

In compliance with the  
Canadian Privacy Legislation  
some supporting forms  
may have been removed from  
this dissertation.

While these forms may be included  
in the document page count,  
their removal does not represent  
any loss of content from the dissertation.

**Université de Sherbrooke**

**Anticorps monovalents modifiés anti-CA 125: nouveaux  
inhibiteurs de l'antigène tumoral CA 125**

par

**Julie Beaudin**

Département de microbiologie et d'infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

maître *ès sciences* (M.Sc.) en microbiologie

Juin 2003



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*ISBN: 0-612-86629-7*

*Our file* *Notre référence*

*ISBN: 0-612-86629-7*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

**Canada**

# TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	II
Liste des figures.....	VI
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des abréviations.....	IX
Résumé.....	XIII
Introduction.....	1
1. Cancer ovarien épithélial.....	1
1.1 Cancer ovarien épithélial séreux.....	3
1.2 Cancer ovarien épithélial mucineux.....	5
1.3 Autres types importants de cancers épithéliaux de l'ovaire.....	5
2. Propriétés des cellules cancéreuses.....	6
2.1 Cascade métastatique.....	6
2.2 Adhésion.....	9
2.3 Résistance à l'apoptose.....	11
3. Mucines.....	11
3.1 MUC 1.....	13
3.2 MUC 4.....	15
3.3 Autres mucines.....	17
4. CA 125.....	19
4.1 Historique.....	19



4.2	Importance clinique.....	20
4.3	Propriétés.....	21
4.4	Séquence de CA 125.....	24
4.5	Rôles possibles.....	27
5.	Méthodes employées pour étudier les protéines.....	28
5.1	Antisens.....	29
5.2	Ribozyme.....	29
5.3	ARN interférence.....	30
5.4	Ajout de fonction.....	30
5.5	ScFv.....	31
5.5.1	Exemples d'utilisation des scFvs.....	32
5.6	Autres méthodes protéiques.....	34
6.	Hypothèse et objectifs.....	35
	Matériels et méthodes.....	37
7.	Hybridomes et anticorps.....	37
8.	Isolation de l'ARNm.....	40
9.	Synthèse d'ADNc.....	41
10.	Amplification par PCR.....	42
11.	Réaction d'assemblage.....	43
12.	Clonage.....	44
12.1	Description des plasmides.....	45
13.	<i>Colony lift assay</i> .....	47
14.	Extraits périsplasmiques.....	49
15.	ELISA.....	49

16.	Gel SDS et immunobuvardage.....	51
17.	Culture cellulaire.....	52
17.1	Lignées cellulaires et réactifs.....	52
17.2	Transfection cellulaire transitoire.....	53
17.3	Transfection cellulaire stable.....	53
17.4	Lyse cellulaire.....	54
18.	Immunoprécipitation.....	55
19.	Immunofluorescence indirecte sur lame.....	55
20.	Cytométrie de flux.....	56
20.1	Analyse du cycle cellulaire.....	57
21.	Essai XTT.....	58
22.	Essai de clonogénicité.....	59
23.	Essai <i>in vivo</i> .....	59
24.	Essai d'agrégation cellulaire.....	60
	Résultats.....	61
25.	Construction de deux bibliothèques de scFvs.....	61
26.	Validation de l'expression et de la liaison à CA 125 de scFvs solubles dans un système procaryote.....	65
27.	Validation des scFvs dans un système eucaryote transitoire.....	70
28.	Validation de l'expression des scFvs dans un système eucaryote stable.....	78
29.	Prolifération cellulaire.....	87
30.	Sensibilité aux drogues chimiothérapeutiques.....	88
31.	Essai de clonogénicité.....	91
32.	Cycle cellulaire.....	96

33.	Interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire.....	98
34.	Prolifération et interactions cellulaires (essai <i>in vivo</i> ).....	100
	Discussion.....	101
35.	Construction et validation de deux librairies de scFvs dirigées contre l'antigène CA 125 dans un système procaryote.....	102
36.	Validation des librairies de scFvs dirigées contre l'antigène CA 125 dans deux systèmes eucaryotes.....	108
37.	Conséquences de l'inhibition de CA 125 à la surface cellulaire.....	115
	Conclusion.....	125
	Remerciements.....	128
	Bibliographie.....	129

## LISTE DES FIGURES

1.	Cascade métastatique.....	7
2.	Unité répétitive de CA 125.....	25
3.	Structure proposée de CA 125.....	26
4.	Structure d'un scFv.....	31
5.	Étapes nécessaires pour la construction d'une librairie de scFvs.....	62
6.	Production des librairies de $V_H$ et de $V_L$ .....	63
7.	Production de la librairie de scFvs.....	63
8.	Validation de la construction de la librairie de scFvs.....	64
9.	Vecteur d'expression procaryote pCantab-5E.....	64
10.	Expression des scFvs à partir du vecteur d'expression procaryote pCantab-5E par ELISA.....	66
11.	Expression des scFvs à partir du vecteur d'expression procaryote pCantab-5E par immunobuvardage.....	66
12.	Liaison des scFvs VK-8 # 1:9 et OC125 # 3:11 à CA 125 par ELISA.....	68
13.	Séquences en acides aminés des scFvs VK-8 # 1:9 et # 4:5 et du scFv OC125 # 3:11.. .....	69
14.	Expression des scFvs dans un système eucaryote transitoire.....	71
15.	Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation des scFvs avec CA 125.....	73
16.	Localisation intracellulaire des scFvs dans les cellules NIH OVCAR-3 par immunofluorescence indirecte sur lame.....	74

17.	Expression transitoire des scFvs et de CA 125 à la surface cellulaire déterminée par immunofluorescence indirecte sur lame dans les cellules NIH OVCAR-3.....	76
18.	Expression des scFvs dans un système eucaryote stable.....	78
19.	Expression des scFvs et de CA 125 à la surface cellulaire dans les transfectants stables dérivés des cellules NIH OVCAR-3.....	80
20.	Expression des scFvs et de CA 125 analysée par cytométrie de flux.....	83
21.	Expression des scFvs et de la E-Cadhérine à la surface cellulaire.....	85
22.	Expression des scFvs et de l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ à la surface cellulaire.....	86
23.	Mesure de la prolifération cellulaire par essai XTT.....	87
24.	Sensibilité des transfectants au cisplatine.....	89
25.	Sensibilité des transfectants au taxol.....	90
26.	Quantité de foyers formés par essai de clonogénicité.....	92
27.	Essai de clonogénicité.....	93
28.	Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux.....	97
29.	Formation de sphéroïdes par agrégation cellulaire.....	99
30.	Croissance de tumeurs sous-cutanées dans des souris <i>Nude</i> CD-1.....	100

## LISTE DES TABLEAUX

1.	Stades de développement des cancers ovariens épithéliaux séreux.....	4
2.	Anticorps primaires utilisés.....	38
3.	Anticorps secondaires utilisés.....	39
4.	Concentration de cisplatine nécessaire pour causer la mort de 50 % des cellules (Ic50).....	90
5.	Concentration de taxol nécessaire pour causer la mort de 50 % des cellules (Ic50)...	91

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AEBSF	4-(2-aminoéthyl) benzènesulfonyl fluoride hydrochloride
AG	ampicilline, glucose
AI	ampicilline, IPTG
AMOP	<i>adhesion-associated domain in MUC 4 and other protein</i>
APC	<i>adenomatous poliposis coli</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATG	adénine, tyrosine, guanine
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSD	<i>blasticidin daminase</i>
CA 125	<i>cancer antigen 125</i>
cm	centimètre
CMV	cytomégalovirus
DMEM	<i>dubelcco's modified eagle's medium</i>
Do	densité optique
Dox	doxycycline

EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>
Fw	<i>framework</i>
g	gramme
GDPH	glycine, asparagine, proline, histidine
gp	glycoprotéine
Gly	glycine
h	heure
HBOC	<i>hereditary breast-ovarian cancer</i>
HLGP	<i>hypothetical luminal glycoprotein</i>
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal syndrome</i>
HRP	<i>horse radish peroxydase</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IGF	<i>insulin growth factor</i>
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KDEL	lysine, aspartate, glutamine, leucine
lac	lactose
LH	<i>luteinizing hormone</i>
l	litre



LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	molaire
min	minute
mg	milligramme
ml	millilitre
mM	millimolaire
MMP	<i>matrix metalloprotease</i>
MUC	mucine
NK	<i>natural killer</i>
ng	nanogramme
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
OC125	<i>ovarian cancer 125</i>
OSE	<i>ovarian surface epithelium</i>
pb	paire de base
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEM	<i>polymorphic epithelial mucin</i>
PMS	phénazine méthosulfate
poly A	polyribose A
PUM	<i>peanut-lectin binding urinary mucin</i>
RE	réticulum endoplasmique
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RPMI	<i>roswell park memorial institute medium</i>
rtTA	site transactivateur

%	pourcentage
scFv	<i>single-chain fragment variable</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEA	<i>sperm protein, enterokinase and agrin</i>
SEC	sécrété
Ser	sérine
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC	<i>sialomucin complex</i>
TGF- $\alpha$	<i>transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TMB	tétraméthyl-benzidine
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
U	unité
$\mu$	micron
$\mu$ g	microgramme
$\mu$ l	microlitre
$\mu$ M	micromolaire
uPA	<i>urokinase plasminogen activator</i>
V	volt
V <sub>H</sub>	<i>variable heavy chain</i>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
V <sub>L</sub>	<i>variable light chain</i>
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
x g	force centrifuge

## RÉSUMÉ

La mortalité associée au cancer ovarien est un problème de santé important chez les femmes. Malgré une réponse aux traitements de chimiothérapie qui atteint les 70 %, la plupart des patientes rechutent et meurent éventuellement de cette maladie. Dans ce contexte, une meilleure connaissance de la biologie du cancer ovarien procurera de l'information utile pouvant être utilisée pour traiter cette maladie.

CA 125 est un déterminant antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal OC125. Une surexpression de la glycoprotéine CA 125 au niveau de la surface des ovaires est observée dans plus de 90 % des cancers ovariens séreux, mais n'est pas détectable dans les tissus ovariens normaux. Il s'agit d'une glycoprotéine, membre de la famille des mucines ayant un poids moléculaire supérieur à 200 kDa. Malgré des recherches intensives, la fonction de cet antigène tumoral demeure inconnue à cause de difficultés à isoler et à cloner les séquences codantes.

Dans l'optique d'étudier CA 125 et ses rôles possibles dans le développement du cancer ovarien, nous avons généré les premiers inhibiteurs de CA 125. Ces inhibiteurs consistent en des anticorps monovalents modifiés (scFv) dérivés des anticorps monoclonaux OC125 et VK-8 qui sont spécifiques à CA 125 et qui reconnaissent deux épitopes différents. Les bibliothèques de scFvs ont été criblées par ELISA pour la liaison à CA 125. Un scFv dérivant de chacune des bibliothèques, OC125 # 3:11 et VK-8 # 1:9, a été sélectionné pour la suite de l'étude. Ces scFvs ont ensuite été sous-clonés dans des vecteurs d'expression eucaryotes en les

ciblant au réticulum endoplasmique et au trans-médian Golgi. Des études d'immunofluorescence ont confirmé la localisation cellulaire des scFvs dans les bons organelles. Des résultats de co-immunoprécipitation ont confirmé la liaison *in vitro* du scFv OC125 # 3:11 ciblé au RE et au Golgi et du scFv VK-8 # 1:9 ciblé au RE à CA 125. Des études par co-immunofluorescence sur des cellules NIH OVCAR-3 (cellules surexprimant CA 125) qui expriment les scFvs, ont permis d'observer une diminution de CA 125 à la surface des cellules. Cette diminution de CA 125 à la surface cellulaire a aussi été confirmée par cytométrie de flux, validant encore plus leur potentiel d'inhibiteurs de CA 125. Dans les cellules où l'expression de surface de CA 125 est inhibée, on observe une augmentation de la prolifération cellulaire validée par essai XTT, essai de sensibilité au cisplatine, essai de clonogénicité et analyse du cycle cellulaire. En plus, la diminution de l'expression de surface de CA 125 entraîne une relocalisation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ , prévient la formation de sphéroïdes dans un essai d'agrégation cellulaire et provoque une diminution marquée de la formation de tumeurs *in vivo*. Nos résultats suggèrent donc que CA 125 joue un rôle au niveau des interactions cellule-cellule et/ou cellule-matrice extracellulaire et au niveau de la progression du cycle cellulaire. Finalement, ces résultats nous confirment que ces nouveaux inhibiteurs de CA 125 représentent des outils uniques et inestimables pour séquestrer et inhiber cette protéine dans les cellules. De plus, ils nous permettront d'étudier la fonction de CA 125 dans le cancer ovarien.

# INTRODUCTION

## 1. Cancer ovarien épithélial

Les cancers ovariens épithéliaux sont les plus répandus et les plus létaux de tous les cancers gynécologiques au Canada et aux États-Unis (Ozols et al., 2000). Au Canada, en 2002, près de 2500 nouveaux cas ont été diagnostiqués et près de 1500 femmes en sont décédées (Société Canadienne du Cancer, 2003). Aux États-Unis, l'*American Cancer Society* estime qu'en 2003, 25 400 nouveaux cas de cancers ovariens seront diagnostiqués et que 14 300 femmes en mourront (American Cancer Society, 2003). Le cancer ovarien est la cinquième cause de cancer en importance chez les femmes. Ce cancer n'est pas fréquent chez les femmes de moins de 40 ans, ensuite la probabilité augmente chez les femmes entre 40 et 44 ans, pour atteindre un maximum chez les femmes entre 70 et 74 ans. L'âge moyen du diagnostic est de 63 ans. Lorsque les femmes se font traiter pour un cancer ovarien épithélial, le pourcentage de survie après cinq ans est de 70 % pour les femmes âgées de moins de 45 ans, comparativement à 20 % pour les femmes de plus de 75 ans (Ozols et al., 2000). De plus, le pourcentage de survie après cinq ans est de 95 % pour les cancers diagnostiqués à un stade précoce (stade I ou II), alors qu'il est de 25 % pour les diagnostics à des stades avancés (stade III ou IV). Malheureusement, 75 % des cancers ovariens épithéliaux sont diagnostiqués à des stades avancés, en partie dû à l'absence de symptômes précoces au cours de la maladie et à l'absence de tests diagnostiques sensibles et spécifiques pour une détection précoce (Schummer et al., 1999). Lorsque le cancer ovarien est détecté

tardivement, il y a invasion et étalement des cellules cancéreuses dans des sites extra-ovariens, comme dans l'endomètre, le péritoine, le foie, autour de l'intestin et sous le diaphragme.

Des études épidémiologiques ont démontré que des facteurs endocrines, environnementaux et génétiques sont importants dans la carcinogenèse du cancer ovarien. Entre autres, les grossesses et l'utilisation de contraceptifs oraux diminuent le risque de cancer ovarien de 30 à 60 % comparativement à des femmes qui n'ont pas eu d'enfants ou qui n'utilisent pas de contraceptifs oraux. C'est dans les pays industrialisés de l'Ouest qu'on retrouve la plus haute incidence du cancer ovarien épithélial, tandis qu'on remarque la plus faible incidence au Japon. Il est estimé que 10 % de tous les cancers ovariens épithéliaux résultent de prédisposition génétique. Deux syndromes cliniques sont associés aux cancers ovariens héréditaires. Le syndrome de cancer ovarien-sein héréditaire (HBOC, *hereditary breast-ovarian cancer*) est reconnu dans 85 à 90 % des cas de cancers héréditaires et la majorité des cas sont associés à des mutations dans le locus BRCA1 (Ozols et al., 2000). BRCA1 est un gène suppresseur de tumeur qui agit comme régulateur négatif de la croissance tumorale. Lorsqu'une femme hérite d'un allèle mutant de BRCA1, qui prédispose au cancer, il y a perte de l'inactivation de l'allèle sauvage, ce qui résulte en une non-régulation de la croissance cellulaire et la progression vers un phénotype malin (Ozols et al., 2000). Le risque des femmes de développer un cancer ovarien au cours de leur vie est de 28 % et ce chiffre grimpe à 44 % lorsque ces femmes ont une mutation dans le gène BRCA1 (Ozols et al., 2000). Le second syndrome, le HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal syndrome*), est caractérisé par une prédisposition à un cancer colorectal site-spécifique avec, entre autres, une prédilection pour un cancer du colon proximal et une augmentation de la prédisposition pour d'autres tumeurs, incluant les tumeurs endométriales, ovariennes et de l'estomac. Les

cancers ovariens sont décelés dans 5 à 10 % des patientes ayant le syndrome HNPCC (Ozols et al., 2000).

Des anomalies d'expression de certains oncogènes sont retrouvées dans le cancer ovarien, dont *c-myc*, *H-ras* et *Ki-ras* (Ozols et al., 2000). Par exemple, le produit du gène *ras*, p21, est exprimé dans 44 % et surexprimé dans 18 % des tumeurs épithéliales invasives (Ozols et al., 2000). Des molécules comme EGFR sont exprimées dans près de la moitié des tumeurs ovariennes et une augmentation de leur expression est associée à une diminution de la survie des patientes. De plus *erbB-2*, un membre de la famille EGFR, est amplifié et/ou surexprimé dans 32 % des cancers ovariens (Ozols et al., 2000). On remarque aussi une expression de l'antigène tumoral CA 125 au niveau de la surface épithéliale des ovaires cancéreux, tandis que cet antigène n'y était pas exprimé dans des ovaires normaux (Kabawat et al., 1983b).

Les néoplasmes d'origine épithéliale proviennent de la surface de l'épithélium ou de la séreuse de l'ovaire. L'épithélium, en devenant néoplasique, exhibe une variété de différenciations de type Mullérien qui sont, des plus fréquentes au moins fréquentes : (1) séreuse, (2) mucineuse, (3) endométriale et (4) cellules-claires (Ozols et al., 2000).

## **1.1 Cancer ovarien épithélial séreux**

Les tumeurs séreuses de l'ovaire constituent 46 % de toutes les tumeurs épithéliales. Le tiers sont malignes, le sixième sont à la limite maligne/bénigne et la moitié sont bénignes (Ozols et al., 2000). La caractéristique majeure de ce type de cancer est la détection de la protéine

CA 125, ce qui n'est pas le cas pour les cancers ovariens épithéliaux mucineux. Les cancers ovariens épithéliaux séreux sont subdivisés en stades de développement qui sont présentés au tableau 1 (tiré de Martin, 2002).

**Tableau 1**

**Stades de développement des cancers ovariens épithéliaux séreux**

<b>Stade</b>	<b>Description</b>
<b>Stade I</b>	Croissance limitée aux ovaires.
<b>Stade IA</b>	Croissance limitée à un ovaire, sans ascite; pas de tumeurs sur la face externe, capsule intacte.
<b>Stade IB</b>	Croissance limitée aux deux ovaires, sans ascite; pas de tumeurs sur la face externe, capsule intacte.
<b>Stade IC</b>	Tumeur de stade 1A ou 1B, mais avec des tumeurs à la surface d'un ou des deux ovaires, avec une rupture de la capsule et de l'ascite contenant des cellules malignes.
<b>Stade II</b>	Croissance impliquant un ou deux ovaires avec une extension pelvienne.
<b>Stade IIA</b>	Extension ou métastases dans l'utérus ou les trompes de Fallope.
<b>Stade IIB</b>	Croissance impliquant un ou deux ovaires avec une extension pelvienne.
<b>Stade IIC</b>	Tumeur de stade IIA ou IIB, mais avec des tumeurs sur la surface d'un ou des deux ovaires, avec une rupture de la capsule, avec de l'ascite contenant des cellules malignes.
<b>Stade III</b>	Tumeur impliquant un ou deux ovaires avec une implantation péritonéale à l'extérieur du bassin, métastases au foie de manière superficielle, tumeurs limitées au vrai bassin, mais avec une extension maligne au petit intestin vérifiée histologiquement.
<b>Stade IIIA</b>	Tumeur limitée au vrai bassin et négative aux ganglions, mais avec une implantation microscopique sur les surfaces abdominales péritonéales, vérifiée histologiquement.
<b>Stade IIIB</b>	Tumeur sur un ou deux ovaires avec une implantation sur les surfaces abdominales péritonéales (pas plus de deux centimètres de diamètre), vérifiée histologiquement; négatif aux ganglions.



---

<b>Stade IIIC</b>	Implantation abdominale de plus de deux centimètres de diamètre.
<b>Stade IV</b>	Croissance impliquant un ou deux ovaires avec des métastases distantes et une effusion pleurale; métastases au niveau du mésenchyme du foie.

---

## **1.2 Cancer ovarien épithélial mucineux**

Ce type de cancer constitue le tiers (36 %) de tous les cancers ovariens épithéliaux. La majorité sont bénins (81 %), le sixième sont à la limite malins/bénins et seulement 5 % sont malins (Ozols et al., 2000).

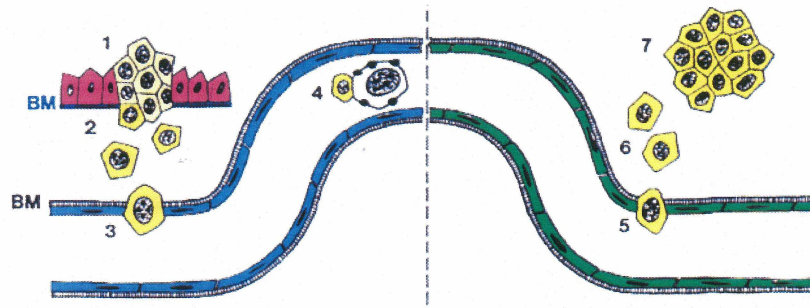
## **1.3 Autres types importants de cancers épithéliaux de l'ovaire**

Les tumeurs endométriales constituent 8 % des cancers épithéliaux de l'ovaire et la plupart des tumeurs sont malignes. Le cinquième seulement constituent des tumeurs de type limite maligne/bénigne et 10 % des cas sont associés avec de l'endométriose. Les tumeurs de type "cellules-claires" ne sont pas communes et ne constituent que 3 % des cancers ovariens épithéliaux. Le peu de tumeurs qui sont bénignes ou à la limite maligne/bénigne sont des adénofibromes et l'autre moitié sont associées avec de l'endométriose (Ozols et al., 2000).

## **2. Propriétés des cellules cancéreuses**

### **2.1 Cascade métastatique**

La cascade métastatique réfère à plusieurs étapes qui sont: la migration des cellules tumorales, la protéolyse, l'invasion, l'implantation de ces cellules dans un nouveau site et l'angiogenèse, comme illustré à la figure 1. L'habileté des cellules malignes tumorales à voyager vers des sites distants de leur site d'origine augmente suite à l'invasion et la néovascularisation. Pour ce qui est des cellules de cancer ovarien, elles ne migreront pas dans les vaisseaux sanguins ni lymphatiques comme la plupart des cellules cancéreuses, celles-ci envahissent de nouveaux sites localement et envahissent également très tôt et agressivement les surfaces péritonéales (Brown et al., 2000). Donc, la cascade métastatique dans ce cas ne fait pas intervenir les étapes de migration vers les vaisseaux sanguins. Par contre, les mêmes étapes de migration, d'invasion et d'implantation sont nécessaires pour envahir les surfaces péritonéales. La survie à l'anoïkose est nécessaire dans ce cas lorsqu'il y a formation d'ascites par les cellules cancéreuses dans la cavité péritonéale.



**Figure 1. Cascade métastatique.**

Lors d'une invasion maligne, (1) les cellules tumorales prolifèrent, (2) migrent vers la membrane basilaire vasculaire et (3) vont la dégrader. Suite à la protéolyse de la membrane basilaire vasculaire, les cellules vont migrer à travers celle-ci, entre les cellules endothéliales, pour rejoindre la circulation sanguine. Dans la circulation sanguine, les cellules doivent être résistantes à l'anoïkose pour pouvoir voyager dans la circulation sanguine et (5) ressortir de celle-ci pour s'implanter à un nouveau site. Les cellules peuvent résister à l'anoïkose, entre autres, en formant des agrégats entre elles et ainsi être moins affectées par le milieu environnant ou une cellule unique peut se lier à des globules blancs présents dans le sang (illustré en 4) qui lui permettra de voyager dans la circulation sanguine. Finalement, après l'implantation (6), les cellules tumorales vont compléter leur processus de dissémination avec l'apport de l'angiogenèse et de la prolifération (7).

L'invasion est une translocation active des cellules à travers un tissu, à travers des cellules hôtes et de la matrice extracellulaire. Lors de l'embryogenèse, la morphogenèse et la réparation de blessures, le processus invasif est très régulé. Cette régulation est absente ou altérée lors de l'invasion de cellules tumorales malignes et les signaux normaux, originant de l'environnement des cellules, peuvent être absents, altérés ou ignorés. Le processus d'invasion requiert l'adhésion, la protéolyse et la migration cellulaire. Lors d'une invasion maligne, les cellules tumorales doivent migrer et adhérer à la surface extérieure de la membrane basilaire vasculaire, dégrader la matrice de cette membrane et migrer à travers celle-ci, entre les cellules endothéliales, pour rejoindre la circulation sanguine, d'où elles devront ressortir pour s'implanter à un nouveau site. Ces cellules ne pourront compléter leur

processus de dissémination qu'avec l'apport de l'angiogenèse et de la prolifération (Brown et al., 2000).

Pour que ce processus soit efficace, les cellules tumorales doivent sécréter des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire. Cette dégradation ne dépend pas seulement de la quantité de ces enzymes, mais de la balance entre la quantité de protéases actives et d'inhibiteurs de celles-ci. Les MMPs sont des métalloprotéases de la matrice, une famille d'enzymes neutres sécrétés sous forme de proenzymes. Ces proenzymes doivent être activés par le clivage d'un domaine en N-terminal et leur activité dépend de la présence des ions divalents zinc et calcium. Une augmentation de l'activité des MMPs est détectée dans les cancers ovariens et corrèle avec l'invasion et le potentiel métastatique de ce type de cancer. D'ailleurs, il y a une surexpression des MMP-2 (gélatinase A) et des MMP-9 (gélatinase B) dans les cancers ovariens (Brown et al., 2000). En plus, une surexpression des récepteurs de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et de la production d'uPA est observé dans les cancers ovariens. Les activateurs du plasminogène sont des sérines protéases qui convertissent le plasminogène inactif en plasmine active, un enzyme qui dégrade la fibrine, la fibronectine, le collagène IV, la vitronectine et la laminine (Brown et al., 2000).

La protéolyse seule n'est pas responsable de toute la cascade invasive. Les cellules doivent coupler la protéolyse avec un attachement et un détachement coordonnés de celles-ci pour permettre la migration. Certains agents stimulent cette motilité, comme les IGFs, tandis que d'autres peuvent l'inhiber (Brown et al., 2000). En ce qui concerne la vascularisation tumorale, elle constitue une des étapes limitantes pour la croissance tumorale et l'apparition de métastases. L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants. Plus il y a de néovascularisation ou plus celle-ci est dense, moins les

chances de survie du patient sont élevées. Puisque l'invasion tumorale est limitée par la nécessité des nutriments et la relâche de déchets métaboliques dans le milieu, la formation de vaisseaux sanguins devient essentielle. Finalement, la cascade métastatique est un processus peu efficace. Malgré le fait que des millions de cellules tumorales se retrouvent dans la circulation, moins de 0,01 % de celles-ci forment des métastases (Brown et al., 2000).

## **2.2 Adhésion**

Les interactions cellule-cellule et cellule-matrice jouent un rôle important dans l'invasion tumorale. L'adhésion des cellules tumorales à certaines molécules comme les intégrines et les cadhérines stabilise l'intégrité du tissu, tandis qu'une perte ou une altération de cette adhésion est associée à une augmentation du potentiel métastatique. L'organisation et la polarité cellulaire durant la migration et l'étalement sont régulées par les interactions cellulaires avec des protéines de la matrice extracellulaire, telles que celles de la famille des intégrines, de même qu'avec des interactions avec d'autres cellules par les cadhérines transmembranaires. Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires qui médient les interactions cellulaires dépendantes du calcium. La protéine E-cadhérine, qui est la plus étudiée, est impliquée dans les communications cellule-cellule des cellules épithéliales. Lors d'un cancer ovarien, une diminution de l'expression de la E-cadherine à la surface des cellules épithéliales ovariennes cause une diminution dans l'adhésion cellulaire durant la progression de la transformation de la surface épithéliale ovarienne (Brown et al., 2000). Les intégrines sont des hétérodimères composés de sous-unités glycoprotéiques membranaires,  $\alpha$ - et  $\beta$ -, liées de manière non-covalente. Ce sont des molécules de signalisation impliquées au niveau

de la régulation de l'apoptose, l'expression de gènes, la prolifération cellulaire, l'invasion, les métastases et de l'angiogenèse. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , dont l'expression est détectée dans des lignées cellulaires de cancer ovarien, joue un rôle fondamental dans l'angiogenèse et l'invasion.  $\alpha_v\beta_3$  médie l'adhésion cellulaire à la vitronectine, au facteur von Willebrand, au fibrinogène et à la fibronectine. Son activation initie une voie de signalisation dépendante du calcium menant à une augmentation de la motilité cellulaire (Brown et al., 2000). Plusieurs études démontrent l'importance des intégrines pour les cellules cancéreuses. Par exemple, un pré-traitement avec un anticorps monoclonal contre la sous-unité  $\beta_1$  des intégrines, sur des cellules d'une lignée de cancer ovarien, diminue drastiquement l'adhésion de celles-ci aux cellules mésothéliales d'une manière dose-dépendante (Skubitz, 2002). Plusieurs intégrines, comme  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_6$  et  $\beta_1$ , sont impliquées dans la régulation des interactions adhésives importantes dans la formation des métastases tumorales. Chez des patients atteints de tumeurs de la tête et du cou ainsi que de la peau, une perte d'expression de  $\alpha_6$  corrèle avec un avantage de survie de ces patients. En plus *in vitro*, une inhibition de l'expression de  $\alpha_6$  par un traitement avec un ribozyme ou un traitement avec un anticorps dirigé contre  $\alpha_6$ , sur des cellules métastatiques, résulte en l'inhibition de l'adhésion, de l'invasion et de métastases expérimentales de ces cellules provenant de tumeurs de la tête et du cou ainsi que de la peau (Price et al., 1997). Inversement, la transfection de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  dans une lignée cellulaire *rhabdomyosarcoma* peu métastatique augmente la production de colonies métastatiques dans des souris nues et augmente l'adhésion de ces cellules à la laminine et au collagène, des composantes de la matrice extracellulaire, *in vitro* et *in vivo* (Price et al., 1997).

### **2.3 Résistance à l'apoptose**

Les cellules cancéreuses peuvent démontrer une résistance à l'apoptose, soit via la modulation de la balance des molécules anti- et pro-apoptotiques, ou via une résistance à l'anoïkose. On remarque dans les cellules cancéreuses une augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques, comme Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> et une diminution des molécules pro-apoptotiques, comme Bax et Bad (Kroemer et Reed, 2000). Ce débalancement vers les molécules anti-apoptotiques favorise la survie cellulaire. De plus, les cellules cancéreuses peuvent survivre sans attachement à la matrice, ce qui augmente leur potentiel métastatique. La résistance à l'anoïkose permet aux cellules cancéreuses de survivre dans la circulation sanguine et de se réimplanter en d'autres sites (Grossmann, 2002).

### **3. Mucines**

Les mucines sont des glycoprotéines d'un poids moléculaire variant entre 250 000 et 10 millions de daltons avec un contenu élevé en oligosaccharides. Elles sont responsables de la protection des surfaces épithéliales par la formation d'un gel protecteur (mucus), qui forme une barrière physique entre la membrane cellulaire et l'environnement (Strous et Dekker, 1992). Spécifiquement, les mucines sont constituées d'au moins 50 % de leur poids en hydrates de carbone organisés en oligosaccharides liés en O- (O-glycosylés) sur des résidus sérines ou thréonines sur le corps peptidique. Ce corps central peptidique contient un certain nombre de séquences qui sont répétées et qui comprennent les O-glycosylations (Strous et

Dekker, 1992). En général, ces répétitions sont codées par un seul exon qui peut varier de 2,2 kb pour MUC 7 à 21 kb pour MUC 4. Quand les domaines répétitifs sont plus longs que quelques kilobases, ils sont caractérisés par un polymorphisme inter-individuel de type VNTR dû à une instabilité du nombre de répétitions au cours des générations (Moniaux et al., 2001).

Les régions N- et C-terminales d'une mucine contiennent les N-glycosylations, tous les résidus cystéines et aucune O-glycosylation. Les monosaccharides des mucines sont composés de fucose, galactose, N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine, acide sialique et quelques fois de résidus mannoses, ce qui en fait une molécule chargée négativement. Cette charge provient de l'acide sialique et des résidus sulfates sur les oligosaccharides. Finalement, les mucines sont composées surtout de sérines, thréonines, prolines, glycines et alanines (50 % de tous les acides aminés) et presque toutes les sérines et thréonines (25 à 40 % de tous les acides aminés) sont O-glycosylées (Strous et Dekker, 1992).

À ce jour, 14 mucines ont été identifiées et elles peuvent être divisées en deux groupes: celles qui sont sécrétées ou solubles, puis les membranaires. Les mucines sécrétées constituent le gel visqueux qui couvre la plupart des surfaces muqueuses des conduits respiratoires, gastrointestinaux et reproductifs. Ces mucines ont une structure oligomérique linéaire flexible avec plusieurs glycoprotéines monomériques assemblées bout-à-bout. Il y a présence en N-terminal de cystéines qui permettent l'oligomérisation et les liens disulphures intra- et inter-moléculaires. Donc, les oligomères sont liés par des ponts disulphures (Strous et Dekker, 1992). Les mucines membranaires contiennent des acides aminés hydrophobes pour leur ancrage dans la membrane plasmique et ne forment pas de ponts disulphures inter-moléculaires. Dans le cas des tumeurs épithéliales, de plus grandes concentrations de



mucines sont présentes sous forme soluble dans la circulation sanguine et origineraient d'un clivage protéolytique de mucines membranaires à la surface des cellules tumorales (Strous et Dekker, 1992).

Les mucines entre elles n'ont pas d'homologie de séquences, tant au niveau des séquences nucléotidiques que celles des acides aminés, même pour les répétitions, mais il existe certaines familles regroupant des gènes de mucines sur certains chromosomes (Strous et Dekker, 1992). Finalement, les mucines joueraient, entre autres, un rôle dans la carcinogenèse au niveau de la migration cellulaire, de l'adhésion aux cellules, à la matrice extracellulaire ou à des organismes pathogènes, puis à la reconnaissance cellulaire (Strous et Dekker, 1992).

### **3.1 MUC 1**

Aussi nommé DU-PAN-2, *episialin*, MAM-6, PEM et PUM, MUC 1 est une mucine membranaire. Elle est localisée au niveau des épithéliums normaux des bronches, glandes mammaires, endomètre, prostate, utérus, des reins, de l'estomac et du pancréas et elle est très exprimée dans les adénocarcinomes du sein et du pancréas où dans ceux-ci les O-glycosylations sont très diminuées. MUC 1 contient, entre autres, des répétitions en tandem de 20 acides aminés et une queue cytoplasmique qui interagit avec le squelette d'actine (Gendler et Spicer, 1995). Le gène de MUC 1 est situé sur le chromosome 1, dans la région q21-24 (Gendler et Spicer, 1995).

MUC 1 est caractérisé par plusieurs isoformes. MUC 1/SEC, qui résulte d'un épissage alternatif de MUC 1, ne possède pas de séquence transmembranaire ni de queue cytoplasmique (Moniaux et al., 2001). MUC 1/Y résulte aussi d'un épissage alternatif et est caractérisé par la délétion du domaine central qui correspond aux répétitions en tandem (Zrihan-Licht et al., 1994b). MUC 1/Y est membranaire et semble être un récepteur pouvant être phosphorylé à des sites tyrosines et sérines ce qui activerait une cascade de signalisation via GRB2. Cette mucine augmente l'initiation et la progression tumorale *in vivo* (Gendler et Spicer, 1995). Par ailleurs, MUC 1/SEC serait un ligand de MUC 1/Y et cette interaction induirait la phosphorylation de MUC 1/Y et un changement dans la morphologie cellulaire (Zrihan-Licht et al., 1994a; Baruch et al., 1999). MUC 1/X est un produit d'épissage de MUC 1 qui ne contient pas de répétitions en tandem et qui a une insertion de 18 acides aminés de plus que MUC 1/Y (Baruch et al., 1997). MUC 1/Z est un autre produit d'épissage alternatif de MUC 1 et ne contient aucune répétitions, par contre il est plus gros que MUC 1/Y de 54 pb (Oosterkamp et al., 1997). Malgré le fait qu'il n'y ait aucune mention de cette hypothèse, il paraît vraisemblable que MUC 1/X et MUC 1/Z soit la même molécule. Enfin, MUC 1 est retrouvé sous forme soluble par un clivage de MUC 1 membranaire et est nommé MUC 1/REP.

MUC 1 joue des rôles dans la progression tumorale et le processus métastatique. Elle est une protéine anti-adhésive bloquant les interactions cellule-cellule en déstabilisant les interactions cellule-cellule et/ou cellule-matrice extracellulaire et en interférant avec l'adhésion médiée par les intégrines et E-cadhérine. Cependant, elle peut aussi agir de manière adhésive avec ses hydrates de carbone extracellulaires servant de ligands pour des molécules telles que les sélectines et ainsi aider à la dissémination métastatique (Moniaux et al., 2001). MUC 1 interagit directement avec les bêta-caténines via un motif dans sa queue

cytoplasmique où la bêta-caténine a une grande importance dans la formation des jonctions cellule-cellule par l'interaction avec E-cadhérine. Plus la queue cytoplasmique de MUC 1 est phosphorylée, moins MUC 1 interagit avec les bêta-caténines. D'un autre côté, plus les hydrates de carbone de MUC 1 sont glycosylés, plus elle peut interagir avec MUC 1/SEC et MUC 1/Y (Moniaux et al., 2001). MUC 1 augmente aussi la présentation à l'antigène des cellules T, probablement par une interaction avec une lectine, et serait un ligand des ICAM-1 exprimés par les cellules endothéliales, ce qui suggère un rôle de MUC 1 dans la migration cellulaire (Taylor-Papadimitriou et al., 1999; Treon et al., 1999). De plus, les cellules exprimant MUC 1 pourraient moduler des fonctions immunitaires, car ces cellules sont résistantes aux cellules NK et aux cellules T cytotoxiques. Il est également intéressant de noter que le dexaméthasone induit l'expression de MUC 1 à la surface de lignées de cancer ovarien et de cancer de la prostate, contrairement au cas de CA 125 où ce même produit, le dexaméthasone, induit une diminution de CA 125 à la surface cellulaire dans plusieurs lignées cellulaires de cancer ovarien et en augmente la sécrétion (Karlan et al., 1988; Barbati et al., 1991; Nakai et al., 1991; Treon et al., 1999). En plus, la phosphorylation en tyrosine de MUC1 est augmentée dans des cultures cellulaires non confluentes. Cette phosphorylation se produirait lors de la migration cellulaire et pourrait refléter la redistribution de MUC 1 au moment de l'adhésion cellule-cellule (Quin et McGuckin, 2000).

### **3.2 MUC 4**

Cette mucine, dont le gène est situé sur le chromosome 3 région q29, est membranaire et est exprimée au niveau des épithéliums normaux des bronches, de l'utérus, de l'estomac, de

l'intestin grêle et du côlon, mais pas du pancréas, sein et vésicule biliaire. Par contre, il y a une surexpression de l'ARNm de MUC 4 lors de cancers du pancréas. Cette mucine contient 380 répétitions de 48 pb et son homologue chez le rat est SMC (*sialomucin complex*) (Nollet et al., 1998).

La partie C-terminale est composée, entre autres, de deux domaines EGF, d'une séquence transmembranaire et d'un site de clivage protéolytique GDPH permettant la production des molécules MUC 4 $\alpha$  (glycoprotéine de type mucine) et MUC 4 $\beta$  (sous-unité transmembranaire). Chez le rat, le site de clivage produit ASGP-1, une sialomucine à la surface cellulaire de 600 kDa et ASGP-2, un peptide membranaire de 80 kDa, ces deux molécules étant associées d'une manière non covalente. Il est très intéressant de noter que le domaine EGF-1 de ASPG-2 interagit et active le proto-oncogène kinase p185<sup>neu</sup>, l'homologue de erbB-2 chez l'humain (Moniaux et al., 1999). De plus, MUC 4 contiendrait un domaine extracellulaire AMOP, qui n'est retrouvé que dans les protéines contenant un domaine extracellulaire impliqué dans l'adhésion cellulaire, ainsi qu'un domaine NIDO qui est un domaine extracellulaire de fonction inconnue trouvé dans le nidogène (Ciccarelli et al., 2002).

En plus du précurseur de MUC 4, qui est un transcrite de 26,5 kb produisant une apomucine de 930 kDa, neuf variants sont produits par épissage alternatif. Cinq variants sont sécrétés, deux sont membranaires et deux, MUC 4/Y et MUC 4/X, n'ont pas de répétitions en tandem (Moniaux et al., 2000).

Une augmentation de l'expression de l'ARNm de MUC 4 est observée par l'ajout d'acide rétinoïque et ce processus serait médié par les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.

Une augmentation de l'expression de MUC 4 requiert l'activation de la voie TGF  $\beta$ 2 par un mécanisme autocrine ou paracrine. Cependant, l'estradiol-17 $\beta$ , le dexaméthasone, l'insuline, le TNF- $\alpha$ , la progestérone, l'hydrocortisone, l'EGF et le TGF- $\beta$  n'ont pas d'effets sur l'expression de MUC 4 (Choudhury et al., 2000).

MUC 4 aurait un rôle à jouer dans une voie de signalisation requise pour la prolifération et la différenciation de cellules épithéliales (Moniaux et al., 1999). SMC, l'homologue de MUC 4 chez le rat, possède des propriétés anti-adhésive lorsqu'il est exprimé en bloquant les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, permet une protection contre le système immunitaire et augmente le potentiel métastatique où tous ces effets sont liés à la O-glycosylations, donc le nombre de répétitions en tandem (Price-Schiavi et al., 2002).

### **3.3 Autres mucines**

Les mucines sécrétées sont divisées en quatre classes. Premièrement, la classe des mucines intestinales comprend MUC 2, dont le gène est situé sur le chromosome 11 région p15 et la protéine membranaire MUC 3. La classe des mucines trachéobronchiales comprend MUC 5AC et MUC 5B, dont le gène est situé au chromosome 11 région p15. La classe des mucines gastriques comprend MUC 6 dont le gène est situé au chromosome 11 région p15.4-15.5, soit dans la même région que les gènes de MUC 2 et MUC 5. MUC 6 possède les répétitions en tandem les plus longues, chacune étant composée de 169 acides aminés

(Gendler et Spicer, 1995). Finalement, la classe des mucines des glandes salivaires comprend MUC 7 dont le gène est situé au chromosome 7.

MUC 3A, MUC 3B, MUC 11 (dont seulement des séquences de la région répétée du gène sont connues) et MUC 12 forment une famille de mucines membranaires dont les gènes sont situés sur le chromosome 7 région q22 et contiennent un domaine transmembranaire, un domaine SEA et un ou deux domaine(s) EGF (Dekker et al., 2002). MUC 3 jouerait un rôle dans la transduction de signaux (comme MUC 1) et dans les interactions protéine-protéine et la liaison de ligands. MUC 3 comprend aussi deux sites d'épissage alternatif formant deux isoformes sécrétés (Williams et al., 1999).

Le gène de MUC 13 se situe au chromosome 3 région q13.3 et contient aussi les domaines SEA, EGF et transmembranaire. Le gène de MUC 8 est situé au chromosome 12 région q24 (peu caractérisé) et le gène de MUC 16 (aussi nommé CA 125) serait situé au chromosome 19 région p 13.2, d'où l'importance d'étudier les mucines pour comprendre CA 125 (Dekker et al., 2002).

## 4. CA 125

### 4.1 Historique

En 1981, Robert C. Bast développa un anticorps monoclonal, OC125, provenant d'un hybridome dérivé de lymphocytes de souris immunisées avec la lignée cellulaire de cancer ovarien OVCA 433. Cet anticorps réagissait avec un antigène retrouvé à la surface de cellules tumorales provenant de patientes ayant un cancer ovarien (Bast et al., 1981). Plus particulièrement, les auteurs ont observé que OC125 produisait des immunoglobulines IgG1 qui se liaient à six lignées cellulaires de cancer ovarien, ainsi qu'à sept échantillons de cellules tumorales ovariennes provenant d'ascites de patientes. Il est maintenant reconnu que cet antigène est détecté principalement au niveau des tumeurs ovariennes séreuses, soit bénigne, à la limite bénigne/maligne ou maligne et il n'y a, entre autres, aucune réactivité sur des tumeurs ovariennes mucineuses (Kabawat et al., 1983a; Kabawat et al., 1983b). De plus, dans les tumeurs positives pour l'antigène, OC125 réagissait par immunofluorescence à la surface des cellules et peu de réaction était observée dans le cytoplasme. Cet antigène fut désigné CA 125 en 1983. Par la suite, en 1984 on confirma que OC125 se liait à plus de 80 % des cancers ovariens épithéliaux non mucineux (Masuho et al., 1984). Pendant près de 20 ans plusieurs études ont permis d'en savoir plus sur CA 125 au niveau biochimique et clinique. Il est aujourd'hui reconnu que des traces de CA 125 sont détectées durant le développement embryonnaire dans l'épithélium cœlomique, le conduit Müllerien et dans l'amnion. Chez l'adulte, l'antigène est détecté au niveau de l'épithélium des trompes de Fallope, dans l'endomètre et le col de l'utérus, qui sont des structures dérivant du conduit de

Müller ainsi que dans le lait humain, les glandes endométriales, le tissu pulmonaire normal, le mucus bronchial normal et dans le plasma séminal humain. Malgré le fait que la protéine CA 125 soit détectée au niveau de l'épithélium des ovaires lors d'un cancer, elle n'est pas détectable dans les tissus ovariens normaux avec les anticorps disponibles présentement, autant chez l'adulte que le fœtus (Kabawat et al., 1983b). Ce n'est qu'en 2001 qu'une première séquence partielle de CA 125 fut disponible. À partir de cet instant les chercheurs ont pu se concentrer sur la nature moléculaire de CA 125 ainsi que de ses rôles possibles dans la pathogenèse du cancer ovarien.

#### **4.2 Importance clinique**

À l'aide d'un radioimmunoessai, les niveaux de CA 125 dans des sérums de patientes ayant un cancer ovarien épithélial ont pu être détectés (Bast et al., 1983). Les niveaux de CA 125 corrélerent avec le statut clinique des patientes. C'est-à-dire que de bas niveaux de CA 125 (< 35 U/ml) sont détectés dans le sérum de femmes en santé, que des niveaux augmentant corrélerent avec une progression de la tumeur, que des niveaux diminuant corrélerent avec une régression de la tumeur et lorsque les niveaux demeurent stables, la tumeur demeure stable. Malheureusement, au moins 50 % des patientes atteintes d'un cancer ovarien au stade I n'ont pas d'élévation du niveau de CA 125. Donc, ce marqueur ne peut être utilisé pour une détection précoce de la maladie (Markman, 1997). Par contre, lors de stades plus avancés, plus de 80-95 % des patientes ont un niveau de CA 125 élevé dans leur sérum (> 35 U/ml) (Berchuck et al., 1989).



### 4.3 Propriétés

CA 125 est une énorme glycoprotéine de 200 à 2000 kDa (observé par immunobuvardage *western*), faisant partie de la famille des mucines. L'analyse de la composition en acides aminés de CA 125, purifié avec l'anticorps VK-8 (Lloyd et al., 1997), confirme un haut contenu en sérine, thréonine et proline avec plusieurs des résidus sérines et thréonines O-glycosylés. Vingt-quatre pourcent du poids de CA 125 est composé de sucres avec de hauts niveaux de galactose, glucosamine et N-acétylgalactosamine et des niveaux un peu plus faibles de fucose, acide N-acétylneuraminique, acide sialique et de mannose. Le mannose indique une présence de chaînes liées en N. Puisque CA 125 détient deux domaines antigéniques majeurs, les anticorps leur étant complémentaires ont été classés en deux groupes; soit ceux de la famille OC125 (groupe A) ou de M11 (groupe B) et ces deux groupes ne compétitionnent pas entre eux. Les épitopes sont de composition protéique, répétés au moins 60 fois et une contribution des hydrates de carbone pourrait être nécessaire pour la liaison des anticorps (Lloyd et al., 1997; O' Brien et al., 2001).

Malgré le peu d'information disponible sur le ou les rôles de CA 125, plusieurs groupes de recherche ont investigué ce qui pouvait influencer l'expression ou la localisation de CA 125. Tout d'abord, deux groupes ont observé qu'il y a une augmentation de la concentration de CA 125 dans le milieu de culture cellulaire avec le temps (Bast et al., 1983; Masuho et al., 1984). Par manque de connaissances on ne peut conclure, jusqu'à maintenant, ni à un clivage de l'antigène à la surface cellulaire ni à une forme sécrétée de CA 125. L'interféron- $\gamma$  module la localisation de CA 125 (Marth et al., 1989; Zeimet et al., 1996). Lorsque administré de manière intra-péritonéale chez des patientes, il y a une augmentation de la concentration de

CA 125 dans le sang périphérique, même si la tumeur régresse à cause d'une thérapie. L'interféron- $\gamma$  stimule directement les cellules de cancer ovarien à induire la relâche de CA 125 dans le sang. Les auteurs ont observé sur deux lignées cellulaires de cancer ovarien que l'interféron- $\gamma$  augmente la concentration de CA 125 intracellulaire, à la surface cellulaire ainsi que dans le milieu de culture. D'ailleurs, ces auteurs ont déterminé que le temps nécessaire pour détecter du CA 125 dans le milieu de culture est de 24 heures (Marth et al., 1992), corroborant les observations de Masuho et *al.* quant à l'augmentation de la concentration de CA 125 dans le milieu de culture. Ces observations indiquent que le CA 125 intracellulaire et lié à la membrane est renouvelé à tous les jours. Dans le même ordre d'idée, notons que le butyrate de sodium et la colchicine augmentent la relâche de CA 125 dans le milieu de culture de cellules de cancer ovarien (Barbati et al., 1991; Nakai et al., 1991). En plus, une diminution de l'expression de CA 125 à la surface cellulaire et son accumulation dans le milieu de culture ont été observées sous l'influence du dexaméthasone dans plusieurs lignées cellulaires de cancer ovarien (Karlan et al., 1988; Barbati et al., 1991; Nakai et al., 1991), ainsi qu'avec le TGF- $\beta$  dans la lignée cellulaire OVCAR-3 (Marth et al., 1990).

D'autre part, l'hormone lutéinisante humaine diminue le relâchement de CA 125 dans le milieu lors de la culture primaire de cellules de cancer ovarien séreux (Kurbacher et al., 1995). Le TGF- $\alpha$ , un ligand de EGFR qui est exprimé et qui est important pour la croissance des cellules de cancer ovarien, augmente la sécrétion de CA 125 d'une lignée cellulaire de cancer ovarien (SHIN-3) et de cellules primaires de cancer de l'ovaire (Kurachi et al., 1996). Par contre, la trypsine semble causer l'inactivation de CA 125 (Kobayashi et al., 1993). En plus, il semble que le paclitaxel (un agent antinéoplasique employé en chimiothérapie)

induirait le relâchement de CA 125 dans des lignées cellulaires de cancer ovarien. Les auteurs ont observé une augmentation de la relâche de CA 125 d'une manière dose dépendante avec le paclitaxel et le docétaxel (composé de la même famille). Ces taxanes n'induiraient pas la biosynthèse *de novo* de CA 125, mais exerceraient leur action exclusivement sur des cellules ayant une expression constitutive de CA 125 (Marth et al., 1997; Paulsen et al., 2000). La croissance cellulaire n'est pas modulée par la production ou la relâche de CA 125 (Marth et al., 1992). Par contre, les niveaux élevés de CA 125 corrént avec le pourcentage de cellules en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire et la quantité de CA 125 sécrété par cellules augmente avec la densité cellulaire (Marth et al., 1992).

Il a aussi été démontré que CA 125 est phosphorylé avant sa sécrétion et que les niveaux de phosphorylation et de sécrétion de CA 125 dépendent de la stimulation du EGF. Cet effet du EGF sur la relâche de CA 125 ne se produirait pas par la voie des protéines kinases C (Konishi et al., 1994). D'ailleurs, une augmentation de la sécrétion de CA 125 a aussi été observée en inhibant les protéines phosphotyrosines phosphatases avec du vanadate et cet effet est amplifié avec l'ajout de EGF, les sites de phosphorylation se situant au niveau des résidus sérines et/ou thréonines, mais pas sur des résidus tyrosines (Fendrick et al., 1997).

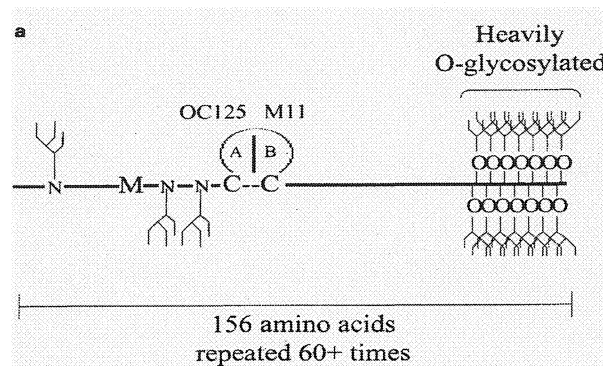
Il est intéressant de noter que la molécule d'adhésion E-Cadhérine est détectée dans des cancers ovariens primaires. D'ailleurs, lorsque des cellules normales OSE immortalisées (avec gT de SV40) sont transfectées avec un ADNc murin de E-Cadhérine, il y a, entre autres, une production de l'antigène tumoral CA 125 et on observe sa sécrétion dans le milieu de culture (Auersperg et al., 1999). Suite à toutes ces expériences, nous pouvons conclure que l'expression et le relâchement de CA 125 dans le milieu de culture est un processus cellulaire très régulé.

#### 4.4 Séquence de CA 125

En 2001, Yin et Lloyd ont obtenu une séquence partielle de CA 125 désignée MUC 16. Cette séquence de 5965 pb (1890 aa) contient neuf répétitions de 495 pb (156 aa) chacune qui sont partiellement conservées (deux cystéines étant conservées sur toutes les répétitions), de même qu'une région en 3' non-répétitive (537 aa) contenant un codon d'arrêt, un signal de polyadénylation et une région poly A (Yin et Lloyd, 2001). Une séquence de 25 acides aminés hydrophobes est présente près du C-terminal, elle représenterait une région transmembranaire. Cette région est suivie d'une queue cytoplasmique de 31 acides aminés qui contient trois tyrosines, deux thréonines et une sérine. Selon un logiciel de prédiction de phosphorylation, deux des trois tyrosines et une des deux thréonines seraient phosphorylées, mais pas la sérine (Programme de prédiction NetPhos 2.0, 2003). Aucune séquence d'initiation n'est présente (ATG dans boîte Kozak), ce qui indique que les auteurs ne possèdent qu'une séquence partielle. Six domaines SEA ont été identifiés sur la séquence, mais aucun domaine EGF. Jusqu'à maintenant, les domaines SEA ont été identifiés sur des molécules qui interagissent avec des constituants de la matrice extracellulaire comme MUC 1, perlecan, l'antigène de surface 114/A10, l'entérokinase, l'agrén et une protéine de sperme chez l'oursin de mer (Bork et Patthy, 1995). Finalement, le gène se situerait au chromosome 19 région p13.3.

Dans la même année, O'Brien a lui aussi publié une séquence partielle de CA 125 (plus complète que celle de Lloyd) et il a proposé un modèle pour la structure de CA 125. En plus d'appuyer les résultats de Lloyd, O'Brien propose que le domaine extracellulaire de CA 125 est composé de 60 répétitions en tandem de 156 acides aminés, chacune comprenant une

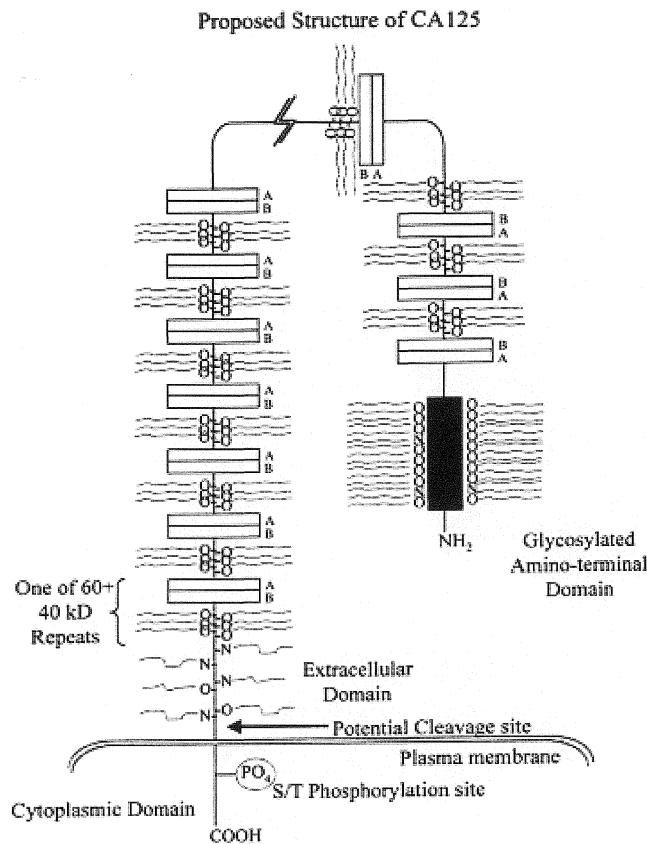
boucle cystéine avec les épitopes reconnus par les anticorps des familles OC125 et M11, ce qui augmente la taille de l'ARNm à 35 351 pb (O'Brien et al., 2001). O'Brien propose que la séquence est riche en résidus sérines, thréonines et prolines, ce qui est typique des régions répétées des mucines. De plus, une méthionine est conservée à la position 24 de toutes les répétitions et un pont disulfure est présent dans la boucle cystéine où se retrouve les épitopes (figure 2).



**Figure 2. Unité répétitive de CA 125.**

Selon O'Brien, chacune des répétitions de CA 125 serait composée de 156 acides aminés comprenant des N-glycosylations (N) en N-terminal, une méthionine conservée (M), une boucle cystéine incluant les sites de liaison des anticorps de la famille M11 et OC125 et des résidus O-glycosylés en C-terminal (O'Brien et al., 2001).

O'Brien propose également la présence de sites de phosphorylation en tyrosine de même que des sites potentiels de phosphorylation en sérine/thréonine. Il propose aussi une structure de CA 125 composée d'un domaine cytoplasmique et d'un domaine extracellulaire très glycosylé comme illustré à la figure 3.



**Figure 3. Structure proposée de CA 125.**

Selon O'Brien, la molécule a plusieurs domaines de répétitions dans la partie extracellulaire qui inclut les épitopes et un domaine N-terminal très glycosylé. CA 125 contiendrait un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique avec des sites potentiels de phosphorylation (O'Brien et al., 2001).

Par contre, comme mentionné par O'Brien, des séquences au niveau des répétitions peuvent être placées incorrectement et des unités répétitives ne sont peut-être pas encore identifiées (O'Brien et al., 2001). En plus, celui-ci soutient que CA 125 occupe 150 000 pb sur le chromosome 19 région q13.2 (comparativement à Lloyd au chromosome 19 région p13.3). Finalement en 2002, O'Brien propose une séquence plus complète de CA 125 contenant un énorme domaine N-terminal (O'Brien et al., 2002). Une région de 10 431 acides aminés

nommée HLGP sur le chromosome 19, correspondrait à l'extension 5' de la séquence de CA 125. De plus, une méthionine (codon de départ ATG) serait retrouvée aux bases 205-207 satisfaisant la séquence Kosak d'initiation de la traduction. Donc, selon O'Brien CA 125 serait composé de 22 152 acides aminés où 12 068 constituent le domaine N-terminal et près de 10 000 acides aminés représentant les domaines de répétitions en tandem. Ce qui confère un poids protéique de 2,5 millions de daltons et près du double lorsque la protéine est glycosylée. CA 125 occuperait un minimum de 174 000 pb sur le chromosome 19 et un ARNm de 66 kb. Compte tenu de cette taille immense, il sera très difficile de cloner CA 125 et de l'étudier en utilisant cette méthode. En plus, il existe une confusion quant à déterminer la localisation chromosomale exacte de CA 125. Cette confusion est présente car le génome humain n'est pas complètement séquencé et il y a des cosmides qui sont réassignés à de nouveaux endroits sur le chromosome 19 à mesure que des données sont disponibles. Donc, à ce jour, le gène de CA 125 est assigné au chromosome 19 région p13.2.

#### **4.5 Rôles possibles**

Jusqu'à maintenant les rôles de CA 125 dans la pathogenèse du cancer ovarien ne sont pas très bien connus puisqu'aucun « knockout » de CA 125 n'a été effectué. Par contre, nous pouvons envisager que CA 125 pourrait avoir un rôle au niveau de la reconnaissance cellulaire, soit par des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire grâce au domaine SEA. La protéine CA 125 pourrait se lier à elle-même (comme dans le cas de MUC 1) ou lier d'autres molécules de surface cellulaire qui pourraient être impliquées dans l'adhésion cellulaire. Selon un article récent, l'adhésion cellulaire de plusieurs lignées

cellulaires cancéreuses *in vitro* est retardée par CA 125. Selon les auteurs, CA 125 serait une molécule anti-adhésive qui faciliterait le détachement des cellules de la matrice extracellulaire (Gaetje et al., 2002). En plus, CA 125 pourrait augmenter ou prévenir l'adhésion cellulaire et pourrait aussi jouer un rôle au niveau de l'invasion cellulaire et de ce fait augmenter le potentiel métastatique des cellules. D'ailleurs, CA 125 serait un régulateur autocrine de l'invasion des cellules primaires endométriotiques EEC 145, qui n'expriment pas de CA 125 à leur surface cellulaire (Gaetje et al., 1999).

## **5. Méthodes employées pour étudier les protéines**

Puisque le projet consiste à déterminer le rôle de la protéine CA 125, il s'avère important de choisir quelle méthode serait la plus appropriée dans notre cas pour étudier CA 125. Rappelons qu'au début de cette recherche, en 2000, aucune séquence de CA 125 (même partielle) n'était disponible. À cet égard, les techniques ciblant l'ADN et l'ARN de CA 125 n'étaient pas appropriées dans notre cas, par contre leur description sont incluses car présentement des séquences d'ADNc partiels de CA 125 sont disponibles et ces méthodes pourraient maintenant être envisagées.



## **5.1 Antisens**

Un antisens est un oligonucléotide d'ADN simple brin qui modifie les cellules en s'hybridant à des séquences cibles dans l'ARNm, déstabilisant cet ARNm et diminuant sa traduction en protéine à cause de l'effet stérique de la liaison ou par une induction de la dégradation de l'ARNm par les RNases (Askari et McDonnel, 1996). Cette technique requiert, par contre, une connaissance des séquences nucléotidiques encodant la protéine d'intérêt et cet outil est limité car les antisens ont une courte demie-vie *in vivo*, ils sont facilement détruits par les DNases, ils stimulent le système immunitaire et il y a un manque de reproductibilité de leurs effets biologiques relativement non spécifiques (Indolfi et al., 1996).

## **5.2 Ribozyme**

Un ribozyme est une molécule d'ARN catalytique qui clive les ARNs. Le ribozyme se lie à une cible d'ARN spécifique par des séquences antisens et l'inactive en clivant le corps phosphodiester à un site spécifique (Piché et Rancourt, 1999). Cette technique requiert une excellente connaissance des séquences codantes.

### **5.3 ARN interférence**

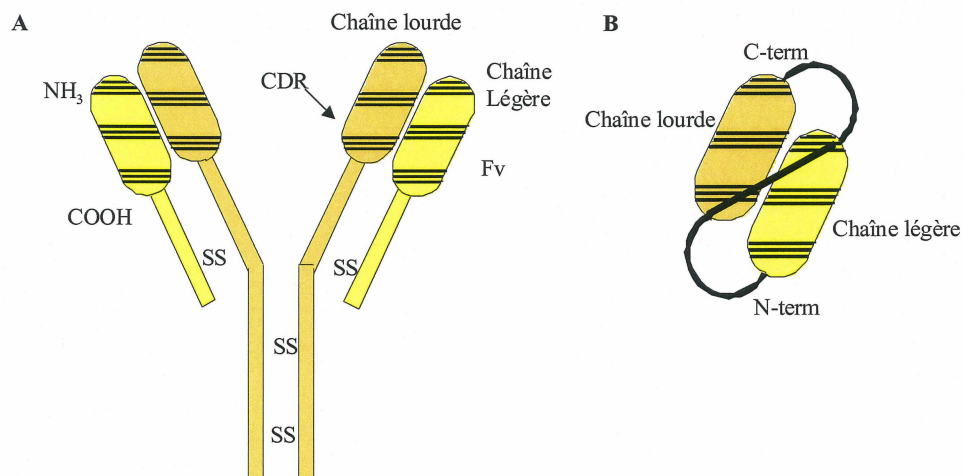
L'ARN interférence induit la dégradation d'ARNm homologue ce qui va résulter en une inhibition séquence spécifique au niveau post-transcriptionnel. Tout d'abord, un ARN double-brin est reconnu par une RNase (enzyme DICER) qui le clivera en plusieurs fragments de 21 à 25 nucléotides. Ces petits ARNs interférences (siRNA, *small interfering RNA*) se lieront à un complexe effecteur RISC et le guideront vers le substrat homologue à leur séquence pour ainsi inhiber la fonction du produit de cet ARNm (Hannon, 2002). Cette technique requiert la connaissance de la séquence codante de la protéine d'intérêt.

### **5.4 Ajout de fonction**

Cette approche requiert la connaissance des séquences codantes de la protéine d'intérêt. Les séquences codantes complètes ou partielles peuvent être clonées dans différents vecteurs procaryotes ou eucaryotes. Par la suite, ces vecteurs sont transformés ou transfectés et les effets de la production de la protéine par l'organisme hôte sont observés.

## 5.5 ScFv

Un scFv est un mini anticorps, six fois plus petit que l'anticorps parental, composé des parties variables de la chaîne lourde ( $V_H$ ) et de la chaîne légère ( $V_L$ ) d'un anticorps monoclonal qui sont liées par un polypeptide flexible composé de quatre glycines et une sérine répétées trois fois,  $(Gly_4Ser)_3$ . Les scFvs sont fabriqués à partir des anticorps monoclonaux et conservent donc le site de liaison à l'antigène ainsi que sa spécificité pour celui-ci (figure 4). Les scFvs, comme dit plus haut, sont composés d'un  $V_H$  et d'un  $V_L$  liés artificiellement par un polypeptide flexible et sont exprimés comme un simple polypeptide.



**Figure 4. Structure d'un scFv.**

**A.** Structure d'un anticorps monoclonal IgG. Molécule bivalente composée de deux chaînes lourdes et légères identiques. **B.** Structure d'un scFv. La chaîne lourde variable et la chaîne légère variable sont liées ensemble par un polypeptide flexible composé de  $(Gly_4Ser)_3$ .

Des bibliothèques de  $V_H$  seulement ont aussi été construites, car il semblerait que la spécificité de liaison résiderait dans le  $V_H$  et que le  $V_L$  contribuerait pour l'affinité et que dans certaines circonstances, la liaison des scFvs à leurs cibles aient été inhibée par la présence du  $V_L$  (Cai

et Garen, 1997). On peut modifier les scFvs en leur ajoutant des signaux de trafic intracellulaire comme un signal de sécrétion, un signal de rétention dans la lumière du RE, à la membrane du trans-médian Golgi, à la mitochondrie ou un signal de localisation nucléaire (Marasco et Dana Jones, 1998). Cependant, les niveaux d'expression et de stabilité des scFvs dépendent du compartiment cellulaire où ils sont localisés (Biocca et al., 1995). Les scFvs ciblés dans la voie de sécrétion, au RE, au trans-médian Golgi et à la mitochondrie sont plus stables, car les liens disulfures intrachâînes sont correctement formés. Ces liens, au contraire, ne se forment pas pour les scFvs ciblés au cytosol à cause de l'environnement réducteur de celui-ci (Biocca et al., 1995). Ce problème peut être évité en introduisant des mutations qui vont stabiliser le scFv dans le cytoplasme (Martineau et al., 1998). Alors, avec cette méthode nous pouvons bloquer une protéine cible à l'intérieur de la cellule et aucune séquence codante n'est nécessaire pour pouvoir l'étudier.

### **5.5.1 Exemples d'utilisation des scFvs**

Les scFvs peuvent bloquer des interactions cibles entre des protéines, moduler des interactions enzymatiques en bloquant des sites actifs et peuvent séquestrer des molécules dans des compartiments cellulaires ce qui va interférer avec le trafic normal de la molécule cible (Marasco et Dana Jones, 1998). À cause de leur petite taille, les scFvs ont plusieurs avantages pour des applications cliniques. Ils peuvent être éliminés plus rapidement du sérum comparativement aux anticorps monoclonaux, ils sont moins immunogéniques et ont un niveau de bruit de fond plus faible en imagerie, car ils ne possèdent pas la portion Fc des anticorps qui est habituellement reconnue par les récepteurs cellulaires. Finalement, ils

peuvent pénétrer la micro-circulation entourant les tumeurs solides mieux que les anticorps monoclonaux (Bird et al., 1988).

Généralement, les scFvs sont développés comme outil analytique pour effectuer une inhibition ou une séquestration d'une molécule cible. Suite aux résultats obtenus, les scFvs peuvent être utilisés directement comme une drogue, par exemple contre des molécules de surface cellulaire s'ils sont neutralisants ou d'autres outils peuvent être générés contre la molécule cible qui seront plus appropriés ou efficaces que les scFvs en essais cliniques, comme des virus en thérapie génique. Il est avantageux de vérifier les effets d'une inhibition d'une protéine à l'aide des scFvs avant, par exemple, de produire des virus, car ces outils sont faciles et rapides à produire et à utiliser et ne sont pas très dispendieux. Les scFvs ont été utilisés à plusieurs escients pour étudier les rôles de différentes protéines. Tout d'abord, des scFvs ont été construits pour cibler des protéines du virus du VIH. Le scFv 105 cible la protéine gp160 du VIH, la retient dans le RE et l'empêche d'être clivée en protéines gp120 et gp41 qui sont nécessaires pour l'assemblage viral (Marasco et al., 1993). Un scFv anti-rev, quant à lui, retient la protéine rev dans le cytoplasme, ce qui altère sa localisation cellulaire et cela permet une inhibition élevée de la réplication du VIH-1 (Duan et al., 1994). La modulation de l'apoptose induite par des drogues a été étudiée en utilisant un scFv anti-Bcl-2. En diminuant les niveaux de Bcl-2 intracellulaire, l'effet cytotoxique de la chimiothérapie est augmenté dans des cellules de cancer ovarien et du cancer du sein (Piché et al., 1998a; Piché et al., 1998b). Un scFv dirigé au RE contre le récepteur de l'interleukine 2- $\alpha$  empêche ce dernier de se localiser au niveau de la membrane plasmique et d'interagir avec l'interleukine 2 (Richardson et al., 1995). Un scFv anti-intégrine  $\alpha_4$  altère l'expression à la surface cellulaire de l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$  ce qui diminue l'adhésion et l'étalement des cellules sur

certaines ligands (Yuan et al., 1996). Un scFv dirigé contre le récepteur erbB-2 permet la séquestration de ce récepteur dans le RE et empêche son interaction avec la protéine erbB-2 qui est surexprimée dans le développement du cancer du sein (Wels et al., 1992a; Wels et al., 1992b; Beerli et al., 1994a). En plus, l'inhibition du récepteur erbB-2 entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, une inhibition de l'induction de l'expression de c-fos et de l'activation de la voie protéine kinase activée par les mitogènes (Deshanes et al., 1994; Graus-Porta et al., 1995). Finalement, un scFv contre EGFR empêche ce récepteur de jouer son rôle à la membrane plasmique et affecte la croissance cellulaire (Beerli et al., 1994b; Jannot et al., 1996).

## **5.6 Autres méthodes protéiques**

Les anticorps monoclonaux ont été beaucoup utilisés pour moduler le phénotype tumoral. Un anticorps monoclonal est une molécule bivalente composée de deux chaînes lourdes et légères identiques liées entre elles par des ponts disulfures et liens non covalents, comme illustré à la figure 4. Par exemple, des anticorps antirécepteurs qui ont été dirigés contre l'ectodomaine de p185<sup>neu</sup>, un récepteur de facteur de croissance, inhibe le phénotype des cellules transformées (O'Rourke et Greene, 1998). Par contre, l'humanisation des anticorps est coûteuse et de longue haleine, et la réponse immunitaire limite cette technique pour des applications cliniques. Les anticorps humanisés induisent les réponses hôtes anti-idiotypiques et anti-allotypiques qui sont cellules T CD4<sup>+</sup> dépendantes (O'Rourke et Greene, 1998).

Les autres méthodes protéiques consistent à utiliser le plus petit élément de liaison qui peut être obtenu à partir d'une molécule d'immunoglobuline pour inhiber la molécule cible, la peptidomimétique. La mimétique permet d'augmenter le dosage et la fréquence d'administration de ces peptides restreints lors d'essais cliniques (O'Rourke et Greene, 1998). À cause de leur petite taille (plus petit que 1 kDa), les mimétiques sont solubles dans l'eau, très résistants aux protéases, peu immunogéniques et peuvent franchir la barrière vaisseaux sanguins-cerveau (O'Rourke et Greene, 1998). Ces caractéristiques suggèrent que la peptidomimétique serait plus adéquate pour une utilisation clinique que les anticorps complets, par contre la pharmacocinétique de l'élimination des molécules peptidomimétiques n'a pas été évaluée (O'Rourke et Greene, 1998).

## **6. Hypothèse et objectifs**

Puisque CA 125 est une glycoprotéine transmembranaire, elle doit, lors de sa formation, effectuer un transit par la voie de sécrétion, c'est-à-dire le réticulum endoplasmique, les saccules du Golgi et les vésicules de sécrétion, pour se retrouver à la surface cellulaire. Notre hypothèse était qu'en construisant des scFvs dirigés contre CA 125 et en les ciblant dans ces compartiments cellulaires particuliers de la voie de sécrétion, nous pourrions empêcher CA 125 de se retrouver à la surface cellulaire et ainsi déterminer les fonctions de cet antigène dans le développement du cancer ovarien.

Nos objectifs sont de construire deux bibliothèques de scFvs contre l'antigène tumoral CA 125 à partir des hybridomes OC125 et VK-8 et de sélectionner des scFvs liant CA 125 *in vitro* et *in*

*in vivo*. Nous construirons deux librairies à partir de deux hybridomes différents car CA 125 contient deux épitopes différents. L'anticorps OC125 lie l'épitope de type A et l'anticorps VK-8 l'épitope de type B (O'Brien et al., 2001). Puisque l'anticorps OC 125 serait de plus haute affinité que l'anticorps VK-8 (Nustad et al., 1996; Nap et al., 1996; Nustad et al., 2002), nous croyons que les scFvs générés à partir de cet hybridome seront plus efficaces pour l'inhibition de CA 125. Les scFvs obtenus seront caractérisés et validés, dans un premier temps, dans un système procaryote. Par la suite, les scFvs liant CA 125 seront sous-clonés dans des vecteurs d'expression eucaryote qui permettront de cibler et de retenir ces scFvs dans la lumière du RE et dans les membranes du trans-médian Golgi. Puisque CA 125 emprunte la voie de sécrétion pour se diriger à la surface cellulaire, en ayant des scFvs ciblés dans deux compartiments cellulaires, nous augmenterons nos chances de réussite. Finalement, nous évaluerons et analyserons les conséquences de cette inhibition de surface de CA 125 dans une lignée cellulaire de cancer ovarien exprimant CA 125.



## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 7. Hybridomes et anticorps

L'hybridome VK-8 nous a été gracieusement fourni par K. O' Lloyd (Sloan-Kettering Memorial Cancer Center, New York, NY). À partir de cet hybridome, nous avons purifié l'anticorps VK-8 selon la méthode du kit *ImmunoPure IgG protein A purification* (PIERCE, Rockford, IL). Cent millilitres de surnageant des cellules VK-8 ont été recueillis, déposés dans un erlenmeyer et agités (sans faire de bulles) à 4 °C. Goutte à goutte, 100 ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturé pH 7,5 ont été ajoutés jusqu'à ce que la solution devienne opaque, et nous avons agité encore pendant 30 min à 4 °C. Les protéines ont été centrifugées à 26 712 x g 15 min à 4 °C et le culot (contenant l'anticorps) a été resuspendu dans 2 ml de PBS 1 X froid (PBS 10 X: 91 mM phosphate de sodium dibasique, 17 mM phosphate de sodium monobasique et 150 mM NaCl, pH 7,4). Les protéines ont ensuite été dialysées pendant 2 jours dans du PBS 1 X à 4 °C. Le contenu du sac à dialyse a été dilué 1 : 2 avec le tampon *ImmunoPure IgG binding* (10 mM Tris, pH 7,5). La colonne d'affinité protéine A a été équilibrée avec 5 ml de tampon *ImmunoPure IgG binding* et nous y avons appliqué l'échantillon. Par la suite, la colonne a été lavée avec 15 ml du tampon *ImmunoPure IgG binding*, les anticorps IgG ont été élués avec le tampon *ImmunoPure IgG elution* (0,1 M glycine, pH 2-3) et des fractions de 1 ml ont été récoltées et dosées par la méthode Bradford en utilisant l'essai protéique Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

L'ARNm provenant de l'hybridome OC125 ainsi que l'anticorps OC125 (anti-CA 125) nous ont généreusement été offerts par R. C. Bast (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX). L'anticorps OC125 (1 mg/ml) a été utilisé 1 : 1000 lors des immunobuvardages, 1 : 500 lors des immunofluorescences et 1 : 500 lors de la cytométrie de flux.

**Tableau 2**

**Anticorps primaires utilisés**

<b>Anticorps</b>	<b>Compagnie</b>	<b>Dilution pour immunobuvardage</b>	<b>Dilution pour immunofluorescence</b>	<b>Dilution pour cytométrie de flux</b>
Anti-E-Tag (souris)	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ	1 : 1000	-	-
Anti-c-myc 9E10 (souris)	Invitrogen, Carlsbad, CA	1 : 10 000	1 : 500	1 : 500
Anti-c-myc A-14 (lapin)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA	1 : 10 000	1 : 500	1 : 500
Anti-CA 125 clone M11 (souris)	Dako, Carpinteria, CA	1 : 750	-	1 : 500
Anti-ADP-ribosylation factor clone 1D9 (souris)	Affinity Bioreagents Inc., Hornby, ON	-	1 : 500	-
Anti-calréticuline (lapin)	Affinity Bioreagents Inc., Hornby, ON	-	1 : 1000	-
Anti- $\alpha$ -tubulin clone B-5-1-2 (souris)	SIGMA, Saint-Louis, MI	1 : 100 000	-	-
Anti-intégrine $\alpha_v\beta_5$ clone P1F6 (souris)	Chemicon International, Temecula, CA	-	1 : 1000	-
Anti-E-Cadhérine clone 36 (souris)	BD Bioscience, Mississauga, ON	1 : 2500	1 : 500	-
Anti-MUC 1 (VU4H5) (souris)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA	-	1 : 600	1 : 500

**Tableau 3**

**Anticorps secondaires utilisés**

<b>Anticorps</b>	<b>Compagnie</b>	<b>Dilution pour immunobuvardage</b>	<b>Dilution pour immunofluorescence</b>	<b>Dilution pour cytométrie de flux</b>
Anti-souris IgG conjugué à la peroxidase (HRP)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA	1 : 10 000	-	-
Anti-lapin IgG conjugué à la peroxidase (HRP)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA	1 : 10 000	-	-
Anti-souris IgG conjugué à la R-Phycoérythrine (PE)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA	-	-	1 : 1000
Anti-lapin IgG conjugué à la Fluorescéine (FITC)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA	-	-	1: 1000
Anti-souris IgG conjugué à l' <i>Oregon green</i>	Molecular Probes, Eugene, OR	-	1 : 1000	-
Anti-souris IgG conjugué au <i>Texas Red</i>	Molecular Probes, Eugene, OR	-	1 : 1200	-
Anti-lapin IgG conjugué à l' <i>Oregon Green</i>	Molecular Probes, Eugene, OR	-	1 : 1000	-
Anti-lapin IgG conjugué au <i>Texas Red</i>	Molecular Probes, Eugene, OR	-	1 : 1000	-

## 8. Isolation de l'ARNm

Les ARNm de la lignée cellulaire VK-8 ont été isolés selon le protocole du kit PolyAtract® (Promega, Madison, WI). En premier lieu, à  $1 \times 10^7$  cellules centrifugées 5 min à 300 x g et lavées avec 25 ml de PBS 1 X froid on a ajouté 4 ml de tampon d'extraction (4 M de guanidine thiocyanate et 25 mM de citrate de sodium, pH 7,1) contenant 164  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol (48,7 %), 8 ml de tampon de dilution préchauffé à 70 °C (6 X de tampon SSC, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA et 0,25 % SDS, pH 7,4 où le tampon SSC 20 X est composé de 3 M NaCl et de 0,34 M citrate de sodium, pH 7,2) contenant aussi 164  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol (48,7 %) et 10  $\mu$ l d'amorces oligo(dT) biotinylées. Nous avons incubé ce mélange 5 min à 70 °C, les amorces se sont donc liées spécifiquement aux queues poly-A qui sont seulement présentes à l'extrémité 3' de l'ARNm. Le lysat a ensuite été centrifugé 10 min à 12 000 x g à température pièce. Durant cette centrifugation on a transféré 6 ml de particules SA-PMPs (particules paramagnétiques *MagneSphere* liées à la streptavidine) dans un tube stérile de 50 ml et ce tube a été placé dans le support magnétique à l'horizontale pour retenir les particules magnétiques. En inversant ce montage, on a enlevé le tampon d'entreposage. Ensuite, les particules ont été resuspendues dans 6 ml de tampon SSC 0,5 X pour être lavées, le tube a encore été placé dans le support magnétique à l'horizontale pour retenir les particules magnétiques et en inversant le montage, on a enlevé le tampon. Cette étape a été répétée 3 fois et les particules ont été resuspendues dans 6 ml du même tampon. Après la centrifugation, le surnageant a été recueilli et ajouté aux particules magnétiques dans le tampon SSC 0,5 X et mélangé par inversion. Ce mélange a été incubé 2 min à température de la pièce. En utilisant le support magnétique les particules ont été conservées

tandis que le tampon a été éliminé. De cette manière, les particules de fer liées aux oligo(dT) peuvent se lier au support magnétique, ce qui permet de retenir l'ARNm par la même occasion et ainsi d'éliminer tous les autres ARNs et produits cellulaires. Les particules ont été lavées trois fois avec 2 ml de tampon SSC 0,5 X en éliminant toujours le tampon entre chaque lavage avec le support magnétique. Finalement, une élution a été effectuée pour recueillir les ARNm avec 1 ml d'eau sans RNase, les particules ont été retenues avec le support magnétique et nous avons conservé les ARNm en solution dans l'eau.

## 9. Synthèse d'ADNc

La synthèse des ADNc a été produite selon la méthode du kit *Mouse scFv module* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Les ARNm ont été incubés 10 min à 65 °C et refroidis immédiatement sur glace pour un maximum de 2 min. À 20 µl d'ARNm nous avons ajouté 11 µl d'un mélange d'amorces (transcriptase inverse murin, hexadéoxyribonucléotides mélangés [pd(N)<sub>6</sub>], *RNAgard*, BSA sans RNase ni DNase, dATP, dCTP, dGTP et dTTP dans un tampon aqueux), 0,2 µM DTT et le volume a été complété à 33 µl avec de l'eau sans RNase. Ce mélange a été incubé 1 h à 37 °C.

## 10. Amplification par PCR

L'amplification primaire des ADNc pour générer les  $V_H$  et les  $V_L$  a été produite selon la méthode du kit *Mouse scFv module*. Pour l'amplification des chaînes légères, 33  $\mu$ l de la réaction de synthèse des ADNc ont été ajoutés à 2  $\mu$ l d'un mélange d'amorces pour chaînes légères (mélange de 10 amorces de chaînes légères variables (chacune en 5' et 3') dans l'eau) et 64  $\mu$ l d'eau stérile. Pour l'amplification des chaînes lourdes, 33  $\mu$ l de la réaction de synthèse des ADNc ont été ajoutés à 2  $\mu$ l d'amorce lourde # 1 (amorce de chaîne lourde en 5' dans l'eau), 2  $\mu$ l d'amorce lourde # 2 (amorce de chaîne lourde en 3' dans l'eau) et 62  $\mu$ l d'eau stérile. Cent microlitres d'huile minérale ont été ajoutés pour chacune des réactions et incubés 5 min à 94 °C. Ensuite, 2,5 U d'ADN polymérase AmpliTaq ont été ajoutés pour chacune des réactions et nous avons effectué un PCR (PTC-200 MJ *Research*) selon le programme suivant: 30 cycles avec des incubations de 94 °C pour 1 min, 55 °C pendant 2 min et 72 °C pendant 2 min. Les chaînes lourdes et légères ont été purifiées par extraction sur gel d'agarose selon la méthode du kit *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN, Mississauga, ON). Les ADNc de chacune des bibliothèques de chaînes lourdes et légères ont migré sur un gel d'agarose 0,6 %. Les fragments ont été excisés du gel avec une lame de rasoir propre, pesés et 2 volumes de tampon QG ont été ajoutés par volume de gel. Après une incubation de 10 min à 50 °C pour faire fondre le gel, 10  $\mu$ l d'acétate d'ammonium 7,5 M ont été ajoutés ainsi qu'un volume de gel d'isopropanol et le tout mélangé. Ce mélange a été déposé dans une colonne QIAquick et centrifugé 2 min à 16 520 x g à température pièce. L'éluat a été jeté et nous avons centrifugé de nouveau pendant 2 min à 16 520 x g à température pièce. Pour laver l'ADN, 0,75 ml de tampon PE ont été ajoutés, incubés 5 min à

température de la pièce et centrifugés 3 min à 16 520 x g à température pièce. Finalement, l'éluat a été jeté et la colonne centrifugée de nouveau pendant 3 min à température pièce. L'ADN a été élué avec l'ajout de 30 µl du tampon d'éluion EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) incubé 5 min à température pièce et centrifugé 2 min à 16 520 x g à température pièce. En dernier lieu, les librairies purifiées ont été quantifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,6 %.

## 11. Réaction d'assemblage

Après purification par extraction sur gel d'agarose et dosage par spectrophotométrie, les chaînes lourdes et les chaînes légères ont été liées entre elles par un polypeptide flexible composé de (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> qui était fourni dans le kit *mouse scFv module*. Pour que la réaction soit efficace, 50 ng de chacun des produits ont été nécessaires, qui ont été ajoutés à 4 µl d'un mélange d'amorces du polypeptide flexible (mélange équimolaire des amorces 3' lourdes et 5' légères du polypeptide flexible), 5 µl du tampon de PCR 10 X (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % gélatine, pH 8,3), 2,5 µl d'un mélange de dNTPs (20 mM de chacun des dNTP), 2,5 U d'ADN polymérase AmpliTaq et le volume a été complété avec de l'eau stérile à 50 µl. Après ajout de 50 µl d'huile minérale nous avons effectué un PCR selon le programme suivant: 7 cycles avec des incubations de 94 °C pour 1 min et 63 °C pendant 4 min (Pharmacia biotech, 1995). Finalement, pour obtenir la librairie de scFvs, une deuxième amplification par PCR a été effectuée. Cette étape, à l'aide d'amorces fournies dans le kit *mouse scFv module*, a permis d'ajouter des sites de restriction à l'ADN ainsi qu'à

l'amplifier. Le site Sfi1 a été ajouté en 5' des scFvs et le site Not1 en 3'. La réaction de PCR contenait les composantes de la réaction d'assemblage (après le PCR), 2,5 U d'ADN polymérase PWO (Roche Diagnostics, Laval, QUÉ), 5 µl de tampon de PCR 10 X contenant du MgSO<sub>4</sub> (100 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 20 mM de MgSO<sub>4</sub>, pH 8,85), 2,5 µl d'un mélange de dNTPs (20 mM de chacun des dNTP), 4 µl d'un mélange d'amorces RS (mélange d'amorces de chaînes lourdes en 5' avec le site Sfi1 et d'amorces de chaînes légères avec le site Not1 dans l'eau) et 39 µl d'eau stérile. Après l'ajout de 50 µl d'huile minérale nous avons effectué un PCR selon le programme suivant: 30 cycles avec des incubations de 94 °C pour 1 min, 55 °C pendant 2 min et 72 °C pendant 2 min (Pharmacia biotech, 1995). Finalement, la librairie de scFvs a été purifiée par extraction sur gel d'agarose et dosée par spectrophotométrie.

## 12. Clonage

La librairie de scFvs a été digérée avec les enzymes Sfi1 (New England BioLabs, Pickering, ON) à 50 °C pendant 4 h et Not1 (New England BioLabs, Pickering, ON) toute la nuit à 37 °C pour générer les sites de restriction qui avaient été ajoutés par PCR. Ces digestions ont permis le clonage des librairies dans le vecteur procaryote pCantab-5E (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) ainsi que dans les vecteurs d'expression eucaryote pSTCF.KDEL, pSTCF.Golgi, pLTR.KDEL et pLTR.Golgi, linéarisés par ces mêmes enzymes, mais pendant 1 h 30 à 50 °C pour Sfi1 et 1 h à 37 °C pour Not1. Les digestions avec l'enzyme Sfi1 étaient composées d'une quantité appropriée d'ADN, de 2 µl de tampon



NE2 10 X (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM DTT, pH 7,9), 0,2 µl de BSA 100 X, 20 U de l'enzyme Sfi1 et le volume était complété à 20 µl. Les digestions avec l'enzyme Not1 étaient composées d'une quantité appropriée d'ADN, de 2 µl de tampon NE3 10 X (1 M NaCl, 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM DTT, pH 7,9), 0,2 µl de BSA 100 X, 10 U de l'enzyme Not1 et le volume était complété à 20 µl. Par la suite, le vecteur procaryote pCantab-5E a été ligué avec chacune des librairies de scFvs, tandis que les vecteurs eucaryotes ont été ligués avec les scFvs sélectionnés, c'est-à-dire OC125 # 3:11, VK-8 # 1:9 et VK-8 # 4:5. La réaction de ligation était composée de 100 ng de librairie ou de scFvs, 200 ng de vecteur, 1,5 µl de tampon de ligation 10 X (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 10 mM ATP et 25 µg/ml BSA, pH 7,5) supplémenté de 1 mM ATP additionnel, 400 U de T4 ADN ligase (New England BioLabs, Pickering, ON) et le volume était complété à 15 µl avec de l'eau. Ces réactions ont été incubées toute la nuit à 16 °C. Les clones ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose.

## 12.1 Description des plasmides

Le vecteur d'expression procaryote pCantab-5E (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), illustré à la figure 9, contient un promoteur *lac* permettant d'avoir un système inductible en présence d'IPTG et répressible en présence de glucose, un signal g3 qui est le signal de sécrétion "peptide leader", une étiquette peptidique E-Tag, reconnue par l'anticorps anti-E-Tag et un codon d'arrêt reconnu dans les souches bactériennes non suppressseures. Quand une souche suppressseure de *E. coli*, comme les TG-1, est transformée avec le vecteur

recombinant, la transcription continue à travers le codon d'arrêt ambre pour produire les protéines de fusion scFvs-g3p qui sont exposées à la surface des filaments du phage. Par contre, dans une souche non supresseuse de *E. coli*, comme les XL1 blue, le codon d'arrêt est reconnu et la synthèse des protéines est arrêtée à la fin de l'ADNc des scFvs, les protéines de fusion g3p ne sont pas produites et les scFvs résultants sont solubles, transportés et accumulés dans l'espace périplasmique des bactéries.

Le vecteur d'expression eucaryote pSTCF (modifié à partir du vecteur pSecTag; Invitrogen, Carlsbad, CA), comme illustré à la figure 14 A, contient un promoteur fort CMV, une étiquette peptidique c-myc reconnue par l'anticorps anti-c-myc et soit un signal de sécrétion qui dirige les scFvs dans la voie de sécrétion (IgK) couplé à une séquence de rétention au niveau de la lumière du RE (KDEL) ou un signal Golgi qui permet de diriger les scFvs dans la voie de sécrétion et leur rétention au niveau des membranes du trans-médian Golgi.

Le vecteur d'expression eucaryote rétroviral pLTR (Kasono et al., 2000) (figure 18) comprend deux extrémités LTR qui vont permettre l'intégration de notre construction dans l'ADN de la cellule hôte, un promoteur fort CMV régulé par la tétracycline, c'est-à-dire que l'expression des scFvs est inductible en présence de tétracycline ou d'un analogue de la tétracycline, comme la doxycycline et une séquence rtTA-IRES-BSD qui permet une sélection de nos clones en présence de blasticidine. Nous avons utilisé la doxycycline pour l'induction de l'expression des scFvs, car cette drogue est moins toxique pour les cellules *in vitro* et *in vivo*, car la poudre est dissoute dans de l'eau comparativement à dans de l'éthanol dans le cas de la tétracycline. Le vecteur comprend aussi un signal qui dirige les scFvs dans la voie de sécrétion (IgK) couplé à une séquence de rétention au niveau de la lumière du RE

(KDEL) ou un signal Golgi qui permet de diriger les scFvs dans la voie de sécrétion et leur rétention au niveau des membranes du trans-médian Golgi.

### **13. *Colony lift assay***

L'ADN plasmidique des bibliothèques OC125 et VK-8 dans la construction pCantab-5E/scFvs a été dilué 1 : 90 000 dans l'eau et transformé par électroporation avec les bactéries XL1 blue électrocompétentes, qui ont été étalées sur 10 pétris de milieu 2XYT (pour 1 l: 17 g de bactotryptone, 10 g d'extrait de levures et 5 g de NaCl) supplémenté de 100 µg/ml d'ampicilline et de glucose 2 % (2XYT + AG) et incubées 24 h à 30 °C. Le glucose inhibe l'expression des scFvs, car leur production en grande quantité est toxique pour les bactéries. Le lendemain, pour la bibliothèque VK-8, des membranes de nitrocellulose Butterfly (Scheicher & Schell, Keene, NH) ont été déposées sur les pétris, retirées et déposées de manière inversée (colonies vers le haut) sur 10 pétris de milieu 2XYT supplémenté de 100 µg/ml d'ampicilline et de 0,1 mM d'IPTG (2XYT + AI) et incubées 3 h à 37 °C pour induire l'expression des scFvs. Pour la bibliothèque OC125, les membranes de nitrocellulose ont été déposées, colonies vers le haut, sur des membranes préalablement incubées 1 h à température de la pièce dans 1500 U/ml de l'antigène CA 125 purifié commercialement (Bioscience International, Saco, MA) dilué dans du TBS 1 X (TBS 10 X : 1,37 M de NaCl, 26,8 mM de KCl et 247,6 mM de Tris) sur les pétris 2XYT-AI. Ces membranes après avoir été incubées avec l'antigène CA 125, ont été séchées 5 min à température pièce, bloquées dans une solution de lait 2 %/TBS 1 X/Tween 20 (BioRad Laboratories, Hercules, CA) 0,1 % 1 h à

température pièce avec agitation, lavées avec du TBS 1 X et séchées à nouveau. Les autres pétris (2XYT + AG) ont été incubés à nouveau à 30 °C pour la nuit. Après l'incubation de 3 h, les membranes avec les colonies ont été retirées des pétris, inversées à nouveau et lavées trois fois avec la solution de lavage TBS 1 X/Tween 20 0,1 %. Ensuite, un lavage a été effectué avec 0,1 % d'azide de sodium dilué dans la solution de lavage et finalement, les membranes ont été relavées trois fois avec la solution de lavage. Les membranes ont été réinversées (colonies vers le haut) et bloquées dans 2 % de lait en poudre écrémé dilué dans la solution de lavage en agitant 1 h à température de la pièce. Finalement, la solution de blocage a été retirée et les membranes ont été incubées toute la nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire anti-E-Tag dilué 1 : 1000 dans la solution de blocage. Le lendemain, les membranes ont été lavées trois fois pendant 5 min dans la solution de lavage, ensuite l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à la peroxydase (HRP) dilué 1 : 2000 dans la solution de blocage a été ajouté et les membranes ont été incubées avec agitation 2 h à température de la pièce. Ensuite, les membranes ont été lavées trois fois pendant 5 min dans la solution de lavage et un dernier lavage a été effectué avec du TBS 1 X. Finalement, les membranes ont été développées avec le substrat de 4-chloro-1-naphthol (SIGMA, Saint-Louis, MI). Trente milligrammes de 4-chloro-1-naphthol ont été dissouts dans 20 ml de méthanol. La solution de révélation contenait 14 ml de cette dissolution, 70 ml de triéthanolamine salin à pH 7,5 et 35 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %. L'incubation a eu lieu pendant 30 min à température de la pièce avec agitation à l'obscurité. Les membranes ont ensuite été rincées à l'eau courante et les colonies positives (bleues, mauves), exprimant des scFvs solubles, ont été piquées et cultivées dans 3 ml de milieu 2XYT + AG toute la nuit à 30 °C.

#### **14. Extraits périplasmiques**

Un millilitre de culture de chacune des colonies positives, obtenues par *colony lift assay*, a été prélevé, dilué dans 10 ml de milieu 2XYT + AG et incubé à 30 °C 1 h avec agitation à 250 rpm. Ensuite, les bactéries ont été centrifugées 20 min à 742 x g à 4 °C, resuspendues dans 10 ml de milieu 2XYT + AI et incubées 3 h à 30 °C avec une agitation de 250 rpm. Les bactéries ont été centrifugées à nouveau 15 min à 1454 x g à 4 °C et resuspendues dans 600 µl de tampon TES 1 X (0,2 M de Tris-HCl, 0,5 mM d'EDTA et 0,5 M de sucrose, pH 8,0) en vortexant. Les échantillons ont été conservés 30 min sur glace en vortexant aux 5 min et ensuite centrifugés 10 min à 16 060 x g à 4 °C. Les surnageants (extraits périplasmiques contenant les scFvs) ont ensuite été recueillis pour effectuer des essais d'affinité par ELISA et des immunobuvardages.

#### **15. ELISA**

Dans un premier temps, pour déterminer l'expression des scFvs, les plaques ELISA ont été incubées à 4 °C toute la nuit avec 200 µl de chacun des extraits périplasmiques des scFvs. Cent microlitres de chacun des contrôles négatifs, PBS 1 X et les bactéries XL1 blue, ont été incubés avec 100 µl d'une solution de 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6 ainsi que 1 µg/ml d'anticorps monoclonal OC125 et de 2,5 µg/ml d'anticorps monoclonal VK-8 (contrôles positifs). Le lendemain, les puits ont été lavés avec du PBS 1 X trois fois. Le blocage a eu

lieu avec 2 % de lait en poudre dilué dans du PBS 1 X 1 h à 37 °C (pour le scFv OC125 # 3:11) ou à 30 °C (pour les scFvs VK-8 # 1:9 et # 4:5) et l'anticorps primaire anti-E-Tag dilué 1 : 1000 dans la solution de blocage a été incubé 1 h à 37 °C (scFv OC125) ou à 30 °C (scFvs VK-8). Les puits ont été lavés 6 fois au PBS 1 X/Tween 20 0,1 % (scFv OC125) ou avec du PBS 1 X/Tween 20 0,05 % (scFvs VK-8) et l'anticorps secondaire anti-souris conjugué à la peroxydase dilué 1 : 2000 dans la solution de blocage a été ajouté et incubé 1 h à 37 °C (scFv OC125) ou à 30 °C (scFvs VK-8). Les puits ont finalement été lavés 10 fois avec du PBS 1 X/Tween 20 0,1 % (scFv OC125) ou PBS 1 X/Tween 20 0,05 % (scFvs VK-8), les plaques ont été révélées avec 100 µl du substrat *CobasCore* (Roche Diagnostics, Laval, QUÉ) et incubées 15 min à la température de la pièce, ensuite 100 µl d'acide sulfurique 1 N ont été ajoutés et la densité optique a été lue à 450 nm avec un lecteur de plaque ELISA *Sunrise TECAN* (ESBE Scientific, Markham On).

Dans un deuxième temps, pour déterminer la liaison entre les scFvs et CA 125, les plaques ELISA ont été incubées à 4 °C toute la nuit avec 1500 U/ml de l'antigène CA 125 purifié commercialement dilué dans la solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>. Le lendemain, les puits ont été lavés trois fois avec du PBS 1 X et le blocage a eu lieu comme précédemment. Les échantillons (100 µl de chaque extrait périplasmique + 100 µl de tampon de blocage) ont ensuite été ajoutés et incubés 1 h à 37 °C (scFv OC125) ou à 30 °C (scFvs VK-8). Les puits ont été lavés 6 fois avec du PBS 1 X/Tween 20 0,1 % (scFv OC125) ou PBS 1 X/Tween 20 0,05 % (scFvs VK-8) et l'anticorps primaire anti-E-Tag dilué 1 : 1000 dans la solution de blocage a été incubé 1 h à 37 °C (scFv OC125) ou à 30 °C (scFvs VK-8). La suite de l'expérimentation est la même que mentionnée plus haut.

## 16. Gel SDS et immunobuvardage

Pour l'immunobuvardage, un gel séparateur de 7,5 % (lorsque l'expression de CA 125 est observée) ou un gel séparateur de 12 % (dans les autres cas) et un gel concentrateur de 4 % dénaturant ont été coulés. La migration s'est effectuée à 150 volts 1 h à température de la pièce. Le transfert s'est effectué sur des membranes de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) pendant 1 h 30 à 300 milliampères à 4 °C. Le blocage des membranes s'est effectué pendant 1 h à température de la pièce avec agitation dans une solution de PBS 1 X/Tween 20 0,1 %/BSA 3 % ou de PBS 1 X/Tween 20 0,1 %/lait écrémé 4 %, selon les directives des manufacturiers. Les anticorps primaires ont été dilués dans la solution de blocage et les membranes ont été incubées toute la nuit à 4 °C, avec agitation. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois pendant 20 min avec du PBS 1 X/Tween 20 0,1 % et les anticorps secondaires ont été dilués dans la solution de blocage et ajoutés aux membranes qui ont été incubées 45 min à température de la pièce avec agitation. Les membranes ont ensuite été lavées de nouveau avec du PBS 1 X/Tween 20 0,1 % (trois fois pendant 20 min), révélées avec le système ECL + (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) et visualisées par autoradiogramme.

## 17. Culture cellulaire

### 17.1 Lignées cellulaires et réactifs

La lignée cellulaire épithéliale et cancéreuse NIH OVCAR-3 (ATCC, Rockville, MD) est dérivée d'ascites d'un adénocarcinome ovarien exprimant constitutivement CA 125, maintenue en culture dans du milieu RPMI 1640 (Biomédia Canada Inc., Drummondville, QUÉ) supplémenté de 20% FBS (Biomédia Canada Inc., Drummondville, QUÉ), 4 mM de L-Glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 10 µg/ml d'insuline (SIGMA, St-Louis, MO) et 2,5 µg/ml de fongizone.

Les cellules COS-7 (ATCC, Rockville, MD) sont une lignée cellulaire de fibroblastes transformés avec l'antigène SV-40 dérivant du rein du singe vert Africain *Cercopithecus aethiops* faiblement positive pour CA 125. Ces cellules ont été maintenues dans du milieu DMEM F-12 plus 4,5 g/l glucose (Biomédia Canada Inc., Drummondville, QUÉ) supplémenté de 10 % FBS, 2 mM de L-Glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2,5 µg/ml de fongizone.

Les lignées cellulaires ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère de 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules ont subi des passages routiniers 1 : 3 pour les NIH OVCAR-3 ou 1 : 10 pour les COS-7. Brièvement, ces passages étaient constitués d'un lavage avec 5 ml de PBS 1 X, une incubation avec 2 ml de versène/EDTA 0,54 mM avec trypsine diluée 1 : 5 pour pouvoir



recueillir les cellules et d'une centrifugation à 194,5 x g pendant 5 min à 4 °C. Les cellules étaient ensuite divisées dans plusieurs flacons T-75.

### **17.2 Transfection cellulaire transitoire**

La veille de la transfection (pour les cellules COS-7) ou deux jours avant (pour les cellules NIH OVCAR-3), 300 000 cellules ont été étalées dans des plaques 6 puits contenant 3 ml de milieu complet. Dans un eppendorf ont été mélangé 100 µl du milieu approprié sans sérum, 3 µl de FuGENE (Roche Diagnostics, Laval, QUÉ) et 1 µg d'ADN et le tout a été incubé 1 h 30 à température de la pièce et ajouté ensuite aux cellules. Après une incubation de 72 h des lyses cellulaires ont été effectuées.

### **17.3 Transfection cellulaire stable**

Deux jours avant la transfection, 600 000 cellules NIH OVCAR-3 ont été étalées dans des pétris de 6 cm contenant 4 ml de milieu complet. Dans un eppendorf ont été mélangé 100 µl de milieu RPMI 1640 sans sérum, 6 µl de FuGENE et 2 µg d'ADN linéarisé avec 100 U de l'enzyme ScaI (New England BioLabs, Pickering, ON) pour libérer les extrémités LTR qui vont permettre l'intégration dans le chromosome et le tout a été incubé 1 h 30 à température de la pièce et ajouté aux cellules. Cinq jours plus tard, 1,5 µg/ml de blasticidine

(Calbiochem, La Jolla, CA) ont été ajoutés aux cellules pour une sélection de 10 jours, ce qui a permis aux cellules n'ayant pas intégré de plasmide de mourir. Par la suite, une concentration de 1 µg/ml de blasticidine a toujours été maintenue avec les clones stables. Lorsque des foyers de cellules ont été distingués, ils ont été prélevés à l'aide d'un petit anneau de métal et transférés dans une plaque 96 puits. Chacun des différents clones a ensuite été amplifié successivement en plaque 24 puits, 12 puits, 6 puits, en flacon T-25 et finalement en flacon T-75. L'induction de la production des scFvs a été possible par l'ajout de 1 µg/ml de doxycycline (SIGMA, Saint-Louis, MI).

#### **17.4 Lyse cellulaire**

Les cellules ont été lavées avec 3 ml (plaque 6 puits) ou 5 ml (flacon T-75) de PBS 1 X et lysées avec 250 µl (plaque 6 puits) ou 750 µl (flacon T-75) de tampon de lyse NP-40 1 X (0,01 M de Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,01 M MgCl<sub>2</sub> et 0,5 % NP-40, pH 7,3) contenant des inhibiteurs de protéases (1 µg/ml de AEBSF (SIGMA, Saint-Louis, MI), 0,5 µg/ml de leupeptine (SIGMA, Saint-Louis, MI), 20 µg/ml d'aprotinine (Roche Diagnostics, Laval, QUÉ) et 0,7 µg/ml de pepstatine A (SIGMA, Saint-Louis, MI) pendant 20 min sur glace avec agitation douce. Le lysat a été recueilli et centrifugé 5 min à 16 060 x g à 4 °C, le surnageant cellulaire a été conservé et utilisé pour les expérimentations. La concentration protéique des échantillons a été mesurée par la méthode Bradford en utilisant l'essai protéique Bio-Rad.

## **18. Immunoprécipitation**

Les immunoprécipitations ont été effectuées à partir des lysats cellulaires. Tout d'abord, 300 µg de lysats protéiques ont été incubés avec 1 µg d'anticorps pendant une heure sur glace sans agitation. Ensuite, 30 µl de protéines G-Agarose (Roche Diagnostics, Laval, QUÉ), préalablement lavées trois fois avec 500 µl de tampon d'immunoprécipitation (0,5 % NP-40, 0,5 % de sodium déoxycholate, 0,1 % SDS, 0,1 M NaCl, 0,001 M EDTA et 0,02 M de Tris-HCl, pH 8,0) et resuspendues 1 : 2 dans ce même tampon, ont été ajoutés et incubés 1 h à 4 °C avec agitation. Le complexe a ensuite été centrifugé 5 min à 2376 x g et lavé trois fois avec 500 µl de tampon d'immunoprécipitation. Après le dernier lavage, les billes ont été resuspendues dans 40 µl de tampon d'immunoprécipitation et chauffées à 95 °C pendant 5 min. Finalement, les billes ont été centrifugées 10 min à 2376 x g et le surnageant a été conservé pour effectuer des immunobuvardages.

## **19. Immunofluorescence indirecte sur lame**

Les cellules ont été déposées sur des lames dans des pétris et incubées à 37 °C pendant 6 h pour bien faire adhérer les cellules à la lame. Par la suite, 10 ml de milieu complet ont été ajoutés dans les pétris et les cellules ont été incubées pendant 48 h. Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 50-75 %, les lames ont été rincées avec du PBS 1 X froid et les cellules fixées dans du méthanol froid pendant 10 min à -20 °C. Nous avons délimité des

zones de confluences cellulaires acceptables sur les lames avec un crayon à pointe de diamant. Les lames ont été lavées 5 min avec agitation avec du PBS 1 X froid à 4 °C, 5 min avec agitation avec du PBS 1 X/Triton X-100 0,1 % froid à 4 °C et encore 5 min avec agitation avec du PBS 1 X froid à 4 °C. Ensuite, les lames ont été bloquées 45 min à 4 °C avec du PBS 1 X/BSA 2 % et incubées avec l'anticorps primaire approprié dilué dans 2 % BSA/PBS 1 X 1 h à température de la pièce. Après cette incubation, les lames ont été lavées 3 fois 10 min dans du PBS 1 X froid avec agitation à 4 °C et incubées avec l'anticorps secondaire approprié dilué dans 2 % BSA/PBS 1 X dans le noir 30 min à température pièce. Finalement, les lames ont été lavées 2 fois dans le noir pendant 10 min avec du PBS 1 X froid avec agitation à 4 °C et une goutte de milieu de montage (100 mg de p-phénylènediamine dissout dans 10 ml de PBS 1 X, pH 9,0 et ajouté à 90 ml de glycérol, ce mélange était conservé à -80 °C) a été déposée sur la lame et recouverte d'une lamelle. La visualisation a eu lieu sur un microscope à fluorescence Olympus 1X70.

## **20. Cytométrie de flux**

Pour chacun des échantillons 900 000 cellules ont été étalées dans des pétris 10 cm et incubées pendant 72 h à 37 °C. Les cellules ont été récoltées avec l'ajout de versène/EDTA sans trypsine pour ne pas affecter les protéines présentes à la surface cellulaire avec l'ajout de trypsine. Les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de PBS 1 X et comptées, entre  $5 \times 10^5$  et  $1 \times 10^6$  cellules sont nécessaires. Les cellules ont été centrifugées 1 min 30 à 855 x g à température de la pièce et fixées dans 250 µl de paraformaldéhyde 2 % filtré (préparé dans du PBS 1 X) 20 min à température pièce. Ensuite, les cellules ont été centrifugées 1 min 30 à

855 x g à température pièce et perméabilisées avec 500 µl de 0,1 % saponine diluée dans du PBS 1 X 20 min à température pièce. Par la suite, les cellules ont été centrifugées 2 min à 7062 x g à température de la pièce et incubées 45 min à température pièce avec l'anticorps primaire approprié dilué dans 2 % BSA/PBS 1 X, dans un volume de 500 µl. Nous avons par la suite centrifugé les cellules 2 min à 7062 x g à température pièce, elles ont été resuspendues dans 500 µl de PBS 1 X et re-centrifugées 2 min à 7062 x g à température pièce. L'anticorps secondaire approprié dilué dans 2 % BSA/PBS 1 X, dans un volume de 500 µl, a été ajouté et incubé 45 min à la noirceur à température pièce. Finalement, les cellules ont été centrifugées 2 min à 7062 x g à température pièce, lavées avec 500 µl de PBS 1 X, re-centrifugées 2 min à 7062 x g à température pièce et resuspendues dans 400 µl de PBS 1 X. Les analyses ont été effectuées sur un *FACS Scan Cytometer* (Becton Dickenson, Mississauga, ON).

## **20.1 Analyse du cycle cellulaire**

Les cellules non synchronisées ont été prélevées et centrifugées à 1000 x g pendant 5 min à 4 °C. Les cellules ont ensuite été rincées 2 fois au PBS 1 X, resuspendues dans 500 µl de PBS 1 X et fixées avec 5 ml d'éthanol froid pour la nuit ou au maximum trois semaines. Cinq millions de cellules fixées ont été prélevées et centrifugées à 1000 x g pendant 5 min à 4 °C. Après avoir éliminé l'éthanol, les cellules ont été lavées 2 fois dans 5 ml de PBS 1 X/BSA 1 % et le culot a été vortexé après chacune des additions de PBS 1 X/BSA 1 %. Ensuite, le culot a été resuspendu dans 800 µl de PBS 1 X/BSA 1 %. On a ajouté 100 µl d'iodure de

propidium 10 X (500 µg/ml d'iodure de propidium (SIGMA, Saint-Louis, MI) dans 88 mM citrate de sodium, pH 7,0) ainsi que 100 µl de RNase A (10 mg/ml dans 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) (SIGMA, Saint-Louis, MI), incubée 5 min à 95 °C, au culot resuspendu dans le PBS et le tout a été incubé 30 min à 37 °C. Les analyses ont été effectuées sur un *FACS Scan Cytometer*.

## **21. Essai XTT**

Tout d'abord, 10 mg de poudre XTT (SIGMA, Saint-Louis, MI) ont été dilués dans 10 ml de PBS 1 X et incubés 30 min à 60 °C à la noirceur. Ensuite, à la noirceur nous avons incorporé 10 ml de milieu DMEM F-12 sans rouge de phénol (SIGMA, Saint-Louis, MI), la solution XTT diluée, chauffée et filtrée avec un filtre 0,22 µ et 15 µl de PMS (SIGMA, St-Louis, MO). Le milieu des plaques 96 puits, préalablement incubées 48 h avec 15 000 cellules par puits dans 200 µl de milieu complet, a été aspiré et 100 µl par puits du mélange XTT : milieu ont été ajoutés. La densité optique a été lue à 450 nm avec un lecteur de plaque ELISA *Sunrise TECAN* après une incubation de 30 min dans le noir à température pièce.

## **22. Essai de clonogénicité**

Dans des plaques 6 puits, contenant 3 ml de milieu complet, 100, 200, 300, 400, 500 et 1000 cellules ont étéensemencées. Les cellules ont été incubées pendant 14 jours et les foyers de cellules formés ont été fixés, colorés au Giemsa et comptés. Coloration au Giemsa: les cellules ont été rincées avec 1 ml de PBS 1 X et avec 1 ml d'un mélange PBS 1 X : méthanol (1 : 1). Les cellules ont ensuite été incubées 10 min avec 1 ml de méthanol et rincées de nouveau avec 1 ml de méthanol. Les cellules ont été incubées 2 min avec 1 ml de colorant Giemsa (GIBCO BRL, Grand Island, NY) et 4 ml d'eau stérile ont été ajoutés dans chacun des puits pour diluer le Giemsa et une incubation de 2 min a eu lieu. Enfin, les plaques ont été rincées à l'eau courante pendant 4 min.

## **23. Essai *in vivo***

Dix millions de cellules ont été injectées en quatre points sous-cutanés dans 3 souris CD-1 *Nude* (CrI: CD-1-nuBR) (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Pour les souris injectées avec les clones stables, de la doxycycline a été ajoutée dans l'eau des souris à une concentration de 1 µg/ml. Les tumeurs ont progressé pendant 53 jours et les souris ont été sacrifiées par inhalation au CO<sub>2</sub>. La masse de chacune des tumeurs a ensuite été pesée.

## **24. Essai d'agrégation cellulaire**

Pour cet essai, 1,2 % d'agarose stérile a été mélangé 1 : 1 à du milieu RPMI 1640 2 X (SIGMA, Saint-Louis, MI) et incubés pendant 30 min à 42 °C. Six millilitres de ce mélange ont été déposés dans des pétris 10 cm et solidifiés pendant 1 h à température pièce. Par la suite, nous avons déposé 225 000 cellules sur l'agarose dans un volume de 10 ml de milieu RPMI 1640. Après 48 et 72 h d'incubation, des photos dans une lumière visible ont été prises avec le microscope Olympus 1X70 à l'objectif 10 X.

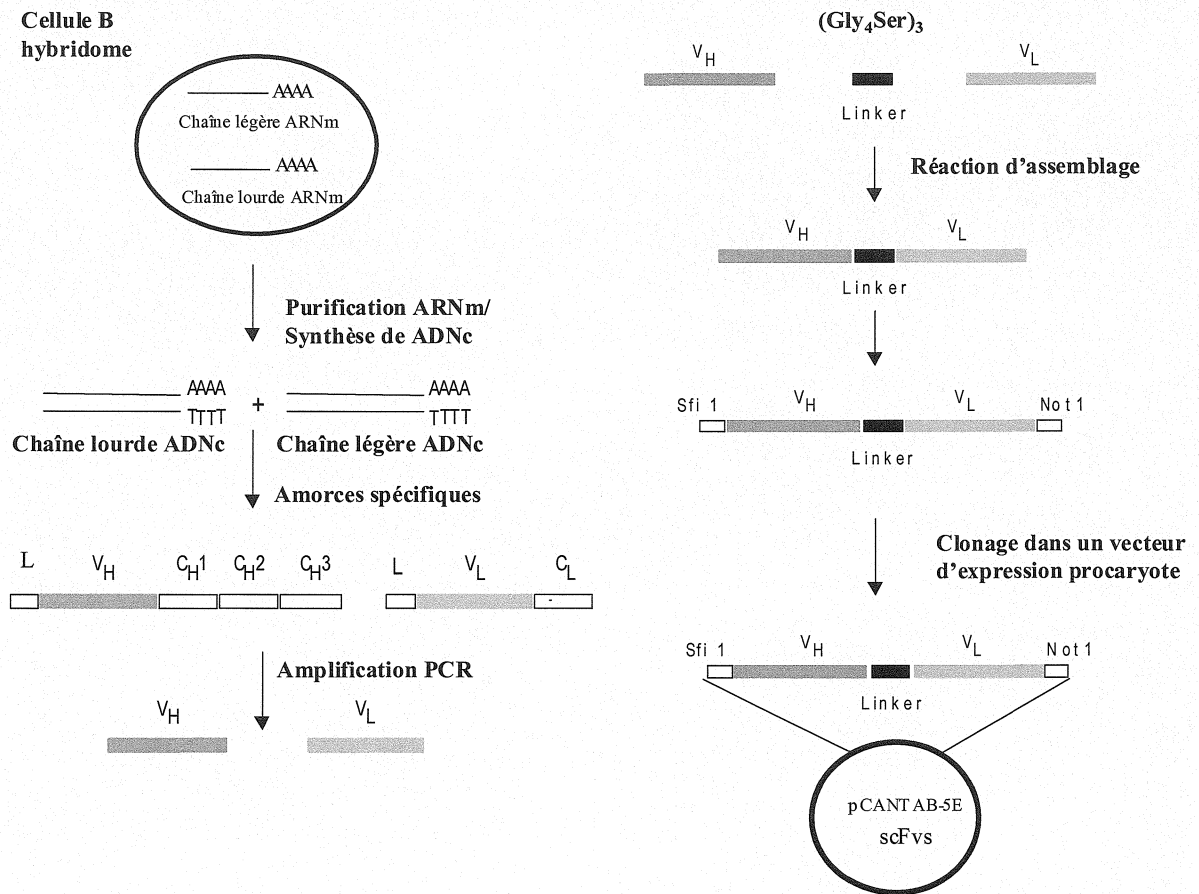


## RÉSULTATS

### 25. Construction de deux bibliothèques de scFvs

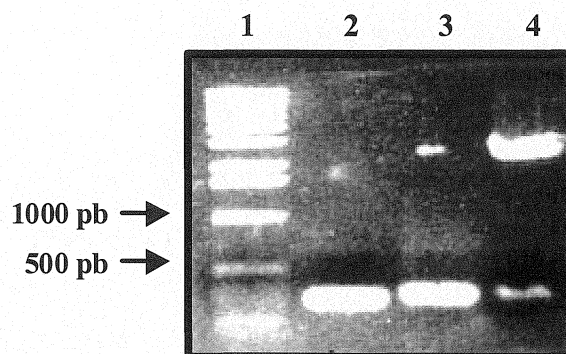
Deux familles d'anticorps monoclonaux reconnaissent le domaine extracellulaire de CA 125, la famille de OC125 qui reconnaît l'épitope de type A et la famille de M11 qui reconnaît l'épitope de type B. C'est à partir de deux hybridomes, OC125 (épitope de type A) et VK-8 (épitope de type B) qu'ont été construites les bibliothèques de scFvs. Un scFv correspond à la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps liée à l'aide d'un polypeptide flexible composé de  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$  à la région variable de la chaîne légère de ce même anticorps, dirigé contre l'antigène CA 125. La figure 5 résume les différentes étapes de la construction d'une bibliothèque de scFvs. Après avoir isolé les ARNm de l'hybridome VK-8, ce qui ne fut pas nécessaire pour l'hybridome OC125 car nous possédions ces ARNm, nous les avons purifiés et nous avons synthétisé les ADNc des chaînes lourdes et légères à partir de chacune des préparations d'ARNm. Par la suite, avec des amorces spécifiques dégénérées dirigées contre des parties constantes des régions variables des chaînes lourdes et légères, nous avons amplifié par PCR les chaînes  $V_H$  et  $V_L$  de chacun des hybridomes, comme illustré à la figure 6 pour l'hybridome OC125 (hybridome VK-8, résultats non montrés). Les chaînes légères ont un poids moléculaire de 325 pb comparativement aux chaînes lourdes qui ont un poids de 340 pb. Ces  $V_H$  et ces  $V_L$  ont ensuite été liés ensemble par un polypeptide flexible de 15 acides aminés,  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ , lors d'une réaction d'assemblage par PCR. Comme illustré à la

figure 7, le résultat est une librairie de scFvs OC125 ayant un poids moléculaire de 750 pb (résultats de la librairie de scFvs VK-8 non montrés).



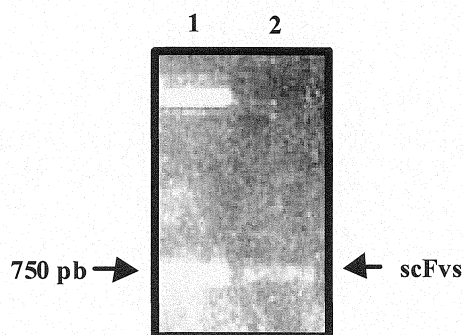
**Figure 5. Étapes nécessaires pour la construction d'une librairie de scFvs.**

Après extraction et purification des ARNm, les ADNc sont synthétisés avec la transcriptase inverse et des hexamères dégénérés. Les chaînes lourdes et légères de l'anticorps sont amplifiées par PCR en deux réactions séparées avec des amorces dégénérées. Les ADNc des chaînes lourdes et légères, purifiés sont assemblés en une seule molécule avec un polypeptide flexible d'ADN. La librairie de scFvs est ensuite clonée dans le vecteur d'expression procaryote pCantab-5E.



**Figure 6. Production des librairies de  $V_H$  et de  $V_L$ .**

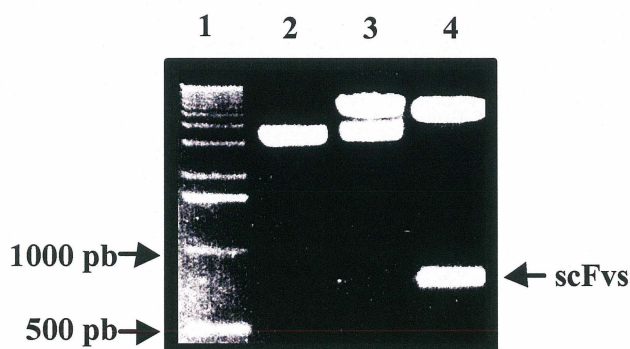
Électrophorèse d'un gel d'agarose 0,6 % (migration à 150 V) de la région variable de la librairie des chaînes légères ( $V_L$ ) et des chaînes lourdes ( $V_H$ ) de l'hybridome OC125 dirigée contre l'antigène CA 125. Puits 1: marqueur ADN 1 kb (400 ng) (GIBCO BRL, Grand Island, NY); puits 2: librairie de  $V_L$  à 325 pb; puits 3: librairie de  $V_H$  à 340 pb; puits 4: marqueur de  $V_H$  (15 ng) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).



**Figure 7. Production de la librairie de scFvs.**

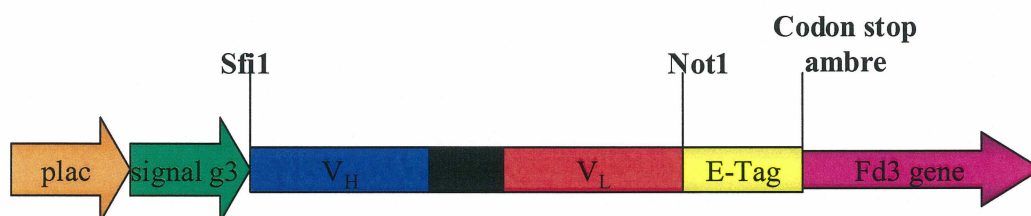
Électrophorèse d'un gel d'agarose 0,8 % (migration à 150 V) de l'assemblage de la librairie de scFvs OC125 dirigée contre l'antigène CA 125. Puits 1: marqueur de scFv (20 ng) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); puits 2: librairie de scFvs OC125 à 750 pb.

Par PCR, les sites de digestion des enzymes de restriction, Sfi1 et Not1, ont été ajoutés aux extrémités 5' et 3' respectivement, de chacune des bibliothèques de scFvs. Après la digestion de ces extrémités et du vecteur, chacune des bibliothèques de scFvs a été clonée dans le vecteur d'expression procaryote pCantab-5E (figure 9), comme illustré à la figure 8 pour la bibliothèque OC125 (résultats de la bibliothèque VK-8 non montrés).



**Figure 8. Validation de la construction de la bibliothèque de scFvs.**

Électrophorèse d'un gel d'agarose 0,8 % (migration à 150 V) du sous-clonage de la bibliothèque de scFvs OC125 dans le vecteur d'expression procaryote pCantab-5E. Puits 1: marqueur ADN 1 kb; puits 2: pCantab-5E/scFvs non digéré; puits 3: pCantab-5E/scFvs digéré par l'enzyme de restriction Sfi1; puits 4: pCantab-5E/scFvs digéré par les enzymes de restriction Sfi1 et Not1.

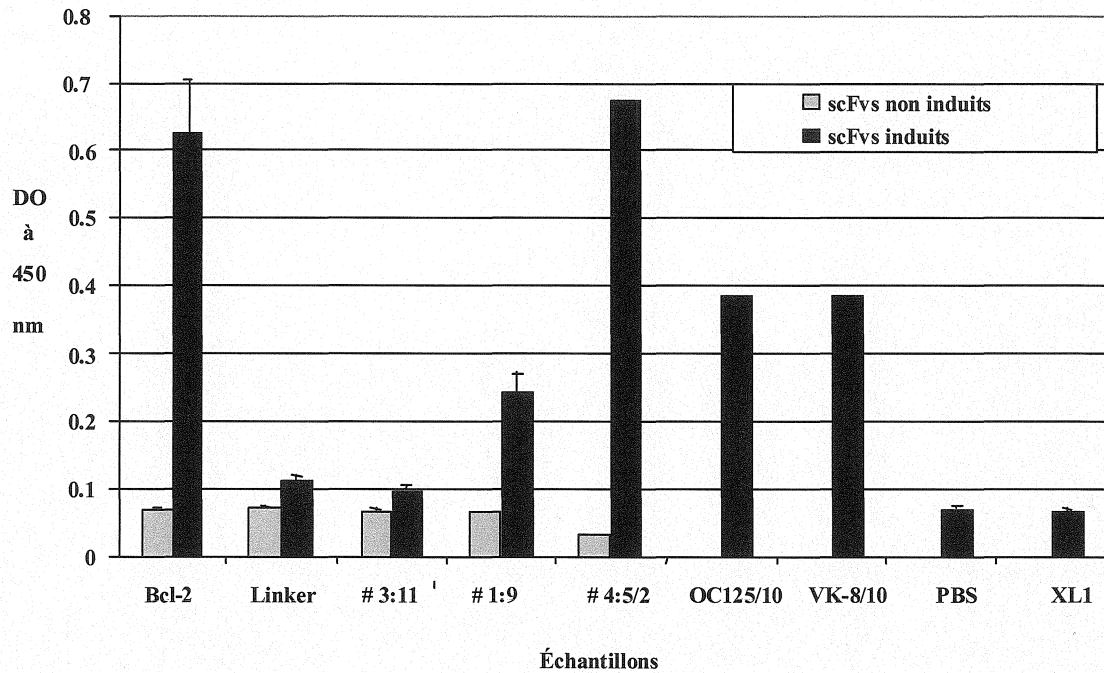


**Figure 9. Vecteur d'expression procaryote pCantab-5E.**

Vecteur d'expression procaryote pCantab-5E/scFvs qui cible les scFvs dans l'espace périplasmique des bactéries ou sous une protéine de fusion avec la protéine g3p du phage.

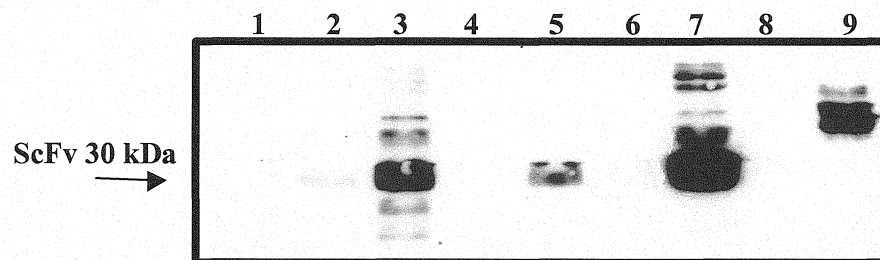
## 26. Validation de l'expression et de la liaison à CA 125 de scFvs solubles dans un système procaryote

Le *colony lift assay* nous a permis, dans le cas de la librairie de scFvs VK-8, de sélectionner des scFvs solubles, car les scFvs solubles se déposaient sur une seule membrane de nitrocellulose. Près de 130 clones ont été déterminés comme étant solubles (résultats non montrés) où un seul liait CA 125. Pour la librairie de scFvs OC125, nous avons effectué une double sélection. Nous avons donc sélectionné des scFvs solubles et qui liaient CA 125, car deux membranes de nitrocellulose ont été utilisées pour la sélection dont une préalablement incubée avec du CA 125 purifié commercialement, donc les protéines solubles traversaient la première membrane et se déposaient sur celle contenant du CA 125. Nous avons obtenu 141 clones (résultats non montrés) où, encore une fois, un seul liait CA 125. Après avoir effectué des extraits périsplasmiques de chacun de ces clones pour recueillir les scFvs, nous avons déterminé par ELISA (figure 10) et immunobuvardage (figure 11) leur niveau d'expression. Lorsque les cultures bactériennes étaient incubées en présence de glucose, la production de scFvs était réprimée, par contre en présence d'IPTG et en absence de glucose, il y avait production des scFvs. Le scFv anti-Bcl-2 et le peptide linker servent de contrôles d'expression et ils ne lient pas CA 125, tandis que les anticorps monoclonaux OC125 et VK-8 servent de contrôles positifs pour l'anticorps secondaire, mais ceux-ci lient CA 125. Les scFv # 1:9 et # 4:5 dérivent de la librairie VK-8, tandis que le scFv # 3:11 a été obtenu à partir de la librairie OC125. Les bactéries XL1 Blue et le PBS servent de contrôles négatifs. Ces résultats démontrent que l'expression du scFv VK-8 # 1:9 est plus élevée que l'expression du scFv OC125 # 3:11 dans un système procaryote.



**Figure 10.** Expression des scFvs à partir du vecteur d'expression procaryote pCantab-5E par ELISA.

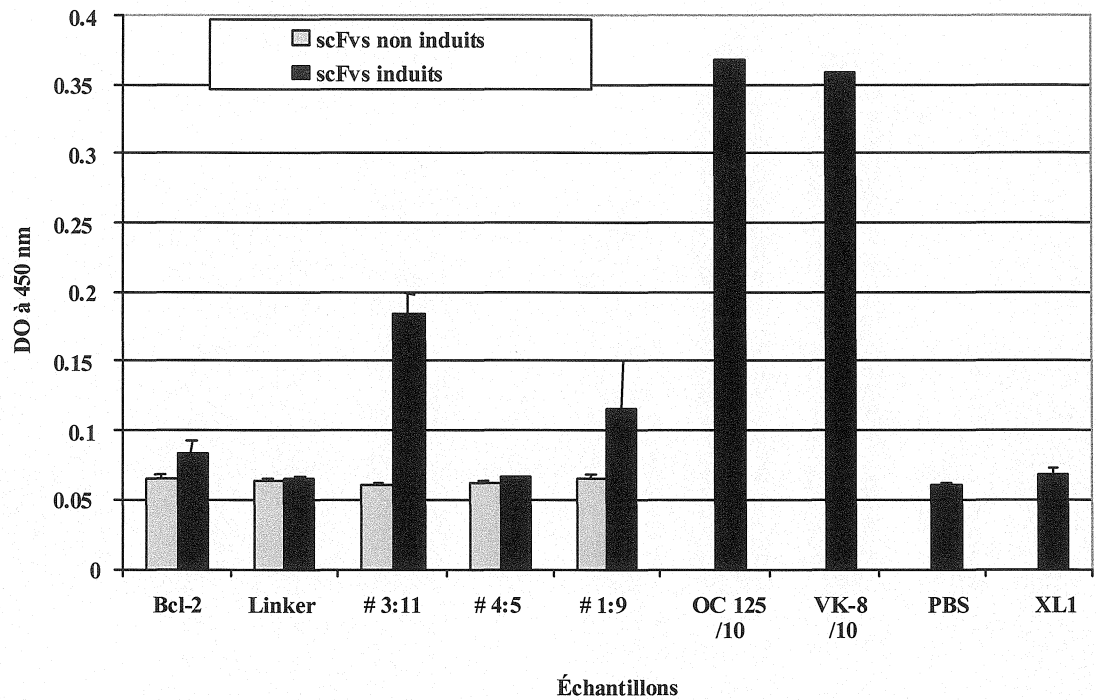
Les scFvs étaient non induits en présence de glucose et induits en présence d'IPTG. Les puits ont été incubés toute la nuit avec 200 µl d'extraits périplasmiques contenant les scFvs pour vérifier leur niveau d'expression. Les contrôles positifs sont OC125 et VK-8 et les contrôles négatifs sont le PBS et les bactéries XL1 Blue. Moyenne des résultats de trois expériences indépendantes effectuées en triplicata.



**Figure 11.** Expression des scFvs à partir du vecteur d'expression procaryote pCantab-5E par immunobuvardage.

Les scFvs solubles obtenus d'extraits périplasmiques ont été sujets à un gel SDS 12 % et analysés pour leur expression par un immunobuvardage révélé avec l'anticorps anti-E-Tag 1 : 1000. Les scFvs étaient non induits en présence de glucose et induits en présence d'IPTG. Puits 1: bactéries XL1 Blue (contrôle négatif); puits 2: scFv anti-Bcl-2 non induit; puits 3: scFv anti-Bcl-2 induit; puits 4: scFv OC125 # 3:11 non induit; puits 5: scFv OC125 # 3:11 induit; puits 6: scFv VK-8 # 1:9 non induit; puits 7: scFv VK-8 # 1:9 induit; puits 8: peptide linker non induit; puits 9: peptide linker induit. (Résultats scFv VK-8 # 4:5 non montrés).

Nous avons déterminé par ELISA (figure 12), dans le même système procaryote, que le scFv # 1:9 (bibliothèque VK-8) et que le scFv # 3:11 (bibliothèque OC125) liaient CA 125. Puisque le scFv # 4:5 est bien exprimé et qu'il ne lie pas CA 125, pour la suite des expériences nous l'avons utilisé comme contrôle négatif. Nous avons préféré ce contrôle à un vecteur vide, car dans ce cas-ci il y a sécrétion d'un scFv qui ne lie pas CA 125 alors nous pourrions évaluer l'effet de la production d'une protéine et son accumulation dans la cellule hôte et vérifier si cela engendre des effets non désirés. On peut remarquer à la figure 12 que le scFv OC125 # 3:11 semble lier plus fortement CA 125 que le scFv VK-8 # 1:9. Pour confirmer que les protéines que nous avons obtenu par extraits périsplasmiques, qui sont exprimées et qui lient CA 125 soient vraiment des scFvs, nous avons déterminé leurs séquences codantes à partir du vecteur pCantab-5E. Comme illustré à la figure 13, chacun des scFvs (VK-8 # 1:9, VK-8 # 4:5 et OC125 # 3:11) est constitué des régions constantes (Fw) et variables (CDR) de la chaîne lourde, du linker et des régions constantes et variables de la chaîne légère, caractéristiques des scFvs. Le scFv OC125 # 3:11 a 70 acides aminés différents du scFv VK-8 # 1:9, ainsi qu'une délétion de 21 acides aminés dans la partie constante 3 (FW3) du V<sub>H</sub> et une addition de 2 acides aminés. Il est intéressant de noter qu'il n'y a que trois acides aminés qui sont différents entre les scFvs # 1:9 et # 4:5 qui dérivent de la même bibliothèque (VK-8) et que ces mutations se situent dans des régions constantes. Ces résultats démontrent que les scFvs # 1:9 et # 3:11 proviennent de deux bibliothèques différentes selon leur niveau de liaison à CA 125 et leur séquence et qu'une mutation au niveau de trois acides aminés dans le scFv VK-8 # 4:5 empêche la liaison de ce scFv à CA 125. Même si ces deux scFvs (# 1:9 et # 4:5) proviennent de la même bibliothèque, ce sont des clones différents générés à partir d'un hybridome, donc de deux lignées cellulaires fusionnées contenant une pléiades de chaînes lourdes et légères.



**Figure 12. Liaison des scFvs VK-8 # 1:9 et OC125 # 3:11 à CA 125 par ELISA.**

L'expression des scFvs était réprimée en présence de glucose et induite en présence d'IPTG. Les puits ont été incubés toute la nuit avec 1500 U/ml de CA 125 purifié. Les contrôles positifs sont OC125 et VK-8 et les contrôles négatifs sont le PBS et les bactéries XL1 Blue. Moyenne des résultats de trois expériences indépendantes effectuées en triplicata.



```

1:9 QVQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGKSLEWIGYIYPYNGDTGY
4:5 QVQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGKSLEWIGYIYPYNGDTGY
3:11 QVQLQQSGTVLARPGASVKMSLQASGYTFTSYWMHWVKQRFGQGLEWIGAIYPGNSDTSY
      VH FW1          CDR1          VH FW2          CDR2

1:9 NQKFRNKASLTVDTSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSGGFWYFDVWGQGTTTVTVSSGG
4:5 NQKFRNKASLTVDTSSTAYMELRSLTSEDSAVYYWARSGGFWYFDVWGQGTTTVTVSSGG
3:11 NQKFKGKAKLTAVTSCTRSY-----D-----WYFDVWGQGTTTVTVSSGG
      VH FW3          CDR3          VH FW4

1:9 GSGGGGGSGGGSDIQMTQSPAILSASPGEKVTMTCRATPSV-SYMHWYQQKPGSSPKPL
4:5 GSGGGGGSGGGSDIQMTQSPAILSASPGEKVTMTCRATPSV-SYMHWYQQKPGSSPKPW
3:11 GSGGGGGSGGGSDIQLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQSIGTDMHWYQQRTNGSPRLL
      linker          VL FW1          CDR1          VL FW2

1:9 I-YTTSNLAGVPARFSGGGSGGTSYSLTVSRVEAEDAATYCQQWSRSPPTFGAGTKLEIK
4:5 I-YTTSNLAGVPARFSGGGSGGTSYSLTVSRVEAEDAATYCQQWSRSPPTFGAGAKLEIK
3:11 IKYASESI-SGIPSRFSGSGSGGTDFTLSINSVESEDIADYCQQSYSWPLTFGAGTKLEIK
      CDR2          VL FW3          CDR3          VL FW4

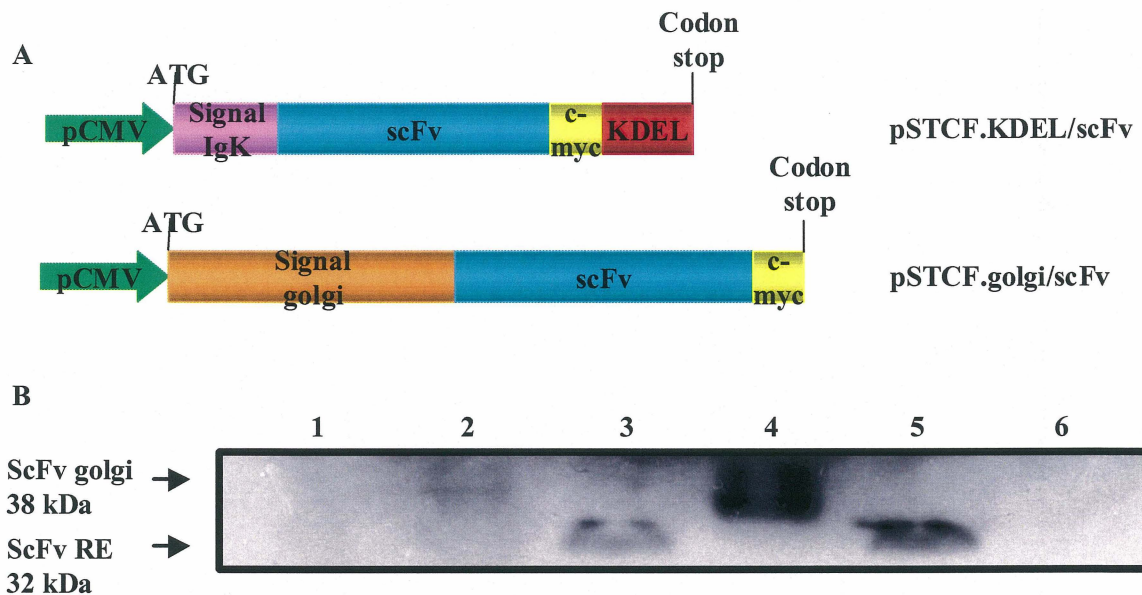
```

**Figure 13. Séquences en acides aminés des scFvs VK-8 # 1:9 et # 4:5 et du scFv OC125 # 3:11.**

Les ADNc encodants les scFvs VK-8 # 1:9, # 4:5 et OC125 # 3:11 ont été séquencés à partir du vecteur pCantab-5E par un système de séquençage automatique LI-COR (Bio S&T Inc., Lachine, QUÉ). En jaune est représenté les acides aminés différents entre le scFv VK-8 # 1:9 et le scFv OC125 # 3:11, en rouge les trois acides aminés différents entre les scFvs VK-8 # 1:9 et # 4:5 et en bleu le polypeptide flexible (linker).

## 27. Validation des scFvs dans un système eucaryote transitoire

Chacun des scFvs, VK-8 # 1:9, VK-8 # 4:5 et OC125 # 3:11, a été sous-cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pSTCF (figure 14 A). Les scFvs ont été clonés entre les sites Sfi1 et Not1 de chacune des versions du vecteur. Chacune des constructions a ensuite été transfectée transitoirement dans la lignée cellulaire NIH OVCAR-3. Cette lignée de cancer ovarien surexprime l'antigène CA 125 à la surface cellulaire. Après lyse cellulaire, l'expression des différents scFvs a été analysée par immunobuvardage, comme illustré à la figure 14 B. Habituellement, les scFvs ont un poids moléculaire de ~28 kDa, avec l'ajout de la séquence KDEL les scFvs ont une masse de 32 kDa et avec l'ajout de la séquence Golgi, ces scFvs ont un poids moléculaire de 38 kDa.

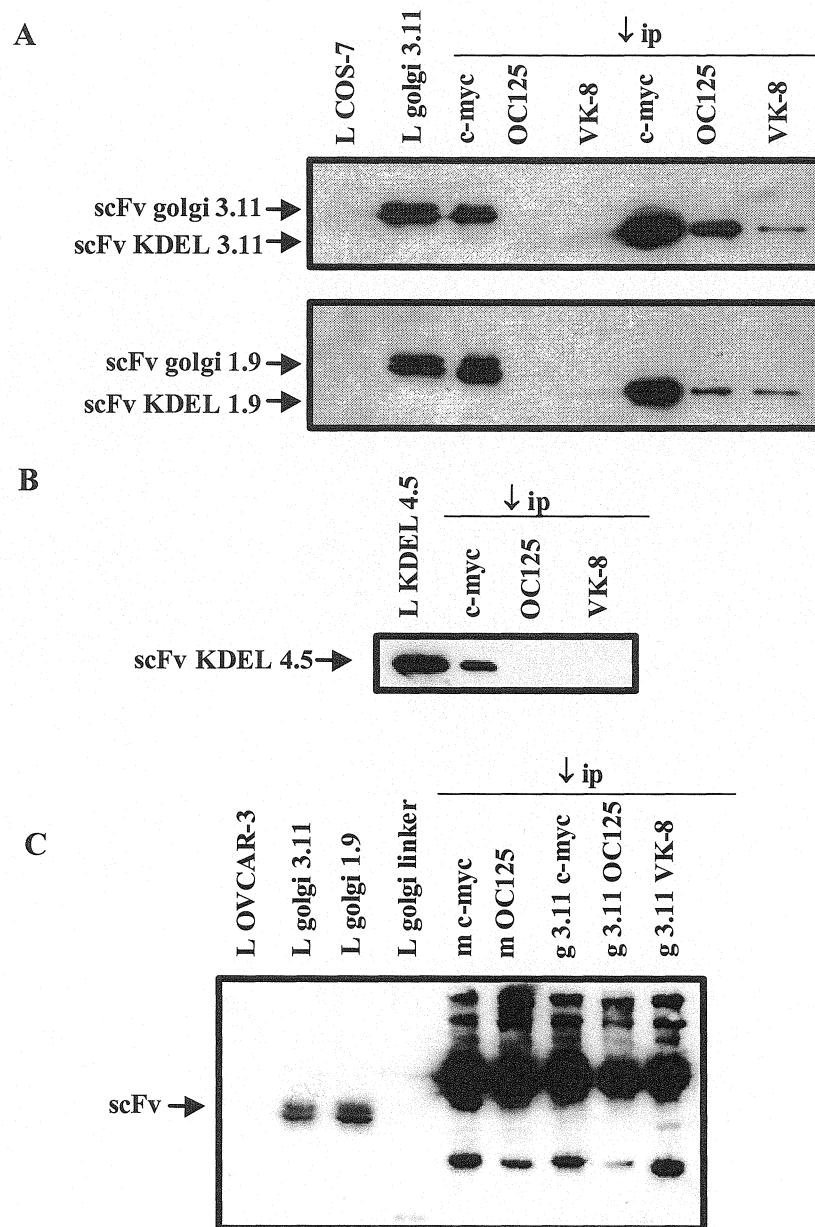


**Figure 14. Expression des scFvs dans un système eucaryote transitoire.**

**A.** Vecteurs d'expression eucaryotes pSTCF.KDEL/scFv et pSTCF.Golgi/scFv qui ciblent et retiennent respectivement les scFvs dans la lumière du RE et dans les membranes du trans-médian Golgi. **B.** Expression intracellulaire des scFvs. Les scFvs ont été transfectés transitoirement dans les cellules NIH OVCAR-3. Quarante-huit heures plus tard, les lysats cellulaires (30 µg) ont été déposés sur un gel SDS 12 % et analysés par immunobuvardage avec l'anticorps anti-c-myc 9E10. Puits 1: lysat OVCAR-3; puits 2: lysat scFv OC125 Golgi # 3:11; puits 3: lysat scFv OC125 KDEL # 3:11; puits 4: lysat scFv VK-8 Golgi # 1:9; puits 5: lysat scFv VK-8 KDEL # 1:9; puits 6: lysat Golgi linker. Résultats scFv VK-8 # 4:5 non montrés.

Pour déterminer si les scFvs liaient CA 125 dans un système eucaryote, de manière *in vitro*, nous avons procédé à des co-immunoprécipitations avec les différents scFvs. Dans un premier temps, les scFvs VK-8 # 1:9 et OC125 # 3:11, ciblés au RE et au Golgi, ont été transfectés transitoirement dans les cellules COS-7, en raison de leur haute efficacité de transfection. Pour chacune des transfections, nous avons procédé à une immunoprécipitation, avec 300 µg de lysats cellulaires, avec l'anticorps anti-c-myc 9E10, qui se lie à l'étiquette

peptidique c-myc sur les scFvs et les anticorps monoclonaux OC125 et VK-8, qui lient CA 125 sur deux épitopes différents. On peut visualiser à la figure 15 A, que le scFv OC125 Golgi # 3:11 est immunoprécipité par l'anticorps anti-c-myc 9E10, mais non par les anticorps monoclonaux OC125 et VK-8. Par contre, lorsque ce scFv est ciblé au RE, il est immunoprécipité par l'anticorps anti-c-myc 9E10, mais aussi par les anticorps monoclonaux OC125 et VK-8. Donc, il semble que ce scFv lie CA 125 lorsqu'il est ciblé au RE, mais non lorsqu'il est ciblé dans le trans-médian Golgi. On observe le même résultat pour le scFv VK-8 # 1:9 dans les cellules COS-7, c'est-à-dire que ce scFv ne semble lier CA 125 que lorsqu'il est ciblé au RE. Le scFv VK-8 # 4:5 ciblé au RE, qui nous sert de contrôle négatif, est immunoprécipité avec l'anticorps anti-c-myc 9E10, mais pas co-immunoprécipité avec les anticorps monoclonaux OC125 et VK-8 dans les cellules NIH OVCAR-3 (figure 15 B). Dans un deuxième temps, nous avons effectué la même expérience avec les scFvs ciblés au Golgi, mais dans les cellules NIH OVCAR-3. D'une manière intéressante, nous avons visualisé le scFvs OC125 # 3:11 lorsqu'on effectue une immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal VK-8 (figure 15 C). Les bandes supérieures à celles des scFvs visualisées dans la partie immunoprécipitation du gel sont les chaînes lourdes des anticorps utilisés pour immunoprécipiter, tandis que les bandes inférieures à celles des scFvs correspondent aux chaînes légères. Donc, *in vitro*, le scFv VK-8 # 1:9 ciblé au RE et le scFv OC125 # 3:11 ciblé au RE et au Golgi semblent lier CA 125 ce qui n'est pas le cas pour le scFv contrôle VK-8 # 4:5.

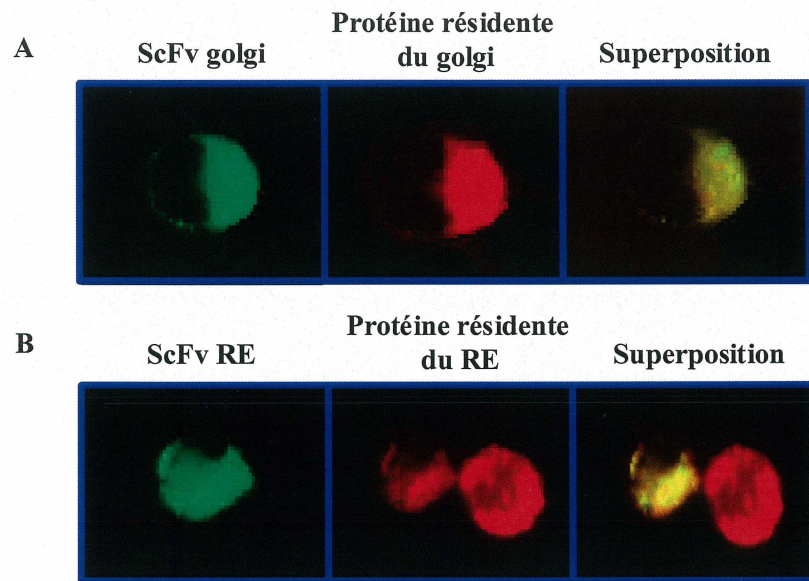


**Figure 15. Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation des scFvs avec CA 125.**

Les scFvs ont été immunoprécipités ou co-immunoprécipités avec les anticorps anti-c-myc 9E10 ou OC125 et VK-8 respectivement avec 300 µg de lysats cellulaires. Les échantillons ont été migrés sur un gel SDS 12 % et été analysés par immunobuvardage avec l'anticorps anti-c-myc A-14 (A et B) ou anti-c-myc 9E10 (C). **A.** Transfection transitoire des cellules COS-7 avec les scFvs OC125 Golgi # 3:11 et KDEL # 3:11 et les scFvs VK-8 Golgi # 1:9 et KDEL # 1:9. **B.** Transfection transitoire des cellules NIH OVCAR-3 avec le scFv VK-8 KDEL # 4:5. **C.** Transfection transitoire des cellules NIH OVCAR-3 avec le scFv OC125 Golgi # 3:11, le scFv VK-8 Golgi # 1:9 et le vecteur contrôle contenant le linker ciblé au Golgi. L: lysat; g: Golgi; ↓ ip: anticorps avec lesquels les scFvs ont été immunoprécipités; m: mock (lysate cellulaire transfecté sans ADN).



Nous avons ensuite vérifié la localisation intracellulaire des scFvs par immunofluorescence indirecte sur lame. Nous observons que les scFvs ciblés au RE co-localisent avec la calréticuline, une protéine résidente du RE (figure 16 B) et que les scFvs ciblés au Golgi co-localisent avec le facteur ADP ribosylation, une protéine résidente du Golgi (figure 16 A). Ces résultats démontrent que la localisation cellulaire des scFvs est appropriée.

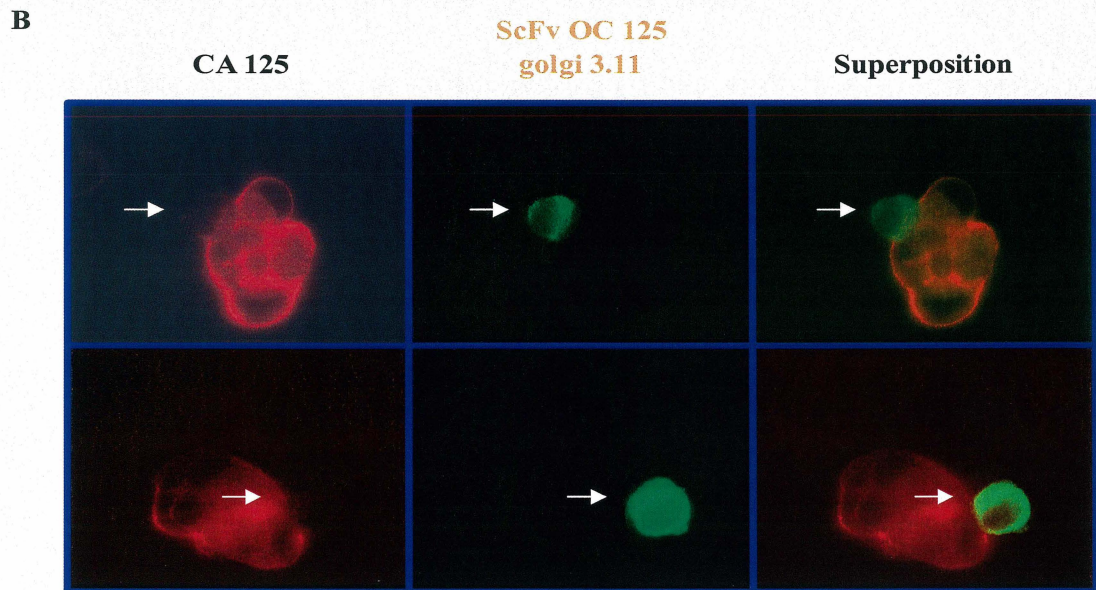
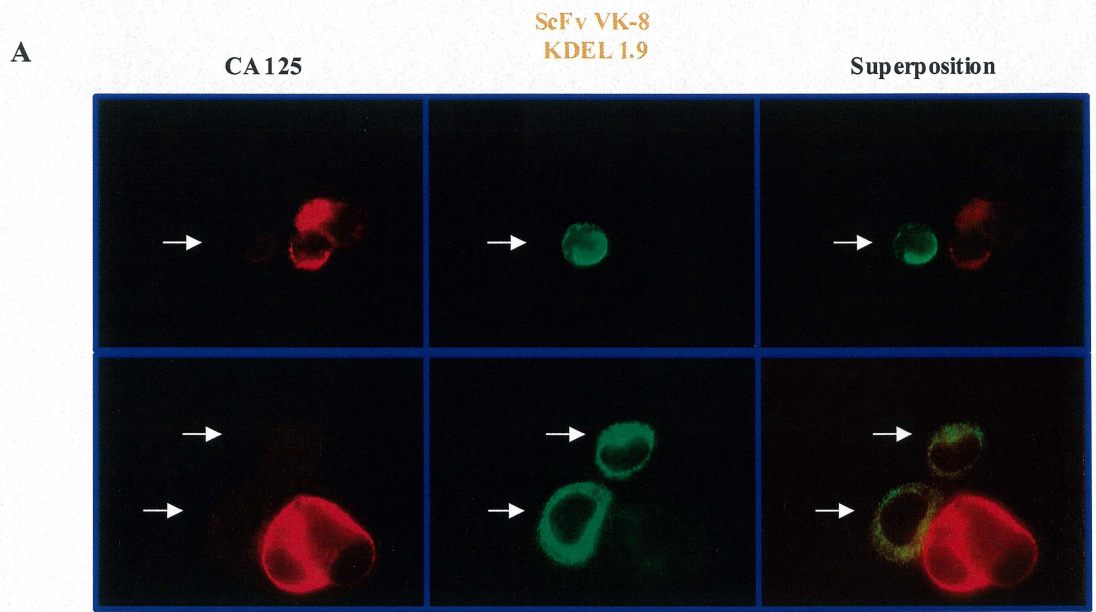


**Figure 16. Localisation intracellulaire des scFvs dans les cellules NIH OVCAR-3 par immunofluorescence indirecte sur lame.**

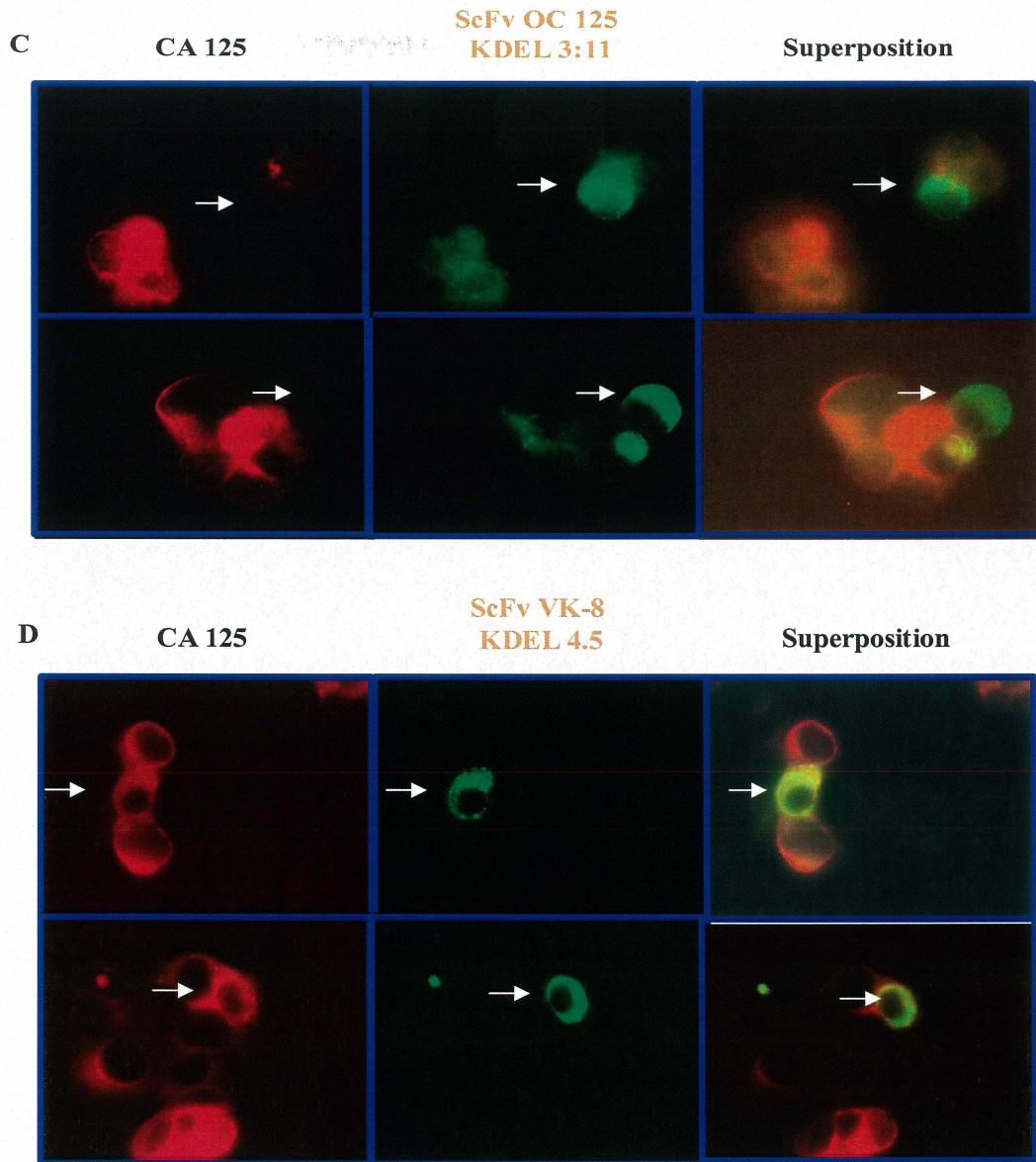
**A.** ScFv ciblé aux membranes du trans-médian Golgi. Les cellules NIH OVCAR-3 ont été transfectées transitoirement avec la construction pSTCF.Golgi/scFv et incubées avec l'anticorps anti-c-myc A-14 pour détecter l'expression du scFv et l'anticorps anti-*ADP ribosylation factor* clone 1D9 (résident du Golgi) comme contrôle. **B.** ScFv ciblé dans la lumière du RE. Les cellules NIH OVCAR-3 ont été transfectées transitoirement avec la construction pSTCF.KDEL/scFv et incubées avec l'anticorps anti-c-myc 9E10 pour détecter l'expression du scFv et l'anticorps anti-calréticuline (résident du RE) comme contrôle. Objectif de 60 X et photos agrandies dans le programme Adobe Photoshop pour mieux visualiser ces cellules uniques.

Finally, we verified by indirect immunofluorescence on slide our hypothesis that the scFv OC125 # 3:11 targeted to RE and Golgi and the scFv VK-8 # 1:9 targeted to RE decreased the surface expression of CA 125, by retaining the protein in their target cellular compartment. When the scFv VK-8 KDEL # 1:9 is transiently expressed, as illustrated in figure 17 A, there is a decrease of CA 125 at the cellular surface. Similar results were obtained with the scFv OC125 Golgi # 3:11 (figure 17 B) and for the scFv OC125 KDEL # 3:11 (figure 17 C). As expected, the control scFv VK-8 KDEL # 4:5 does not affect the cellular localization of CA 125 when it is expressed (figure 17 D).







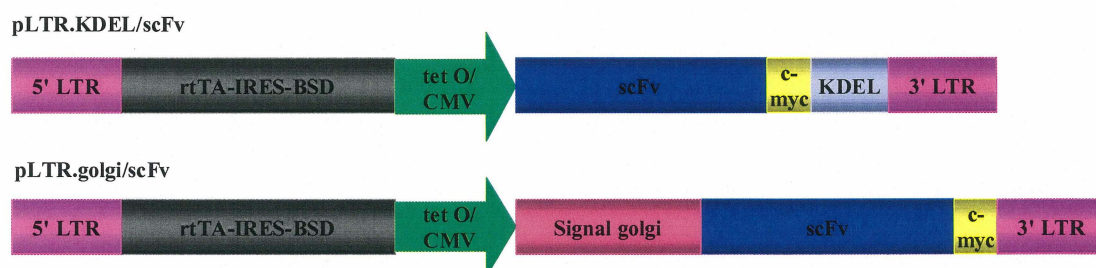


**Figure 17. Expression transitoire des scFvs et de CA 125 à la surface cellulaire déterminée par immunofluorescence indirecte sur lame dans les cellules NIH OVCAR-3.**

Les cellules transfectées avec les constructions VK-8 pSTCF.KDEL/1:9, VK-8 pSTCF.KDEL/4:5, OC125 pSTCF.KDEL/3:11 et OC125 pSTCF.Golgi/3:11 ont été incubées 48 h plus tard avec l'anticorps anti-c-myc A-14 pour détecter l'expression des scFvs et avec l'anticorps monoclonal OC125 pour détecter l'expression de CA 125. **A.** Diminution de l'expression de CA 125 à la surface cellulaire par l'expression du scFv VK-8 KDEL # 1:9 ciblé au RE. **B.** Diminution de l'expression de CA 125 à la surface cellulaire par l'expression du scFv OC125 Golgi # 3:11 ciblé au trans-médian Golgi. **C.** Diminution de l'expression de CA 125 à la surface cellulaire par l'expression du scFv OC125 KDEL # 3:11 ciblé au RE. **D.** Expression de CA 125 à la surface cellulaire malgré l'expression du scFv contrôle VK-8 KDEL # 4:5 ciblé au RE. Les flèches pointent les cellules transfectées. Objectif de 60 X.

## 28. Validation de l'expression des scFvs dans un système eucaryote stable

Nous avons sous-cloné chacun des scFvs dans le vecteur d'expression eucaryote pLTR (figure 18), soit ciblé au RE ou au trans-médian Golgi. À partir de ces constructions, nous avons produit des clones stables, c'est-à-dire des cellules exprimant de manière stable nos scFvs. Compte tenu de la difficulté à produire des clones stables dans la lignée cellulaire NIH OVCAR-3, des clones ont seulement été obtenus avec les constructions VK-8 pLTR.KDEL/1:9 (clone # 9) et VK-8 pLTR.KDEL/4:5 (clone # 12).

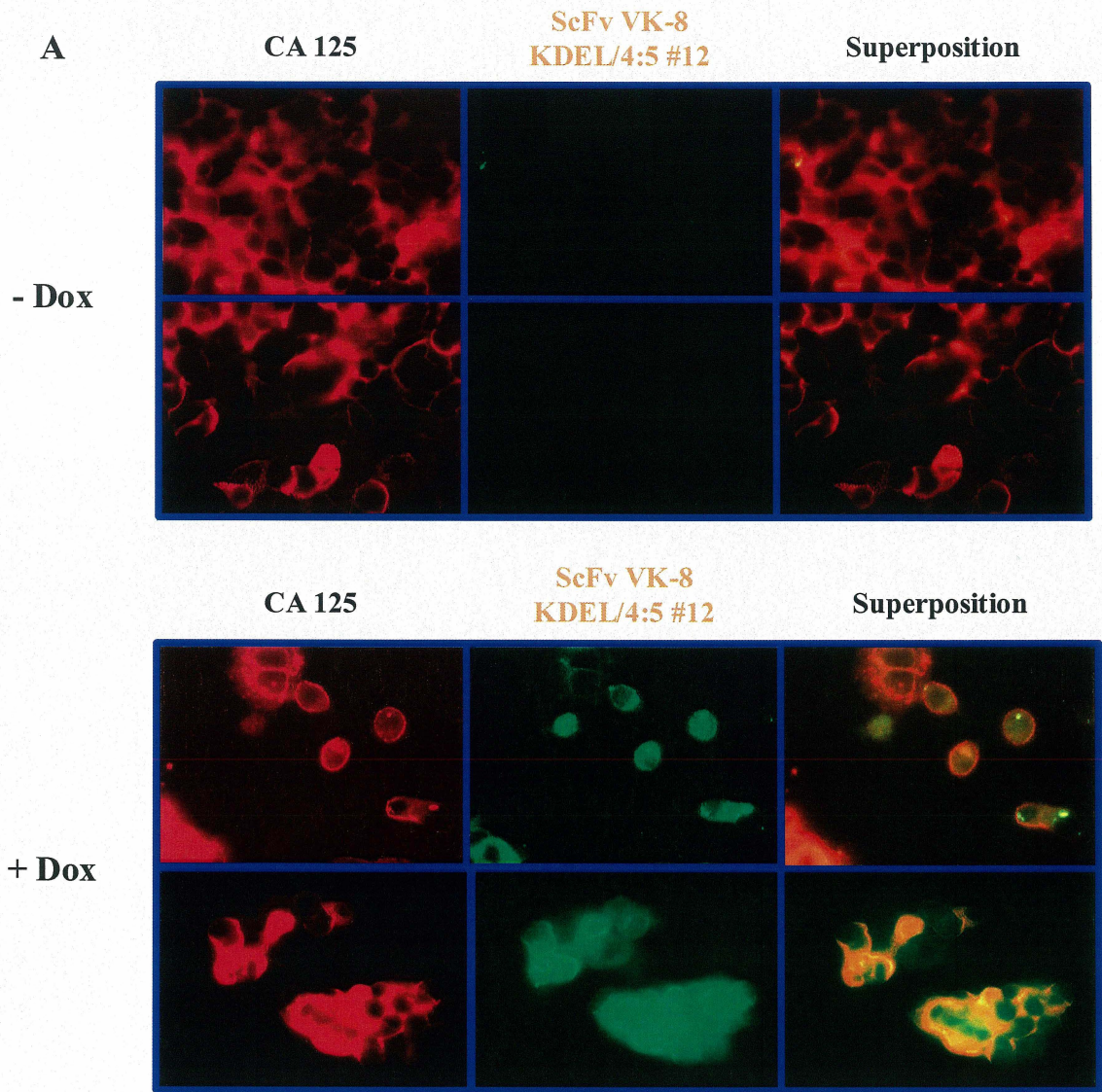


**Figure 18. Expression des scFvs dans un système eucaryote stable.**

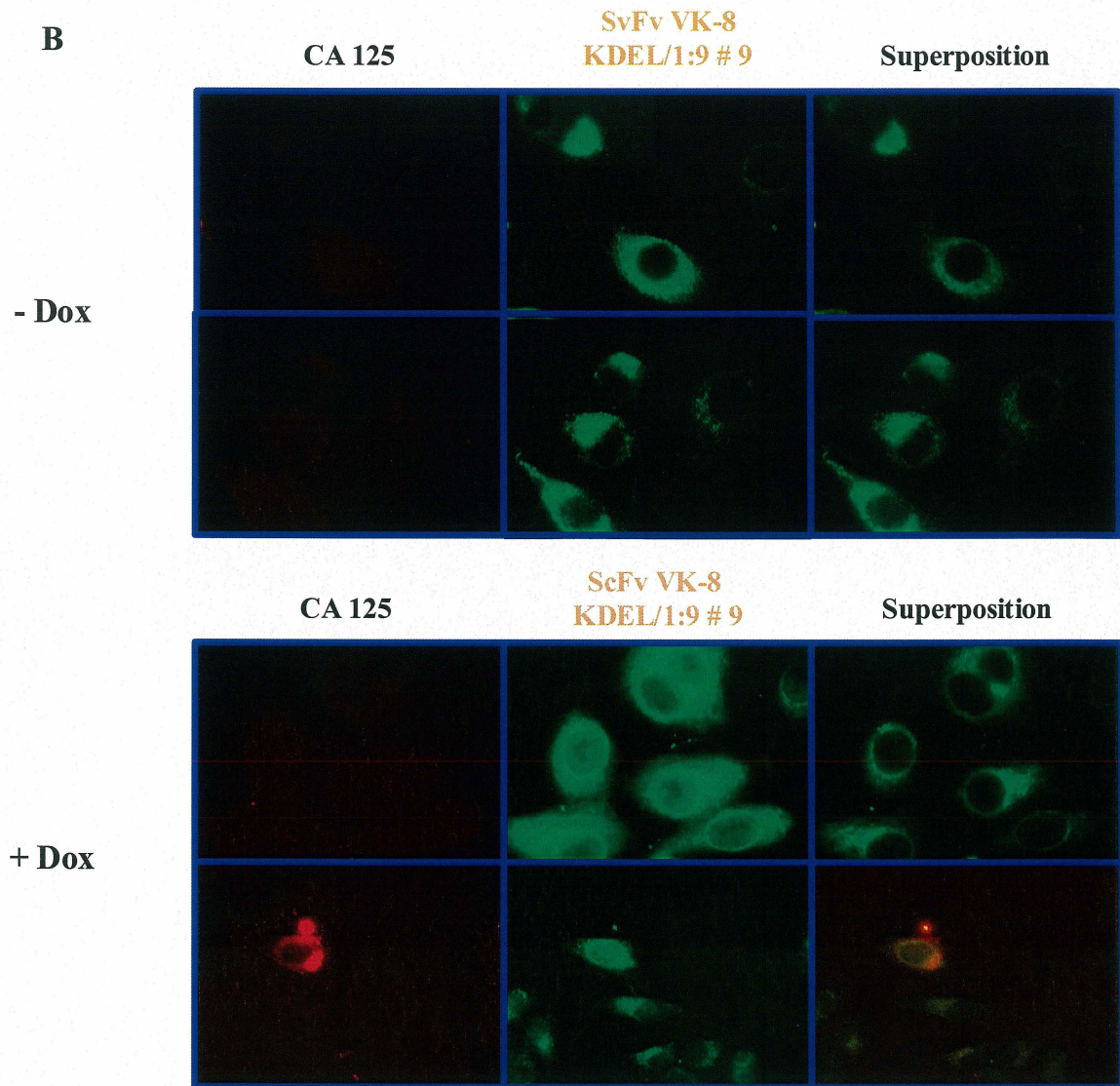
Vecteurs d'expression rétroviraux eucaryotes pLTR.KDEL/scFv et pLTR.Golgi/scFv qui ciblent et retiennent respectivement les scFvs dans la lumière du RE et dans les membranes du trans-médian Golgi.

Nous avons d'abord caractérisé ces deux clones par immunofluorescence indirecte sur lame afin de confirmer les résultats obtenus de manière transitoire. Chaque transfectant stable a été incubé en présence ou non de doxycycline pour induire ou non l'expression des scFvs. La figure 19 A montre qu'en absence de doxycycline le transfectant contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 n'est pas exprimé, alors qu'il l'est en présence de doxycycline. Dans ces deux cas, l'expression de CA 125 à la surface cellulaire n'est pas modifiée (comme démontré transitoirement à la figure 17 D). Par contre, on détecte l'expression du scFv VK-8 pLTR.KDEL/1:9 # 9 même en absence de doxycycline. On remarque également une importante perte d'expression de CA 125 à la surface cellulaire de ce transfectant stable (figure 19 B). Donc, le clone contrôle pLTR.KDEL/4:5 # 12 est inductible en présence de doxycycline et l'expression de ce scFv n'affecte pas l'expression de CA 125, tandis que le clone pLTR.KDEL/1:9 # 9 exprime constitutivement le scFv VK-8 # 1:9 et inhibe l'expression de CA 125 à la membrane cellulaire et ce même en absence de doxycycline.





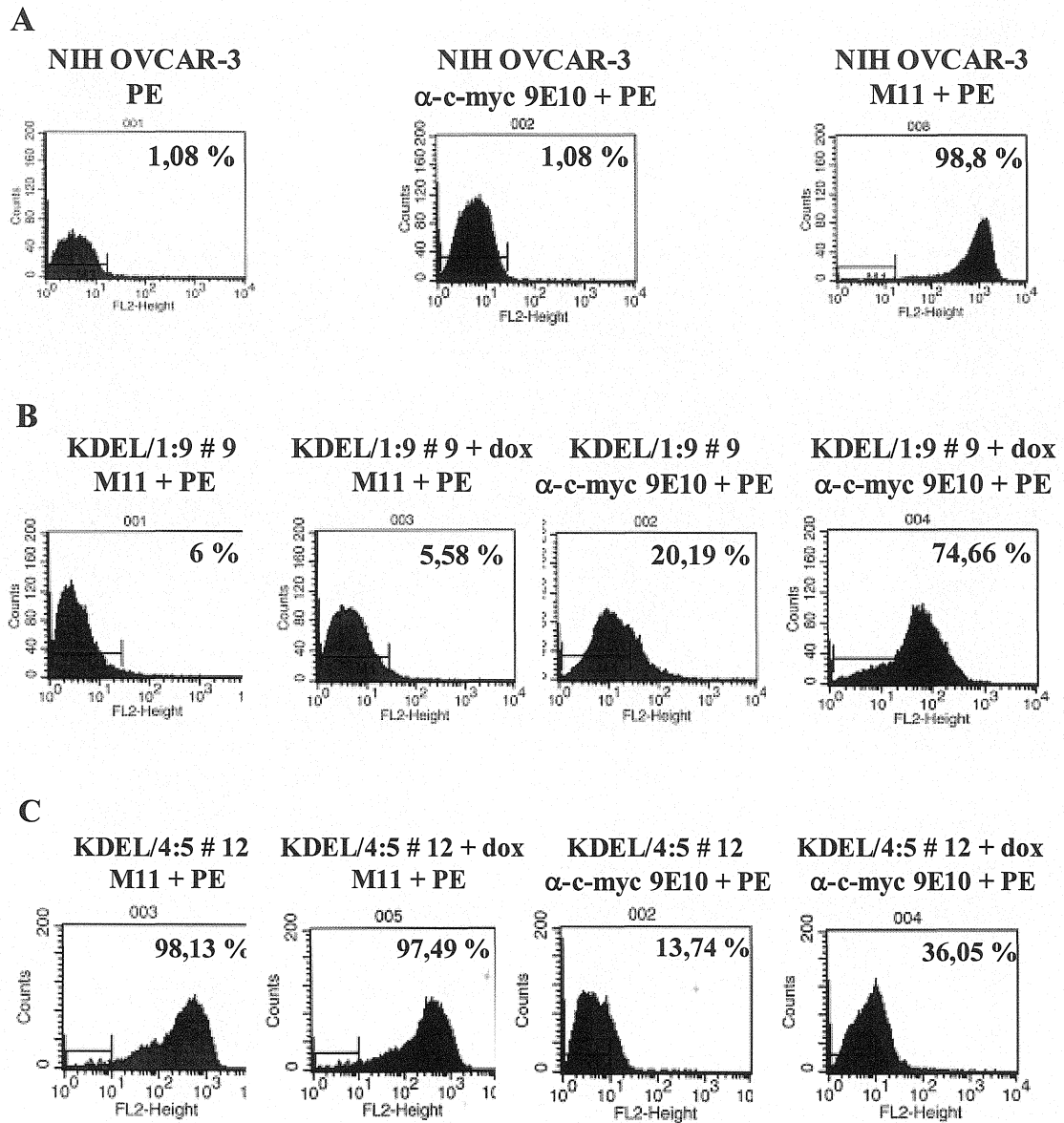




**Figure 19.** Expression des scFvs et de CA 125 à la surface cellulaire dans les transfectants stables dérivés des cellules NIH OVCAR-3.

Les clones stables VK-8 pLTR.KDEL/4:5 # 12 et VK-8 pLTR.KDEL/1:9 # 9 ont été mis sur lames et poussés en présence ou non de doxycycline et incubés à 37 °C. Quarante-huit heures plus tard l'expression des scFvs et de CA 125 a été déterminée par immunofluorescence indirecte sur lame à l'aide des anticorps primaires anti-c-myc A-14 et OC125 respectivement. **A.** Transfectant contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12, objectif de 60 X. **B.** Transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9, objectif de 100 X.. Dox: doxycycline.

Comme illustré à la figure 20, l'expression de CA 125 à la surface des cellules a également été analysée par cytométrie de flux. Nous avons observé une forte expression de CA 125 à la surface de la lignée parentale NIH OVCAR-3. Lorsque les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire PE, il n'y a aucune expression de protéines (1,08 %), lorsqu'elles sont incubées avec l'anticorps anti-c-myc 9E10 aucune expression de scFvs n'est observée (1,08 %) et lorsqu'elles sont incubées avec l'anticorps M11, il y a une expression de CA 125 très élevée (98,8 %). Par contre, dans le clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9, indépendamment d'une expression faible ou forte du scFv (lorsqu'il est induit à la doxycycline), il y a une diminution très importante de l'expression de surface de CA 125 (6 % au lieu de 98 %). Cependant l'expression du scFv dans le clone stable VK-8 KDEL/4:5 # 12 n'a aucune influence sur l'expression de CA 125. Donc, que le scFv ciblé au RE 1:9 # 9 soit exprimé à 20 % ou à 75 %, il y a une abolition presque complète de l'expression de CA 125, ce qui n'est pas le cas avec le scFv contrôle ciblé au RE 4:5 # 12.

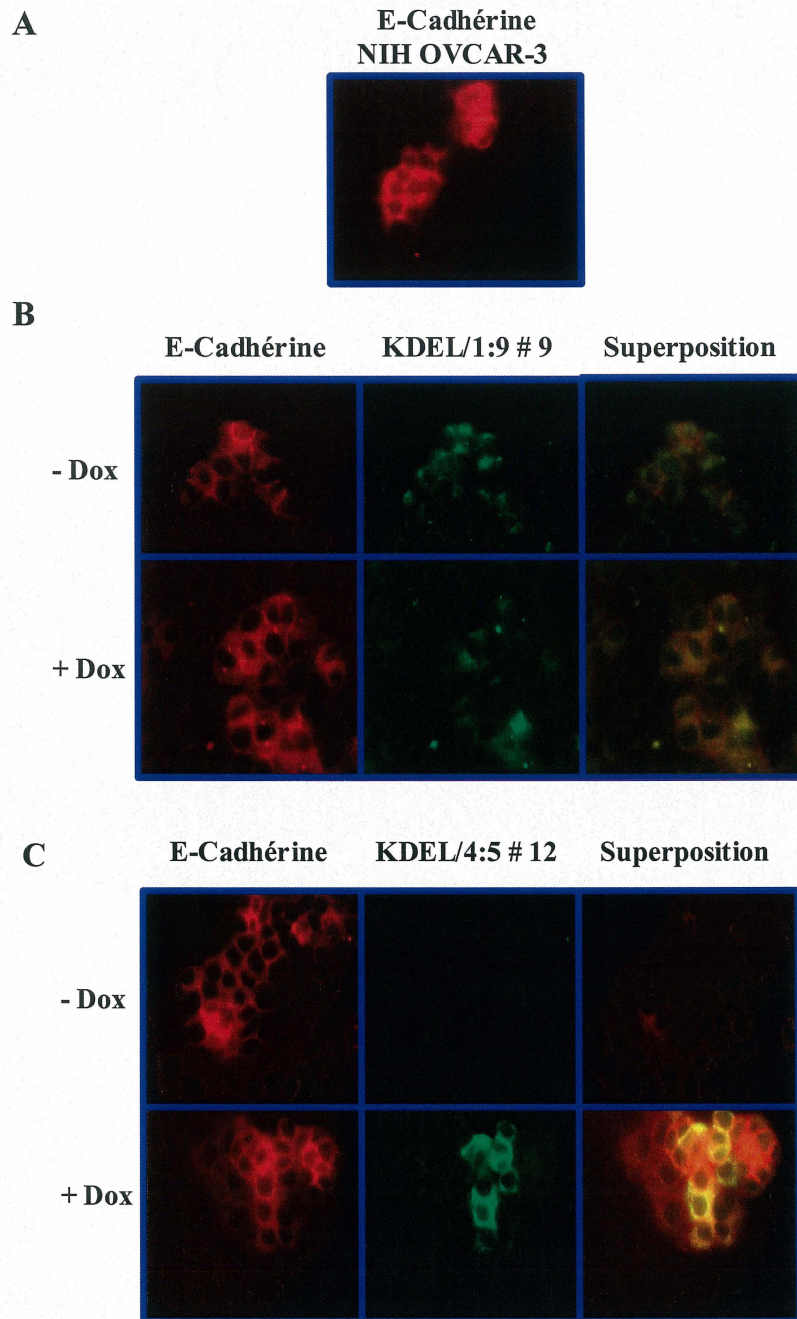


**Figure 20. Expression des scFvs et de CA 125 analysée par cytométrie de flux.**

Les clones stables VK-8 pLTR.KDEL/4:5 # 12 et VK-8 pLTR.KDEL/1:9 # 9 et les cellules NIH OVCAR-3 ont été fixés et incubés avec l'anticorps anti-c-myc 9E10 pour détecter l'expression des scFvs et avec l'anticorps monoclonal anti-CA 125 M11 pour détecter l'expression de CA 125. **A.** Analyse de l'expression de CA 125 par cytométrie de flux dans la lignée parentale NIH OVCAR-3. **B.** Diminution de l'expression de CA 125 par cytométrie de flux du transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9 en présence ou non de doxycycline. **C.** Expression de CA 125 et du scFv dans le transfectant contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 lorsqu'il est induit à la doxycycline. PE: anti-souris IgG conjugué à la R-Phycoérythrine; dox: doxycycline.

Nous avons également vérifié si l'expression de surface de d'autres protéines était influencée par l'expression intracellulaire des scFvs VK-8. Les niveaux d'expression et la localisation cellulaire de la E-cadhérine ne sont pas modifiés par l'expression des scFvs (figure 21). Par contre, la localisation cellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  est affectée lorsqu'il y a inhibition de l'expression de surface de CA 125 (figure 22 B). La localisation membranaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  devient intracellulaire, malgré un niveau d'expression similaire. En somme, l'inhibition de surface de CA 125 engendrée par le transfectant ciblé au RE 1:9 # 9 influence la localisation d'une protéine impliquée dans les interactions cellule-matrice extracellulaire (intégrine  $\alpha_v\beta_5$ ), mais non une protéine impliquée dans les interactions cellule-cellule (E-cadhérine). Ce résultat sera confirmé par microscopie confocale.

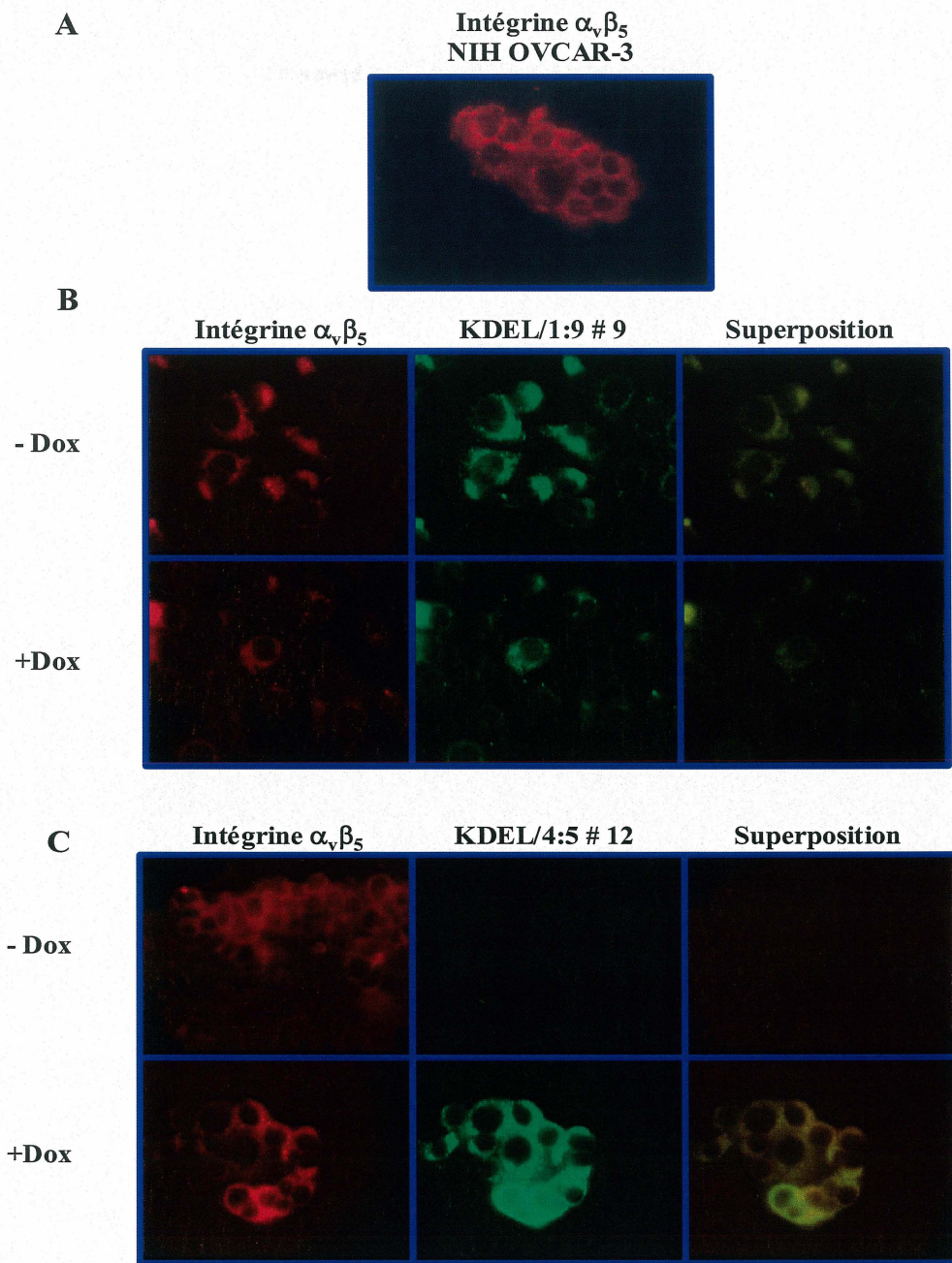




**Figure 21. Expression des scFvs et de la E-cadhérine à la surface cellulaire.**

Immunofluorescence indirecte sur lame avec les transfectants VK-8 pLTR.KDEL/4:5 # 12 et VK-8 pLTR.KDEL/1:9 # 9 qui ont été mis sur lames en présence ou non de doxycycline et incubés 48 h plus tard avec l'anticorps anti-c-myc A-14 pour détecter l'expression des scFvs et avec l'anticorps anti-E-Cadhérine clone 36 pour détecter l'expression de la E-cadhérine. **A.** Expression de la E-cadhérine à la surface cellulaire dans les cellules NIH OVCA3. **B.** Expression de la E-cadhérine à la surface cellulaire dans le transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9 induit ou non à la doxycycline. **C.** Expression de la E-cadhérine à la surface cellulaire dans le transfectant contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 en présence ou non de doxycycline. Objectif de 60 X. Dox: doxycycline.



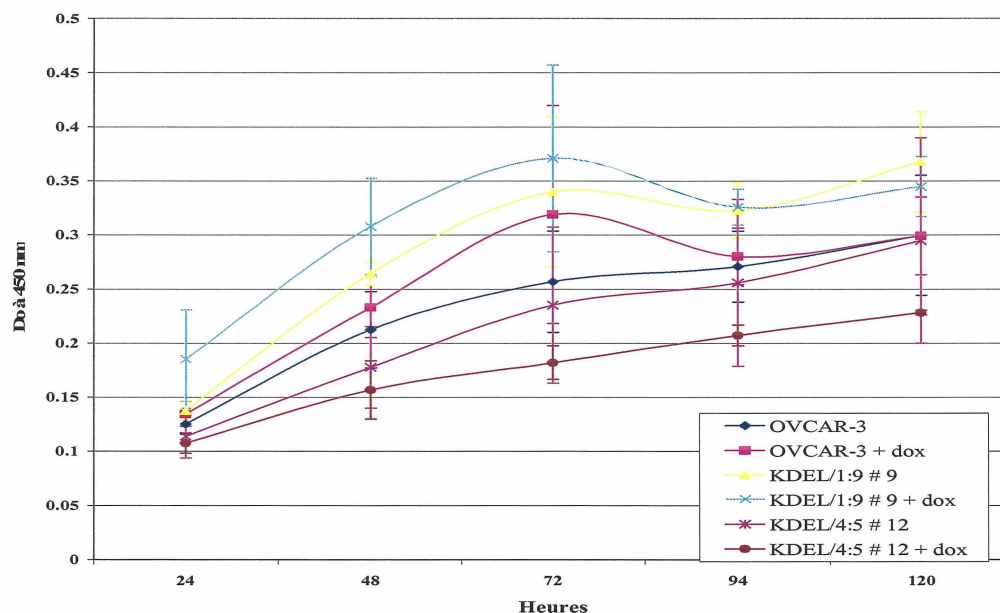


**Figure 22. Expression des scFvs et de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  à la surface cellulaire.**

Immunofluorescence indirecte sur lame avec les transfectants VK-8 pLTR.KDEL/4:5 # 12 et VK-8 pLTR.KDEL/1:9 # 9 qui ont été mis sur lames en présence ou non de doxycycline et incubés 48 h plus tard avec l'anticorps anti-c-myc A-14 pour détecter l'expression des scFvs et l'anti-intégrine  $\alpha_v\beta_5$  clone P1F6 pour détecter l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ . **A.** Expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  à la surface cellulaire dans les cellules NIH OVCAR-3. **B.** Expression intracellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  dans le transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9 induit ou non à la doxycycline. **C.** Expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  à la surface cellulaire dans le transfectant contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 en présence ou non de doxycycline. Objectif de 60 X. Dox: doxycycline.

## 29. Prolifération cellulaire

La prolifération des cellules NIH OVCAR-3 ainsi que des deux clones stables a été mesurée par un essai XTT. À la figure 23 on observe une croissance plus rapide des cellules dans le clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 qu'il soit induit ou non à la doxycycline, comparativement aux cellules du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 (induit ou non). La croissance des cellules NIH OVCAR-3 se situe entre les deux clones stables. Il est à noter pour les prochaines figures qui suivent, qu'il faut comparer les valeurs des clones stables entre eux, car ils ont subi le même processus de sélection, les cellules NIH OVCAR-3 ne sont représentées qu'à titre indicatif.



**Figure 23. Mesure de la prolifération cellulaire par essai XTT.**

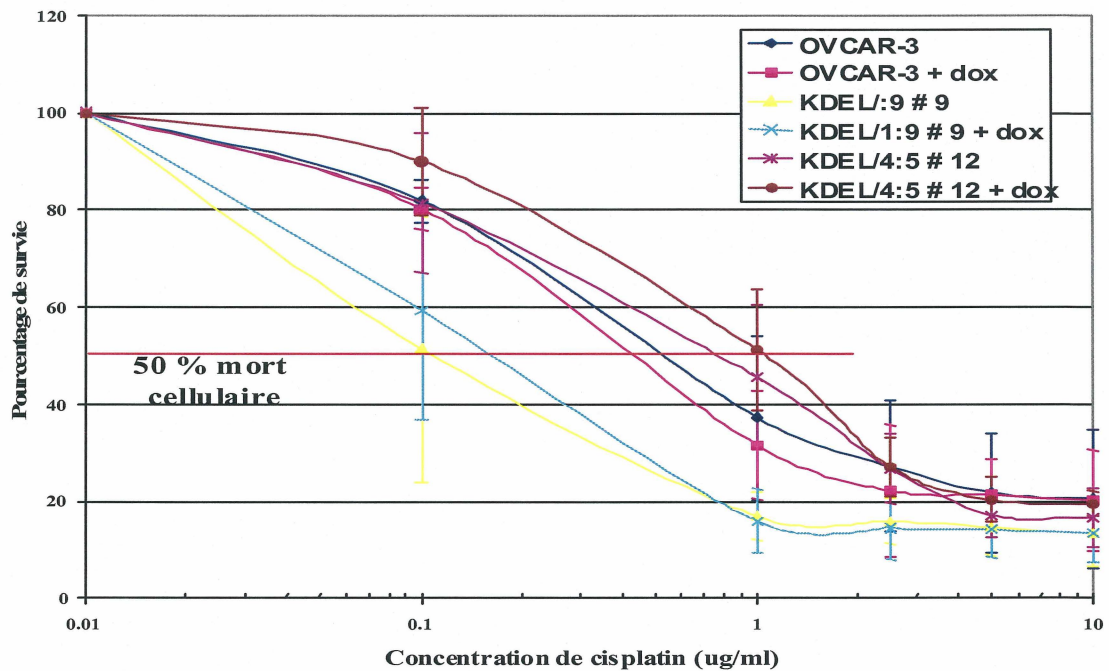
Les cellules NIH OVCAR-3 et les deux clones stables VK-8 KDEL/1:9 # 9 et KDEL/4:5 # 12 ont été ensemencés dans des plaques 96 puits (15 000 cellules) pour la mesure de la prolifération cellulaire par ajout de XTT. Chacun des échantillons a été induit ou non à la doxycycline. Dox: doxycycline. Moyenne des résultats de trois expériences indépendantes effectuées en triplicata.

### 30. Sensibilité aux drogues chimiothérapeutiques

Puisque les cellules du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 semblaient croître plus rapidement que celles du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12, nous avons vérifié, à la figure 24, si cela affectait l'efficacité d'action du cisplatine, un agent anti-tumoral qui agit au niveau des cellules en division active. Le cisplatine crée des dommages dans l'ADN en brisant les liens intra- et inter-brins dans l'ADN et en brisant les liens ADN-protéines ce qui entraîne l'inhibition de la réplication de l'ADN, de la transcription et l'arrêt du cycle cellulaire et/ou la mort cellulaire programmée (Cohen et Lippard, 2001). Nous avons aussi évalué l'efficacité du taxol (drogue chimiothérapeutique) sur les clones, car son mécanisme d'action est relié à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (figure 25) et non à l'ADN ou à la prolifération cellulaire. Le taxol induit la polymérisation des filaments des microtubules et la phosphorylation de Bcl-2, ce qui l'empêche de jouer son rôle anti-apoptotique (Makhija et al., 1999). Par l'ajout de concentrations croissantes des drogues chimiothérapeutiques cisplatine et taxol, nous avons déterminé par essai XTT la concentration de drogue qui causait 50 % de mort cellulaire (Ic50) et nous avons comparé les clones entre eux. Le Ic50 des cellules est la résultante de la moyenne de trois expériences indépendantes effectuées en triplicata. On observe à la figure 24 et au tableau 4, que les cellules du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9, qui ne possèdent plus de CA 125 à la surface cellulaire, démontrent une sensibilité accrue de dix fois au cisplatine comparativement aux cellules du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12. L'essai de sensibilité au taxol n'indique aucune différence de sensibilité entre les clones (figure 25 et tableau 5). Ces résultats suggèrent que les cellules du transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9 prolifèrent plus rapidement que les cellules du transfectant contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 et que cette prolifération active entraîne une énorme augmentation de la



sensibilité au cisplatine de ces cellules. Lorsqu'une drogue chimiothérapeutique indépendante de la prolifération cellulaire a été employée, il y a eu mort cellulaire de manière équivalente entre les transfectants, ce qui suppose que la prolifération cellulaire plus rapide des cellules du transfectant KDEL/1:9 # 9 n'est pas engendrée par un avantage de survie de celles-ci.



**Figure 24. Sensibilité des transfectants au cisplatine.**

Essai XTT avec des concentrations croissantes de cisplatine pour déterminer le  $Ic_{50}$  des échantillons. Les cellules NIH OVCAR-3, et les deux clones stables VK-8 KDEL/1:9 # 9 et KDEL/4:5 # 12 ont étéensemencés dans des plaques 96 puits (15 000 cellules) et chacun des échantillons a été induit ou non à la doxycycline, l'essai a eu lieu après 5 jours d'incubation avec le cisplatine. Moyenne des résultats de trois expériences indépendantes effectuées en triplicata. Dox: doxycycline.

Tableau 4

Concentration de cisplatine nécessaire pour causer la mort de 50 % des cellules (Ic50)

Échantillons	µg/ml cisplatine	µM cisplatine
OVCAR-3	0,67 ± 0,4	2,22 ± 1,35
OVCAR-3 + dox	0,48 ± 0,09	1,6 ± 0,29
<b>KDEL/1:9 # 9</b>	<b>0,06 ± 0,017</b>	<b>0,2 ± 0,06</b>
<b>KDEL/1:9 # 9 + dox</b>	<b>0,088 ± 0,011</b>	<b>0,293 ± 0,32</b>
KDEL/4:5 # 12	0,55 ± 0,04	1,83 ± 0,14
KDEL/4:5 # 12 + dox	0,8 ± 0,13	2,65 ± 0,45

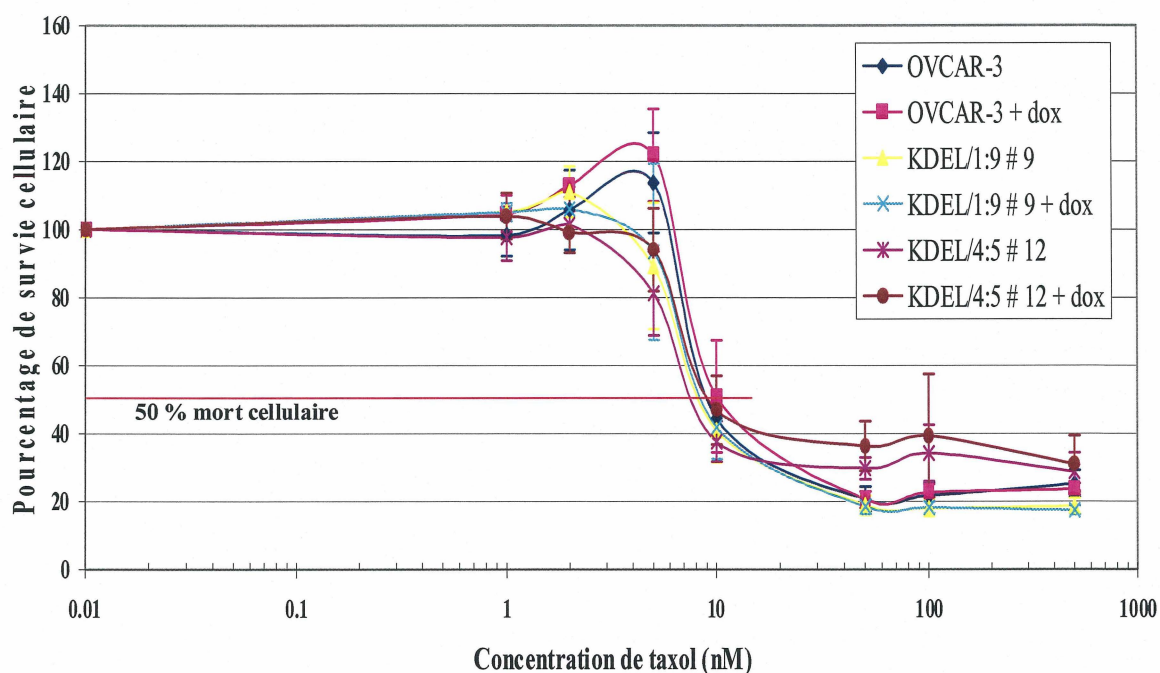


Figure 25. Sensibilité des transfectants au taxol.

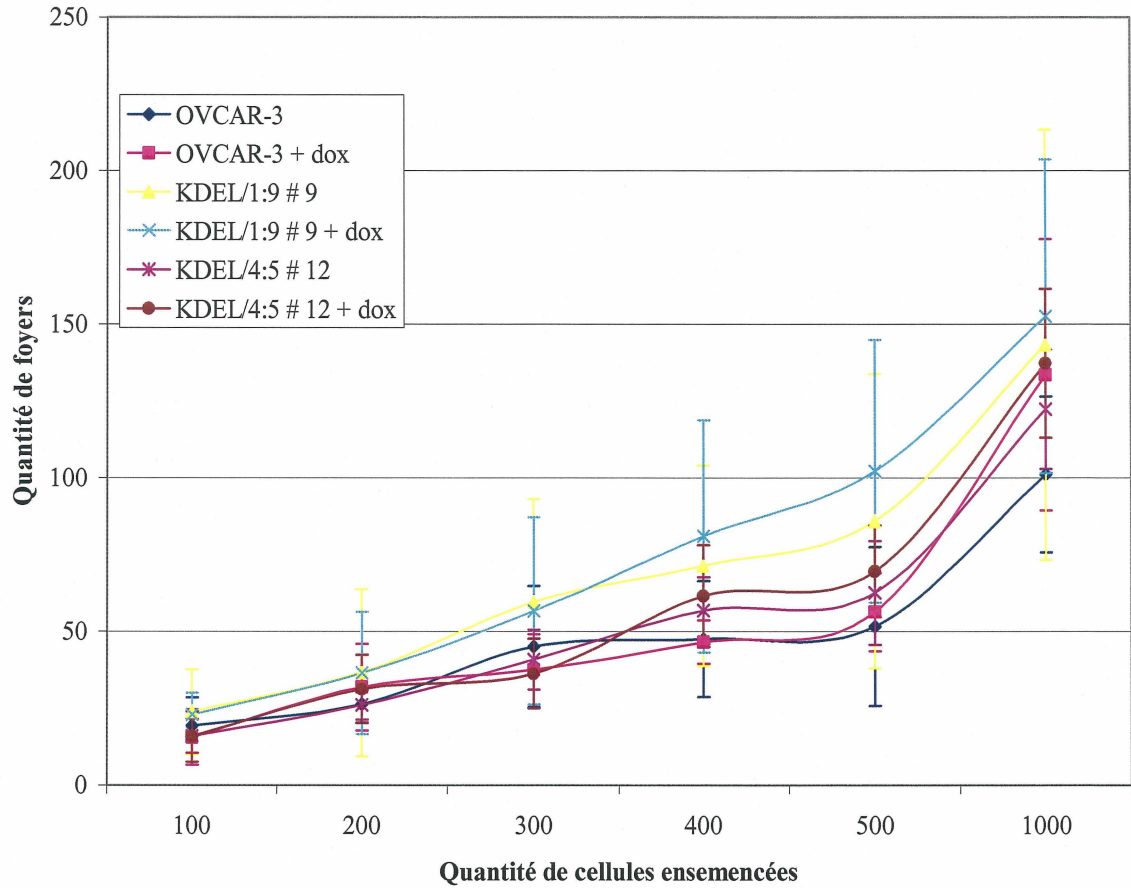
Essai XTT avec des concentrations croissantes de taxol pour déterminer le Ic50 des échantillons. Les cellules NIH OVCAR-3, et les deux clones stables VK-8 KDEL/1:9 # 9 et KDEL/4:5 # 12 ont été ensemencés dans des plaques 96 puits (15 000 cellules) et chacun des échantillons a été induit ou non à la doxycycline, l'essai a eu lieu après 5 jours d'incubation avec le taxol. Moyenne des résultats de trois expériences indépendantes effectuées en triplicata. Dox: doxycycline.

**Tableau 5****Concentration de taxol nécessaire pour causer la mort de 50 % des cellules (Ic50)**

<b>Échantillons</b>	<b>ng/ml taxol</b>	<b>nM taxol</b>
OVCAR-3	7,91 ± 0,81	9,2 ± 0,94
OVCAR-3 + dox	8,26 ± 0,97	9,6 ± 1,13
<b>KDEL/1:9 # 9</b>	<b>7,31 ± 0,93</b>	<b>8,5 ± 1,08</b>
<b>KDEL/1:9 # 9 + dox</b>	<b>7,31 ± 0,93</b>	<b>8,5 ± 1,08</b>
KDEL/4:5 # 12	6,6 ± 0,21	7,67 ± 0,24
KDEL/4:5 # 12 + dox	7,98 ± 1,03	9,27 ± 1,2

### 31. Essai de clonogénicité

L'essai de clonogénicité en conditions adhérentes, permet de mesurer la capacité des cellules à former des foyers cellulaires lorsqu'elles sontensemencées à de faible densité cellulaire. Nous avons déterminé que chacun des clones stables avait l'habileté de former des foyers cellulaires dans la même proportion (figure 26), par contre les foyers du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 sont plus gros que ceux du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 ou des cellules NIH OVCAR-3 (figure 27). Ces résultats suggèrent que les cellules du transfectant KDEL/1:9 # 9 n'exprimant plus CA 125 à la surface cellulaire conservent la possibilité de former des foyers cellulaires en condition adhésive et que ceux-ci sont plus gros que ceux du transfectant contrôle KDEL/4:5 # 12, car les cellules prolifèrent plus rapidement selon l'essai de prolifération cellulaire et par l'analyse de la sensibilité des cellules aux drogues chimiothérapeutiques.



**Figure 26. Quantité de foyers formés par essai de clonogénicité.**

Essai de clonogénicité où des quantités croissantes de cellules de chacun des clones stables VK-8 KDEL/1:9 # 9 et KDEL/4:5 # 12 et des cellules NIH OVCAR-3 induites ou non à la doxycycline, ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Les foyers de cellules formés ont été comptés après 14 jours d'incubation. Moyenne des résultats de quatre expériences indépendantes. Dox: doxycycline.



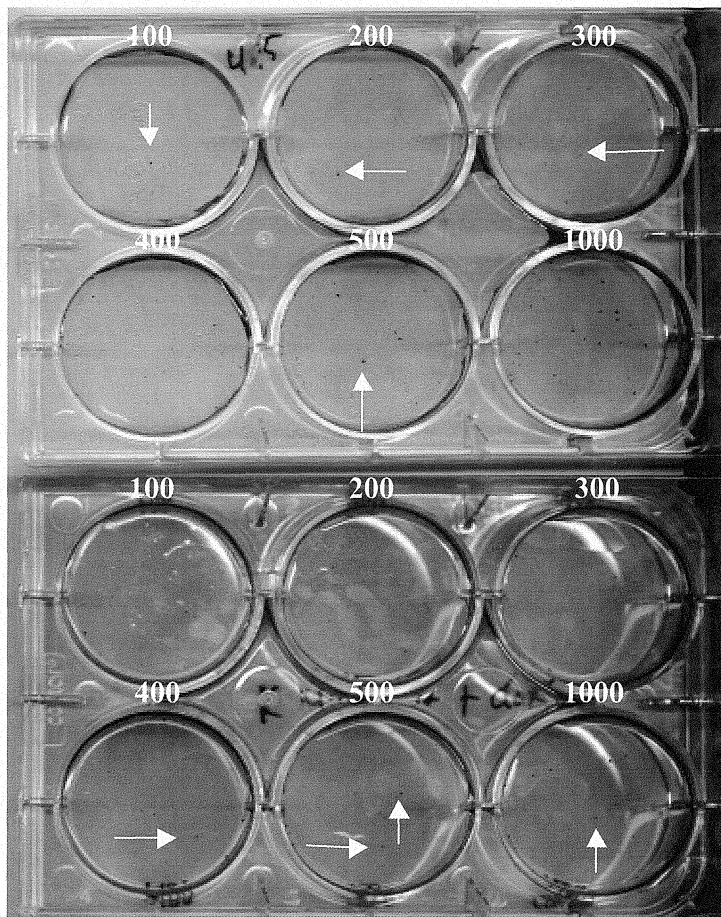
A



NIH OVCA-3

NIH OVCA-3 + dox

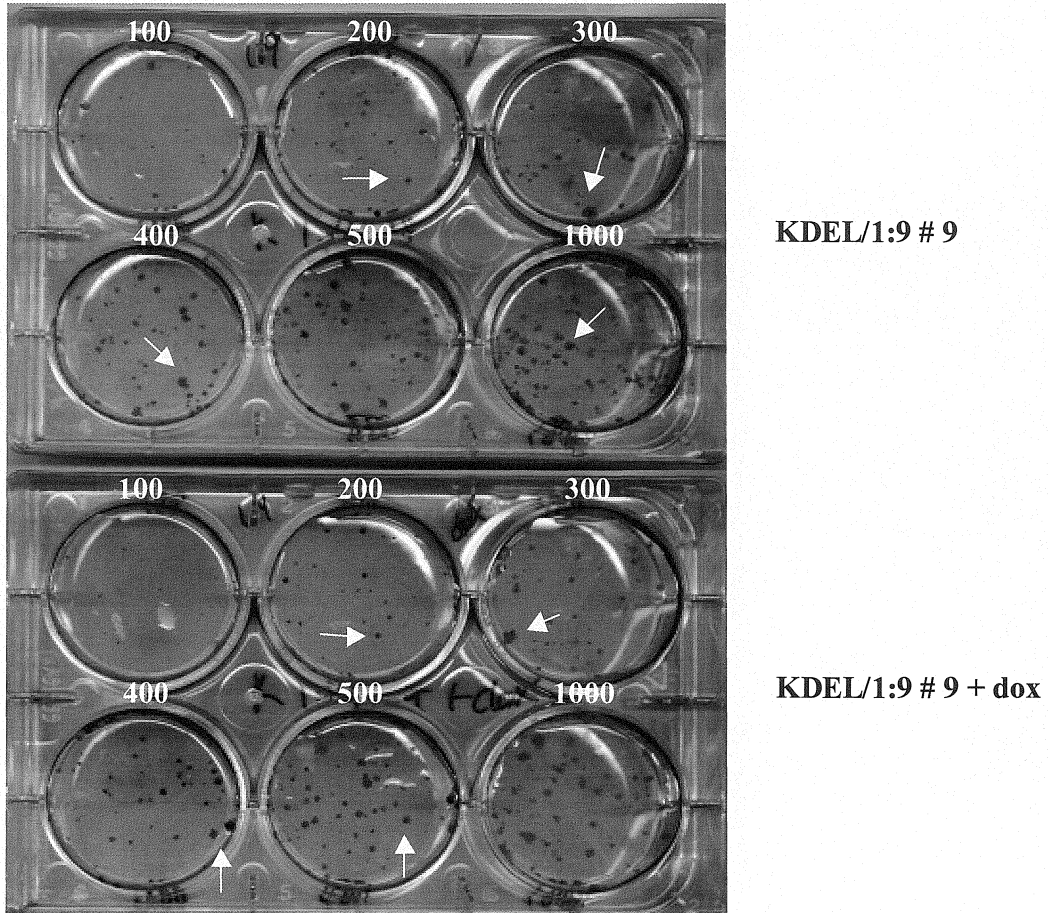
**B**



**KDEL/4:5 # 12**

**KDEL/4:5 # 12 + dox**

C

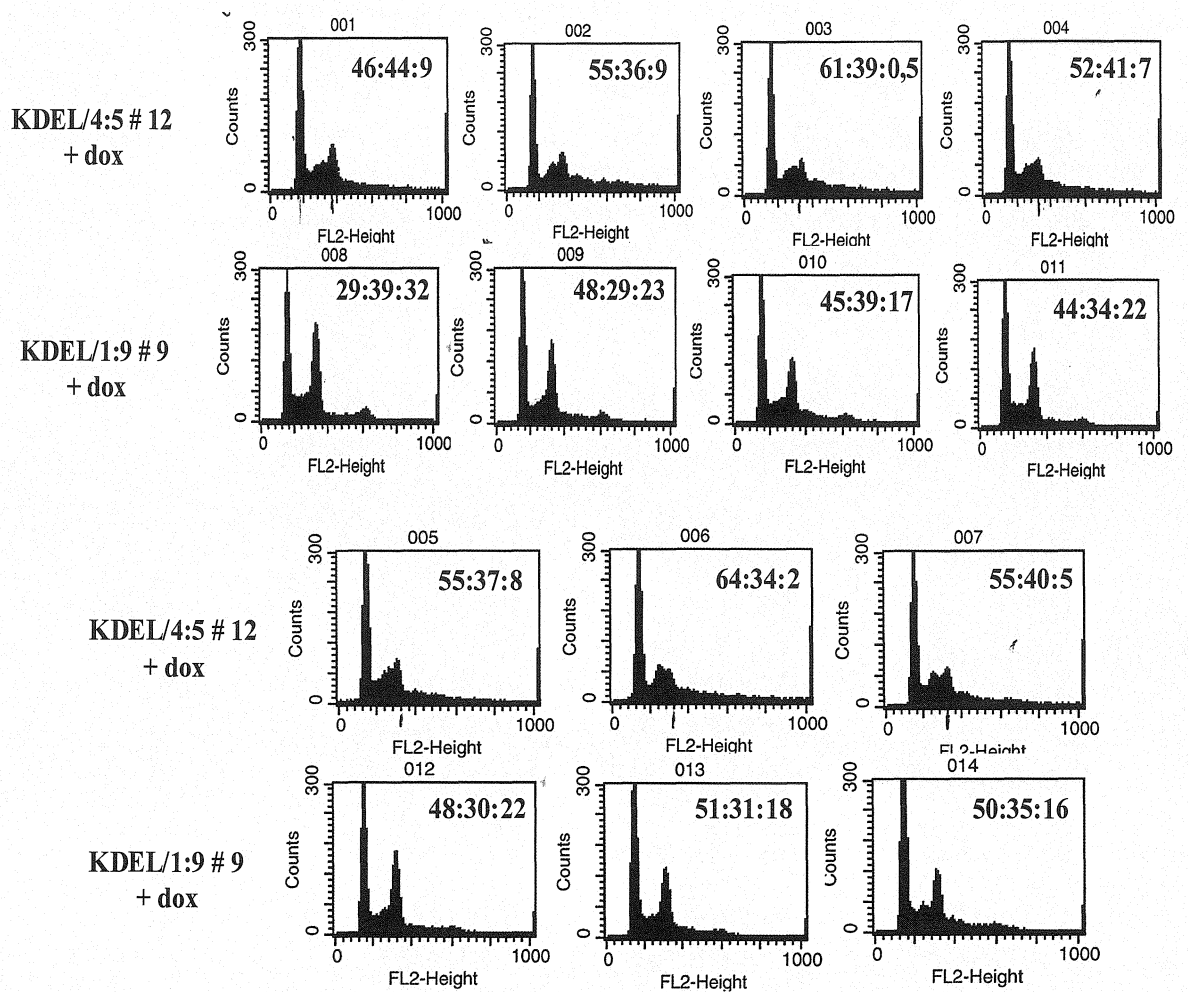


**Figure 27. Essai de clonogénicité.**

Essai de clonogénicité où des quantités croissantes de cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Les foyers de cellules formés ont été fixés au méthanol, colorés au Giemsa et comptés après 14 jours d'incubation. Les flèches blanches pointent vers des foyers de cellules et les chiffres correspondent à la quantité de cellulesensemencées au départ. **A.** Lignée cellulaire parentale NIH OVCAR-3 induite ou non à la doxycycline. **B.** Transfectant contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 induit ou non à la doxycycline. **C.** Transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9 induit ou non à la doxycycline. Résultats représentant une expérience typique. Dox: doxycycline.

## 32. Cycle cellulaire

Nous avons effectué une analyse du cycle cellulaire avec des cellules non synchronisées de chacun des clones stables VK-8 induits à la doxycycline. Comme illustré à la figure 28, des échantillons des cellules ont été prélevés aux huit heures, fixés, colorés et analysés par cytométrie de flux. On remarque à la figure 28 que dans chacun des échantillons du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9, il y a toujours plus de cellules en phase G<sub>2</sub>/M et moins en G<sub>1</sub> et S que dans le clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12. Dans ce dernier, les cellules semblent être ralenties en phase G<sub>1</sub> ou S et il n'y a pratiquement pas de cellules en G<sub>2</sub>/M. D'après ces résultats, il semble que les cellules du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 effectuent plus rapidement un cycle cellulaire que les cellules du clone stable KDEL/4:5 # 12 qui semblent être ralenties en phase G<sub>1</sub> ou S du cycle cellulaire.



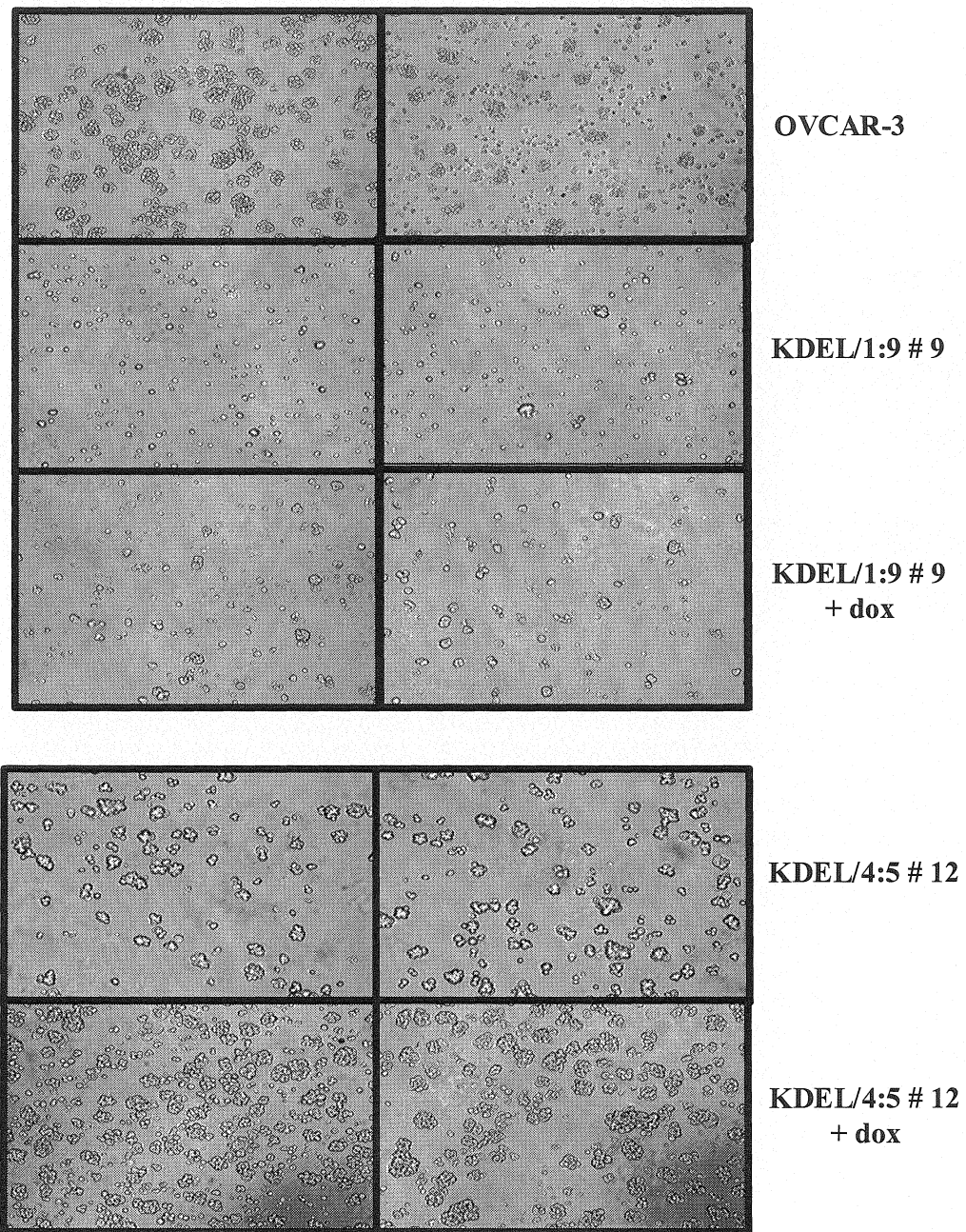
**Figure 28. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux.**

Les cellules des clones stables VK-8 KDEL/1:9 # 9 et KDEL/4:5 # 12 ont été prélevées à toutes les 8 h, 28 h après leur ensemencement dans des flacons T-75 et leur induction à la doxycycline. Ces cellules ont ensuite été fixées à l'éthanol, colorées à l'iodure de propidium et analysées par cytométrie de flux pour leur contenu en ADN.

### **33. Interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire**

Suite à un essai d'agrégation cellulaire mesurant la capacité des cellules à former des agrégats en absence de matrice permettant l'adhésion cellulaire, nous avons observé que les cellules n'exprimant plus CA 125 à leur surface (clone VK-8 KDEL/1:9 # 9) ne formaient pas de sphéroïdes comparativement aux cellules du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 et aux cellules NIH OVCAR-3, comme illustré à la figure 29. Après coloration au bleu de trypan, malgré le fait que les cellules du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 ne formaient pas de sphéroïdes, nous avons déterminé qu'elles étaient vivantes et survivaient à l'anoïkose, comme les cellules NIH OVCAR-3 et les cellules du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent donc que la perte d'expression de surface de CA 125 influence les interactions cellule-cellule tout en n'influençant pas la propriété de survie en anoïkose de ces cellules.





**Figure 29. Formation de sphéroïdes par agrégation cellulaire.**

Essai d'agrégation cellulaire. Dans des pétris bactériens dont le fond a été préalablement recouvert d'une couche d'agarose mélangé à du milieu de culture, 225 000 des différentes cellules ont étéensemencées et incubées 72 h avant de prendre des photos dans le visible à 10 X. Résultats représentant une expérience typique. Dox: doxycycline.





## DISCUSSION

La mortalité associée aux cancers ovariens est un problème de santé important chez les femmes. Malgré que la réponse initiale aux traitements de chimiothérapie atteint les 70 %, la plupart des patientes subissent une rechute et vont éventuellement décéder de cette maladie. Une meilleure connaissance de la pathogenèse du cancer ovarien nous permettrait de trouver de meilleurs outils et de meilleurs traitements pour la combattre. CA 125 est une glycoprotéine de type mucine reconnue par les anticorps des familles OC125 et M11. Malgré des efforts intensifs et un clonage récent mais partiel de l'ADNc encodant la protéine CA 125, aucune fonction n'est attribuée à CA 125. Une surexpression de CA 125 est détectée dans les cancers ovariens épithéliaux séreux, mais non dans les tissus ovariens normaux ce qui suggérerait un rôle possible de CA 125 dans le développement du cancer ovarien. Puisque la séquence codante de CA 125 n'était pas disponible, une approche alternative a été utilisée par notre laboratoire pour étudier le rôle de CA 125. Les anticorps monovalents modifiés (scFvs) ont été utilisés pour séquestrer la molécule dans un compartiment cellulaire cible. Généralement, tous les anticorps ont une structure commune qui consiste en la liaison par des ponts disulfures et liens non covalents entre deux chaînes lourdes et légères qui sont identiques entre elles. En C-terminal se trouve la région variable des chaînes lourdes et légères où chacune des régions contribue à la spécificité et à l'affinité de l'anticorps. En utilisant la technologie du PCR pour synthétiser les ADNc encodant les régions variables des anticorps, la spécificité et l'affinité des régions  $V_H$  et  $V_L$  peuvent être analysées séparément ou couplées dans une molécule nommée scFv. Puisque CA 125 contient deux épitopes

distincts sur sa portion extracellulaire, reconnus par deux classes d'anticorps, nous avons produit une librairie de scFvs contre chacun de ces épitopes (OC125 et M11).

### **35. Construction et validation de deux librairies de scFvs dirigées contre l'antigène CA 125 dans un système procaryote**

Puisque CA 125 contient deux épitopes différents et que les caractéristiques fonctionnelles de chacun d'eux ne sont pas définies, nous avons construit deux librairies de scFvs dirigées contre ces épitopes. Les librairies ont été produites à partir des hybridomes OC125 et VK-8. Les trois anticorps monoclonaux les plus connus et utilisés contre CA 125 sont OC125, VK-8 et M11, VK-8 faisant partie de la famille de M11. Il a été démontré que ces trois anticorps ont des affinités différentes pour CA 125 où par affinité décroissante  $M11 > OC125 > VK-8$  (Nustad et al., 1996; Nap et al., 1996; Nustad et al., 2002). Nous avons observé le même genre de résultats en utilisant ces trois anticorps par immunobuvardage et immunoprécipitation. Puisque nous ne possédions pas l'hybridome ou l'ARNm de M11 et que nous possédions l'hybridome VK-8 et l'ARNm de OC125 nous avons construit les librairies de scFvs à partir de ces deux derniers, malgré la plus haute affinité de M11 pour CA 125. Des librairies ont été produites pour obtenir et enrichir le plus de clones possibles liant CA 125. À cet égard, les librairies ont été produites à partir d'hybridomes, car ceux-ci expriment la plus grande quantité de chaînes lourdes et légères d'un anticorps donné. Ils représentent la source la plus directe et abondante à partir de laquelle des gènes d'anticorps peuvent être clonés (Amersham Pharmacia Biotech Inc., 1999). Quand un animal est injecté avec un antigène, la population de lymphocytes B de cet animal est stimulée à produire des

anticorps contre cet antigène. Chaque cellule de la population produit un anticorps qui reconnaît un épitope unique sur l'antigène. La réponse est polyclonale, car la population collective des anticorps développés liera plusieurs sites sur l'antigène. Une cellule B unique de cette population polyclonale peut être immortalisée par la fusion avec une lignée cellulaire de myélome. Le clone résultant, l'hybridome, sécrètera un anticorps monoclonal (Amersham Pharmacia Biotech Inc., 1999). L'utilisation d'hybridomes n'élimine pas par contre la nécessité d'effectuer une sélection pour obtenir des scFvs liant CA 125, car malgré le fait qu'ils ne sécrètent qu'un anticorps monoclonal, ils contiennent intracellulairement toutes les chaînes lourdes et légères provenant de la lignée cellulaire de myélome, donc pas seulement des chaînes lourdes et légères de l'anticorps sécrété. L'utilisation de bibliothèques permet d'obtenir une source génétique stable, car certains hybridomes sont génétiquement instables et vont perdre ou arrêter l'expression des gènes des anticorps. Avec les bibliothèques, nous pouvons générer un très grand répertoire de gènes de la région variable des immunoglobulines sans la nécessité d'énorme culture cellulaire pour leur production. Les bibliothèques peuvent aussi être facilement manipulées génétiquement (Amersham Pharmacia Biotech Inc., 1999).

Des scFvs ont été générés contre CA 125 pour inhiber cette protéine premièrement dans un but analytique. Nous voulions déterminer qu'elles étaient les fonctions de CA 125. Par la suite, nous vérifierons si les scFvs produits sont neutralisants, s'ils le sont nous pourrions utiliser directement les scFvs comme drogue contre CA 125 dans des expériences *in vivo* et éventuellement dans des essais cliniques. Plusieurs techniques d'enrobage de petits peptides sont disponibles pour permettre la livraison des scFvs dans des essais cliniques (Ma et al., 1998). Nous ne pouvions déterminer au départ si les anticorps monoclonaux OC125 et VK-8 étaient neutralisants, car nous n'avions aucune idée des conséquences obtenues de l'inhibition de CA 125, donc nous ne savions pas quoi analyser. Si les scFvs ne sont pas neutralisants,

nous pourrions continuer à les utiliser comme outil académique pour déterminer d'autres fonctions de CA 125 ou trouver des partenaires de CA 125. Dans ce cas, l'utilisation de siRNA ou la fabrication d'adénovirus encodant nos scFvs pourraient être envisagées pour permettre l'inhibition de CA 125 dans des buts thérapeutiques.

Après la construction de chacune des bibliothèques deux techniques différentes de *colony lift assay* ont été utilisées pour la sélection de scFvs solubles ou de scFvs solubles liant CA 125. Puisque la première technique ne nous a permis que de sélectionner des scFvs solubles et qu'il a fallu ensuite tous les analyser par ELISA pour déterminer lesquels liaient CA 125, nous avons utilisé une méthode permettant d'effectuer une double sélection pour la bibliothèque OC125. Une membrane a été incubée avec 1500 U/ml de CA 125 purifié et une membrane contenant les colonies a été déposée sur le dessus de celle-ci, nous analysons ensuite la membrane contenant le CA 125 pour la présence de scFvs. Malgré l'attrait de cette méthode et le fait que nous ayons obtenu un clone positif, nous avons obtenu plus de faux positifs en préincubant cette membrane dans du CA 125 purifié et la révélation a été moins efficace car les scFvs qui étaient solubles devaient traverser complètement au travers d'une membrane pour se déposer sur une deuxième. À cause de cette double sélection, nous croyons avoir perdu des candidats potentiels dans notre bibliothèque. Au delà de 125 clones ont été analysés pour chacune des bibliothèques et seulement un était positif pour CA 125 dans chacun des cas. Nous avons obtenu si peu de positifs, car un hybridome est une lignée cellulaire dérivant de la fusion de cellules de myélome et de cellules de la rate, donc les scFvs produits et solubles ne sont pas tous spécifiques à CA 125 puisqu'ils proviennent de deux types cellulaires différents, d'où la nécessité d'effectuer une sélection. En plus, quoiqu'elle soit attrayante à utiliser, car les résultats sont obtenus plus facilement et plus rapidement, la méthode du

*colony lift assay* permet un enrichissement plus faible de scFvs positifs comparativement à la méthode du *phage display* (Amersham Pharmacia Biotech Inc., 1999).

Deux candidats liant CA 125 ont été obtenus, le scFv # 1:9 dérivé de la librairie VK-8 et le scFv # 3:11 dérivé de la librairie OC125. Le scFv VK-8 # 4:5 est un scFv très bien exprimé par ELISA et immunobuvardage, mais ne liant pas CA 125, il constitue le contrôle négatif. Il est intéressant d'observer aux figures 10 et 12 que le scFv VK-8 # 1:9 est fortement exprimé par ELISA et qu'il lie faiblement CA 125, par contre le scFv OC125 # 3:11 est faiblement exprimé, mais lie plus fortement CA 125. Comme mentionné plus haut, il est intéressant de posséder deux librairies car de cette façon nous pourrions évaluer l'apport de chacun des épitopes. Il a été rapporté récemment que l'anticorps VK-8 liait un épitope différent de celui de M11 et que celui-ci serait de type conformationnel (Yin, et al., 2002). Ceci pourrait expliquer la faible liaison du scFv VK-8 # 1:9 à CA 125 dans un système procaryote, malgré une forte expression. Nous avons observé dans le laboratoire que l'anticorps monoclonal VK-8 semble avoir une affinité plus faible pour CA 125 que l'anticorps monoclonal M11. Par exemple, lors des immunoprécipitations un tampon d'immunoprécipitation moins stringente a été mis au point pour détecter les liaisons avec l'anticorps monoclonal VK-8. Par conséquent, si les anticorps monoclonaux ont des affinités différentes pour CA 125, les scFvs dérivés de ceux-ci auraient eux aussi des affinités différentes pour CA 125. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que les différents niveaux de liaison à CA 125 entre les deux scFvs dépendent de l'affinité différente de scFvs différents envers leur protéine cible ou que la liaison à CA 125 dans un système procaryote par le scFv VK-8 # 1:9 est moins efficace que celle du scFv OC125 # 3:11. Les scFvs # 1:9 et # 3:11 lient CA 125 par ELISA, mais avec une affinité de près de 20 fois inférieure à celle des anticorps parentaux OC 125 et VK-8. Ce résultat était attendu, car la concentration de scFvs incubés dans la plaque était très inférieure à celle des

anticorps monoclonaux. Un excès d'anticorps monoclonaux a été incubé dans la plaque ELISA pour être certain d'obtenir un résultat positif de ceux-ci. D'ailleurs, on observe à la figure 10 que les scFvs sont exprimés entre 6 et 15 fois moins que les anticorps parentaux. Nous aurions pu diminuer la concentration des anticorps parentaux ou concentrer la quantité de scFvs produits dans les bactéries pour en incuber plus sur la plaque ELISA pour comparer l'affinité de liaison entre les scFvs et les anticorps parentaux. Mais dans ce cas-ci, le but visé de l'expérience n'était pas de comparer les affinités entre les scFvs et les anticorps parentaux, mais de trouver des scFvs liant CA 125. De toute façon une affinité égale, inférieure ou supérieure en bactéries entre les scFvs et les anticorps parentaux, ne reflète pas le genre de liaison qui se produira dans les lignées cellulaires. D'ailleurs, il a été démontré récemment que d'avoir augmenté l'affinité de près de 1000 fois *in vitro* d'un scFv dirigé contre erbB-2 et utilisé en essais cliniques, n'a pas augmenté l'expression intracellulaire du scFv, sa liaison à sa molécule cible et la cytotoxicité tumorale est demeurée la même (Arafat et al., 2000). Il se pourrait que l'affinité de nos scFvs soit un peu plus faible que celle de l'anticorps parental envers CA 125 comme dans le cas de Wels *et al* où leur scFv contre le récepteur membranaire erbB-2 a une affinité huit fois moindre que celle de l'anticorps parental. Selon eux, cette diminution de l'affinité pourrait être causée par la présence du linker (Wels et al., 1992a).

Nous avons analysé chacune des séquences des scFvs sélectionnés. Il est intéressant de noter qu'il n'y a que trois acides aminés différents entre les scFvs dérivant du même hybridome, c'est-à-dire le scFv VK-8 # 1:9 et le scFv VK-8 # 4:5 et que ces seules différences discriminent entre un scFv qui lie CA 125 et un qui ne lie pas cette protéine. Donc, avant la partie conservée 4 du V<sub>H</sub> des deux scFvs, une cystéine (scFv # 1:9) est substituée pour un tryptophane (scFv # 4:5), entre la partie conservée 1 et la partie conservée 4 du V<sub>L</sub>, une

leucine (scFv # 1:9) est remplacée par un tryptophane (scFv # 4:5) et une valine (scFv # 1:9) est substituée à une alanine (scFv # 4:5) près de la partie conservée 4 du V<sub>L</sub>. Ces mutations sont présentes, car au départ nous avons une librairie de scFvs et le scFv # 1:9 et le scFv # 4:5 sont deux clones différents provenant d'une librairie de scFvs générée par PCR. La différence majeure entre les séquences survient avec le changement des deux acides aminés cystéine et leucine et le tryptophane. Le tryptophane porte une chaîne latérale aromatique bicyclique qui pourrait causer un encombrement stérique ou un changement de conformation du scFv ce qui empêcherait la liaison du scFv VK-8 # 4:5 à CA 125. De plus, la cystéine possède une chaîne latérale hydrophile tandis que la chaîne latérale du tryptophane est hydrophobe, ce changement dans la polarité des acides aminés pourrait affecter de façon appréciable la conformation et expliquer ainsi la non-liaison du scFv VK-8 # 4:5 à CA 125. Le scFv OC125 # 3:11 a 70 acides aminés qui sont différents du scFv VK-8 # 1:9, ainsi qu'une délétion de 21 acides aminés dans la partie conservée 3 du V<sub>H</sub> et une addition de 2 acides aminés. Selon ces séquences, il apparaît clair que les scFvs OC125 # 3:11 et VK-8 # 1:9 ne proviennent pas de la même librairie et qu'ils lient deux épitopes différents de CA 125. Par contre, aucune information n'est présentement disponible sur les séquences exactes des épitopes et on ne peut expliquer pour l'instant comment une séquence aussi différente de celle du scFv # 1:9 et qui contient une délétion dans une région constante du scFv n'empêche pas la liaison à CA 125.

### **36. Validation des librairies de scFvs dirigées contre l'antigène CA 125 dans deux systèmes eucaryotes**

Nous avons sous-cloné les scFvs VK-8 # 1:9 et # 4:5 et le scFv OC125 # 3:11 dans deux vecteurs d'expression eucaryote. Chacun des vecteurs (pSTCF et pLTR) contenait soit une séquence de sécrétion et de rétention dans la lumière du RE ou une séquence de séquestration dans les membranes du trans-médian Golgi. Comme mentionné précédemment, le scFv # 4:5 a été utilisé comme contrôle négatif. Nous avons préféré ce contrôle à un vecteur vide, car dans ce cas-ci il y a sécrétion d'un scFv qui ne lie pas CA 125 alors nous pouvons évaluer l'effet de la production d'une protéine et son accumulation dans la cellule hôte et vérifier si cela engendre des effets non désirés. Au départ, nous voulions utiliser comme contrôle négatif le vecteur pSTCF (KDEL ou Golgi) encodant un linker de 15 acides aminés qui n'avait aucune fonction. Par contre, vu la petite taille du linker, il était difficile de vérifier son expression par immunobuvardage et immunofluorescence.

CA 125 est une protéine très glycosylée ayant des O- et des N-glycosylations, celles-ci s'ajoutant tout le long de la voie de sécrétion. C'est-à-dire que les N-glycosylations s'ajoutent à la molécule au niveau du RE et leur synthèse se termine dans le cis-Golgi, tandis que les O-glycosylations s'ajoutent au niveau du cis-Golgi et leur biosynthèse se termine au trans-Golgi (Strous et Dekker, 1992). D'autre part, plus la protéine progresse dans la voie de sécrétion, plus elle acquiert sa conformation finale. Dans cette optique, nous avons ciblé nos scFvs dans deux compartiments cellulaires, le RE et le trans-médian Golgi, pour séquestrer CA 125 et ainsi déterminer si la quantité d'hydrates de carbone et/ou la conformation de CA 125 ont une influence sur l'efficacité et l'affinité de liaison des scFvs à CA 125 dans des



cellules humaines de cancer ovarien. Tout d'abord, lorsque les scFvs sont exprimés transitoirement dans les cellules NIH OVCAR-3, on remarque que les scFvs ciblés dans les membranes du trans-médian Golgi se trouvent sous forme de doublet (visualisé aux figures 14 et 15). Des doublets de scFvs ont été observés lorsque ceux-ci étaient ciblés à la mitochondrie, car le signal ciblant les scFvs aux mitochondries contient une préséquence qui est clivée. La forme immature du scFv correspondrait à la bande la plus haute sur un gel SDS, tandis que la forme mature du scFv, après clivage, correspondrait à la bande la plus basse (Biocca et al., 1995). Certains scFvs ciblés au cytoplasme forment des doublets à cause de l'environnement réducteur de celui-ci, la bande du haut par gel SDS, représentant la forme réduite du scFv et la bande du bas, la forme oxydée (Martineau et al., 1998). Des scFvs ciblés dans la lumière du RE peuvent aussi former des doublets, la bande la plus élevée par gel SDS correspondant à une forme N-glycosylée du scFv et cette bande n'étant plus détectée après un traitement avec une N-glycosidase (Beerli et al., 1994a). Puisque nous sommes la première équipe à utiliser des scFvs ciblés au Golgi, il n'y a pas de littérature disponible à ce sujet, alors nous croyons que la troisième hypothèse est la plus probable dans notre cas. Comme mentionné plus haut, les N-glycosylations se produisent dans le RE, par contre la structure finale de cette glycosylation se produit dans le Golgi, donc il serait probable que le doublet observé soit une forme N-glycosylée de celui-ci. Mais si tel était le cas, il est surprenant que nous n'observions pas ce doublet lorsque les scFvs sont ciblés au RE comme dans le cas de Beerli et *al.* On pourrait supposer que des O-glycosylations pourraient être à l'origine du doublet observé lorsque les scFvs sont ciblés au Golgi, mais peu de données sont connues au sujet de la O-glycosylation des scFvs. Par contre, si on analyse la séquence des trois scFvs (figure 13), des résidus sérines et thréonines y sont présents, alors on pourrait imaginer qu'ils puissent être glycosylés. Enfin, aucun clivage de la séquence dirigeant les scFvs aux membranes du trans-médian Golgi n'est nécessaire et l'environnement du Golgi

ressemble à celui du RE (moins réducteur) comparativement au cytoplasme, donc ces deux hypothèses n'ont pas été retenues. Donc, nous croyons que le doublet de scFvs est produit par une N-glycosylation de ceux-ci lorsqu'ils sont ciblés au Golgi.

Nous avons confirmé *in vitro*, par transfection transitoire de chacun des scFvs, la liaison des scFvs VK-8 # 1:9 et OC125 # 3:11 à CA 125 par des expériences de co-immunoprécipitation. Il est intéressant d'observer à la figure 15 A que seulement les scFvs ciblés au RE sont co-immunoprécipités par les anticorps monoclonaux OC125 et VK-8 et non ceux ciblés au Golgi. Cette difficulté de liaison des scFvs à CA 125 dans le Golgi pourrait être causée par une plus grande quantité de glycosylations de CA 125 ou des scFvs ou par une conformation non disponible de CA 125 pour la liaison des anticorps comme mentionné précédemment. Ce problème ne se produirait pas dans le RE, car la protéine et les scFvs seraient moins glycosylés que dans le Golgi et CA 125 est moins repliée. D'ailleurs, CA 125 sous-glycosylé est reconnu par les anticorps OC125 et M11 dans des extraits bactériens. Les auteurs ont exprimé une unité répétitive de CA 125, qui est habituellement glycosylée, dans les bactéries *E. coli* JM 109 et les anticorps l'ont détecté (O' Brien et al., 2001). En plus, puisque les scFvs ciblés au RE se retrouvent dans la lumière de cet organelle et que les scFvs ciblés au trans-médian Golgi sont ancrés dans les membranes de ces saccules, nous croyons que la liaison scFv-CA 125 se produirait plus efficacement dans le RE. L'ancrage des scFvs dans les membranes du trans-médian Golgi pourrait masquer certains sites de liaison des scFvs à CA 125 ou engendrer un certain encombrement stérique. La bande observée à la figure 15 C dans la dernière colonne, nous confirme la liaison *in vitro* du scFv OC125 # 3:11 à CA 125, co-immunoprécipité par l'anticorps monoclonal VK-8, ciblé au trans-médian Golgi, par contre cette liaison à CA 125 n'a été observée qu'une seule fois et ce résultat a été obtenu après plusieurs tentatives, ce qui supporte l'idée d'une

reconnaissance ou d'une liaison moins favorisée dans le Golgi. D'ailleurs, ce même scFv n'a pu être immunoprécipité par l'anticorps anti-c-myc ni par l'anticorps monoclonal OC125, comparativement aux scFvs ciblés au RE, supportant un problème d'accessibilité lorsqu'ancré dans la membrane.

Après confirmation de la localisation intracellulaire des scFvs ciblés au RE et au trans-médian Golgi, nous avons observé par immunofluorescence indirecte sur lame l'expression des différents scFvs et celle de CA 125 à la surface cellulaire. Comme proposé dans notre hypothèse de départ, lorsque le scFv OC125 # 3:11 ciblé au RE ou au trans-médian Golgi et le scFv # 1:9 ciblé au RE sont exprimés transitoirement dans les cellules NIH OVCAR-3, on observe une forte diminution de l'expression de CA 125 à la surface cellulaire. Donc, en plus de lier CA 125, ces différents scFvs séquestrent CA 125 dans leur compartiment cellulaire cible et l'empêche de se localiser à la membrane plasmique et ainsi potentiellement de jouer son rôle. Cette conclusion n'a pu être observée pour le scFv # 1:9 ciblé au trans-médian Golgi. Puisque l'anticorps VK-8 semble avoir une moins bonne efficacité de liaison à CA 125 que les anticorps OC125 ou M11 et qu'en plus le scFv dérivé de cette librairie est ciblé au Golgi, il se pourrait que ce soit suffisant pour empêcher l'interaction entre le scFv et CA 125. Pour confirmer que l'inhibition de surface de CA 125 n'était pas causée par la transfection des différents scFvs, nous avons transfecté transitoirement le scFv contrôle ciblé au RE VK-8 # 4:5, dans les cellules NIH OVCAR-3 et lorsqu'il était exprimé, aucune diminution de l'expression de surface de CA 125 n'était observée par immunofluorescence indirecte sur lame. Pour visualiser l'effet sur CA 125 du scFv OC125 # 3:11, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal OC125 malgré que ce scFv se lie sur l'épitope OC125. Puisque CA 125 contiendrait plus de 60 répétitions en tandem, donc plus de 60 épitopes, nous croyons que le scFv OC125 # 3:11 lie une certaine quantité de ces épitopes et qu'il en reste

un nombre suffisant de libres pour que l'anticorps monoclonal OC125 lie CA 125 pour détecter la protéine lors de l'étude par immunofluorescence. En plus, nous avons réussi à co-immunoprécipiter le scFv OC125 # 3:11 ciblé au RE avec les deux anticorps monoclonaux, soit OC125 et VK-8. Par contre, il serait intéressant de répéter ces immunofluorescences en détectant la présence de CA 125 avec l'anticorps monoclonal VK-8 pour confirmer nos résultats et démontrer que peu importe l'anticorps ou le scFv utilisé, les résultats seront les mêmes vu le nombre important d'épitopes sur CA 125.

Comme mentionné plus haut, nous avons sous-cloné les différents scFvs dans le vecteur rétroviral d'expression eucaryote pLTR. Ce système nous a permis d'obtenir des clones stables, c'est-à-dire des cellules exprimant de manière stable et inductible les scFvs, par l'ajout de doxycycline. Pour l'instant, nous n'avons obtenu des clones dans la lignée cellulaire NIH OVCAR-3 qu'avec les scFvs VK-8 # 1:9 et # 4:5 ciblés au RE. Les autres clones, avec le scFv # 3:11 ciblé au RE et au trans-médian Golgi, seront produits prochainement. Nous avons conservé à cette étape le scFv # 4:5 comme contrôle négatif, car le scFv # 1:9 lorsqu'il n'est pas induit avec la doxycycline a une expression de base suffisante pour inhiber l'expression de surface de CA 125. Ce contrôle n'est pas idéal, car l'avantage de travailler avec des clones stables c'est qu'habituellement ils sont inductibles et que lorsque le scFv est non induit, cela constitue le meilleur contrôle négatif. Donc, puisque ce sont deux clones différents, ils ne produiront pas les mêmes effets dans la cellule-hôte, c'est pourquoi nous avons toujours effectué nos expérimentations avec la lignée parentale pour vérifier si le clone stable contrôle négatif avait sensiblement les mêmes résultats que la lignée parentale. Encore une fois, la lignée parentale n'est pas un excellent contrôle, car elle n'a pas subi le même processus de sélection que les clones stables, mais nous croyons qu'en comparant les résultats de la lignée parentale et du clone stable contrôle exprimant le scFv 4:5 # 12 nous

pouvons déterminer et juger de quels sont les effets du transfectant exprimant le scFv 1:9 # 9 sur CA 125. Prochainement une nouvelle sélection de clones stables aura lieu pour obtenir un clone stable exprimant le scFv # 1:9 de manière parfaitement inducible pour confirmer nos résultats obtenus jusqu'à maintenant.

Nous avons vérifié l'expression des transfectants par immunobuvardage (résultats non montrés). Nous avons observé que le transfectant KDEL/4:5 # 12 était bien exprimé lorsqu'il était induit avec la doxycycline et qu'il y avait une forte expression de CA 125 que le transfectant soit induit ou non. Par contre, par immunobuvardage nous n'avons pas observé l'expression du transfectant KDEL/1:9 # 9 même en présence de doxycycline et nous n'avons observé que très faiblement l'expression de CA 125. Ce phénomène est connu et a déjà été observé et rapporté comme étant une dégradation du complexe scFv-protéine présent dans le RE par la voie de dégradation via le protéasome par ubiquitination (Richardson et al., 1995; Werner et al., 1996; Piché et al., 1998a; Piché et al., 1998c). Par contre, ce phénomène souvent rapporté n'a jamais été prouvé hors de tout doute. D'ailleurs dans l'article de Richardson *et al*, les auteurs "prouvent" que le complexe scFv-protéine est dégradé par la voie du protéasome en démontrant qu'il n'est pas dégradé par la voie du peroxysome et du lysosome, ce qui en soit n'implique pas que c'est la voie du protéasome qui sera utilisée. Dans notre cas, nous avons tenté de démontrer par quelle voie avait lieu la dégradation de notre complexe scFv-CA 125. Nous avons successivement inhiber la voie de dégradation via le protéasome, le peroxysome et le lysosome avec des inhibiteurs disponibles commercialement et dans aucun cas nous n'avons observé une augmentation de l'expression du scFv du transfectant KDEL/1:9 # 9 ou de CA 125, malgré l'augmentation de l'expression de protéines contrôles accumulées (par exemple, les protéines ubiquitinilées lorsque la voie de dégradation via le protéasome est inhibée) (résultats non montrés). En plus, comme on le

remarque à la figure 19, l'expression intracellulaire du scFv KDEL/1:9 # 9 est facilement détectable par immunofluorescence indirecte sur lame et cytométrie de flux, ce qui n'est pas le cas par immunobuvardage. Cette différence ne peut être expliquée par les anticorps utilisés, car nous avons testé les deux anticorps anti-c-myc (souris et lapin) dirigés contre l'étiquette peptidique c-myc présente en C-terminal des scFvs. Nous ne pouvons pour l'instant expliquer davantage ce phénomène.

Nous avons confirmé avec les clones VK-8 ciblés au RE 1:9 # 9 et 4:5 # 12, par immunofluorescence indirecte sur lame et cytométrie de flux, que le scFv 1:9 # 9 lorsqu'il était exprimé, causait une diminution de l'expression de CA 125 à la surface cellulaire, tandis que l'expression du scFv 4:5 # 12 n'affectait pas la localisation cellulaire de CA 125. Il est intéressant de noter que le scFv KDEL/1:9 # 9 est exprimé faiblement (~ 20 %) en absence de doxycycline et que cette expression de base est suffisante pour inhiber CA 125 à la surface cellulaire (6 % au lieu de 98 %). Donc, malgré que son expression soit approximativement triplée en présence de doxycycline, l'effet sur CA 125 semble être le même (5,58 % au lieu de 98 %). Un autre clone stable ciblé au RE, 1:9 # 7, a été produit et il sera analysé prochainement pour déterminer son inductibilité. S'il est parfaitement inductible, comme le scFv VK-8 KDEL/4:5 # 12, nous aurons deux systèmes différents pour étudier CA 125, un étant considéré comme ayant une expression constitutive du scFv et l'autre ayant une expression inductible du scFv. Dans le premier cas, cela nous permettra d'étudier les effets à long terme de l'inhibition de CA 125, tandis que dans l'autre cas nous pourrons étudier la cinétique et les effets à court terme de l'inhibition de CA 125.

### 37. Conséquences de l'inhibition de CA 125 à la surface cellulaire

Puisque le scFv VK-8 KDEL/1:9 # 9 inhibe l'expression de la protéine membranaire CA 125, nous avons vérifié si ce scFv était bien spécifique à celle-ci. Nous avons analysé par immunofluorescence indirecte sur lame l'expression de la E-cadhérine et de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  dans la lignée cellulaire NIH OVCAR-3 et dans les clones stables VK-8 KDEL/1:9 # 9 et KDEL/4:5 # 12 induits ou non à la doxycycline. Nous nous attendions à ce qu'il n'y ait aucun changement dans l'expression de ces protéines. La E-cadhérine est une glycoprotéine transmembranaire qui médie l'adhésion cellule-cellule au niveau des jonctions adhérentes et des desmosomes. Cette réaction est homophile, c'est-à-dire que la E-cadhérine s'homodimérise, mais ne lie aucune autres cadhérines ou molécules (Skubitz, 2002). À la figure 21, on observe que l'expression des scFvs induits ou non ne semble pas affecter l'expression et la distribution de la E-cadhérine à la surface des cellules. Par contre, comme on le verra plus loin, CA 125 semble être impliqué dans le processus d'adhésion cellule-cellule, donc il serait intéressant d'analyser si CA 125 pourrait faire partie de la voie de la E-cadhérine, par exemple en analysant les changements de statut de phosphorylation entre ces deux protéines. D'ailleurs, il a été rapporté que la mucine MUC 1 bloque les interactions cellule-cellule en déstabilisant les interactions cellule-cellule et/ou cellule-matrice extracellulaire et en interférant avec l'adhésion médiée par les intégrines et E-cadhérine (Quin et McGuckin, 2000). En plus, la phosphorylation du domaine cytoplasmique de MUC 1 corrèle avec un changement dans l'adhésion cellule-cellule. Enfin, MUC 1 est phosphorylé en tyrosine plus abondamment dans des cultures cellulaires non confluentes et cette phosphorylation se produirait lors de la migration cellulaire et pourrait refléter la redistribution de MUC 1 au moment de l'adhésion cellule-cellule (Quin et McGuckin, 2000).

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellule-matrice extracellulaire à la surface cellulaire qui sont composés d'une sous-unité  $\alpha$  liée de manière non covalente à une sous-unité  $\beta$ . Les intégrines sont activées par un changement conformationnel causé par la liaison du ligand ou par un processus intracellulaire. L'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ , exprimée à la surface des cellules cancéreuses lie la vitronectine, la fibronectine et le fibrinogène, des composantes de la matrice extracellulaire (Brown et al., 2000; Neuromuscular, 2002). Nous observons à la figure 22 B, que la localisation cellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  est affectée par l'expression du scFv VK-8 KDEL/1:9 # 9 induit ou non à la doxycycline tandis que son niveau d'expression semble être le même entre les différents échantillons lorsqu'analysé par immunofluorescence, des analyses par cytométrie de flux seront effectuées pour quantifier cette expression. Au lieu de se retrouver à la surface cellulaire, l'intégrine semble être co-localisée au RE avec le scFv VK-8 KDEL/1:9 # 9 et CA 125. Ce changement de localisation n'est pas observé avec l'expression du scFv VK-8 contrôle KDEL/4:5 # 12. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Le transfectant KDEL/1:9 # 9 pourrait lier l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  de façon non spécifique et ainsi la séquestrer au RE. Cette hypothèse semble peu probable, car le scFv est un anticorps et il devrait lier spécifiquement son antigène et non d'autres molécules. De plus le transfectant contrôle ne semble pas séquestrer cette intégrine au RE. Cette hypothèse sera vérifiée par des expériences de co-immunoprécipitation pour vérifier s'il y a liaison entre les scFvs et l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ . Ensuite, CA 125 pourrait être un ligand de cette intégrine et de ce fait puisque CA 125 est séquestré au RE, l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  pourrait être co-séquestrée. Des expériences ultérieures d'immunoprécipitation nous informeront sur une liaison possible entre CA 125 et cette intégrine. Pour ces deux premières hypothèses, nous pourrions aussi effectuer des essais ELISA avec de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  purifiée et vérifier s'il y a liaison avec CA 125 ou les scFvs. Nous effectuerons cette expérience de la même façon que nous avons testé



la liaison des scFvs à du CA 125 purifié par ELISA. La liaison entre CA 125 et l'intégrine pourrait se produire de manière indirecte, c'est-à-dire que CA 125 pourrait lier une molécule, qui elle lierait l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ . Le changement de localisation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  pourrait être causé par des cascades de signalisation intracellulaires. CA 125 pourrait moduler certains gènes ou phosphoryler certaines molécules ce qui entrainerait une modulation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  de manière positive ou négative. Enfin, si CA 125 influence réellement la localisation cellulaire de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  on pourrait imaginer que CA 125 aurait un rôle à jouer au niveau des interactions cellule-matrice extracellulaire et il sera intéressant d'étudier d'autres molécules impliquées au niveau de ces interactions.

Nous avons analysé la prolifération cellulaire entre les deux clones stables, car lors de passages cellulaires effectués en général aux trois jours, les cellules exprimant le scFv VK-8 KDEL/1:9 # 9 semblaient croître plus rapidement que les NIH OVCAR-3 et les cellules exprimant le scFv contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12. On remarque souvent lorsque des molécules probablement impliquées dans la tumorigenèse sont inhibées, qu'il y a une diminution de la prolifération cellulaire de ces cellules (Deshane et al., 1994; Jannot et al., 1996; Kasono et al., 2000; Wels et al., 1992a), ce qui ne semblait pas être notre cas. L'essai XTT mesure la quantité de XTT incorporé et réduit par les cellules vivantes. Ce procédé se réfère plus à un essai métabolique, c'est-à-dire que si deux lignées cellulaires prolifèrent au même rythme et qu'une d'elle est métaboliquement plus active que l'autre, les densités optiques mesurées suite à l'essai XTT seront plus élevées dans ce cas. En général, une augmentation du métabolisme indique une augmentation du nombre de cellules donc une augmentation de la prolifération cellulaire mesurée, c'est pourquoi dans la littérature on accepte cet essai comme une mesure de la prolifération cellulaire. D'après cet essai (figure

23), les cellules contenant le scFv VK-8 KDEL/1:9 # 9 prolifèrent plus rapidement que les cellules contenant le scFv VK-8 contrôle KDEL/4:5 # 12, lorsqu'on compare les scFvs induits entre eux. Ce résultat corrèle bien avec l'observation d'une croissance cellulaire plus rapide du transfectant KDEL/1:9 # 9 lors des passages cellulaires réguliers. Un essai de prolifération cellulaire plus direct, essai d'incorporation de BrdU, a été effectué (résultats non montrés) pour corrèler nos résultats obtenus par essai XTT, malheureusement il est non pertinent et sera répété avec différentes conditions prochainement.

La prolifération cellulaire est influencée par la vitesse de progression du cycle cellulaire et le taux d'apoptose. Comme deux évidences (passages cellulaires réguliers et essai XTT) supportaient une augmentation de la prolifération cellulaire lorsqu'il y a perte de CA 125 à la surface cellulaire, nous avons analysé si c'était causé par une résistance accrue à l'apoptose de ces cellules ou par un cycle cellulaire plus rapide.

Nous avons vérifié l'efficacité d'action du cisplatine, un agent anti-tumoral qui agit au niveau des cellules en division active, sur les clones stables et la lignée parentale. Le cisplatine, en s'intercalant, crée des dommages dans l'ADN en brisant les liens intra- et inter-brins et en brisant les liens ADN-protéines ce qui entraîne l'inhibition de la réplication de l'ADN, l'inhibition de la transcription et l'arrêt du cycle cellulaire et/ou la mort cellulaire programmée (Cohen et Lippard, 2001). Plus les cellules sont en prolifération active, plus elles seront affectées par le cisplatine, donc selon les résultats précédents nous nous attendions à observer des  $IC_{50}$  différents entre les cellules qui expriment CA 125 et celles qui ne l'expriment plus. Par l'ajout de concentrations croissantes de cisplatine, nous avons déterminé par essai XTT la concentration de drogue qui causait 50 % de mort cellulaire ( $IC_{50}$ ). Les cellules du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9, qui ne possèdent plus de CA 125 à la surface

cellulaire, démontrent une sensibilité accrue au cisplatine de près de dix fois, comparativement aux cellules du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12. Ce résultat pourrait confirmer que le transfectant KDEL/1:9 # 9 a une prolifération cellulaire plus rapide que le transfectant KDEL/4:5 # 12 et la lignée parentale.

Nous avons ensuite déterminé si cette prolifération cellulaire plus rapide des cellules n'exprimant plus CA 125 était causée par une résistance accrue à l'apoptose. Nous avons donc évalué l'efficacité du taxol (drogue chimiothérapeutique) entre les clones, car son activité est différente de celle du cisplatine, malgré que ces deux drogues induisent l'apoptose. Le mécanisme d'action du taxol est relié à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et est indépendant de la division cellulaire. Le taxol induit la phosphorylation de Bcl-2, pour l'empêcher de jouer son rôle anti-apoptotique et induit également la polymérisation des filaments des microtubules (Makhija et al., 1999). Donc, si les cellules n'exprimant plus CA 125 sont plus résistantes à l'apoptose que les cellules exprimant CA 125, nous devrions observer encore une fois des différences au niveau des  $IC_{50}$ . Alors, nous avons analysé la sensibilité des cellules au taxol par un essai XTT et aucune différence de sensibilité ( $IC_{50}$ ) n'a été observée entre les clones. Donc, la prolifération cellulaire plus rapide observée n'est pas reliée à une résistance des cellules à l'apoptose ou à un taux d'apoptose plus faible dans les cellules du transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9. Nous vérifierons prochainement les niveaux d'apoptose sans stimuli entre les transfectants par un essai de mesure de la caspase 3 (caspase activée lorsqu'il y a apoptose) pour déterminer si les taux basaux d'apoptose sont similaires entre les deux clones. Nous nous attendons à ce qu'il n'y ait aucune différence dans les niveaux basaux d'apoptose entre les transfectants et la lignée parentale.

Ces résultats sont très intéressants, car ils confirment que la prolifération des cellules du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 est plus rapide que pour le clone VK-8 KDEL/4:5 # 12, car l'action de la drogue chimiothérapeutique cisplatine est plus efficace. Selon ces résultats, d'un point de vue clinique, en inhibant CA 125 à la surface des cellules cancéreuses chez des patientes atteintes d'un cancer ovarien, ces patientes seraient plus réceptives à un traitement de chimiothérapie employant des drogues agissant de façon similaire au cisplatine. Pour confirmer que ces résultats ne sont pas dépendants de la lignée cellulaire utilisée, des adénovirus encodant le scFv anti-CA 125 VK-8 KDEL/1:9 # 9 ainsi qu'un adénovirus contrôle encodant le scFv VK-8 KDEL/4:5 # 12 seront construits afin d'infecter des cultures primaires de cancer ovarien provenant de patientes et de vérifier les effets de l'inhibition de CA 125 dans ces cellules.

Lors d'un essai de clonogénicité nous avons observé que la même quantité de foyers cellulaires était formée entre les deux clones stables et la lignée parentale, après les 14 jours d'incubation, mais les foyers du clone VK-8 KDEL/1:9 # 9 étaient beaucoup plus gros que ceux de l'autre clone stable et des cellules NIH OVCAR-3, ce qui suggère, encore une fois, que ces cellules (clone KDEL/1:9 # 9) prolifèrent plus rapidement. Les foyers plus gros ne sont pas une conséquence d'une adhésion plus rapide des cellules du transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9 comparativement aux cellules de la lignée parentale ou du transfectant contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12, car suite à un essai d'adhésion cellulaire préliminaire en condition adhésive dans des plaques 6 puits, la même quantité de cellules étaient adhérentes après un délai de 30 minutes (résultats non montrés). Des expériences plus approfondies avec différents temps et différentes densités de cellulesensemencées devront être effectuées pour confirmer ce résultat. Donc, puisqu'il y a augmentation de la prolifération cellulaire lorsqu'il

y a perte de CA 125 et que l'apoptose est inchangée, alors nous avons analysé le cycle cellulaire des clones.

Nous avons vérifié que les cellules exprimant le scFv VK-8 KDEL/1:9 # 9 proliféraient plus rapidement que celles du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 par une analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux. On remarque à la figure 28 que dans chacun des échantillons du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9, il y a toujours plus de cellules en phase G<sub>2</sub>/M et moins en G<sub>1</sub> et S que dans le clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12. Dans ce dernier, les cellules semblent être ralenties en phase G<sub>1</sub> ou S et il n'y a pratiquement pas de cellules en G<sub>2</sub>/M. Donc selon les derniers résultats présentés, les cellules de cancer ovarien NIH OVCAR-3 n'exprimant plus de CA 125 à leur surface (clone VK-8 KDEL/1:9 # 9) progressent plus rapidement dans le cycle cellulaire et de ce fait prolifèrent plus rapidement que les cellules de cancer ovarien NIH OVCAR-3 exprimant CA 125 à leur surface (lignée parentale et clone VK-8 KDEL/4:5 # 12). Pour confirmer ce résultat, des analyses du cycle cellulaire avec des cellules synchronisées en phase M seront effectuées pour déterminer où (en phase G<sub>1</sub> ou S) se trouve le ralentissement des cellules exprimant CA 125 à leur surface.

Les mucines joueraient, entre autres, un rôle dans la carcinogenèse au niveau de la migration cellulaire, de l'adhésion aux cellules, à la matrice extracellulaire ou à des organismes pathogènes, puis à la reconnaissance cellulaire (Strous et Dekker, 1992). D'ailleurs SMC, l'homologue de MUC 4 chez le rat, possède des propriétés anti-adhésive lorsqu'il est exprimé. Il permet de bloquer les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, il permet une protection contre le système immunitaire et augmente le potentiel métastatique où tous ces effets sont liés à la O-glycosylations, donc le nombre de répétitions en tandem (Price-Schiavi et al., 2002). En plus comme cité précédemment, MUC 1 joue des rôles dans la progression

tumorale et le processus métastatique. Elle est une protéine anti-adhésive bloquant les interactions cellule-cellule en déstabilisant les interactions cellule-cellule et/ou cellule-matrice extracellulaire et en interférant avec l'adhésion médiée par les intégrines et E-cadhérine. Cependant, elle peut aussi agir de manière adhésive avec ses hydrates de carbones extracellulaires servant de ligands pour des molécules telles que les sélectines et ainsi aider à la dissémination métastatique (Moniaux et al., 2001). Suite à ses informations, nous avons voulu déterminer si CA 125 avait des rôles potentiels dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire.

Nous avons observé par un essai d'agrégation cellulaire que les cellules du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 ne forment pas d'agrégats comparativement aux cellules du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 et de la lignée parentale NIH OVCAR-3. Dans cet essai nous analysons la propriété des cellules à former des agrégats, donc des interactions cellule-cellule et non cellule-matrice extracellulaire, mais aussi leur propriété à survivre en absence de matrice extracellulaire. Les cellules n'exprimant plus CA 125 ont perdu la propriété de former des agrégats cellulaires, ce qui suggère une modulation des interactions cellule-cellule. Ces résultats nous portent à croire que CA 125 pourrait avoir une fonction au niveau des interactions cellule-cellule (adhésion cellule-cellule), soit par des liaisons CA 125-CA 125 ou CA 125-molécule de surface cellulaire (autre que E-cadhérine), qui seraient perdues lorsqu'on inhibe CA 125. Nous confirmerons prochainement si les cellules non agrégées du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 et les cellules agrégées du clone stable contrôle VK-8 KDEL/4:5 # 12 sont vivantes par coloration à l'acridine orange/iodure de propidium. Cette coloration s'effectue selon l'intégrité membranaire, les cellules vivantes retiennent l'acridine orange et émettent une couleur verte tandis que les cellules mortes permettent l'entrée de l'iodure de propidium pour émettre une couleur rouge. Selon des résultats obtenus dans notre

laboratoire avec d'autres lignées cellulaires, nous nous attendons à ce que les agrégats cellulaires soient composés de cellules vivantes et que le centre soit composé de cellules nécrotiques. Si les cellules non agrégées du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 s'avéraient vivantes, alors seulement la perte d'interactions cellule-cellule serait observée et la fonction de CA 125 serait reliée à un rôle dans l'adhésion cellule-cellule. Par contre, si ces cellules étaient mortes c'est qu'elles auraient donc perdu la capacité à survivre à l'anoïkose. Dans ce cas, la perte des interactions cellule-cellule, cellule-matrice extracellulaire ou seulement la perte de CA 125 engendrerait la mort des cellules en condition non adhésive.

Chacun des transfectants a été injecté sous-cutané dans des souris nues afin de déterminer si la formation de tumeurs *in vivo* était influencée par la perte de CA 125. Pendant les 53 jours suivant l'injection sous-cutanée des cellules NIH OVCAR-3 et des clones stables VK-8 KDEL/1:9 # 9 et KDEL/4:5 # 12, induits ou non à la doxycycline, dans des souris *nude* CD-1, des tumeurs solides se sont formées aux différents sites d'injection. Seulement deux tumeurs se sont formées sur une possibilité de 24 sur les souris ayant été injectées avec le clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 et celles-ci avaient un poids inférieur à 0,04 g. Comme illustré à la figure 30, les cellules n'exprimant plus CA 125 à leur surface ne produisent pas de tumeurs de façon significative comparativement aux cellules du clone stable VK-8 KDEL/4:5 # 12 et des cellules NIH OVCAR-3, qui expriment CA 125 à leur surface. Alors, malgré le fait que les cellules du transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9 prolifèrent plus rapidement *in vitro*, il n'y a pas eu de formation de tumeurs. Ce résultat peut être expliqué de plusieurs façons. Tout d'abord, les tumeurs provenant du clone stable VK-8 KDEL/1:9 # 9 ne se sont peut-être pas implantées soit par un manque d'interactions cellule-matrice extracellulaire ou par un manque d'interactions cellule-cellule causé par la perte de CA 125 à la surface cellulaire. On pourrait vérifier cette hypothèse en injectant les cellules sous-cutané

avec de la matrice extracellulaire synthétique, comme du matrigel, pour vérifier s'il y aurait formation de tumeurs. Ensuite, les cellules du transfectant VK-8 KDEL/1:9 # 9 pourraient avoir perdu la capacité de sécréter des facteurs angiogéniques ou pourraient surexprimer la sécrétion de facteurs anti-angiogéniques, ce qui aurait empêché ou ralenti fortement la formation de vaisseaux sanguins, donc la croissance tumorale. Il a été montré que la présence de mucines à la surface cellulaire, comme MUC 4, empêche la reconnaissance des cellules cancéreuses par les cellules cytotoxiques à cause de la grande quantité de O-glycosylations, ce qui masquerait les sites de liaison de ces cellules cytotoxiques (Price-Schiavi et al., 2002). Donc, on pourrait supposer que le fait d'éliminer CA 125 de la surface des cellules cancéreuses permettrait aux cellules cytotoxiques de reconnaître ces cellules cancéreuses et de les éliminer. Puisque les souris nues CD-1 sont partiellement immunocompromises, car elles ont conservé la présence des cellules B et NK (Charles River Laboratories, 2003), cela pourrait expliquer le fait que pratiquement aucune tumeur n'ait été observée. On pourrait effectuer cette expérience sous-cutanée dans des souris SCID qui sont plus immunocomprimées que les souris nues, donc dans ces souris, nous devrions observer la formation de tumeurs plus grosses lorsqu'il y a présence de CA 125, et même la formation de plus de tumeurs lorsque les cellules n'expriment plus CA 125 seraient injectées. Dans cet essai, l'inhibition de la formation de tumeurs sous-cutanée est très importante, mais l'essai de survie nous donnera une meilleure indication de l'effet de l'inhibition de CA 125 pour pouvoir extrapoler si les scFvs contre CA 125 auraient un effet thérapeutique. Donc, cet essai sous-cutané sera répété pour confirmer ce résultat et des sections des tumeurs seront analysées pour leur contenu en CA 125. Par la suite, des injections intra-péritonéales auront lieu pour des essais de survie cellulaire et des analyses sur les endroits d'implantation et de dissémination des cellules tumorales.



## CONCLUSION

Malgré la découverte récente de séquences de CA 125 et d'une structure proposée, aucune fonction claire n'est associée à cette protéine. CA 125 est un antigène exprimé à la surface des tumeurs épithéliales ovariennes séreuses, mais n'est pas détecté à la surface des ovaires normaux, avec les anticorps disponibles présentement. Les niveaux d'expression de CA 125 semblent corrélés avec une progression ou une régression des tumeurs selon le cas. Cependant, la maladie est détectée tardivement (stade III ou IV) à cause de l'absence de tests diagnostiques sensibles et spécifiques pour permettre une détection précoce de la maladie. À cet égard, il devient essentiel de pouvoir étudier et comprendre le rôle de CA 125 dans le développement du cancer ovarien.

Jusqu'à maintenant, les études portant sur CA 125 ont évalué les effets sur CA 125 de l'influence de certains produits, comme l'EGF et les glucocorticoïdes. Ces études ont permis de comprendre un peu plus comment s'effectue la régulation de CA 125, mais les voies de régulation de ces différents agents sur CA 125 ne sont pas encore connues. Par la suite, certaines études ont tenté de définir un rôle à CA 125 dans l'adhésion et l'invasion cellulaire, mais la plupart de ces études comparaient une lignée cellulaire exprimant CA 125 et une ne l'exprimant pas. Dans l'optique où aucune séquence de CA 125 n'était disponible il y a deux ans et où, encore maintenant, les séquences disponibles ne sont que partielles, une autre méthode d'étude des protéines devait être envisagée pour déterminer le rôle de CA 125 dans la pathogenèse du cancer ovarien.

Avec la technologie des anticorps monovalents modifiés, nous avons effectué une inhibition de l'expression de surface de CA 125 dans les cellules NIH OVCAR-3. Nous détenons présentement le seul système disponible à ce jour pour étudier CA 125 "dans un circuit fermé". C'est-à-dire que nous étudions l'expression et l'inhibition de surface de CA 125 dans la même lignée cellulaire, ce qui nous permet de voir des effets directs et vrais. À l'aide de deux inhibiteurs dirigés contre deux épitopes différents sur CA 125, nous avons effectué une séquestration de cette protéine dans le RE et le Golgi.

Lors de nos différents essais nous avons déterminé que les scFvs VK-8 # 1:9 et OC125 # 3:11 étaient exprimés (autant de manière procaryote qu'eucaryote) et qu'ils liaient CA 125, engendrant ainsi une séquestration de CA 125 dans leur compartiment cellulaire cible (au niveau eucaryote). L'inhibition de surface de CA 125 a entraîné une relocalisation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$ , mais n'a eu aucun effet apparent sur la E-cadhérine. L'inhibition a aussi entraîné une augmentation de la prolifération cellulaire observée par des passages cellulaires réguliers, essai XTT, essai de sensibilité au cisplatine, essai de clonogénicité et analyse du cycle cellulaire. Les cellules n'exprimant plus CA 125 sont dix fois plus sensibles à l'action du cisplatine, mais aucune différence n'est observée entre les clones avec le taxol, ce qui suggère que la prolifération cellulaire plus rapide des cellules n'exprimant pas CA 125 soit responsable de ces effets, ce qui a été confirmé par l'analyse du cycle cellulaire. Enfin, la perte d'expression de surface de CA 125 engendre une perte des contacts cellule-cellule et une diminution marquée de la formation de tumeurs *in vivo* ce qui empêche la formation d'agrégats cellulaires. Ces résultats nous permettent d'avancer que CA 125 pourrait avoir un rôle dans l'adhésion cellulaire, soit par des interactions CA 125-CA 125 ou CA 125-autres molécules de surface cellulaire; pourrait être impliqué, d'une façon inconnue, dans la régulation du cycle cellulaire et possiblement au niveau des interactions cellule-matrice

extracellulaire. Des analyses détaillées du cycle cellulaire et de nouvelles expériences avec des souris (injections sous-cutanées et intrapéritonéales) seront effectuées. Plusieurs essais d'adhésion des cellules sur différentes matrices et des essais d'invasion auront lieu pour déterminer quelles sont les molécules liant CA 125. Des études de profil d'expression des gènes auront lieu pour découvrir quels gènes sont influencés par l'inhibition de surface de CA 125. Enfin, nous déterminerons si le scFv # 1:9 est neutralisant soit en ajoutant celui-ci directement dans le milieu de culture cellulaire ou en exprimant ce scFv intracellulairement dans un vecteur ne contenant qu'un signal de sécrétion, donc le scFv sera sécrété dans le milieu de culture. Nous vérifierons alors si nous observons les mêmes conséquences de l'inhibition de CA 125 observée par une inhibition intracellulaire. Si le scFv est neutralisant il pourrait éventuellement être utilisé en clinique si ce n'est pas le cas, nous envisagerons d'autres outils d'études comme les siRNA et les adénovirus.

En somme, les objectifs principaux du projet ont été rencontrés et des outils de recherche uniques ont été développés pour étudier le rôle de CA 125, ouvrant ainsi la voie à l'analyse de la fonction de CA 125 dans le développement du cancer ovarien.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier en premier lieu ma directrice de recherche, la docteure Claudine Rancourt pour son support tout au long de mes études et la confiance qu'elle a misé en moi. Ce fut un grand plaisir d'apprendre et de travailler dans son laboratoire.

J'adresse aussi mes remerciements au docteur Alain Piché pour les discussions, quelque fois vives, mais toujours pertinentes quant à mon projet.

J'adresse un remerciement particulier aux stagiaires avec lesquelles j'ai eu l'occasion de travailler; Martine Migneault, Marianne Boivin, Nathalie Cloutier et Magalie Canuel.

J'aimerais remercier Carole Bergeron pour son aide et son support dans le laboratoire dès mes débuts, ainsi qu'à Denis Lane, Lise Imbeault et Geneviève Garon pour avoir toujours répondu à mes nombreux questionnements.

Un grand merci à tous les étudiants passés et présents dans le laboratoire, ce n'est pas toujours facile, mais une bonne atmosphère de travail règle toujours tout.

Finalement, j'aimerais remercier mon mari, Sébastien, pour ses encouragements constants dans les moments les plus difficiles durant ces deux dernières années. Je remercie particulièrement mes parents et ma famille pour leur support et leurs encouragements durant toutes mes études, sans eux, j'aurais eu de la difficulté à atteindre mon but. Merci.

## BIBLIOGRAPHIE

American Cancer Society. (2003). <http://www.cancer.org>

Amersham Pharmacia Biotech Inc. (1999). Recombinant phage antibody system, 1-40.

Arafat W., Gomez-Navarro J., Xiang J., Siegal G. P., Alvarez R. D. et Curiel D. T. (2000). Antineoplastic effect of anti-erbB-2 intrabody is not correlated with scFv affinity for its target, *Cancer Gene Ther* 7, 1250-1256.

Askari F. K. et McDonnell M. (1996). Molecular medicine: antisense-oligonucleotide therapy, *New Engl J Med* 334, 316-318.

Auersperg N., Pan J., Grove B. D., Peterson T., Fisher J., Maines-Bandiera S., Somasiri A. et Roskelley D. (1999). E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6249-6254.

Barbati A., Broccucci L., Anceschi M. M. et Cosmi E. V. (1991). Regulation of CA 125 production by amnion and WISH cells in culture, *Am J Obstet Gynecol* 164, 1355-1359.

Baruch A., Hartmann M.-L., Yoeli M., Adereth Y., Greenstein S., Stadler Y., Skornik Y., Zaretsky J., Smorodinsky N. I., Keydar I. et Wreschner D. H. (1999). The breast cancer-

associated *MUC 1* gene generates both a receptor and its cognate binding protein, *Cancer Res* 59, 1552-1561.

Baruch A., Hartmann M.-L., Zrihan-Licht S., Greenstein S., Burstein M., Keydar I., Weiss M., Smorodinsky N. I., et Wreschner D. H. (1997). Preferential expression of novel MUC 1 tumor antigen isoforms in human epithelial tumors and their tumor-potentiating function, *Int J Cancer* 71, 741-749.

Bast R. C. Jr., Feeney M., Lazarus H., Nadler L. M., Clovin R. B. et Knapp R. C. (1981). Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma, *J Clin Invest* 68, 1331-1337.

Bast R. C. Jr., Klug T. L., St-John E., Jenison E., Niloff J. M., Lazarus H., Berkowitz R. S., Leavitt T., Griffiths C. T., Parker L., Zurawski V. R. et Knapp R.C. (1983). A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer, *N Engl J Med* 309, 883-887.

Beerli R. R., Wels W. et Hynes N. E. (1994a). Intracellular expression of single-chain antibodies reverts erbB-2 transformation, *J Biol Chem* 269, 23931-23936.

Beerli R. R., Wels W. et Hynes N. E. (1994b). Autocrine inhibition of the epidermal growth factor receptor by intracellular expression of a single-chain antibody, *Biochem Biophys Res Comm* 204, 666-672.

Berchuck A., Soisson A. P., Clarke-Pearson D. L., Soper J. T., Boyer C. M., Kinney R. B., McCarty K. S. Jr. et Bast R. C. Jr. (1989). Immunohistochemical expression of CA 125 in endometrial adenocarcinoma: correlation of antigen expression with metastatic potential, *Cancer Res* 49, 2091-2095.

Biocca S., Ruberti F., Tafani M., Pierandrei-Amaldi P. et Cattaneo A. (1995). Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria, *Bio/Technology* 13, 1110-1115.

Bird R. E., Hardman K. D., Jacobson J. W., Johnson S., Kaufman B. M., Lee S.-M., Lee T., Pope S. H., Riordan G. S. et Whitlow M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins, *Science* 242, 423-426.

Bork P. et Patthy L. (1995). The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation, *Protein Sci* 4, 1421-1425.

Brown M. R., Masiero L. et Kohn E. C. (2000). Tumor angiogenesis and metastasis. Dans *Principles and practice of gynecologic oncology* third edition, W. J. Hoskins, C. A. Perez et R. C. Young, éds. (Lippincott Williams and Wilkins., Philadelphia, PA), p.87-102.

Cai X. et Garen A. (1997). Comparison of fusion phage libraries displaying V<sub>H</sub> or single-chain Fv antibody fragments derived from the antibody repertoire of a vaccinated melanoma patient as a source of melanoma-specific targeting molecules, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9261-9266.

Charles River Laboratories. (2003). <http://www.criver.com>

Choudhury A., Singh R. K., Moniaux N., El-Metwally T. H., Aubert J.-P. et Batra S. K. (2000). Retinoic acid-dependent transforming growth factor- $\beta$ 2-mediated induction of MUC 4 mucin expression in human pancreatic tumor cells follows retinoic acid receptor- $\alpha$  signaling pathway, *J Biol Chem* 275, 33929-33936.

Ciccarelli F. D., Doerk S. T. et Bork P. (2002). AMOP, a protein module alternatively spliced in cancer cells, *Trends Biochem Sci* 27, 113-115.

Cohen S. M. et Lippard S. J. (2001). Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 67, 93-130.

Dekker J., Rossen J. W. A., Büller H. A. et Einerhand A. W. C. (2002). The MUC family: an obituary, *Trends Biochem Sci* 27, 126-131.

Deshane J., Loechel F., Conry R. M., Siegal G. P., King C. R. et Curiel D. T. (1994). Intracellular single-chain antibody directed against erbB-2 downregulates cell surface erbB-2 and exhibits a selective anti-proliferative effect in erbB-2 overexpressing cancer cell lines, *Gene Therapy* 1, 332-337.

Duan L., Bagasra O., Laughlin M. A., Oakes J. W. et Pomerantz R. J. (1994). Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody, *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5075-5079.



Fendrick J. L., Konishi I., Geary S. M., Parmley T. H., Quirk J. G. Jr. et O'Brien T. J. (1997). CA 125 phosphorylation is associated with its secretion from the WISH human amnion cell line, *Tumor Biol* 18, 278-289.

Gaetje R., Winnekendonk D. W., Ahr A. et Kaufmann M. (2002). Ovarian cancer antigen CA 125 influences adhesion of human and mammalian cell lines in vitro, *Clin Exp Obstet Gynecol* 1, 34-36.

Gaetje R., Winnekendonk D. W., Scharl A. et Kaufmann M. (1999). Ovarian cancer antigen CA 125 enhances the invasiveness of the endometriotic cell line EEC 145, *J Soc Gynecol Invest* 6, 278-281.

Gendler S. J. et Spicer A. P. (1995). Epithelial mucin genes, *Annu Rev Physiol* 57, 607-634.

Graus-Porta D., Beerli R.R. et Hynes N. E. (1995). Single-chain antibody-mediated intracellular retention of erbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling, *Mol Cell Biol* 15, 1182-1191.

Grossmann J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-anoikis", *Apoptosis* 7, 247-260.

Hannon G. J. (2002). RNA interference, *Nature* 418, 244-251.

Indolfi C., Chiariello M. et Avvedimento E. V. (1996). Selective gene therapy for proliferative disorders: sense and antisense, *Nature Med* 2, 634-635.

Jannot C. B., Beerli R. R., Mason S., Gullick W. J. et Hynes N. E. (1996). Intracellular expression of a single-chain antibody directed to the EGFR leads to growth inhibition of tumor cells, *Oncogene* 13, 275-282.

Kabawat S. E., Bast R. C., Welch W. R., Knapp R. C., et Colvin R. B. (1983a). Immunopathologic characterization of a monoclonal antibody that recognizes common surface antigens of human ovarian tumors of serous, endometrioid, and clear cell types, *Am J Clin Pathol* 79, 98-104.

Kabawat S. E., Bast R. C. Jr., Bhan A. K., Welch W. R., Knapp R. C. et Colvin R. B. (1983b). Tissue distribution of a coelomic-epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125, *Int J Gynecol Pathol* 2, 275-285.

Karlan B. Y., Amin W., Casper S. E. et Littlefield B. A. (1988). Hormonal regulation of CA 125 tumor marker expression in human ovarian carcinoma cells: inhibition by glucocorticoids, *Cancer Res* 48, 3502-3506.

Kasono K., Heike Y., Piché A., Kim M., Hagiwara M., Nawrath M., Moelling K. et Curiel D.T. (2000). Tetracycline-induced expression of an anti-c-Myb single-chain antibody and its inhibitory effect on proliferation of the human leukemia cell line K562, *Cancer Gene Ther* 7, 151-159.

Kobayashi H., Ida W., Terao T. et Kawashima Y. (1993). Molecular characteristics of the CA 125 antigen produced by human endometrial cells: comparison between eutopic and heterotopic epithelial cells, *Am J Obstet Gynecol* 169, 725-730.

Konishi I., Fendrick J. L., Parmley T. H., Quirk J. G. Jr. et O'Brien T. J. (1994). Epidermal growth factor enhances secretion of the ovarian tumor-associated cancer antigen CA 125 from the human amnion WISH cell line, *J Soc Gynecol Invest* 1, 89-96.

Kroemer G. et Reed J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death, *Nature Med* 6, 513-519.

Kurachi H., Adachi H., Morishige K.-I., Adachi K., Takeda T., Homma H., Yamamoto T. et Miyake A. (1996). Transforming growth factor- $\alpha$  promotes tumor markers secretion from human ovarian cancers in vitro, *Cancer* 78, 1049-1054.

Kurbacher C. M., Jäger W., Kurbacher J. A., Bittl A., Wildt L. et Lang N. (1995). Influence of human luteinizing hormone on cell growth and CA 125 secretion of primary epithelial ovarian carcinomas in vitro, *Tumor Biol* 16, 374-384.

Lloyd K. O., Yin B. W. T. et Kudryashov V. (1997). Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule, *Int J Cancer* 71, 842-850.

Ma J., Luo D., Kwon G. S., Samuel J., Noujaim A. A. et Madiyalakan R. (1998). Use of encapsulated single chain antibodies for induction of anti-idiotypic humoral and cellular immune responses, *J Pharmaceutical Sci* 87, 1375-1378.

Makhija S., Taylor D. D., Gibb R. K. et Gerçel-Taylor Ç. (1999). Taxol-induced Bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids, *Int J Oncol* 14, 515-521.

Marasco W. A. et Dana Jones S. (1998). Antibodies for targeted gene therapy: extracellular gene targeting intracellular expression, *Adv Drug Deliv Rev* 31, 153-170.

Marasco W. A., Haseltine W. A. et Chen S. (1993). Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7889-7893.

Markman M. (1997). The role of CA 125 in the management of ovarian cancer, *The Oncologist* 2, 6-9.

Marth C., Fuith L. C., Böck G., Daxenbichler G. et Dapunt O. (1989). Modulation of ovarian carcinoma tumor marker CA 125 by  $\gamma$ -interferon, *Cancer Res* 49, 6538-6542.

Marth C., Lang T., Koza A., Mayer I. et Daxenbichler G. (1990). Transforming growth factor-beta and ovarian carcinoma cells: regulation of proliferation and surface antigen expression, *Cancer Lett* 51, 221-225.

Marth C., Zeimet A. G., Böck G. et Daxenbichler G. (1992). Modulation of tumour marker CA 125 expression in cultured ovarian carcinoma cells, *Eur J Cancer* 28A, 2002-2006.

Marth C., Zeimet A. G., Widschwendter M., Ludescher C., Kaern J., Tropé C., Gastl G., Daxenbichler G. et Dapunt O. (1997). Paclitaxel- and docetaxel-dependent activation of CA 125 expression in human ovarian carcinoma cells, *Cancer Res* 57, 3818-3822.

Martin V. R. (2002). Ovarian cancer, *Semin Oncol Nursing* 18, 174-183.

Martineau P., Jones P. et Winter G. (1998). Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm, *J Mol Biol* 280, 117-127.

Masuho Y., Zalutsky M., Knapp R. C. et Bast R. C. Jr. (1984). Interaction of monoclonal antibodies with cell surface antigens of human ovarian carcinomas, *Cancer Res* 44, 2813-2819.

Moniaux N., Escande F., Batra S. K., Porchet N., Laine A. et Aubert J.-P. (2000). Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associated MUC 4 mucins, *Eur J Biochem* 267, 4536-4544.

Moniaux N., Escande F., Porchet N., Aubert J.-P. et Batra S. K. (2001). Structural organization and classification of the human mucin genes, *Front Biosci* 6, 1192-1206.

Moniaux N., Nollet S., Porchet N., Degand P., Laine A. et Aubert J.-P. (1999). Complete sequence of the human mucin MUC 4 : a putative cell membrane-associated mucin, *Biochem J* 338, 325-333.

Nakai T., Endo K., Hosono M., Saga T., Watanabe Y., Sakahara H., Imai K., Yachi A., Kiyozuka Y., Ishiwata I. et Konishi J. (1991). Drug effects on CA 125 antigen expression and antibody binding to cancer cells, *Int J Cancer* 48, 463-467.

Nap M., Vitali A., Nustad K., Bast R. C. Jr., O'Brien T. J., Nilsson O., Seguin P., Suresh M. R., Bormer O. P., Saga T., de Bruijn H. W. A., Nozawa S., Kreutz F. T., Jette D., Sakahara H., Gadnell M., Endo K., Barlow E. H., Warren D., Paus E., Hammarström S., Kenemans P.

et Hilgers J. (1996). Immunohistochemical characterization of 22 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: 2nd report from the ISOBM-TD-1 workshop, *Tumor Biol* 17, 325-331.

Neuromuscular. (2002). <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/lab/adhesion.htm>

Nollet S., Moniaux N., Maury J., Petitprez D., Degand P., Laine A., Porchet N. et Aubert J.-P. (1998). Human mucin gene MUC 4 : organization of its 5'-region and polymorphism of its central tandem repeat array, *Biochem J* 332, 739-748.

Nustad K., Bast R. C. Jr., O'Brien T. J., Nilsson O., Seguin P., Suresh M. R., Saga T., Nozawa S., Borner O. P., de Bruijn H. W. A., Nap M., Vitali A., Gadnell M., Clark J., Shigemasa K., Karlsson B., Kreutz F. T., Jette D., Sakahara H., Endo K., Paus E., Warren D., Hammarström S., Kenemans P. et Hilgers J. (1996). Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen. First report from the ISOBM TD-1 workshop, *Tumor Biol* 17, 196-219.

Nustad K., Lebedin Y., Lloyd K. O., Shigemasa K., de Bruijn H. W. A., Jansson B., Nilsson O., Olsen K. H. et O'Brien T. J. (2002). Epitopes on CA 125 from cervical mucus and ascites fluid and characterization of six new antibodies. Third report from the ISOBM TD-1 workshop, *Tumor Biol* 23, 303-314.

O'Brien T. J., Beard J. B., Underwood L. J., Dennis R. A., Santin A. D. et York L. (2001). The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences, *Tumor Biol* 22, 348-366.

O'Brien T. J., Beard J. B., Underwood L. J. et Shigemasa K. (2002). The CA 125 gene: a newly discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of the extracellular superstructure, *Tumor Biol* 23, 154-169.

Oosterkamp H. M., Scheiner L., Stefanova M. C., Lloyd K. O. et Finstad C. L. (1997). Comparison of MUC 1 mucin expression in epithelial and non-epithelial cancer cell lines and demonstration of a new short variant form (MUC 1/Z), *Int J Cancer* 72, 87-94.

O'Rourke D. M. et Greene M. I. (1998). Immunologic approaches to inhibiting cell-surface-residing oncoproteins in human tumors, *Immunol Res* 17, 179-189.

Ozols R. F., Rubin S. C., Thomas G. M. et Robboy S. J. (2000). Epithelial ovarian cancer. Dans *Principles and practice of gynecologic oncology* third edition, W. J. Hoskins, C. A. Perez et R. C. Young, édés. (Lippincott Williams and Wilkins., Philadelphia, PA), p. 981-1058.

Paulsen T., Marth C., Kaern J., Nustad K., Kristensen G. B. et Tropé C. (2000). Effects of paclitaxel on CA 125 serum levels in ovarian cancer patients, *Gynecol Oncol* 76, 326-330.

Pharmacia biotech. (1995). Mouse scFv module/recombinant phage antibody system, 1-47.

Piché A., Grim J., Rancourt C., Gómez-Navarro J., Reed J. C. et Curiel D. T. (1998a). Modulation of Bcl-2 protein levels by an intracellular anti-Bcl-2 single-chain antibody increases drug-induced cytotoxicity in the breast cancer cell line MCF-7, *Cancer Res* 58, 2134-2140.

Piché A., Kasono K., Johanning F., Curiel T. J. et Curiel D. T. (1998c). Phenotypic knock-out of the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus by an intracellular single-chain antibody, *Gene Therapy* 5, 1171-1179.

Piché A. et Rancourt C. (1999). A role for intracellular immunization in chemosensitization of tumor cells? *Gene Therapy* 6, 1202-1209.

Piché A., Rancourt C., Xiang J., Siegal G. P., Alvarez R. D., Reed J. C. et Curiel D. T. (1998b). Modulation of drug-induced apoptosis by an anti-Bcl-2 single-chain antibody in ovarian cancer cells, *Tumor Targeting* 3, 147-155.

Price J. T., Bonovich M. T. et Kohn E. C. (1997). The biochemistry of cancer dissemination, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32, 175-253.

Price-Schiavi S. A., Jepson S., Li P., Arango M., Rudland P. S., Yee L. et Carraway K. L. (2002). Rat MUC 4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-erbB-2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance, *Int J Cancer* 99, 783-791.

Programme de prédiction NetPhos 2.0. (2003). <http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph>.

Quin R. J. et McGuckin M. A. (2000). Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC 1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion, *Int J Cancer* 87, 499-506.



Richardson J. H., Sodroski J. G., Waldmann T. A. et Marasco W. A. (1995). Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the  $\alpha$  subunit of the receptor, *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3137-3141.

Schummer M., Ng W. V., Bumgarner R. E., Nelson P. S., Schummer B., Bednarski D. W., Hassell L., Lynn Baldwin R., Karlan B. Y. et Hood L. (1999). Comparative hybridization of an array of 21 500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas, *Gene* 238, 375-385.

Skubitz A. P. N. (2002). Adhesion molecules, *Cancer Treat Res* 107, 305-329.

Société Canadienne du Cancer. (2003). <http://www.cancer.ca>

Strous G. J. et Dekker J. (1992). Mucin-type glycoproteins, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27, 57-92.

Taylor-Papadimitriou J., Burchell J., Miles D. W. et Dalziel M. (1999). MUC 1 and cancer, *Biochim Biophys Acta* 1455, 301-313.

Treon S. P., Mollick J. A., Urashima M., Teoh G., Chauhan D., Ogata A., Raje N., Hilgers J. H. M., Nadler L., Belch A. R., Pilarski L. M. et Anderson K. C. (1999). MUC 1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone, *Blood* 93, 1287-1298.

Wels W., Harwerth I.-M., Mueller M., Groner B. et Hynes N. E. (1992a). Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor, *Cancer Res* 52, 6310-6317.

Wels W., Harwerth I.-M., Zwickl M., Hardman N., Groner B. et Hynes N. E. (1992b). Construction, bacterial expression and characterization of a bifunctional single-chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to the human erbB-2 receptor, *Bio/Technology* 10, 1128-1132.

Werner D., Brodsky J. L. et McCracken A. A. (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13797-13801.

Williams S. J., Munster D. J., Quin R. J., Gotley D. C. et McGuckin M. A. (1999). The MUC 3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced, *Biochem Biophys Res Comm* 261, 83-89.

Yin B. W. T., Dnistrian A. et Lloyd K. O. (2002). Ovarian cancer antigen CA 125 is encoded by the *MUC 16* mucin gene, *Int J Cancer* 98, 737-740.

Yin B. W. T. et Lloyd K. O. (2001). Molecular cloning of the CA 125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin (MUC 16), *J Biol Chem* 276, 27371-27375.

Yuan Q., Strauch K. L., Lobb R. R. et Hemler M. E. (1996). Intracellular single-chain antibody inhibits integrin VLA-4 maturation and function, *Biochem J* 318, 591-596.

Zeimet A. G., Marth C., Offner F. A., Obrist P., Uhl-Steidl M., Feichtinger H., Stadlmann S., Daxenbichler G. et Dapunt O. (1996). Human peritoneal mesothelial cells are more potent than ovarian cancer cells in producing tumor marker CA 125, *Gynecol Oncol* 62, 384-389.

Zrihan-Licht S., Baruch A., Elroy-Stein O., Keydar I. et Wreschner D. H. (1994a). Tyrosine phosphorylation of the MUC 1 breast cancer membrane proteins cytokine receptor-like molecules, *FEBS Lett* 356, 130-136.

Zrihan-Licht S., Vos H. L., Baruch A., Elroy-Stein O., Sagiv D., Keydar I., Hilkens J. et Wreschner D. H. (1994b). Characterization and molecular cloning of a novel MUC 1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue, *Eur J Biochem* 224, 787-795.