogues (de 0 à 100 µM de Pacitaxel ou de Cisplatine) et incubées 72 heures à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Ensuite, la prolifération cellulaire a été évaluée par le système CellTiter 96 (Promega) et par évaluation de la densité optique à 490 nm.

### **3.8 Évaluation des changements d'expression génique reliés à l'expression de DOK1**

Pour évaluer les modulations d'expression génique qui résultent de la variation d'expression de DOK1, une analyse d'expression génique globale a été conduite par micropuces de l'ADN selon le même procédé qu'à la section 3.2.1. Les seules différences rencontrées sont que les échantillons opposés étaient pCMV-DOK1 vs pCMV et shARN-DOK1 vs pLKO, et que l'expérience s'est faite en duplicata avec inversion des colorants durant le marquage (*dye-swap*), c.-à-d., que l'expérience c'est fait deux fois et que les échantillons marqués au Cy5 la première fois, ont été marqués au Cy3 la deuxième fois, et vice-versa. De cette façon, les biais reliés au marquage ont été éliminés. De plus, Ingenuity Pathways analysis (IPA), un logiciel qui permet de modéliser, analyser et comprendre les systèmes biologiques et chimiques complexes au centre de recherche en matière des sciences de la vie, a été utilisé pour intégrer les données obtenues des micropuces de l'ADN. Ceci a permis de visualiser les diverses interactions chimiques et biologiques qu'implique la modulation d'expression de DOK1, d'obtenir des informations sur les gènes impliqués, comme les fonctions dans lesquelles ils interagissent, et de procéder à diverses analyses statistiques.

### **3.9 Évaluation de l'expression de DOK1 dans les tissus par immunohistochimie.**

Pour déterminer le niveau d'expression de DOK1 dans l'épithélium normal ovarien et dans les tissus tumoraux, une immunohistochimie (IHC) a été effectuée sur un microarray de tissus (TMA) contenant 120 échantillons de carcinomes séropapillaires de l'ovaire, de tumeurs borderlines et de tissus ovariens normaux. La paraffine présente sur les TMAs a été enlevée avec du xylène et les lames ont été réhydratées par incubation dans différents gradients d'éthanol (de 100 % éthanol à ddH<sub>2</sub>O). Ensuite, les sites de liaisons à l'antigène ont été démasqués à haute température avec un tampon citrate à pH6. L'activité endogène des peroxydases a été bloquée avec du peroxyde d'hydrogène 3% et les sites de liaisons non spécifiques ont été bloqués avec du sérum de chèvre. Les lames ont été incubées à température pièce toute la nuit avec l'anticorps primaire anti-DOK1 (Santa Cruz) à une

dilution 1/500. La détection s'est fait avec le kit de détection Super Stain HRP (ID labs) et la révélation avec le kit de DAB Chromogen (IDlabs) avec un temps d'incubation de 5 minutes. L'intensité de la coloration a été évaluée à vue par le pathologiste Dr Bernard Têtu.

## 4 Résultats

### 4.1 Sélection de gènes candidats

La liste de gènes obtenue par micropuces de l'ADN dans les cellules ovariennes traitées avec 5-aza-dC a été filtrée pour sélectionner des gènes candidats pour une hyperméthylation potentielle de leur promoteur. Premièrement, une filtration initiale basée sur un intervalle de confiance  $p\text{-value} = 0.005$  et un niveau d'expression d'au moins 3 fois supérieur dans les 4 lignées cellulaires du COE analysées ont raccourci la liste à 179 gènes. Deuxièmement, les gènes sur le chromosome X, les gènes à empreinte et les gènes avec des fonctions inconnues ont été exclus. Troisièmement, seulement les gènes qui contiennent des régions riches en CpG dans leur séquence promotrice ont été gardés (62 gènes). 18 de ces 62 gènes ont déjà été répertoriés dans la littérature comme subissant une hyperméthylation de leur promoteur dans d'autres cancers. Les 46 gènes restants représentent de nouveaux candidats cibles de méthylation dans le cancer ovarien selon notre stratégie de filtration. De ceux-ci, 7 gènes ont été précédemment caractérisés comme des suppresseurs de tumeurs potentiels et/ou ont montré des fonctions pro-apoptotiques et de réponses aux dégâts à l'ADN (Tableau 4-1). Ces gènes ont été initialement sélectionnés pour analyse.

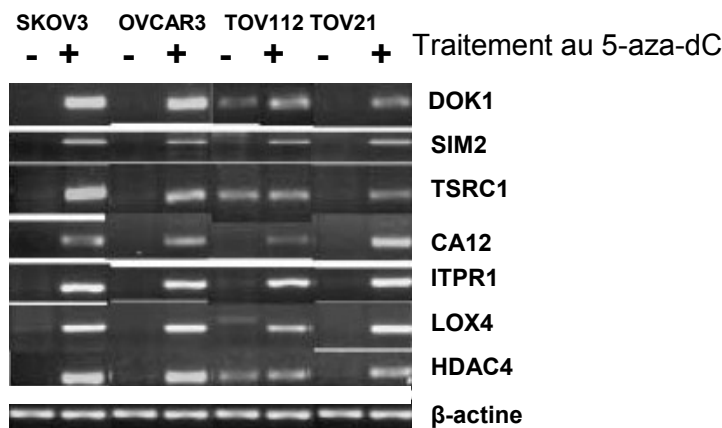


**Tableau 4-1 :** Liste des sept gènes candidats cibles d'une méthylation du promoteur spécifique au cancer de l'ovaire

<b>Gène</b>	<b>Fonctions générales et reliées au cancer</b>
<b>DOK1</b>	Régulateur négatif de réponses aux cytokines; suppresseur de tumeur dans la leucémie (Yasuda, Shirakata et al. 2004; Lamkin, Chin et al. 2006).
<b>SIM2</b>	Répresseur transcriptionnel; caractérisé comme suppresseur de tumeur dans le cancer du sein (Kwak, Gustafson et al. 2007).
<b>TSRC1</b>	Membre de la famille de gène ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)-ressemblante; montre des activités pro-apoptotiques dans les cellules du cancer ovarien (Liu, Guo et al. 2006).
<b>ITPR1</b>	Canal de libération intracellulaire, impliqué dans la signalisation du $Ca^{2+}$ et dans les mécanismes d'apoptose (Sedlak and Snyder 2006).
<b>LOXL4</b>	Amine oxydase, membre de la famille LOX (Kim, Kim et al. 2003), impliquée dans la formation de la matrice extracellulaire; les LOXs sont impliqués dans la sénescence cellulaire et la suppression de tumeurs (Sharma, Kramer et al. 1997).
<b>HDAC4</b>	Réprime la transcription quand attaché à un promoteur. Un composant de la réponse aux dommages à l'ADN en coordination avec p53 (Basile, Mantovani et al. 2006).
<b>CA12</b>	Membre d'une large famille de métalloenzymes de Zinc qui catalyse l'hydratation réversible des dioxydes de carbone. Marqueurs d'un bon pronostic dans le carcinome du sein invasif (Watson, Chia et al. 2003).

## 4.2 Validation par RT-PCR de l'expression différentielle des sept gènes candidats de méthylation

Pour s'assurer que l'expression différentielle des sept gènes identifiés par micropuces à ADN était véridique, elle a été vérifiée par RT-PCR en opposant les cellules traitées au 5-aza-dC aux cellules contrôles non-traitées des quatre lignées cellulaires du COE (figure 4-1). Le gène  $\beta$ -actine a été utilisé comme contrôle. Dans les lignées SKOV3, OVCAR3 et TOV21, aucun signal n'a été détecté en absence de traitement, mais avec traitement, un signal fort est aperçu pour les sept gènes. Pour ce qui est de la lignée cellulaire TOV112, il n'y a aucun signal pour les gènes SIM2, CA12 et ITPR1, un faible signal pour les gènes DOK1, LOXL4 et HDAC4 et un signal élevé pour le gène TSRC1 lorsqu'il n'y a pas de traitement. Par contre, une augmentation ou une apparition de signal est remarquée après traitement au 5-aza-dC.

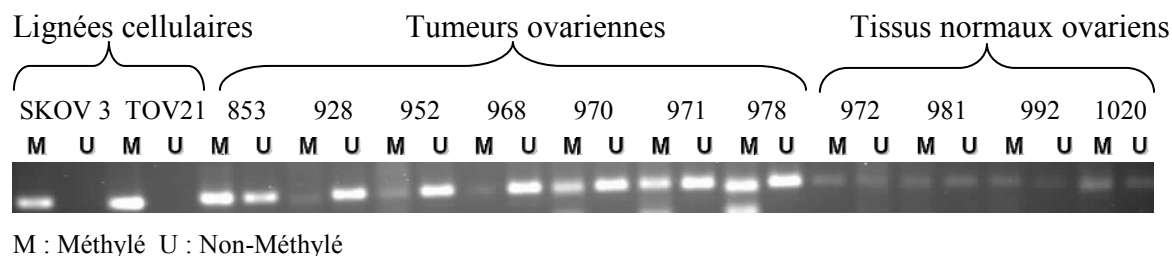


**Figure 4-1 :** Confirmation par RT-PCR des changements d'expression des 7 gènes identifiés dans l'analyse par micropuces de l'ADN après traitement au 5-aza-dC. La β-Actine a été utilisée comme contrôle.

À la base des informations obtenues par l'analyse par micropuces de l'ADN et par RT-PCR et du fait que le gène DOK1 possède un rôle potentiel de suppresseur de tumeurs, le gène DOK1 a été choisi pour les études subséquentes.

### 4.3 Analyse du statut de méthylation par « Methylation specific PCR » (MSP)

Afin d'évaluer le statut de méthylation du gène DOK1 dans le COE, une analyse par MSP a été effectuée sur l'ADN génomique traité au bisulfite de sodium de deux lignées cellulaires, 7 tumeurs ovariennes et 4 tissus ovariens normaux. Cette analyse ciblait, plus particulièrement, une séquence spécifique de la région promotrice potentielle du gène DOK (figure 4-3). Dans les deux lignées cellulaires, il y a un signal élevé de méthylation. Dans les tumeurs, un signal de méthylation est détecté pour les tumeurs 853, 970, 971 et 978, mais pas pour les tumeurs 928, 952 et 968. Dans les tissus ovariens normaux, aucun signal de méthylation n'a été détecté (figure 4-2).



**Figure 4-2 :** « Methylation specific PCR » des lignées cellulaires SKOV3 et TOV21, de 7 tumeurs ovariennes et de 4 tissus ovariens normaux après conversion au bisulfite de sodium.

```

-41 5' CGCCG CAGGG CCAGG AAGCG CGGAA GGAAC CGCCG GGGGC CATGG
ACGGA GCAGT GATGG AAGGG CCGCT TTTT TGCAG AGTCA GCGCT TTGGG
ACCAA GGTAG TCTGG CGCAT GGATG CCGAA CCTTA TCCGG G 3' +95

```

**Figure 4-3 :** Fragment PCR spécifique au MSP situé dans la région promotrice du gène DOK1 en position -41 pb à + 95pb du début du premier exon.

#### 4.4 Analyse du statut de méthylation par « Bisulfite sequencing PCR » (BSP)

Le statut de méthylation a également été évalué par une analyse BSP sur l'ADN génomique traité au bisulfite de sodium des mêmes échantillons de lignées cellulaires, de tumeurs ovariennes et de tissus ovariens normaux. Après une comparaison entre les séquences obtenues par séquençage et la séquence attendue (figure 4-4), il a été possible de déterminer le statut de méthylation de 14 îlots CpG (figure 4-5). Pour les lignées cellulaires, la totalité des îlots CpG a montré une cytosine, donc une présence de méthylation à ces sites. Pour les tumeurs, cinq (853, 952, 968, 970 et 978) ont démontré une méthylation sur tous ou la majorité des îlots, une (971) sur 3 des 14 îlots et la dernière (928) n'a aucun îlot CpG méthylé. Pour les tissus ovariens normaux, ils ont tous présenté une thymidine sur tous les îlots, donc il n'y a aucune méthylation.

**-1085 5'** GGTAG **Y**GTTT T**Y**GG AGGAG TTTT TTTT TAGGG **Y**GTTT TTGG**Y**  
 GGTTT TGTT**Y** GAATA T**Y**GT AGTTT **Y**GT T**Y**GG TATGT GTTT TTT**Y**G  
 TGTAT TTTGT TTTAT TTGT TTTG ATAAG AATTA AATTT TTAGT TGGGT  
 GGTTT TTTT **Y**GATT TTATT TTATA TTATT **Y**GTTT TTTT GGTTT TTTTA  
 TATTT TTTT ATTTT TTATT TATTT TTTT **G**YGGT TAG**Y**G TGATT TTTT  
 TATTT TGGT**Y** GAGTA GGATT TTAAG GATTG GG **3' -777**

**Figure 4-4 :** Fragment PCR spécifique au BSP situé dans la région promotrice du gène DOK1 en position -1085 pb à -777 pb du premier exon. Les **Y** représentent les sites potentiels de méthylation.

	CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5	CpG 6	CpG 7	CpG 8	CpG 9	CpG 10	CpG 11	CpG 12	CpG 13	CpG 14
SKOV 3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
TOV 21	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
853	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
928	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
952	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●
968	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
970	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●
971	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	●
978	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	●	●
972	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
981	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
992	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1020	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

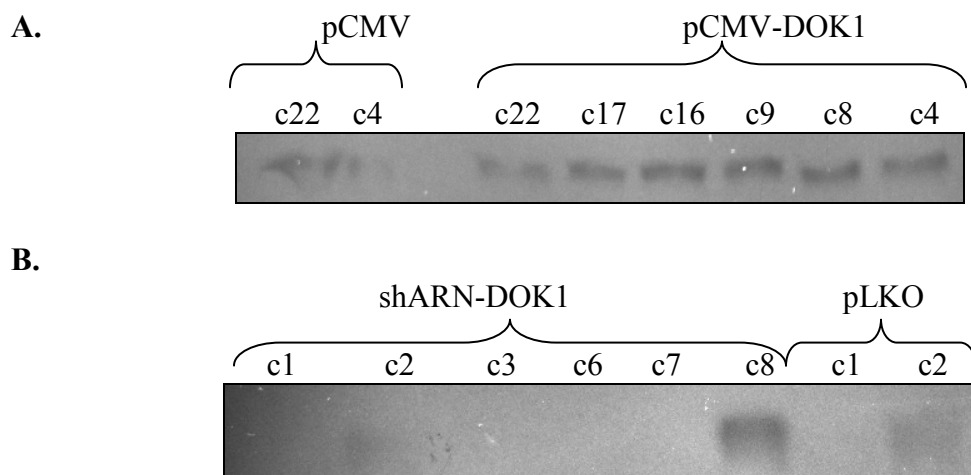
Lignées cellulaires
Tumeurs ovariennes
Tissus normaux ovariens
● Méthylé
○ Non-Méthylé

**Figure 4-5 :** « Bisulfite sequencing PCR » des lignées cellulaires SKOV3 et TOV21, de 7 tumeurs ovariennes et 4 tissus ovariens normaux après conversion au bisulfite de sodium.

## 4.5 Évaluation de l'expression de DOK1 dans les clones surexprimant et sous-exprimant le gène DOK1 dans la lignée cellulaire TOV112

### 4.5.1 Du point de vue des protéines par immunobuvardage (*Western Blot*)

Pour s'assurer que les clones construits modulent bel et bien l'expression de DOK1, un immunobuvardage a été effectué pour évaluer le niveau protéique de DOK1 (figure 4-6). Pour la surexpression du gène (figure 4-6 A), tous les clones pCMV-DOK1 affichent un bon signal, sauf le clone c22, dont le signal est moindre. Les clones pCMV, quant à eux, montrent un signal plus faible, mais présent. Ainsi, les clones pCMV-DOK1 c4 et pCMV c22 ont été sélectionnés pour une vérification subséquente. Pour ce qui est de la suppression du gène (figure 4-6 B), il n'y a aucun signal pour les clones shARN-DOK1, sauf pour c8 qui montre un signal. Le clone contrôle c1 ne démontre aucun signal, tandis que c2 montre un léger signal. Les clones shARN-DOK1 c3 et pLKO c2 ont donc également été sélectionnés pour une vérification subséquente.

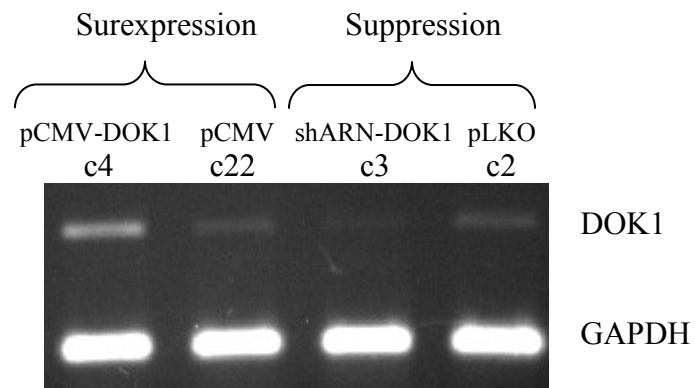


**Figure 4-6 :** Évaluation de l'expression protéique du gène DOK1 des clones.

**A.** Comparaison de l'expression des clones possédant le vecteur pCMV seul à ceux possédant aussi la séquence codante du gène DOK1. **B.** Comparaison de l'expression des clones possédant le vecteur pLKO seul à ceux possédant le shARN contre l'ARNm de DOK1.

## 4.5.2 Du point de vue de l'ARNm par RT-PCR

Afin de valider les résultats obtenus par immunobuvardage, une RT-PCR a été réalisée pour évaluer le niveau d'ARNm (figure 4-7). En premier lieu, pour ce qui est de la surexpression de DOK1, il y a un bon signal pour le clone pCMV-DOK1 et un signal plus faible pour le vecteur correspondant. Par la suite, pour la suppression, il n'y a pratiquement pas de signal pour le clone shARN-DOK1 et un faible signal pour le vecteur seul. Ceci confirme la modulation de l'expression de DOK1 de nos clones.



**Figure 4-7** : Analyse de l'expression du gène DOK1 dans les clones par RT-PCR.

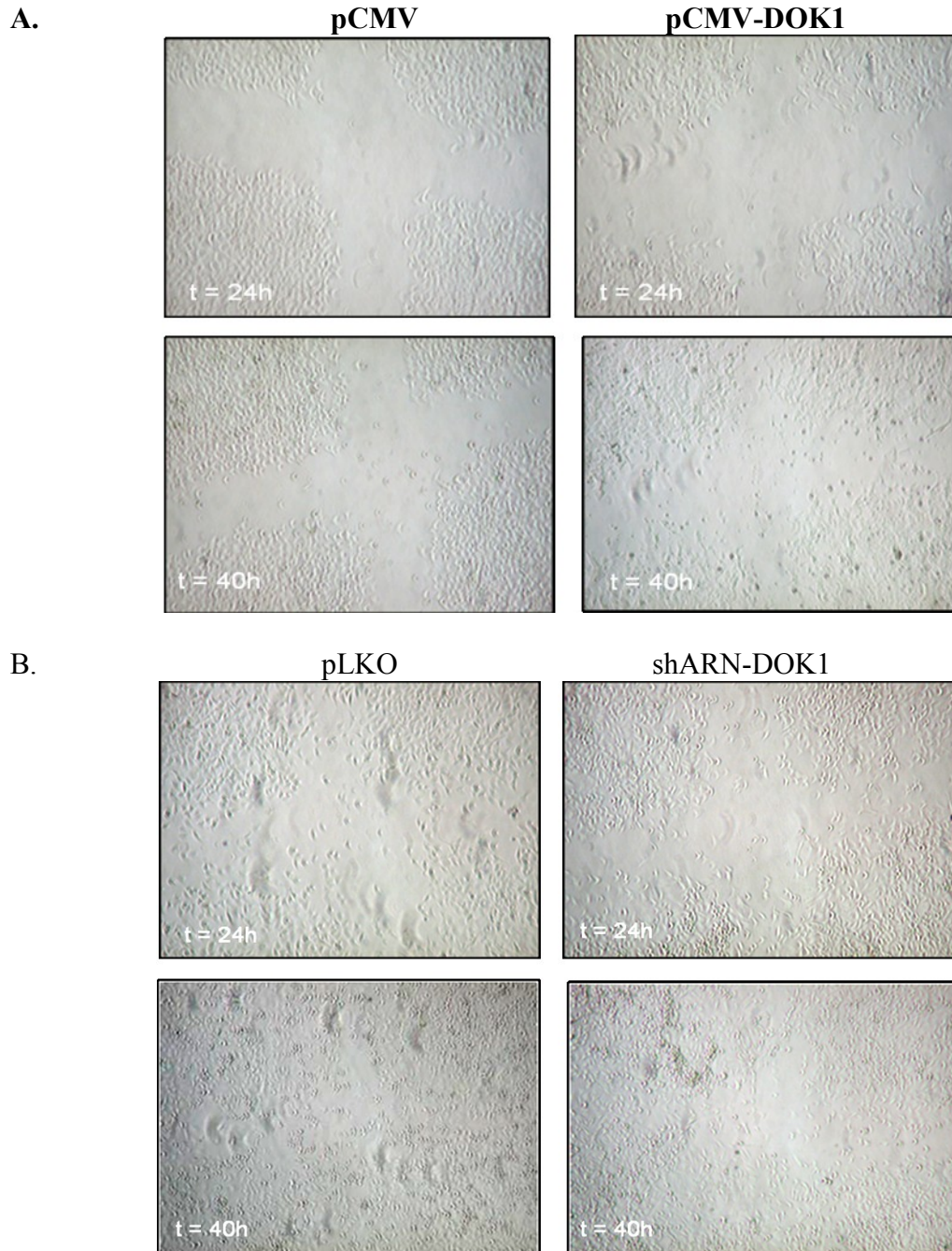
Pour la surexpression, le clone pCMV-DOK1 c4 et son contrôle pCMV c22 ont été choisis pour des études fonctionnelles, tandis que pour la suppression, ce sont le clone shARN-DOK1 c3 et son contrôle pLKO c2.

## 4.6 Études fonctionnelles

### 4.6.1 Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la migration cellulaire

Avec les clones choisis, des études fonctionnelles ont été réalisées dans le but de déterminer le rôle potentiel de l'hyperméthylation de DOK1 dans le cancer ovarien épithélial. En premier lieu, la migration cellulaire a été évaluée par un essai de réparation de blessure. Lorsque le gène est surexprimé (figure 4-8 A), il n'y a pas de différence après 24 heures. Par contre, après 40 heures, un peu plus de cellules recouvrent la blessure du clone pCMV-DOK1 que celle du clone contrôle. Lorsque le gène est supprimé (figure 4-8

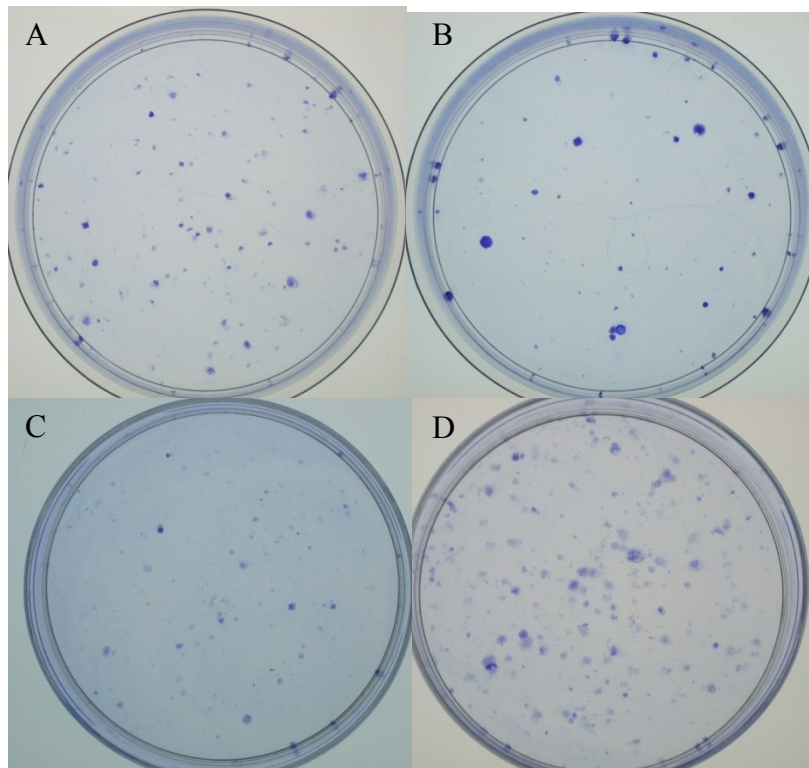
B), il n'y a encore pas de différence après 24 heures, mais après 40 heures, la blessure est légèrement plus recouverte pour le clone pLKO que pour le clone shARN-DOK1. La migration cellulaire est donc très légèrement augmentée avec l'expression de DOK1.



**Figure 4-8** : Essai de réparation de blessure sur les différents clones.  
**A.** Effet de la surexpression de DOK1. **B.** Effet de la suppression de DOK1.

#### 4.6.2 Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la formation de colonie

Ensuite, la formation de colonies a été étudiée par un essai de formation de colonies. À la vue des clones surexprimants DOK1, on remarque un plus grand nombre de colonies pour pCMV-DOK1 que pour son contrôle pCMV. Dans la situation inverse, où le gène est supprimé, le clone shARN-DOK1 montre un plus petit nombre de colonies que le clone contrôle pLKO. L'expression de DOK1 corrèle donc avec la quantité de colonies.

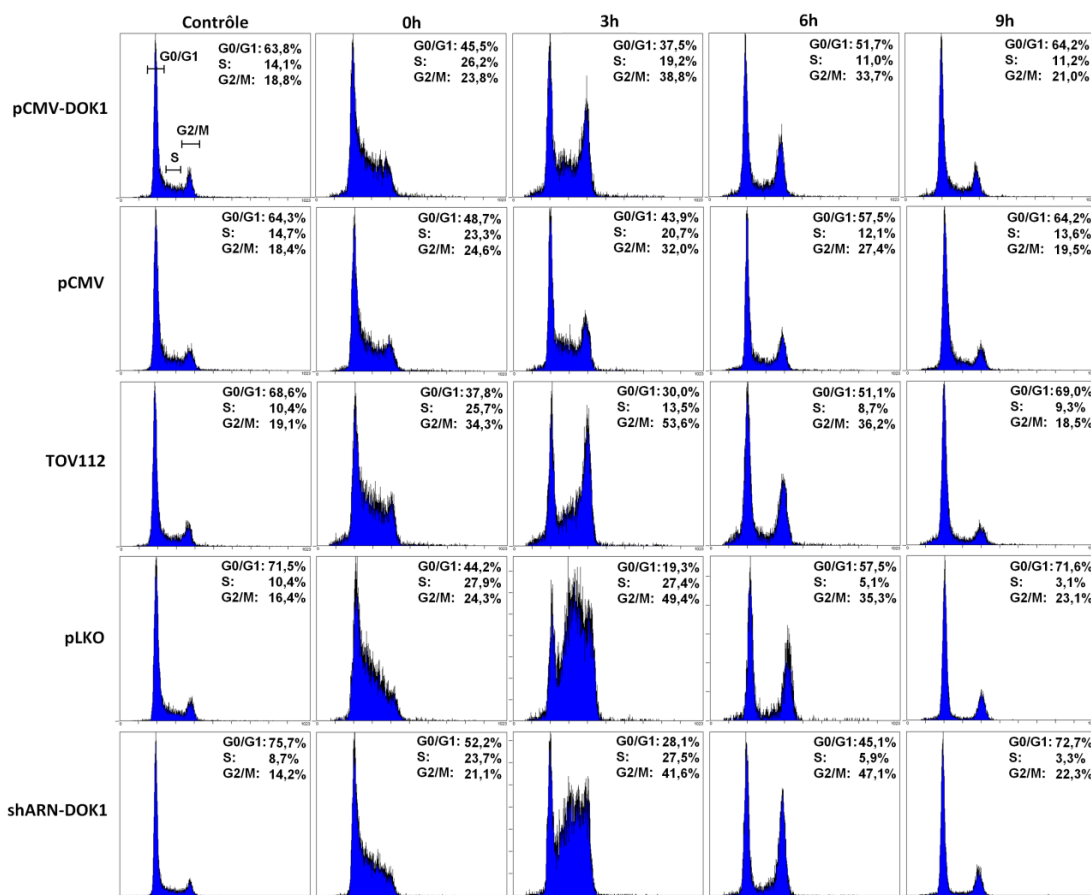


**Figure 4-9 :** Essai de formation de colonie.  
A. pCMV-DOK1 B. pCMV C. shARN-DOK1 D. pLKO



### 4.6.3 Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur le cycle cellulaire par cytométrie de flux (FACS)

Les résultats de l'analyse du cycle cellulaire par FACS ne démontrent pas de différence significative entre les différentes constructions (figure 4-10). Tout d'abord, pour les clones surexprimant DOK1, les cellules pCMV-DOK1 ont bien cyclées. Par contre, celles transfectées par pCMV n'ont pas très bien cyclées, mais malgré tout, la tendance du cycle est visible. Ce qui ressort, c'est que leur pic en G2/M se passe dans les environs de 3 heures, à 6 heures le retour en G0/G1 est entamé et à 9 heures le pourcentage en chaque phase est à nouveau à son état normal. Ils cyclent de la même manière que la lignée cellulaire intacte TOV112. Le cycle cellulaire n'affiche donc pas de changement lors de la surexpression de DOK1.

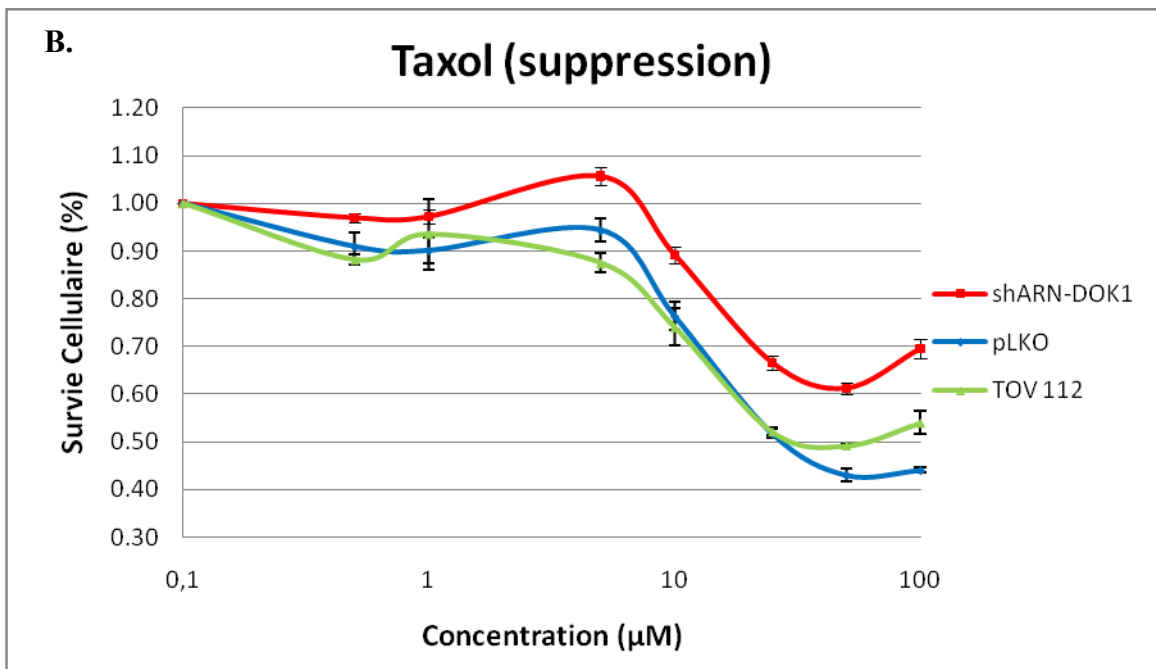
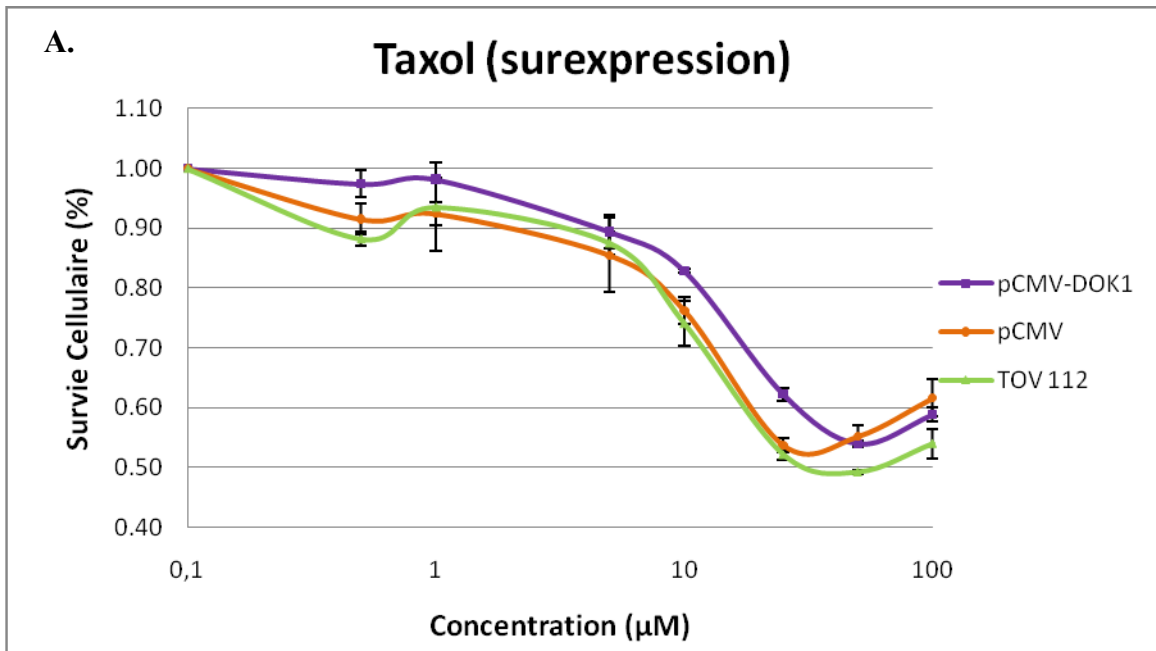


**Figure 4-10 :** Étude du cycle cellulaire par cytométrie de flux (FACS) réalisée sur les différents clones modulant l'expression de DOK1.

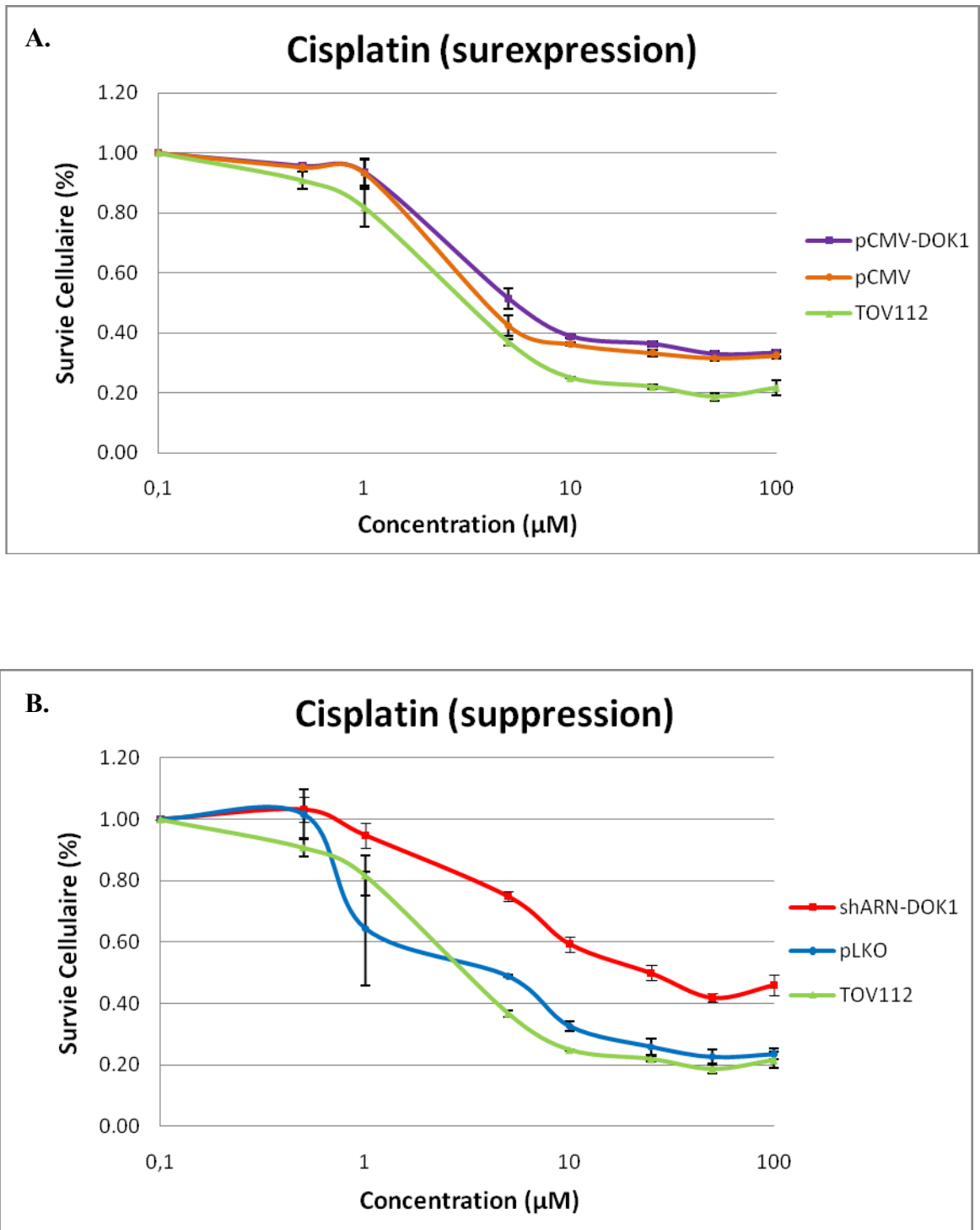
Par la suite, pour les clones supprimant DOK1, pLKO et shARN-DOK1 ont très bien cyclés et possèdent un haut pic en phase S à 3 heures, ce que l'on ne retrouve pas avec les cellules contrôles TOV112. Ceci est peut-être dû à la présence des vecteurs lentiviraux. Ici, une petite différence se fait sentir entre 3 et 6 heures. Pour pLKO, le pourcentage en G2/M passe de 49,4 % à 35,3 %, tandis que pour shARN-DOK1, il passe de 41,6 % à 47,1 %. Par contre, il y a également, un plus petit pourcentage en phase S au départ, en plus d'un plus grand en G0/G1 pour shARN-DOK1, ce qui pourrait expliquer ce léger retard. Il est également important de noter que ce retard est rapidement rattrapé après 9 heures. Il n'y aurait donc pas vraiment de changement significatif dans le cycle cellulaire lors de la suppression de DOK1.

#### **4.6.4 Analyse de l'effet de l'expression de DOK1 sur la sensibilité au taxol et au cisplatine**

La sensibilité au taxol et au cisplatine a été examinée par un essai MTT. Tout d'abord, si l'on regarde la sensibilité au taxol quand il y a surexpression de DOK1 (figure 4-11 A), on remarque qu'il n'y a aucune différence entre pCMV-DOK1, pCMV et TOV112. Par contre, lorsqu'il est supprimé (figure 4-11 B), le clone shARN-DOK1 montre une légère augmentation de la résistance au taxol, comparativement à pLKO et à la lignée cellulaire intacte, TOV112. C'est un peu la même tendance qui est observée au sujet de la sensibilité au cisplatine (figure 4-12). Il n'y a pas de différence lorsque l'expression de DOK1 (figure 4-12 A) est augmentée, mais lorsque son expression est diminuée (figure 4-12 B), il y a une augmentation de la résistance au cisplatine pour la construction shARN-DOK1.



**Figure 4-11** : Effet de l'expression de DOK1 sur la sensibilité au taxol par essai MTT. **A.** Effet de la surexpression de DOK1. **B.** Effet de la suppression de DOK1.



**Figure 4-12** : Effet de l'expression de DOK1 sur la sensibilité au cisplatine par essai MTT. **A.** Effet de la surexpression de DOK1. **B.** Effet de la suppression de DOK1.

## **4.7 Évaluation des changements d'expression génique reliés à l'expression de DOK1**

### **4.7.1 Analyse de la liste de gènes**

Pour tenter de déterminer sur quelle fonction cellulaire agit la modulation de l'expression de DOK1, une analyse d'expression génique globale a été conduite par micropuces de l'ADN. Les gènes exprimés de façon différentielle suivant la modulation d'expression de DOK1 ont été regroupés sur base de leur rôle dans diverses fonctions biologiques. Le tableau 4-2 rassemble tous les gènes dont l'expression est augmentée ou diminuée d'au moins deux fois lorsque DOK1 est surexprimé (pCMV-DOK1 vs pCMV), tandis que dans le tableau 4-3 c'est lors de la suppression de DOK1 (shARN-DOK1 vs pLKO). Plusieurs tendances ressortent. Tout d'abord, pour ce qui est de la surexpression de DOK1, où le clone pCMV-DOK1 démontre une expression du gène DOK1 de 5,78 fois supérieures à celle du vecteur contrôle pCMV, la signalisation intracellulaire, le transport et la régulation de la transcription regroupent la majorité des gènes. Ces mêmes fonctions biologiques, en plus du métabolisme des protéines, de l'adhésion cellulaire, du cycle cellulaire, de la croissance et de la prolifération cellulaire, de la division cellulaire et de la réplication et de la réparation de l'ADN comprennent beaucoup plus de gènes surexprimés que sous-exprimés. Par contre, pour les fonctions d'apoptose, de différenciation cellulaire, de réponse immunitaire et inflammatoire, de migration cellulaire et de mort cellulaire le nombre de gènes reste plutôt semblable dans les deux cas. La quantité de gènes impliqués est même négligeable dans le cas de la mort cellulaire, la migration cellulaire et la différenciation cellulaire. Ensuite, en ce qui concerne la suppression de DOK1, où le clone shARN-DOK1 démontre une expression du gène DOK1 de 3,39 fois inférieures au vecteur contrôle pLKO, la signalisation cellulaire, la régulation de la transcription, le métabolisme des protéines sont les fonctions englobant le plus de gènes, alors qu'il n'y en a très peu impliqué dans la différenciation cellulaire et presque pas dans la division cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN, la migration cellulaire et la mort cellulaire. Il y a une plus grande quantité de gènes surexprimés en ce qui concerne la signalisation intracellulaire de l'apoptose et de la réponse immunitaire et inflammatoire. Pour ce qui est du

métabolisme, la tendance est plutôt contraire. Tandis que pour le reste des fonctions biologiques, la quantité est sensiblement la même.

**Tableau 4-2 :** Liste des gènes dont l'expression est modifiée d'au moins 2 fois après la surexpression du gène DOK1.

FONCTION BIOLOGIQUE	GÈNES IMPLIQUÉS
<b>SIGNALISATION CELLULAIRE</b>	ADCY8, APLP2, ASB5, AXIN2, CAP2, CENTD1, CORO1C, DKK1, DKK2, DLG7, DOK1, EDG2, EPHA3, F2RL1, FGF14, FMN2, GDF15, GNG11, GPR126, HRMT1L1, KREMEN2, MAPK11, NMU, PDE9A, PLEKHK1, PRKG1, RGS5, SCAP2, SPRY2, STMN2, SYT1, TRIM63, COL1A2, DKK3, NUDT11, ARNTL, GLI1, NFATS, NR2F1, AKAP12, EPHA4, FAT, FN1, GPR56, FGF18, GCG, ITGA1, ITGBL1, PP1, EREG, F2R, SOCS3, FGF20, SLIT2, ANXA1, GRCA, SNX10 AVPI1, BIN2, CDCP1, IL22RA1, LRRN6C, TM2D2, FGF13, NTS, EPHA5, NR4A2, ARF4L, RAB37, VAV1, TMEPAI, CIT, RGS1, MAL, PLD1
<b>TRANSPORT</b>	A2M, ACAD9, COL3A1, COL4A5, COL5A2, CYP1B1, CYP24A1, DHCR24, GOSR2, KCNJ2, KCNN2, KCNN4, KCTD12, KIF20A, LDHD, PCLO, RASEF, RIMS1, SLC25A11, SLC38A1, SLC38A2, SLC5A3, SLC6A6, SLN, SQRDL, TRPV2, COL1A2, DKK3, NUDT11, SLC7A11, PKD2, GJA1, SNX10 MT1F, RHCE, ATP1B3, TF, ABCB6, KCNJ14, SLC9A8, GABRG1, COLEC11, SLC6A13, SLC6A15, OSBPL3
<b>RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION</b>	CITED1, DACH1, FOXA1, FOXG1B, HMGA2, HOXA2, HOXA4, HOXA5, HOXA7, HOXA9, LEF1, LRRFIP1, RARB, RORA, RUNX1, SLC2A4RG, TITF1, TLE1, TSC22D2, WHSC1, ZNF11B, ZNF198, ZNF219, ZNF286, ZNF462, ARNTL, GLI1, NFATS, NR2F1, E2F7, E2F8, FOXO1A, UHRF1, SMARCA1 SF3B3, RUNX2, ZNF452, FOXA3, NR4A3, ZBTB1, ZNF10, ZNF23, ZNF397, FOXC1, GATA5, ESX1, SP100, ZNF568, ZNF596, SP140, IRX4, ID4, RRN3, FOSL2, HES4, ASCL2, IFI16, NR4A2
<b>MÉTABOLISME DES PROTÉINES</b>	APEH, BCKDK, DUSP5, FKBP10, HGF, HSPB1, LMO7, PARP8, PBK, PLAT, PPM2C, PPP3CA, PRKAR2B, PTPN13, QPCT, RNF128, SOLH, SSH1, ZNRF3, AKAP12, EPHA4, LEPREL2, GZMB, CTSG, DPP4, PLK2, SLC7A11, HSPA8, DLG4 HSPA5, MGC42174, PLOD2, TTL, FAM80B, ARF4L, RAB37, CIT, CASP9, POLG2, PPIL6, TRIM7, CPVL, PRSS7, USP36
<b>MÉTABOLISME</b>	LEPREL2, GPR56, AK5, ALDH1A1, CBR3, ENOSF1, GAD1, GSTM3, PCCA, SGSH, CD36, ANXA1, MGLL, GRCA CPS1, SLC27A2, SLC27A5, AMY1C, HEL308, THAP10, GCLC, KYNU, TYRP1, GATM, MMP1, AKR1B1, RBKS, OVGPI, ENPP4, GMDS, AOC3, PLD1
<b>APOPTOSE</b>	GZMB, SPP1, AVEN, TNFRSF19, P8, FOXO1A, BIRC5, F2R, SOCS3 MAGEA4, CASP9, MAL
<b>ADHÉSION CELLULAIRE</b>	BCAN, CDH10, CDH11, CDH19, CLDN3, CNTNAP4, HAPLN1, LAMB1, MMRN1, MYBPH, NPHS1, PCDH18, ROBO1, TGFB1, FAT, FN1, GPR56, ITGA1, ITGBL1, SPP1, DST, CYR61, CD36, PKD2 FLRT2, RDS, GMDS, AOC3
<b>CYCLE CELLULAIRE</b>	GAS2L3, KNTC2, KRAS, MACF1, RGC32, STK6, CDKN3, SPAG5, EREG, BIRC5, F2R, DST, INCENP, ASPM, BRRN1, BUB1, CCNB1, CCNB2, CCND2, CCNG1, HCAP-G, KIF23, CDK9, CDKN2C, PLK1, UBE2C, GTSE1, E2F7, E2F8 PINX1, PTN, FGF7, NDN, RGS2, SESN1
<b>CROISSANCE ET PROLIFÉRATION CELLULAIRE</b>	APRIN, CDK9, CDKN2C, CDKN3, CRIP1, CYR61, EMP1, EREG, FGF18, FGF20, GCG, GDF11, IGFBP2, IGFBP7, KIF2C, MT3, P8, PLK1, SOCS3, TGFB1, TGFB2, UBE2C LAMP3, GPNMB, MAGEA4, SESN1, IFI16, HPS1
<b>DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE</b>	ROBO1, EREG, SLIT2, IFRD1, S100A11 HES4, ASCL2, MAL
<b>DIVISION CELLULAIRE</b>	INCENP, ASPM, BRRN1, BUB1, CCNB1, CCNB2, CCND2, CCNG1, HCAP-G, KIF23, UBE2C, SPAG5, CENPE, CENPF
<b>RÉPLICATION ET RÉPARATION DE L'ADN</b>	ERCC1, MGMT, NEIL3, RAD51AP1, RAD54L, CHTF18, PFS2, PTTG2, RRM2, TK1, POLD1, TOP2A, TYMS, CENPF, UHRF1, S100A11, GTSE1 POLG2
<b>RÉPONSE INFLAMMATOIRE ET IMMUNITAIRE</b>	PLA2G4B, ANXA1, MGLL, CTSG, DPP4, PLK2, F2R, CXXC5, LILRB3, GJA1 CFHL3, MAGEA12, MAGEA6, RSAD2, CFH, DAF, CFHL1, LST1, RGS1, IFI16, AOC3
<b>MIGRATION CELLULAIRE</b>	F2R, SLIT2, ANXA1, PPAP2B DNAH7
<b>MORT CELLULAIRE</b>	EMP1 FOSL2

Gènes surexprimés en rouge, gènes sous-exprimés en bleu.

**Tableau 4-3 :** Liste des gènes dont l'expression est modifiée d'au moins 2 fois après la suppression du gène DOK1.

FONCTION BIOLOGIQUE	GÈNES IMPLIQUÉS
<b>SIGNALISATION CELLULAIRE</b>	RASGEF1A, RRP22, RHOBTB1, RASEF, TNFRSF19, KITLG, SPRED1, SLIT2, PDE1A, GDF15, GPR30, BAI3, GPR126, WIF1, CENTD1, GRB14, RGS5, CSRP1, ZD52F10, GREM2, LRRN6C, MPP7, ARHGAP11A, S100A10, RARB, NR4A2, NFAT5, CRABP2, EMR1, ALCAM, RGS2, INHBA, FGF20, EDNRA, GCG, PTHLH, PAG1, FN1, SNX10, SNX5, MAP4K3, TGFBR2, MET, GLRB, COLEC12, RGS2, CXCL14, SOCS2, AHR, CCL2, DDR2, ADM, DDAH1, PPFIBP2, CAP2, IRS1, RASSF2, GNAL, PDE6B, NTS, DOK1, ARHGEF4, TIAM2, DKK1, DKK2, LPPR4, NUDT11, PTGER4, CAMK2G, JAK3, MME, TCF7L1, RKHD3, KIF13B, PTN, MDK, RHOH, PLCB4, TNFRSF14, SPG7, SNX3
<b>TRANSPORT</b>	KCND2, CYP1B1, SYT1, NUPL1, SLN, SLC20A2, SLC7A14, HCN1, SLC4A7, MTX2, SLB, COG6, SPG20, GLRB, ALB, ATP9A, COLEC12, SNX10, SNX5, PARP4 COL10A1, COX41, CYBRD1, CYP2U1, SLC16A9, SLC25A21, SLC40A1, XK, SEC14L4, OSBPL6, NBEA, RAB15, TRAM1L1, NUDT11, NFIA, NOS2A, SLC2A8, PLTP, RHOH, SNX3
<b>RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION</b>	TWISTNB, MYCBP, ELF1, EGR1, LMO4, PRDM13, SALL4, JUN, ZNF198, NFE2L2, MEF2C, FOXG1B, SALL1, LEF1, GABPB2, SAP18, ESX1L, HOXD9, HOXD8, HOXC13, TCF4, ID1, CITED1, ID4, CBF, RFXAP, SKIL, TAF15, PLAGL1, AHR, EGR4, RARB, NR4A2, NFAT5, CRABP2, CDK8, NARG1L, POLR1D RUNX2, FOXA1, FOXP1, FUBP3, HIVEP2, NR4A3, ZFP276, ZNF426, CREM, PAX9, DACH1, BBX, HES2, THRA, TLE2, ZNF219, HOXA2, HOXA7, PITX2, ZFH1B, MGC16385, TCF7L1, RKHD3, EIF4E2, RHOH, NFIA
<b>MÉTABOLISME DES PROTÉINES</b>	MRPS30, MID1, RPL21, PDE4DIP, HSPH1, KIFAP3, UBL3, CPE, EPHA7, DUSP23, PPM1K, PTPN2, ALG5, ADAMTSS, UBE3A, MIPEP, FBXO28, AKAP11, LNX2, RNF6, CAV2, CPEB4, SGK, CCL2, DDR2, PLK2, DPP4, NARG1L, MAP4K3, TGFBR2, MET ARL6IP, RPL13, FKBP9, SCAP2, CAPG, LOXL1, MYLK, STK40, PTPRH, B3GALT4, EDEM1, ADAM19, NPEPL1, HGF, USP9X, UCHL1, FBXO31, UBE2E2, PCGF5, TRIM2, MSRB2, CST3, PSMD5, PTEN, CAMK2G, JAK3, SPG7, C1S, MME, KIF13B, MME
<b>MÉTABOLISME</b>	GBE1, GK, D4ST1, GAD1, AQR, BASP1, IER2, OSR2, PSPC1, PHYHD1, PLAG1, GALNT14, ATP9A, FN1, CHST2, PAPSS2, DHRS2, DHRS4, SRR, GLDC, TYRP1, LTB4DH, EPHX2, DHRS6, DHRS7, ECHDC3, ENPP4, ATAD1, CSTF2T, NNMT, SNAI3, TCEAL5, ZCCHC14, ZFP36L1, SLC2A8, PLTP, BCAT1, PLCB4
<b>APOPTOSE</b>	AVEN, IER3, IFIH1, PERP, PHLDA1, SOCS2, MRPS30, TNFRSF19, INHBA, TNFRSF12A, SGK, PLAGL1, AHR, CCL2, GADD45A CASP7, TNFRSF14
<b>ADHÉSION CELLULAIRE</b>	HAPLN1, PCDH7, PCDH18, LSAMP, CDH10, CDH12, PCDH17, LAMA2, TGFBI, KITLG, EMR1, KITLG, ALCAM, FN1, CCL2, DDR2, TNFRSF12A COMP, FARP1, FLRT2, PKP3, CDH2, PCDHB2, PCDHB5, TRO, MFG8, CDH19, ROBO1, SPG7, CYR61
<b>CYCLE CELLULAIRE</b>	RGS2, CCND2, CDK8, CDK6, INHBA, GADD45A, PLAGL1, AHR DUSP6, KRAS, CEP2, CABLES1, MATK, CDKN1C, CGREF1, TGFB2, BCAT1, PTN, MDK, ANKRD15, PTEN
<b>CROISSANCE ET PROLIFÉRATION CELLULAIRE</b>	TGFBI, ISG20, KITLG, EDNRA, GCG, PTHLH, TGFBR2, MET, CDK6, EGR4, EMP1, PLS3, FGF20, SOCS2, EMP1, JPH3, KLHDC4, SYNE2, IGF1, CYR61, KAZALD1, TGFB2, TPD52L1, SKB1, PMP22, MATK, CDKN1C, CGREF1, PTN, MDK, BCAT1, TGFB2
<b>DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE</b>	BMP5, NDRG2, NRG1, INHBA, TNFRSF12A DAF, FCGRT, ANKRD15, PTGER4, C1S, TNFRSF14, KIF13B, RHOH
<b>DIVISION CELLULAIRE</b>	CCND2, CDK8, CDK6, CENPJ ROBO3, PPP1R9A, MDK
<b>RÉPLICATION ET RÉPARATION DE L'ADN</b>	GADD45A, PARP4 NFIA, NUDT1
<b>RÉPONSE INFLAMMATOIRE ET IMMUNITAIRE</b>	IFIT1, LAG3, PLK2, DPP4, COLEC12, PAG1, CCL2, CHST2, CXCL14, PARP4, CCL2 CABLES1, KAZALD1, NOS2A
<b>MIGRATION CELLULAIRE</b>	FN1, LAMA2, TNFRSF12A
<b>MORT CELLULAIRE</b>	PARP4, ALB, EMP1

Gènes surexprimés en rouge, gènes sous-exprimés en bleu.

#### 4.7.2 Analyse avec le logiciel IPA

Afin de poursuivre la recherche de la ou des fonctions du gène DOK1 dans le COE, les gènes dont l'expression a changé d'au moins 1,5 fois ont été examinés avec le logiciel IPA (figure 4-13). Ce logiciel a permis de faire ressortir les fonctions cellulaires les plus potentiellement influencées par les modulations d'expressions de ces gènes. Mais, tout d'abord, ces gènes ont été séparés en quatre groupes, soit les gènes surexprimés lors de la surexpression de DOK1, les gènes sous-exprimés lors de la surexpression de DOK1, les gènes surexprimés lors de la suppression de DOK1 et les gènes sous-exprimés lors de la suppression de DOK1.

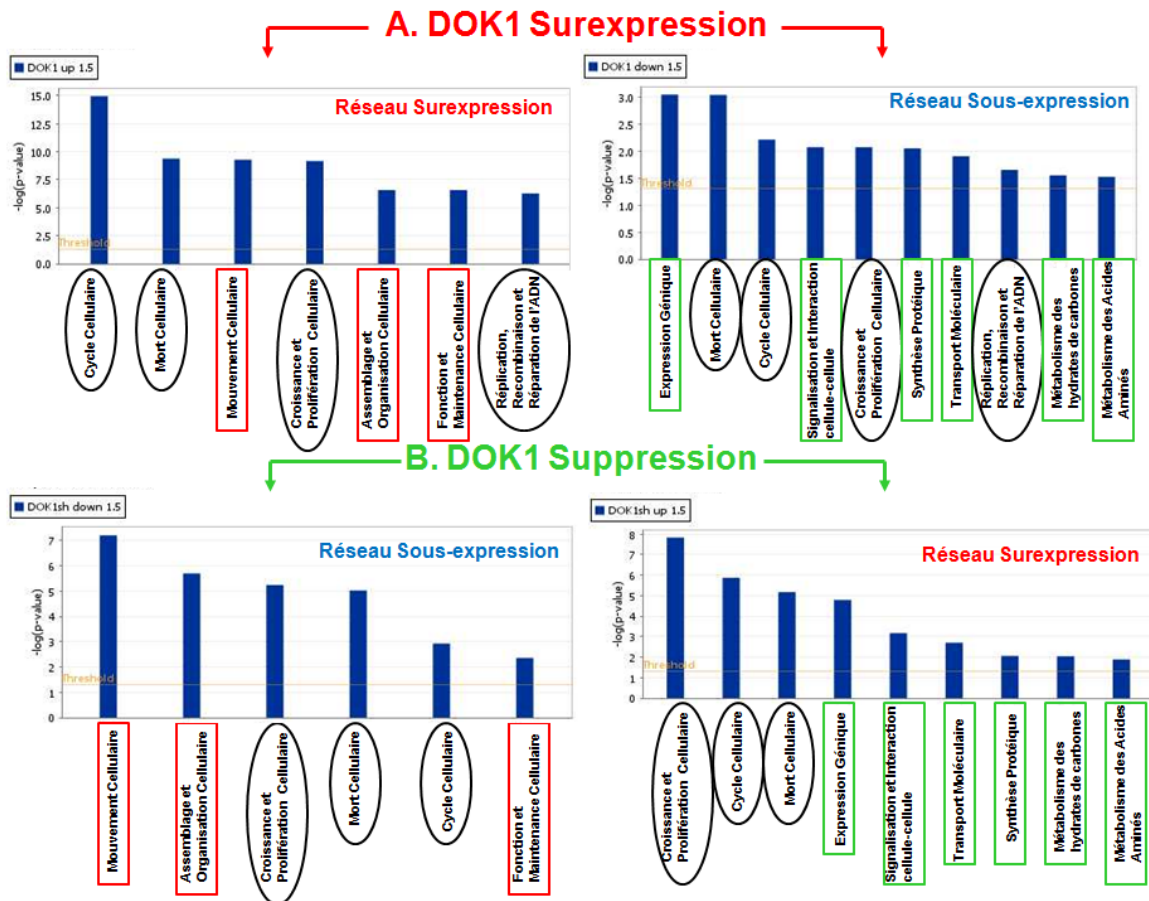
Premièrement, dans ces quatre situations, il y a une bonne modulation d'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire, le cycle cellulaire et la croissance et prolifération cellulaire. Il y a également une bonne modulation d'expression de gènes impliqués dans la réplication, recombinaison et réparation de l'ADN lors de la surexpression de DOK1 (figure 4-13 A).

Deuxièmement, la modulation génique en ce qui concerne le mouvement cellulaire, l'organisation et l'assemblage cellulaire, ainsi que le maintien de la fonction cellulaire sont autant retrouvées chez les gènes surexprimés lors de la surexpression de DOK1 que dans la situation inverse, c.-à-d., chez les gènes sous-exprimés lors de la suppression de DOK1.

Troisièmement, la modulation génique en ce qui concerne l'expression génique, la signalisation et les interactions cellule-cellule, la synthèse protéique, le transport moléculaire, le métabolisme des hydrates de carbones et le métabolisme des acides aminés



sont autant retrouvées chez les gènes sous-exprimés lors de la surexpression de DOK1 que dans le cas contraire, c.-à-d., chez les gènes surexprimés lors de la suppression de DOK1.



**Figure 4-13 :** Fonctions biologiques les plus touchées par les gènes dont l'expression a été modifiée de 1,5 fois.

**A.** Après la surexpression du gène DOK1. Impliquant les gènes surexprimés (à gauche). Impliquant les gènes sous-exprimés (à droite). **B.** Après la suppression du gène DOK1. Impliquant les gènes sous-exprimés (à gauche). Impliquant les gènes surexprimés (à droite).

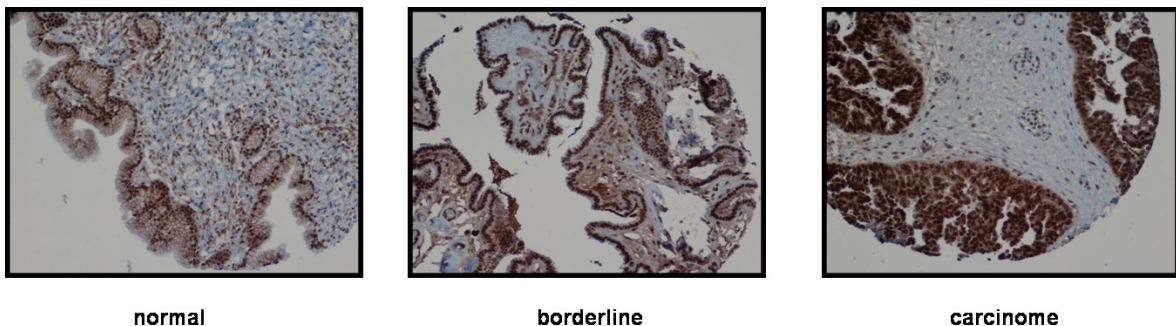
## 4.8 Évaluation de l'expression de DOK1 dans les tissus par Immunohistochimie

L'expression de la protéine DOK1 a été évaluée par une immunohistochimie sur 120 tissus ovariens provenant d'ovaires normaux, de tumeurs borderline et de carcinomes seropapillaires d'ovaire. L'intensité du signal a été évaluée et cotée à vue par le

pathologiste Bernard Têtu et les analyses statistiques ont été réalisées par le Dr Isabelle Bairati. Tout d'abord, à la vue des photos de l'IHC (figure 4-14), on distingue que dans le tissu ovarien normal, il y a une expression faible à moyenne de la protéine. Par contre, cette expression est de moyenne à forte dans les tumeurs borderline et forte dans les carcinomes seropapillaires de l'ovaire. Il y a donc une augmentation de l'expression de DOK1 dans les carcinomes seropapillaires ovariens. De plus, il est intéressant de remarqué la monocouche épithéliale relativement structurée dans le tissu normal ainsi que dans la tumeur borderline, tandis que dans le carcinome séropapillaire, il y a une accumulation de couches désordonnées.

D'un point de vue statistique (tableau 4-4), on distingue également une augmentation de l'expression de DOK1 dans les carcinomes seropapillaires ovariens. En effet, le tissu ovarien normal présente une intensité moyenne de signal de  $1,80 \pm 0,68$ , les tissus borderline présentent une intensité moyenne de  $1,94 \pm 0,91$  et les carcinomes présentent une intensité moyenne de  $2,31 \pm 0,84$ . L'intensité du signal est donc significativement plus haute dans les échantillons de carcinomes, comparativement aux échantillons normaux avec un intervalle de confiance  $p = 0.0115$ .

De plus, une analyse de survie Kaplan-Meier mettant en relief l'association de l'expression de DOK1 avec la progression du cancer de l'ovaire a été réalisée (figure 4-15). Cette analyse démontre que les tumeurs qui surexpriment le gène DOK1 ont eu un risque inférieur de progression que celles avec une basse expression ( $p = 0.0106$ ).



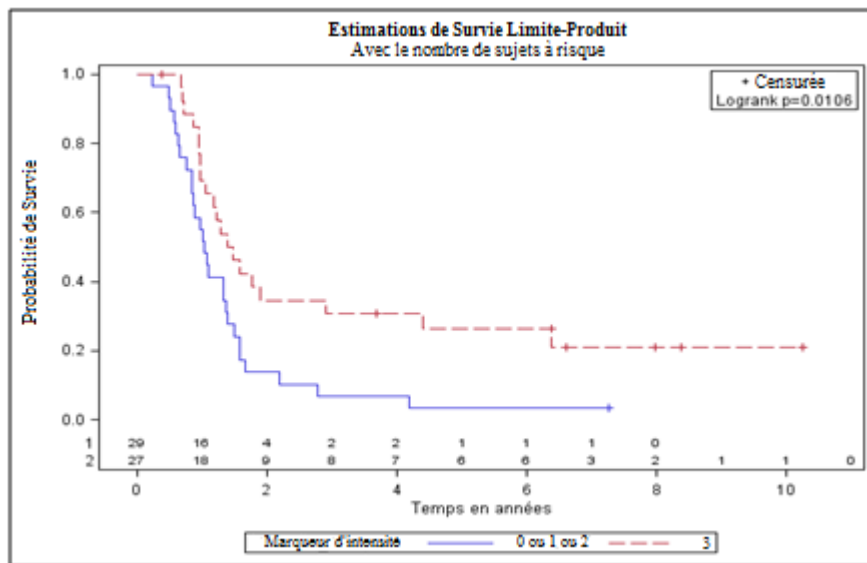
**Figure 4-14** : Analyse de l'expression de DOK1 par IHC dans des TMAs.

Comprend 120 échantillons d'origines normales, borderlines et de carcinomes seropapillaires de l'ovaire. (Grossissement 200X)

**Tableau 4-4 :** L'expression de DOK1 en fonction du type de tissu  
(basé sur l'intensité du signal suivant l'IHC)

Type de tissu	Moyenne $\pm$ Déviation standard*	Médiane
Carcinome (n=64)	2,31 $\pm$ 0,84	2,5
Borderline (n=20)	1,94 $\pm$ 0,91	2,0
Normal (n=36)	1,80 $\pm$ 0,68	2,0

\**p*-value globale (toutes données confondues) = 0.018



**Figure 4-15 :** Analyse de survie Kaplan-Meier – association de l'expression de DOK1 avec la progression de la maladie dans des patientes du COE (n = 58).

## 5 Discussion

Le cancer de l'ovaire compte que pour 4 % des cas de cancer chez la femme, mais constitue la principale cause de mort de source gynécologique. Une des raisons majeures qui explique ce phénomène est l'absence de symptôme précoce chez les femmes atteintes. Une maladie avancée, difficile à traiter et qui possède un taux de récurrence élevé est le plus souvent diagnostiquée à ces dernières. Il est donc nécessaire de trouver un moyen de détecter précocement le cancer ovarien afin d'augmenter la survie des patientes. C'est pourquoi la découverte de biomarqueurs offrirait une avenue intéressante pour réaliser cet objectif. En effet, la découverte d'un simple gène associé à l'initiation du cancer ovarien lors d'un test de dépistage permettrait un diagnostic précoce.

Parallèlement à ceci, les modifications épigénomiques de l'ADN sont impliquées dans le développement et la progression de cancers, dont le cancer ovarien. Une de celles-ci, la méthylation de la région promotrice de gènes, conduit à l'inhibition transcriptionnelle de ces gènes. Cette inactivation de promoteur cause souvent l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, un des éléments pathogéniques clés dans les cancers humains. De plus, la méthylation aberrante de l'ADN est reconnue comme étant un événement moléculaire précoce dans le développement du cancer. Ainsi, l'hyperméthylation spécifique au cancer pourrait servir d'indice pour découvrir de nouveaux suppresseurs de tumeurs et/ou des biomarqueurs.

Dans cet ordre d'idée, une analyse d'expression génique globale a été réalisée afin de découvrir des gènes qui seraient surexprimés après traitement avec un agent déméthylant, le 5-aza-dC. Cette analyse a permis de trouver 46 gènes potentiellement ciblés par une hyperméthylation après filtration. Seulement 7 de ces gènes ont été retenus puisqu'ils possèdent des fonctions pro-apoptotiques et de réponse aux bris de l'ADN, et certains ont

déjà été caractérisés comme potentiels suppresseurs de tumeurs. Par la suite, pour s'assurer que ces gènes étaient bel et bien surexprimés à la suite du traitement au 5-aza-dC, une RT-PCR a été effectuée et les résultats ont démontré une augmentation d'ARN messager après traitement, confirmant ainsi la réexpression de ces gènes. Ultiment, seul le gène DOK1 a été retenu pour poursuivre l'expérimentation puisque les résultats préliminaires étaient particulièrement intéressants dans son cas et qu'il a été démontré qu'il possédait un rôle de suppresseur de tumeurs dans la leucémie myéloïde chronique et dans le cancer des poumons (Niki, Di Cristofano et al. 2004; Berger, Niki et al. 2010).

L'analyse du statut de méthylation de DOK1 par MSP a permis de constater une plus grande méthylation de sa région promotrice dans la majorité des tumeurs et dans les lignées cellulaires du COE comparativement aux tissus ovariens normaux. Cette hyperméthylation a également été retrouvée dans l'analyse BSP. DOK1 n'ayant jamais été répertorié comme subissant une hyperméthylation dans aucun type de cancer, ceci démontre pour la première fois que ce gène subit une méthylation aberrante de sa région promotrice potentielle dans le cancer.

Ensuite, pour comprendre l'effet fonctionnel que pourrait avoir l'inactivation de DOK1 dans le cancer, son rôle dans plusieurs fonctions cellulaires a été étudié. Afin de réaliser cette étude, il a fallu moduler l'expression de DOK1. La lignée cellulaire TOV112 a été utilisée à cette fin. L'augmentation de l'expression a été accomplie par une transfection stable et la diminution de l'expression par un shARN. L'immunobuvardage a indiqué une petite différence d'expression de DOK1 dans les clones et, par la suite, une RT-PCR a clairement démontré la différence d'expression. De plus, une analyse par micropuces de l'ADN a chiffré les différences d'expression. Le clone pCMV-DOK1 affiche une augmentation d'expression de 5,78 fois et le clone shARN-DOK1 une diminution de 3,39 fois et ce, par rapport à leur contrôle correspondant.

Avec ces clones, il a été possible de procéder aux études fonctionnelles. La première fonction à l'étude a été la migration cellulaire. Avec un essai de réparation de blessure, il a été démontré que la surexpression de DOK1 permet un recouvrement légèrement moins rapide de la blessure et que la suppression de DOK1 permet un recouvrement légèrement plus rapide. Ce qui indique que l'expression de DOK1 serait reliée à une faible augmentation de la migration. Ce résultat est un peu inattendu, puisque ce gène a déjà été caractérisé comme suppresseur de tumeur dans d'autres cancers. Par contre, cette observation semble plutôt favoriser la progression du cancer, car une augmentation de la migration cellulaire est une étape importante dans la progression du cancer.

La deuxième fonction étudiée fut la formation de colonie. Encore là, l'expression de notre gène d'intérêt démontre un comportement contradictoire à son rôle potentiel de suppresseur de tumeur. En effet, la surexpression de DOK1 montre une augmentation de la quantité de colonies, alors que la suppression de DOK1 démontre une diminution du nombre de colonies.

La troisième fonction évaluée fut le cycle cellulaire. Ici, l'expression de DOK1 n'a pas amené de changement. À l'exception d'un léger retard dans le cycle pour la suppression de DOK1 par rapport à son contrôle. Ce retard est, cependant, le plus probablement dû à un plus grand pourcentage de cellules en phase S et un plus petit en G0/G1 pour le contrôle, ce qui lui confère une légère longueur d'avance pour progresser dans le cycle cellulaire. De plus, les deux ont, en même temps, récupéré leur état normal.

La dernière fonction observée fut la sensibilité aux drogues de chimiothérapie. En ce qui concerne la sensibilité des cellules dont l'expression de DOK1 est supprimée, une faible résistance au taxol et au cisplatine se fait sentir par rapport au contrôle et à la lignée cellulaire intacte, suggérant un lien entre DOK1 et la chimiorésistance. L'expression de DOK1 semble être associée à une augmentation de la sensibilité des cellules au cisplatine et

au taxol, donc à un rôle de suppresseur de tumeurs. Cependant, du côté des cellules surexprimant le gène, il n'y a aucune diminution de la résistance. Il se peut que la présence d'un certain niveau d'expression de DOK1 dans les contrôles ainsi que dans la lignée TOV112 soit suffisante pour maintenir la sensibilité. Par contre, avec la suppression de DOK1, l'expression est quasi nulle. À ce niveau, il se peut que DOK1 soit insuffisamment présent pour contrer la résistance.

Par la suite, pour mieux comprendre les résultats obtenus lors des études fonctionnelles quant au rôle de l'inhibition de DOK1 dans le cancer ovarien, les changements d'expression génique globale reliés à l'expression de ce gène ont été observés par micropuces de l'ADN. Tout d'abord, il semble qu'il y ait beaucoup de changements cellulaires puisque la liste des gènes sur- et sous-exprimés d'au moins deux fois met en évidence de gros changements dans la signalisation cellulaire, le transport, la régulation de la transcription et le métabolisme des protéines. De plus, il y a une implication d'un bon nombre de gènes dans l'apoptose, l'adhésion cellulaire, le cycle cellulaire, la croissance et la prolifération cellulaire, la réplication et réparation de l'ADN et dans la réponse inflammatoire et immunitaire, ainsi qu'une faible quantité de gènes modifiés dans la migration cellulaire, la différenciation cellulaire, la division cellulaire et la mort cellulaire. Toutes des fonctions souvent altérées dans un événement cancéreux.

Pour ce qui est de l'analyse avec le logiciel IPA, une grande modulation génique est visible dans la mort cellulaire, le cycle cellulaire et la croissance et la prolifération cellulaire lors de la modulation de l'expression de DOK1 chez tous les gènes modulés et une petite modulation génique dans la réplication, recombinaison et réparation de l'ADN chez les gènes modulés lors de la surexpression de DOK1. Une grande modulation génique est visible dans le mouvement cellulaire, l'organisation et l'assemblage cellulaire, ainsi que le maintien de la fonction cellulaire chez les gènes surexprimés lors de la surexpression de DOK1 et chez les gènes sous-exprimés lors de la suppression de DOK1. Une grande modulation génique est également visible dans l'expression génique, la signalisation et les

interactions cellule-cellule, la synthèse protéique, le transport moléculaire, le métabolisme des hydrates de carbones et le métabolisme des acides aminés chez les gènes sous-exprimés lors de la surexpression de DOK et chez les gènes surexprimés lors de la suppression de DOK1. Bref, ils reflètent les observations obtenues avec l'analyse préliminaire. Ces observations démontrent une implication potentielle de DOK1 sur une ou plusieurs de ces fonctions où l'expression d'un grand nombre de gènes est modifiée. Cependant, rien ne permet de déterminer avec exactitude si DOK1 possède une grande influence sur une de ces fonctions. De plus, il est difficile de déterminer si ces changements associent DOK1 à un rôle de suppresseur de tumeurs puisque les gènes modifiés peuvent aussi bien posséder des influences pro qu'anti-cancer. Il est probable que DOK1 puisse démontrer plus fortement ses implications fonctionnelles dans le COE, quand il est combiné avec les autres membres de la famille DOK, telles que démontrées dans le cancer des poumons (Berger, Niki et al. 2010).

Finalement, l'expression de DOK1 dans les tissus ovariens normaux, les tumeurs borderline et les carcinomes séropapillaires de l'ovaire a été regardée. Les résultats sont un peu surprenants. Il y a une bonne expression dans l'ensemble des tissus, à l'exception du tissu normal où l'expression est plus faible. Les carcinomes possèdent une expression de DOK1 significativement plus élevée que les tissus normaux. Ce qui indique que l'expression de DOK1 est augmentée dans le cancer ovarien et que cette modification se produirait potentiellement de façon précoce dans la tumorigenèse ovarienne. En plus, une analyse de survie Kaplan-Meier associant l'expression de DOK1 à la progression du cancer de l'ovaire a démontré que les tumeurs qui surexpriment DOK1 ont un risque inférieur de progression de la maladie que celles avec une basse expression. Cette observation nous amène à penser que DOK1 pourrait avoir un rôle de suppresseur de tumeurs dans le COE.

L'expression de DOK1 est donc augmentée dans le cancer ovarien. Ce qui implique que l'hyperméthylation retrouvée dans la région promotrice potentielle ne semble pas inactiver l'expression de ce gène. Étant donné la grandeur de l'îlot CpG présent sur la région



promotrice, il se peut que la section analysée par MSP et BSP ne corresponde pas au site exact de promotion de ce gène.

## 6 Conclusion

Cette étude avait pour but de trouver des gènes suppresseurs de tumeurs dont l'expression dans le COE est inhibée par une hyperméthylation de leur région promotrice. Par une recherche épigénomique sur quatre lignées cellulaires du cancer ovarien en utilisant l'agent déméthylant 5-aza-dC, 7 gènes ont été identifiés comme des cibles potentielles d'hyperméthylation dans le cancer ovarien. Ceux-ci ont démontré des fonctions pro-apoptotiques et de réponse aux bris de l'ADN et certains ont même déjà été caractérisés comme potentiel suppresseur de tumeurs. Leur expression différentielle a été confirmée par une RT-PCR, mais seulement DOK1 a été retenu pour études ultérieures parce qu'il est un suppresseur de tumeurs dans le cancer des poumons et dans la leucémie myéloïde chronique.

Une plus forte méthylation de la région promotrice potentielle de DOK1 a été retrouvée par une analyse MSP dans les tumeurs ovariennes et dans les lignées cellulaires du COE, comparativement au tissu ovarien normal. Cette altération du statut de méthylation de DOK1 a également été confirmée par une analyse BSP. Ces données montrent pour la première fois que ce suppresseur de tumeur est potentiellement supprimé par un mécanisme épigénétique (hyperméthylation) dans le cancer.

Subséquent, différentes études fonctionnelles ont démontré une légère influence de DOK1 sur la migration, la prolifération, la formation de colonies et sur la résistance au cisplatine et au taxol. En effet, la suppression de l'expression de DOK1 est associée à une faible diminution de ces fonctions. De plus, la diminution de l'expression de DOK1 semble reliée à la chimiorésistance. Par contre, aucune influence n'a été observée dans le cycle cellulaire. Malgré tout, étant donné que les différentes influences sont très minimes, il se peut que la participation d'autres membres de la famille DOK influence l'implication fonctionnelle de DOK1 (Berger, Niki et al. 2010). Des études supplémentaires (vérifier

l'effet fonctionnel d'une double modulation d'expression de DOK1 et de DOK2 dans le COE) devront donc être réalisées pour les confirmer ou les infirmer.

L'ensemble des données recueillies lors de l'analyse des clones par micropuces de l'ADN a démontré une modulation génique dans la mort cellulaire, dans la croissance et la prolifération cellulaire, dans le cycle cellulaire et dans la réplication, recombinaison et réparation de l'ADN. De plus, il y a une augmentation d'expression génique importante dans l'organisation et le maintien des fonctions cellulaires lors de l'augmentation d'expression de DOK1 et une diminution d'expression génique importante dans les interactions cellule-cellule, dans la synthèse protéique et le métabolisme des acides aminés lors de la diminution de l'expression de DOK1. Par contre, ces données ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer le rôle de suppresseur de tumeur de DOK1 dans le cancer ovarien épithéliale.

L'immunohistochimie a démontré une expression d'une intensité moyenne de  $2,31 \pm 0,84$  de DOK1 dans les carcinomes séropapillaires ovariens, une de  $1,94 \pm 0,91$  dans les tumeurs borderline et une de  $1,80 \pm 0,68$  dans le tissu ovarien normal. Les carcinomes ont donc une intensité moyenne d'expression significativement plus haute ( $p = 0.0115$ ) que les tissus normaux. De plus, une analyse de survie Kaplan-Meier (association de l'expression de DOK1 avec la progression du COE) a démontré que les tumeurs qui surexpriment le gène DOK1 ont un risque inférieur de progression que celles avec une basse expression. Ces données pointent vers un rôle de suppresseur de tumeur potentiel du gène DOK1 dans le cancer ovarien.

Finalement, les conclusions de cette étude démontrent que la région promotrice potentielle du gène DOK1 se retrouve hyperméthylée dans le cancer ovarien. De ce fait, une inactivation devrait se produire et lui conférer un rôle potentiel de suppresseur de tumeur dans le cancer ovarien. D'ailleurs, DOK1 est déjà considéré comme suppresseur de tumeur

dans la leucémie myéloïde chronique et dans le cancer des poumons (Niki, Di Cristofano et al. 2004; Berger, Niki et al. 2010). Par contre, les impacts de la modulation d'expression de DOK1 retrouvés lors des études fonctionnelles sont contradictoires à ce qu'on s'attend d'un suppresseur de tumeur. En plus, l'expression de DOK1 dans les carcinomes est augmentée. Il faut cependant considérer que les effets de l'inactivation de DOK1 sont évalués dans une lignée cellulaire du COE et non dans des tumeurs. De plus, l'analyse de survie Kaplan-Meier a indiqué un effet positif de l'augmentation de l'expression de DOK1 sur la survie des patientes. Il faut également prendre en considération que la plupart des données indicatives sur le rôle de DOK1 comme suppresseur de tumeur proviennent d'études sur différentes formes de leucémies. De plus, comme montrée très récemment dans les tumeurs solides (cancer du poumon), l'influence d'autres membres de la famille DOK, plus particulièrement DOK2, peut être plus déterminante dans les mécanismes d'initiation et de progression de la cancérogenèse (Berger, Niki et al. 2010). Des études futures seront donc nécessaires pour déterminer plus précisément l'implication fonctionnelle de DOK1 et des autres membres de la famille DOK dans le COE.

## Bibliographie

- Ahmed, N., E. W. Thompson, et al. (2007). "Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm." *J Cell Physiol* **213**(3): 581-8.
- Auersperg, N., T. Ota, et al. (2002). "Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches." *Int J Gynecol Cancer* **12**(6): 691-703.
- Auersperg, N., A. S. Wong, et al. (2001). "Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology." *Endocr Rev* **22**(2): 255-88.
- Balch, C., F. Fang, et al. (2009). "Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer." *Endocrinology* **150**(9): 4003-11.
- Barton, C. A., N. F. Hacker, et al. (2008). "DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment." *Gynecol Oncol* **109**(1): 129-39.
- Basile, V., R. Mantovani, et al. (2006). "DNA damage promotes histone deacetylase 4 nuclear localization and repression of G2/M promoters, via p53 C-terminal lysines." *J Biol Chem* **281**(4): 2347-57.
- Berger, A. H., M. Niki, et al. (2010). "Identification of DOK genes as lung tumor suppressors." *Nat Genet* **42**(3): 216-23.
- Bonifer, C. and D. T. Bowen (2010). "Epigenetic mechanisms regulating normal and malignant haematopoiesis: new therapeutic targets for clinical medicine." *Expert Rev Mol Med* **12**: e6.
- Boulay, I., J. G. Nemorin, et al. (2005). "Phosphotyrosine binding-mediated oligomerization of downstream of tyrosine kinase (Dok)-1 and Dok-2 is involved in CD2-induced Dok phosphorylation." *J Immunol* **175**(7): 4483-9.
- Colombo, N., T. Van Gorp, et al. (2006). "Ovarian cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* **60**(2): 159-79.
- Comité directeur de la Société canadienne du cancer. (2009). "Statistiques canadiennes sur le cancer 2009." from [www.cancer.ca](http://www.cancer.ca).
- Das, P. M. and R. Singal (2004). "DNA methylation and cancer." *J Clin Oncol* **22**(22): 4632-42.
- Di Cristofano, A., M. Niki, et al. (2001). "p62(dok), a negative regulator of Ras and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, opposes leukemogenesis by p210(bcr-abl)." *J Exp Med* **194**(3): 275-84.
- Eltabbakh, G. H. and C. S. Awtrey (2001). "Current treatment for ovarian cancer." *Expert Opin Pharmacother* **2**(1): 109-24.
- Esteller, M. (2007). "Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome." *Hum Mol Genet* **16 Spec No 1**: R50-9.
- Fader, A. N. and P. G. Rose (2007). "Role of surgery in ovarian carcinoma." *J Clin Oncol* **25**(20): 2873-83.
- Gal-Yam, E. N., Y. Saito, et al. (2008). "Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy." *Annu Rev Med* **59**: 267-80.
- Gronbaek, K., C. Hother, et al. (2007). "Epigenetic changes in cancer." *APMIS* **115**(10): 1039-59.

- Guil, S. and M. Esteller (2009). "DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(1): 87-95.
- Guppy, A. E., P. D. Nathan, et al. (2005). "Epithelial ovarian cancer: a review of current management." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **17**(6): 399-411.
- Hellebrekers, D. M., A. W. Griffioen, et al. (2007). "Dual targeting of epigenetic therapy in cancer." *Biochim Biophys Acta* **1775**(1): 76-91.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." *N Engl J Med* **349**(21): 2042-54.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2009). "Cancer statistics, 2009." *CA Cancer J Clin* **59**(4): 225-49.
- Katabuchi, H. and H. Okamura (2003). "Cell biology of human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinogenesis." *Med Electron Microsc* **36**(2): 74-86.
- Kim, M. S., S. S. Kim, et al. (2003). "Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4." *J Biol Chem* **278**(52): 52071-4.
- Kristensen, L. S., H. M. Nielsen, et al. (2009). "Epigenetics and cancer treatment." *Eur J Pharmacol* **625**(1-3): 131-42.
- Kwak, H. I., T. Gustafson, et al. (2007). "Inhibition of breast cancer growth and invasion by single-minded 2s." *Carcinogenesis* **28**(2): 259-66.
- Lamkin, T. J., V. Chin, et al. (2006). "All-trans retinoic acid induces p62DOK1 and p56DOK2 expression which enhances induced differentiation and G0 arrest of HL-60 leukemia cells." *Am J Hematol* **81**(8): 603-15.
- Lee, S., H. Huang, et al. (2007). "Dok1 expression and mutation in Burkitt's lymphoma cell lines." *Cancer Lett* **245**(1-2): 44-50.
- Liu, J., Q. Guo, et al. (2006). "Cathepsin B and its interacting proteins, bikunin and TSR1, correlate with TNF-induced apoptosis of ovarian cancer cells OV-90." *FEBS Lett* **580**(1): 245-50.
- Mai, A. and L. Altucci (2009). "Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(1): 199-213.
- Marieb E.N. (2005). "Anatomie et physiologie humaine, troisième édition." *ERPI(Québec)*: 1111-1128.
- Markman, M. (2008). "Pharmaceutical management of ovarian cancer : current status." *Drugs* **68**(6): 771-89.
- Mashima, R., Y. Hishida, et al. (2009). "The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling." *Immunol Rev* **232**(1): 273-85.
- Moore, R. G., S. MacLaughlan, et al. (2010). "Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **116**(2): 240-5.
- Niki, M., A. Di Cristofano, et al. (2004). "Role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression." *J Exp Med* **200**(12): 1689-95.
- Niu, Y., F. Roy, et al. (2006). "A nuclear export signal and phosphorylation regulate Dok1 subcellular localization and functions." *Mol Cell Biol* **26**(11): 4288-301.
- Okamura, H. and H. Katabuchi (2001). "Detailed morphology of human ovarian surface epithelium focusing on its metaplastic and neoplastic capability." *Ital J Anat Embryol* **106**(2 Suppl 2): 263-76.
- Ozols, R. F. (2002). "Update on the management of ovarian cancer." *Cancer J* **8 Suppl 1**: S22-30.
- Sedlak, T. W. and S. H. Snyder (2006). "Messenger molecules and cell death: therapeutic implications." *JAMA* **295**(1): 81-9.

- Sharma, R., J. A. Kramer, et al. (1997). "Lysyl oxidase, cellular senescence and tumor suppression." Biosci Rep **17**(4): 409-14.
- Sharma, S., T. K. Kelly, et al. (2010). "Epigenetics in cancer." Carcinogenesis **31**(1): 27-36.
- Smith, L. H., C. R. Morris, et al. (2005). "Ovarian cancer: can we make the clinical diagnosis earlier?" Cancer **104**(7): 1398-407.
- Sundfeldt, K. (2003). "Cell-cell adhesion in the normal ovary and ovarian tumors of epithelial origin; an exception to the rule." Mol Cell Endocrinol **202**(1-2): 89-96.
- Szyf, M. (2006). "Targeting DNA methylation in cancer." Bull Cancer **93**(9): 961-72.
- Szyf, M. (2009). "Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs." Annu Rev Pharmacol Toxicol **49**: 243-63.
- Tortora G.J., P. J. C. (1993). "Principes d'anatomie et de physiologie humaine, nouvelle édition." CEC collégial et universitaire(Montreal): 999-1017.
- Watson, P. H., S. K. Chia, et al. (2003). "Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma." Br J Cancer **88**(7): 1065-70.
- Yasuda, T., M. Shirakata, et al. (2004). "Role of Dok-1 and Dok-2 in myeloid homeostasis and suppression of leukemia." J Exp Med **200**(12): 1681-7.
- Zhang, F., G. Fu, et al. (2009). "Detection of homo- or hetero-association of Doks by fluorescence resonance energy transfer in living cells." Mol Imaging Biol **11**(3): 188-94.