

Université de Sherbrooke

CA 125, un régulateur négatif du potentiel invasif des cellules cancéreuses
de l'ovaire ?

par
Maxime PINARD
Département de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue d'obtention du grade de
maître sciences (M.Sc.)

Août 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-17347-3
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-17347-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

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

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

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

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLES DES MATIÈRES

Tables des matières	I
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	VI
Liste des abréviations	VII
Résumé	
Introduction	1
1 L'ovaire normal et cancéreux	1
1.0.1 Biologie de l'ovaire normal	1
1.0.2 Facteurs favorisant la formation d'une masse tumorale	2
1.0.3 Incidence du cancer ovarien	3
1.0.4 La biologie du cancer ovarien	4
1.1 Les mucines	6
1.1.1 La structure générale des mucines	6
1.1.2 Le rôle des mucines	7
1.1.3 MUC1	8
1.1.4 MUC4	12
1.1.5 CA125 (MUC16)	13
1.1.5.1 Fonctions connues de CA125	13
1.1.5.2 Le gène de CA125	14
1.1.5.3 Description de la structure protéique de CA125	15
1.2 La cascade métastatique	17

1.2.1	Motilité des cellules	20
1.2.2	Invasion cellulaire	23
1.3	Anticorps monovalent modifié ou scFv	26
1.3.1	L'interférence à l'ARN	28
1.4	L'objectif du projet	30
	Matériels et méthodes	32
2.0	Culture cellulaire	32
2.1	Production d'une sonde par random priming	34
2.1.1	Digestion enzymatique	35
2.1.2	Extraction d'ARN	35
2.1.3	Production d'ADN complémentaire	36
2.1.4	Réaction de PCR	37
2.1.5	PCR en temps réel	37
2.2	Northern slot blot	38
2.3	Cytométrie de flux	39
2.4	Zymographie	40
2.4.1	Zymographie inverse	42
2.5	Essai de clonogénéité sur plastique	43
2.6	Préparation de plaques recouvertes de Matrigel	43
2.7	Essai de migration cellulaire par blessure sur monocouche	44
2.8	Essai de à l'aide des chambres de Boyden, blocage de CD44 et invasion	44
2.9	Essai de prolifération par XXT	45

Résultats	47
3.1 Évaluation des niveaux d'expression de CA125 dans les clones stables	47
3.2 Évaluation des niveaux sécrétés de CA125 dans les milieux conditionnés	48
3.3 Comparaison des profils de croissance des différents clones	50
3.4 Changement morphologique des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7	55
3.5 Comparaison des profils d'expression génique des différents clones	58
3.6 Évaluation des capacités migratoires	60
3.7 Le potentiel invasif	66
3.7.1 Niveaux d'expression des composantes de l'hétérotrimère proMMP-2, TIMP-2 et MT1-MMP	66
3.7.2 Capacité invasive des différents clones stables	72
3.8 Interférence à l'ARN	74
3.8.1 Production et validation des siRNA	74
3.8.2 Vérification des effets phénotypiques après transfection transitoire des siRNA	83
Discussion	88
Conclusion	103
Remerciements	105
Bibliographies	107

LISTE DES FIGURES

1. Structure protéique proposée par le groupe de O'BRIEN et <i>al</i> , 2001 pour la glycoprotéine CA125.	16
2. Schématisation de la cascade métastatique conventionnelle.	18
3. Schématisation de la cascade métastatique au niveau du cancer ovarien.	21
4. Évaluation des niveaux d'expression de CA125 à la membrane cellulaire des différents clones par une analyse de cytométrie de flux.	49
5. Dosage du CA125 soluble dans les milieux conditionnés des différents clones cellulaires.	50
6. Courbe de prolifération cellulaire des clones dérivés de la lignée parentale NIH:OVCAR 3.	52
7. Essai de clonogénécité sur plastique de la lignée parentale NIH:OVCAR 3 et des différents clones cellulaires.	54
8. Morphologie des différentes lignées cellulaires cultivées sur plastique.	56
9. Morphologie des différentes lignées cellulaires cultivées sur du Matrigel.	57
10. Mesure de la quantité de la glycoprotéine CD44 membranaire dans les différents clones par cytométrie de flux.	59
11. Évaluation des capacités migratoires des différentes lignées cellulaires par un essai de blessure sur une monocouche cellulaire.	62
12. Évaluation des capacités migratoires des différentes lignées cellulaires par l'utilisation des chambres de Boyden.	63

13. Implication de CD44 dans la migration cellulaire des différentes lignées cellulaires étudiées.	65
14. Mesure de la quantité de métalloprotéinases dans les milieux conditionnés des clones à partir de zymographie.	68
15. Mesure de la quantité d'inhibiteur de métalloprotéinases dans les milieux conditionnés des clones à partir d'un essai de zymographie inverse.	70
16. Évaluation des capacités invasives des différentes lignées cellulaires par l'utilisation des chambres d'invasion.	73
17. Positionnement des siRNA sélectionnés pour produire de l'interférence à l'ARN.	75
18. Évaluation des niveaux d'expression de CA125 à la membrane cellulaire par analyse de cytométrie de flux de transfections transitoires.	76
19. Diminution des niveaux d'expression de CA125 par analyse de cytométrie de flux dans différentes lignées cellulaires par le siRNA s1142.	79
20. Vérification des siRNA par une analyse protéique et une analyse des ARN totaux.	82
21. Quantification de l'ARN de CA125 à partir des Northern slot blot en normalisant avec la β -actine.	83
22. Mesure de la quantité de la glycoprotéine CD44 membranaire dans les NIH:OVCAR 3 après différentes transfections.	85
23. Évaluation des capacités migratoires des cellules NIH:OVCAR 3 transfectées avec différentes conditions par l'utilisation des chambres de Boyden.	86
24. Mesure de la quantité de métalloprotéinases dans les milieux conditionnés des cellules NIH:OVCAR 3 transfectées avec différentes conditions à partir de zymographie.	87

LISTE DES TABLEAUX

1. Les différentes mucines.	9
2. Différents types de métalloprotéinases de matrice connues dans la littérature.	24
3. Conditions expérimentales utilisées pour transfecter les différentes lignées cellulaires.	33
4. Dénombrement des colonies de plus de 50 cellules obtenues dans l'essai de clonogénéicité sur plastique.	54
5. Certains gènes repêchés lors de l'analyse du profil d'expression génique entre les deux lignées contrôles et le clone pLTR KDEL 4:5 #12	60
6. Dénombrement des cellules ayant traversées les pores après 16 heures d'incubation à 37°C.	64
7. Niveau d'expression de la MT1-MMP et de la proMMP-2 par une analyse de PCR en temps réel.	71
8. Dénombrement des cellules ayant traversées les pores après 16 heures d'incubation à 37°C.	74
9. Emplacement des siRNA sur l'ADNc de CA125.	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
APMA	<i>p-Aminophenylmercuric Acetate</i>
APS	<i>Ammonium Persulfate</i>
ARN	acide ribonucléique
BSA	<i>bovin serum albumin</i>
CA125	<i>cancer antigen 125</i>
CPM	<i>compte par minute</i>
dsRBD	<i>double strand RNA binding domain</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
kDa	kilodalton
M	molaire
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MMP	<i>métalloprotéinase de matrice</i>
OSE	<i>ovarian surface epithelium</i>
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	R-Phycoérythrine

PMS	<i>phénazine méthosulfate</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RPM	<i>révolution par minute</i>
RPMI	<i>roswell park memorial institute medium</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SMC	<i>Sialomucin complex</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

RÉSUMÉ

Mots clés : CA125, cancer ovarien, cascade métastatique, scFv, siRNA

L'antigène cancéreux 125 (CA125) est présentement utilisé pour suivre la progression des cancers ovariens durant la thérapie des patientes. CA125 est surexprimé dans plus que 80% des cancers ovariens épithéliales. C'est une protéine transmembranaire qui est fortement glycosylée de la famille des mucines. CA125 est encodé par le gène *MUC16* et son ADN complémentaire aurait une taille de 66 Kb. Même s'il y est utilisé fréquemment en clinique, ses fonctions dans les cellules ne sont pas encore connues.

Notre laboratoire a développé un inhibiteur de CA125 dans le but d'étudier ses fonctions dans le cancer de l'ovaire. Cet inhibiteur consiste en un anticorps monovalent modifié (scFv) qui est ciblé et retenu dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'utilisation d'une séquence "leader" et d'un signal de rétention KDEL. Nous avons dérivé deux différents clones stables (1:9 #9 et 1:9 #7) exprimant le scFv à partir de la lignée NIH:OVCAR 3 qui exprime des niveaux élevés de CA125. Des analyses par cytométrie de flux nous ont confirmé que la séquestration de CA125 dans le RE simule un "knock-down" de CA125 en empêchant la protéine de se localiser normalement à la surface des cellules.

Nous avons initialement caractérisé les deux clones par un essai XTT et par un essai de clonogénéité sur plastique pour ensuite déterminer si CA125 pouvait influencer le potentiel métastatique de la lignée NIH:OVCAR 3. Nous avons donc comparé chacun

les clones stables dans leur capacité migratoire et leur potentiel invasif à l'aide de différents essais. L'essai de blessure sur monocouche nous a démontré que les clones n'exprimant plus CA125 remplissaient les blessures sur la monocouche plus rapidement que les lignées contrôles. Des essais de migration à l'aide des chambres de Boyden nous a confirmé l'augmentation de la motilité de ces clones. Des essais d'invasion ont été effectués à l'aide de chambres de Boyden recouverte par une mince couche de Matrigel (matrice extracellulaire artificielle) et ont démontré que les clones n'exprimant plus CA125 démontraient une meilleure capacité à digérer les composantes de la matrice extracellulaire et à traverser au travers des pores des membranes. La comparaison des profils d'expression génique nous a suggéré qu'il y avait une augmentation significative de l'expression de CD44 (10 fois) et de la proMMP-2 (5 à 10 fois), deux protéines impliquées dans la cascade métastatique du cancer ovarien. Nous avons montré l'augmentation de l'expression de CD44 par cytométrie de flux sur des cellules non-perméabilisées tandis que nous avons observé l'augmentation de l'expression de la proMMP-2 par zymographie. L'essai de zymographie nous suggère une augmentation de la conversion de la proMMP-2 en MMP-2. L'activation de la proMMP-2 est régulée par la TIMP-2 et par la MT1-MMP. Un PCR en temps réel a été effectué pour observer les niveaux d'expression de la MT1-MMP qui ne semblait pas être affecté tandis qu'un zymographe inverse a été effectué pour observer les niveaux de TIMP-2. L'augmentation de la TIMP-2 observée par zymographie supporte l'activation de la proMMP-2 que nous avons observée.

Par la suite, nous avons tenté de mettre au point un siRNA capable d'induire une diminution du CA125 membranaire similaire à celle observée chez les clones exprimant un scFv contre CA125. Par contre, cet outil n'a pas été capable de reproduire les résultats que nous avons obtenus à l'aide du scFv lors des transfections transitoires.

Ensemble, les résultats obtenus avec les scFv démontrent que la perte d'expression de CA125 à la surface des cellules permet aux cellules d'acquérir des comportements cellulaires relié à la cascade métastatique suggérant que CA125 serait un régulateur négatif du potentiel métastatique chez la lignée NIH:OVCAR 3.

INTRODUCTION

1.0 L'ovaire normal et cancéreux

1.0.1 Biologie de l'ovaire normal

L'épithélium ovarien est composé d'une monocouche cellulaire qui est le prolongement du mésothélium appelé OSE (ovarian surface epithelium). Ces cellules à la forme cuboïde sont séparées du stroma de l'ovaire par la tunique albuginée et par une membrane basale (AUERSPERG et *al*, 2001). La portion extérieure de l'ovaire est partiellement recouverte par le péritoine. Ce tissu associé au ligament de l'ovaire permet de positionner l'ovaire à proximité de la trompe de Fallope. Les cellules OSE ont très peu été étudiées avant les années 1980 dû principalement à leurs fonctions peu apparentes et à leur patron histologique relativement simple (AUERSPERG et *al*, 2001). Pourtant, ce sont des cellules qui ont un rôle très important dans la fonction de l'ovaire. En fait, elles peuvent produire différents types de protéases dans le milieu extracellulaire. La présence de ces protéases associées avec une partie des cellules qui commencent à mourir par apoptose facilite la relâche de l'ovule lors de l'ovulation. Suite à la rupture de l'épithélium, une série de voies cellulaires sont activées pour permettre la régénération du tissu ovarien. Malheureusement, avec l'âge, la réparation du tissu serait moins efficace favorisant la formation de cavités et d'invagination dans la monocouche cellulaire

(AUERSPERG et *al*, 2001). Ces sites seraient plus susceptibles pour la formation des masses tumorales.

1.0.2 Facteurs favorisant la formation d'une masse tumorale

Initialement, deux hypothèses avaient été énoncées pour expliquer la formation des tumeurs ovariennes. L'hypothèse de Fathalla formulée en 1971 (FATHALLA, 1971) stipule que la formation de la masse tumorale serait causée par la transformation des cellules OSE à cause de la régénération de l'épithélium ovarien après l'ovulation. L'augmentation de la prolifération aurait pour cause d'accélérer l'apparition des différentes mutations pouvant entraîner à la transformation des cellules épithéliales. La seconde hypothèse, celle des gonadotrophines (CRAMER et WELCH, 1983), suggère que la transformation de l'épithélium ovarien serait causée par les multiples stimulations hormonales. Présentement, on croit que la formation des tumeurs serait due à une combinaison de ces deux hypothèses. Il existe d'autres facteurs qui peuvent contribuer au développement des masses tumorales. Évidemment, l'âge avancé des patientes de même que les conditions environnementales sont des éléments inévitables. Par exemple, l'incidence des cancers ovariens est plus grande en Amérique et en Europe qu'au niveau de la population Africaine (OZOLS, Robert F., 2003). De plus, il existe des facteurs génétiques qui peuvent augmenter les risques de développer un cancer de l'ovaire. Des mutations dans les gènes BRCA1 et BRCA2 sont généralement associées avec les cancers du sein. Par contre, il a été démontré que BRCA1 et BRCA2 pouvaient aussi accroître, respectivement, de 10 à 20% et de 5 à 10% le risque de développer des tumeurs

ovariennes (OZOL et *al*, 2004). Ces gènes sont impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN. L'absence de même que la perte de fonction de ces gènes peuvent donc favoriser l'apparition des mutations nécessaires à la transformation des tissus normaux.

1.0.3 Incidence du cancer ovarien

Selon les statistiques canadiennes, le cancer de l'ovaire est le plus mortel parmi les cancers gynécologiques. En fait, il est classé cinquième pour le taux de mortalité parmi tous les cancers. On estime à près de 2400 nouveaux cas de cancer de l'ovaire pour 2005, alors que près de 2550 patientes en mourront durant la même année (Statistiques Canadiennes sur le cancer, http://www.ncic.cancer.ca/vgn/images/portal/cit_86755361/8/14/400105690cw_stats_2005_fr.pdf, 2005). Le taux de survie des patientes est d'environ 95% après 5 ans lorsque le cancer est diagnostiqué à un stade précoce (stade I ou II), alors qu'il est en dessous de 25% si le cancer est diagnostiqué à un stade avancé (stade III ou IV). Ce taux de survie est presque nul après 10 ans selon les statistiques. Les raisons qui expliquent un taux si faible de survie proviennent du manque de tests efficaces et spécifiques pour pouvoir diagnostiquer la maladie à un stade précoce. De plus, les cancers ovariens répondent faiblement aux traitements chimiothérapeutiques et ils acquièrent rapidement une résistance aux drogues (OZOLS, Robert F., 2003). Ces phénomènes entraînent souvent des récurrences chez les patientes. Finalement, le cancer ovarien est une maladie asymptomatique lorsque la tumeur est à un stade précoce. À ce moment, la tumeur primaire a généralement eu le temps de produire plusieurs métastases

et des tumeurs secondaires dans la cavité péritonéale et sur les autres organes de l'abdomen. De plus, les patientes ont souvent commencé à produire de l'ascite, un liquide corporel composé de plasma et de différents types cellulaires dont une partie des cellules proviennent des tumeurs ovariennes. Cette accumulation est provoquée par l'obstruction des canaux lymphatiques par les cellules métastatiques contenues dans l'ascite et par la réaction inflammatoire engendrée par les cellules immunitaires. Le liquide finit par s'accumuler dans la cavité virtuelle formée par le péritoine.

Une autre des difficultés à laquelle on doit faire face, c'est le manque de modèles animaux pour pouvoir étudier la maladie. Contrairement à l'humain, la distribution des cellules métastatiques dans la cavité péritonéale n'est pas similaire entre l'humain et les rongeurs. De plus, nous avons une mauvaise connaissance de la biologie moléculaire du cancer ovarien. En fait, la structure normale de l'ovaire normale est connue et plusieurs éléments concernant les tumeurs ovariennes ont été accumulés mais pourtant, nous n'avons aucune idée sur l'évolution de la maladie due à la rareté des spécimens de tumeurs ovariennes précoces (stade I+II) et au manque de modèles animaux développant spontanément la maladie.

1.0.4 La biologie du cancer ovarien

Plusieurs types histologiques peuvent produire des masses tumorales au niveau de l'ovaire comme l'épithélium, le mésothélium, le stroma et les cellules germinales. Par contre, 90% des cancers de l'ovaire proviennent de l'épithélium ovarien chez l'humain

(AUERSPERG, et *al*, 2001). Parmi les cancers de types épithéliaux, différents sous-types sont retrouvés mais 80% des tumeurs sont de types séreuses. Les tumeurs séreuses sont généralement positives pour le marqueur tumoral CA125. De plus, la présence de CA125 dans les autres sous-types tumoraux n'est pas nul même si la proportion des tumeurs sortant positives pour CA125 est faible.

Même si les outils utilisés dans la détection du cancer ovarien sont peu efficaces, certains marqueurs sont utilisés pour suivre la progression de la maladie suite à une opération réductrice et à des traitements de chimiothérapie. L'un de ces marqueurs est l'antigène tumoral CA125. Les niveaux sanguins corrént avec l'état de la tumeur. Si la tumeur régresse, alors les niveaux sanguins de CA125 diminuent chez la patiente. Si le niveau sérique reste stable, c'est que la tumeur est stabilisée. Par contre, une augmentation des niveaux sériques de CA125 signifie que la tumeur ovarienne progresse (BAST et *al*, 1983). De plus, plusieurs études semblent montrer une corrélation entre les niveaux de CA125 sérique et le grade des tumeurs (BUT and GORISEK, 1996). Malheureusement, la majorité des études évaluent les niveaux sériques de CA125 mais aucune n'a été effectuée à ce jour sur les niveaux d'expression à la surface des cellules des tumeurs primaires ou secondaires. De plus, la provenance du CA125 sérique n'est pas encore bien déterminée. En effet, certaines cellules comme les cellules mésothéliales peuvent produire une quantité non négligeable de l'antigène tumorale CA125 dans le sang. D'autres maladies non génécologiques peuvent aussi produire du CA125 comme le cancer du poumon.

Étant donné que CA125 est un élément retrouvé dans une majorité des tumeurs ovariennes, il pourrait jouer un rôle important dans leurs développements. CA125 est une glycoprotéine de la famille des mucines qui a été très peu étudié jusqu'à ce jour. Pourtant, différents exemples de mucines ayant un rôle dans la biologie des cancers peuvent être répertoriés dans la littérature (RAINA *et al*, 2004, SINGH *et al*, 2004).

1.1 Les mucines

1.1.1 La structure générale des mucines

La famille des mucines est composée de plusieurs glycoprotéines qui ont un poids moléculaire élevé. De plus, les protéines de cette famille sont fortement glycosylées. Le positionnement des glycosylations sur la protéine de même que la structure sont dépendants des types cellulaires exprimant les mucines. Ces glycoprotéines sont composées de plusieurs régions répétées en tandem extrêmement riche en résidu proline, sérine et thréonine (DEKKER *et al*, 2002). Par contre, cette région est aussi très variable. En fait, le nombre de répétitions peut varier entre différentes mucines mais aussi chez deux mucines identiques. Ces variations sont causées par un fort polymorphisme retrouvé dans plusieurs des mucines comme MUC1 (HANISCH and MÜLLER, 2000).

1.1.2 Rôle des mucines

Dans un organisme vivant, le principal rôle des mucines est de protéger les cellules épithéliales qui sont en contact avec la lumière d'un organe. Les cellules qui sont dans cette situation doivent survivre à différentes conditions qui sont souvent extrêmes. Par exemple, les cellules de l'estomac doivent résister à des pH très acide tandis que l'épithélium pulmonaire doit survivre aux différents polluants présents dans l'air (HOLLINGSWORTH and SWANSON, 2004). Les mucines se retrouvent dans le milieu extracellulaire sous deux formes. Elles peuvent être ancrées à la membrane par un domaine transmembranaire ou être sécrétées dans le milieu extracellulaire. Les mucines peuvent donc être séparées en deux familles distinctes : soluble ou transmembranaire. Évidemment, les mucines sécrétées peuvent emprunter deux voies. Soit en passant par les vésicules de sécrétion de la cellule, soit par clivage des protéines transmembranaires par des protéases pour permettre la relâche du fragment extracellulaire dans le milieu. Certaines mucines transmembranaires peuvent aussi subir de l'épissage alternatif permettant la formation de mucines qui n'ont plus leur domaine d'ancrage. À ce moment, ces formes alternatives pourront être sécrétées dans le milieu extracellulaire, tel que MUC1 sec. Une fois que les mucines sont dans l'espace extracellulaire, les mucines sécrétées peuvent interagir entre elles à partir de leur domaine D pour former un amas tridimensionnel, le mucus (HOLLINGSWORTH and SWANSON, 2004). Le domaine D est un domaine de dimérisation similaire à celui retrouvé dans le facteur von Willebrand au niveau des mucines porcines (HOLLINGSWORTH and SWANSON, 2004). Dues à

leur immense taille, le treillis formé des mucines peut servir de filtre et empêcher les grosses particules comme des bactéries ou des virus d'entrer en contact avec l'épithélium.

Les mucines auraient aussi d'autres fonctions au niveau cellulaire. Le gel qui est formé par les glycoprotéines pourrait séquestrer différentes molécules. Cette rétention pourrait alors servir comme senseur. Lors d'une blessure à l'épithélium, il pourrait y avoir relâche de molécules bioactives qui étaient séquestrées dans le réseau créé par les mucines et activation de différentes voies cellulaires via l'interaction de ces molécules avec des récepteurs à la surface des cellules épithéliales pour répondre aux stimuli environnementaux (HOLLINGSWORTH and SWANSON, 2004). Une plus grande capacité migratoire et l'augmentation de la prolifération cellulaire seraient certains exemples de voies activées par une blessure à la structure formée par les mucines. Certaines mucines ancrées à la membrane cellulaire peuvent envoyer des signaux dans la cellule par différentes voies telles que MUC1 et MUC4. Certaines mucines possèdent des domaines EGF-like qui leur permettrait d'interagir avec le récepteur à l'EGF (ErbB2). Les signaux cellulaires pourraient alors passer par la voie d'AKT et des MAPK pour induire différentes réponses (HOLLINGSWORTH and SWANSON, 2004).

1.1.3 MUC1

MUC 1 est la première mucine à avoir été clonée. Cette glycoprotéine possède aussi différents noms dont l'épisialine, l'antigène membranaire de l'épithélium (EMA), CA15.3 et l'antigène DF3 (HANISCH and MÜLLER, 2000). Elle est retrouvée sur la

Box 1 | The functions of specific mucin domains

Cysteine-rich domain

This is cysteine rich and is not heavily glycosylated.

Cysteine-rich/cysteine-knot domain

A domain that is conserved with von Willebrand factor and the cysteine knot of TGF- β that mediates dimerization of mucin molecules.

Cytoplasmic tail

This domain is found on the cytoplasmic side of the cell-surface membrane. It often contains sites of phosphorylation that interact with mediators of signal transduction and might mediate association with cytoskeletal elements.

D domain (D1, D2, D', D3)

These show sequence homology to the von Willebrand factor 'dimerization' domain and mediate trimerization of secreted mucin core proteins such as MUC2.

D domain (D4)

A region of sequence homology to the D4 dimerization domain of von Willebrand factor; includes the GDPH autocatalytic site near the amino terminus of MUC2 and MUC5AC.

Epidermal-growth-factor (EGF)-like domains

Show homology to EGF and related growth factors and cytokines (for example, Cripto). They are believed to mediate interactions between mucin subunits and ERBB receptors.

GDPH autocatalytic proteolytic cleavage site

An autocatalytic proteolysis site in some mucins (demonstrated for MUC2, conserved in MUC5AC and MUC4) that cleaves between GD and PH residues. A second step might involve formation of an autocatalytic ester linkage between the α carbon of the carboxy-terminal D residue and an internal *N*-acetylgalactosamine moiety on a chondroitin-sulphate glycosaminoglycan on the other subunit, forming a unique covalent bond by which mucin subunits are linked to other secreted molecules.

SEA domain

Named for a common domain found in sperm protein, enterokinase and agrin that was identified by sequence homology. It is widely distributed among cell-surface-associated proteins that are heavily *O*-glycosylated and is postulated to function in protein binding to carbohydrate moieties. Among mucins, this domain was originally identified in MUC1 and has subsequently been found in MUC3, MUC12, MUC13 and MUC17.

Signal sequence

Directs insertion into the endoplasmic reticulum for secretion or cell-surface delivery.

Tandem repeat

Rich in serine, threonine and proline residues. They are heavily *O*-glycosylated and are characteristic of mucin core proteins. There is a high degree of sequence similarity within any one repeat, but very little sequence conservation between different repeats or between orthologues. They can be highly polymorphic for length and sequence variability.

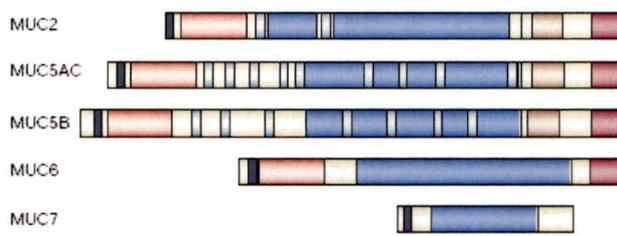
Transmembrane domain

Membrane-spanning domain that creates an integral membrane protein, which is found in cell-surface-associated mucins.

Proteolytic cleavage site

Conserved proteolytic cleavage site that is found within the SEA domains of some mucins and outside of the SEA domains in others. It facilitates the creation of mucin subunits that remain associated.

Secreted mucins



Membrane-associated mucins

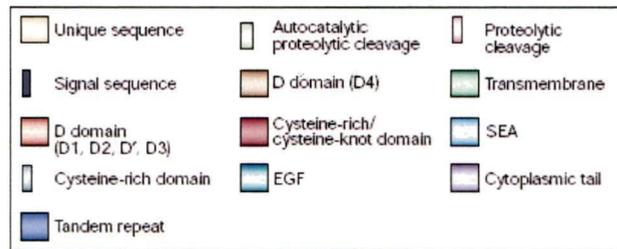
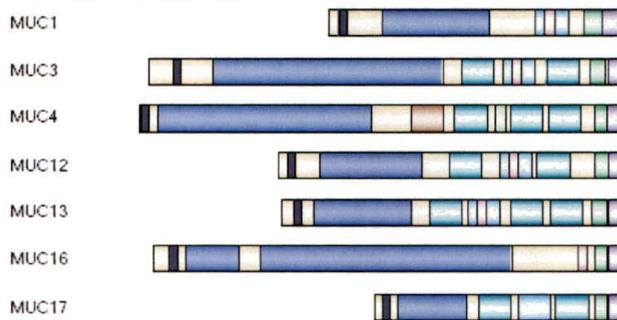


Tableau 1. Les différentes mucines (Tiré de HOLLINGSWORTH and SWANSON, 2004)

portion apicale de la majorité des cellules épithéliales sauf pour les cellules de la peau et comme quelques mucines, elle peut être ancrée à la membrane cellulaire ou relâchées dans le milieu extracellulaire. La localisation de MUC1 est déterminée en partie par l'épissage alternatif du gène. L'isoforme MUC1 possède donc les répétitions en tandem mais aussi un domaine transmembranaire en plus d'une région EGF-like sur sa portion C-Terminale. La protéine MUC1/sec n'a pas de domaine transmembranaire et elle est donc sécrétée dans le milieu extracellulaire. Cette forme alternative de MUC1 est utilisée comme marqueur dans le sang des patientes ayant un cancer du sein. La forme MUC/Y qui ne possède aucune répétition mais qui possède un domaine d'ancrage et une région EGF-like peut être aussi isolée. Cette forme de MUC1 pourrait interagir avec MUC1/sec via le domaine EGF-like et permettrait de recruter MUC1/sec à la membrane cellulaire. Comme toutes les mucines, MUC1 possède plusieurs répétitions en tandem qui sont fortement glycosylées (HANISCH and MÜLLER, 2000). En fait, 50 à 80 pourcent de la structure protéique se retrouve au niveau de ces répétitions en tandem. De plus, la mucine MUC1 est souvent associée avec la progression des tumeurs mammaires.

Contrairement aux cellules normales, l'expression de MUC1 dans les cellules tumorales semble altérée. Au lieu d'exprimer la protéine de manière polarisée, les cellules cancéreuses montrent une distribution aléatoire à la surface cellulaire. La structure et la composition en oligosaccharides des glycosylations retrouvées sur les répétitions sont aussi différentes entre une cellule normale et une cellule tumorale (MENSCHENDORFF-POUILLY et *al*, 2000). Ces nombreuses altérations modifient les comportements des cellules exprimant MUC1. Plusieurs études montrent l'implication de MUC1 dans

certaines phénotypes associés à cascade métastatique. Pourtant, la présence de MUC1 dans l'organisme vivant n'est pas cruciale. Les souris MUC1^{-/-} sont capables de survivre sans aucun problème (AGRAWAL et *al*, 1998 et SPICER et *al*, 1995). L'absence de MUC1 pourrait être comblée par la présence des autres mucines. Point à noter, l'absence de MUC1 semble diminuer la croissance des masses tumorales mammaires lorsque les souris étaient en présence de l'antigène moyen T (AGRAWAL et *al*, 1998 et SPICER et *al*, 1995).

Au niveau moléculaire, la protéine MUC1 est phosphorylée sur différentes thréonines et sérines au niveau de sa queue cytoplasmique. Ces modifications activent différentes voies de signalisation. La phosphorylation de MUC 1 s'effectue sur deux sites distincts. La séquence consensus YEVK est phosphorylée par erbB-1 (EGF-R) une fois liée à son ligand (LI et *al*, 2001). Cette phosphorylation permet l'interaction avec de la protéine c-Src qui peut ensuite phosphoryler MUC1 sur la tyrosine du site consensus SPYEKV. Ceci permet d'augmenter l'interaction de MUC1 avec la β -caténine. Par contre, la GSK3 β (Glycogène synthase kinase 3 β) peut aussi phosphoryler la région consensus SPYEKV mais sur la sérine (LI et *al*, 2001). Cette modification aura pour effet de diminuer l'interaction entre la β -caténine et MUC1. Ensuite, la queue cytoplasmique de MUC1 peut être relâchée dans le cytoplasme dans certaines conditions et celle-ci pourrait transloquer dans différents compartiments cellulaires comme au noyau ou à la mitochondrie (WEN et *al*, 2003, LI et *al*, 2003, REN et *al*, 2004). Dans le noyau, la queue cytoplasmique colocalise avec la β -caténine (WEN et *al*, 2003) ou la γ -caténine (LI et *al*, 2003) selon la nature du signal qui a permis la relâche de la queue dans le

cytoplasme. Au niveau de la mitochondrie, la queue de MUC1 pourrait diminuer la relâche du cytochrome c. Cette inhibition aura pour effet de réduire l'activation de la caspase-3 lors de traitement avec des agents génotoxiques (REN *et al*, 2004). De plus, l'expression de MUC1 dans d'autres lignées cellulaires pouvait protéger les cellules contre l'apoptose. Cette protection serait causée par une modulation des apoptotiques Bcl X_L et Bad (RAINA *et al*, 2004).

1.1.4 MUC4

Au niveau du cancer pancréatique, toutes les mucines sont régulées correctement sauf MUC4. Mise à part les cellules cancéreuses, la mucine MUC4 est exprimée dans une bonne partie du tube digestif chez l'humain (estomac et colon). Cette glycoprotéine possède différents transcrits qui sont produits par épissage alternatif. De plus, MUC4 est composée de deux sous-unités distinctes. MUC4 α est la portion extracellulaire contenant les nombreuses répétitions en tandem et le domaine N-Terminale. La portion transmembranaire de MUC4 se retrouve dans la seconde sous-unité, soit MUC4 β (MONIAUX *et al*, 2004). De plus, cette protéine possède une forte homologie avec la protéine SMC chez le rat. L'homologue chez le rat est capable d'interagir avec le récepteur ErbB2, de provoquer sa phosphorylation et d'induire un signal dans la cellule (MONIAUX *et al.*, 2004). Jusqu'à maintenant, cette interaction n'a pas été démontrée dans la littérature pour MUC4. Lorsque les cellules cancéreuses perdent l'expression de MUC4 via la production d'un antisens, l'adhésion entre les cellules est augmentée. Cette

diminution d'expression entraîne également une croissance cellulaire réduite et une diminution des capacités migratoires des cellules tumorales (SINGH *et al*, 2004).

1.1.5 CA125 (MUC16)

1.1.5.1 Fonctions connues de CA125

Même si le marqueur CA125 est fortement utilisé en clinique, les connaissances à son égard sont très minimes. Plusieurs articles dans la littérature font mention d'interaction possible avec d'autres protéines comme la galectine 1 (SEELENMEYER *et al*, 2003) ou la mésothéline (RUMP *et al*, 2004). Notre laboratoire a montré que la protéine CA125 pouvait aussi interagir avec d'autres protéines comme la E-cadhérine ou la β -caténine (MIGNEAULT *et al.*, non publié). CA125 est détectée dans différents tissus normaux de l'appareil gynécologique comme le col de l'utérus et les trompes de Fallope mais elle n'est pas détectable dans l'épithélium ovarien normal avec les anticorps disponibles présentement. De plus, CA125 peut être retrouvé dans d'autres tissus comme les poumons (DAVIS *et al*, 1986) et même au niveau de l'œil (GARGÜESO *et al*, 2003). Les niveaux d'expression protéiques à la membrane des cellules pourraient être modulés par la relâche de la portion extracellulaire. La relâche subviendrait lors de la stimulation des cellules avec le facteur de croissance épithéliale (EGF) (KONISHI *et al*, 1994). Jusqu'à maintenant, aucun groupe n'a pu montrer la présence d'un site de clivage chez CA125 pourtant, la présence de plusieurs domaines SEA dans la portion extracellulaire suggère un clivage possible (MAEDA *et al*, 2004).

1.1.5.2 Le gène de CA125

Le gène *MUC16* encode la protéine CA125 et est localisé sur le chromosome 19p entre les loci 13.2 et 13.3 (KANAKO et *al.*, 2003). L'ADN complémentaire de CA125 serait composé d'environ 66 Kb selon le groupe d'O'Brien (O'BRIEN et *al.*, 2002), mais récemment, le groupe de Lloyd a suggéré une nouvelle séquence d'environ 21 Kb (YIN et LLOYD, 2001). Cette nouvelle séquence possède plus d'homologie avec ses homologues chez la souris et chez le rat (MIGNEAULT et *al.*, non publié). Contrairement à la séquence proposée par O'Brien, celle de Lloyd possède une portion N-Terminale moins longue et contient moins de répétitions. Il existe aussi une séquence qui possède seulement la portion C-terminale de CA125 avec trois répétitions, soit le FLJ14303.

CA125 comprend différents domaines : portion N-Terminal, les répétitions et la portion C-terminale. La portion N-Terminale, n'est pas encore définitive car elle a été déterminée que par alignement de séquences et qu'aucun groupe n'a réussi à cloner cette portion du gène. De plus, aucun anticorps ne reconnaît cette portion de la protéine CA125. Par la suite, il y a la région centrale composée par les répétitions riches en sérine, thréonine et proline, qui est une caractéristique des mucines. L'ensemble des répétitions dans la séquence proposée par O'Brien aurait plus de 60 répétitions (O'BRIEN et *al.*, 2001). Par contre, la séquence proposée par Lloyd en aurait seulement une vingtaine ce qui serait similaire avec les homologues du rat et de la souris. Cette différence peut être due soit à l'incertitude vis-à-vis la séquence de CA125 ou soit être causée par la présence du polymorphisme retrouvé chez les mucines. Il est important de souligner que les deux

groupes n'ont pas utilisé les mêmes lignées cellulaires pour faire leur essai ce qui pourrait supporter l'hypothèse du polymorphisme. Ensuite, en alignant plusieurs des répétitions, il est possible d'observer une homologie d'environ 80% entre chacune d'entre elles. Finalement, la protéine possède une portion C-terminale qui encode pour la région unique, le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique CA125.

1.1.5.3 Description de la structure protéique de CA125

La protéine CA125 (voir figure 1) est une glycoprotéine d'environ 22 000 résidus d'acide aminé selon la séquence proposée par O'Brien (O'BRIEN et *al*, 2002). Sa structure peut être décomposée en trois régions distinctes. Le N-Terminal serait fortement O-glycosylé et posséderait environ 10000 acides aminés selon le groupe d'O'Brien (O'BRIEN et *al*, 2001). La partie centrale est composée de plusieurs régions répétées en tandem comprenant deux épitopes ayant la capacité d'être reconnus par deux familles d'anticorps distinct soit M11 et OC125. Ces épitopes sont formés grâce à la présence de deux cystéines permettant la formation d'un pont disulfure (O'BRIEN et *al*, 2001). En plus, les répétitions de CA125 sont riches en thréonine et en sérine d'où la forte glycosylation des répétitions. Finalement, la portion C-terminale de CA125 comprend le domaine unique, le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique qui est relativement courte. Celle-ci contiendrait seulement 31 résidus d'acide aminé et cette portion protéique contiendrait plusieurs sites consensus possible de phosphorylation. La phosphorylation s'effectuerait soit sur une thréonine ou sur une tyrosine via le récepteur à l'EGF suite à une stimulation avec son ligand (KONISHI et *al*, 1994).

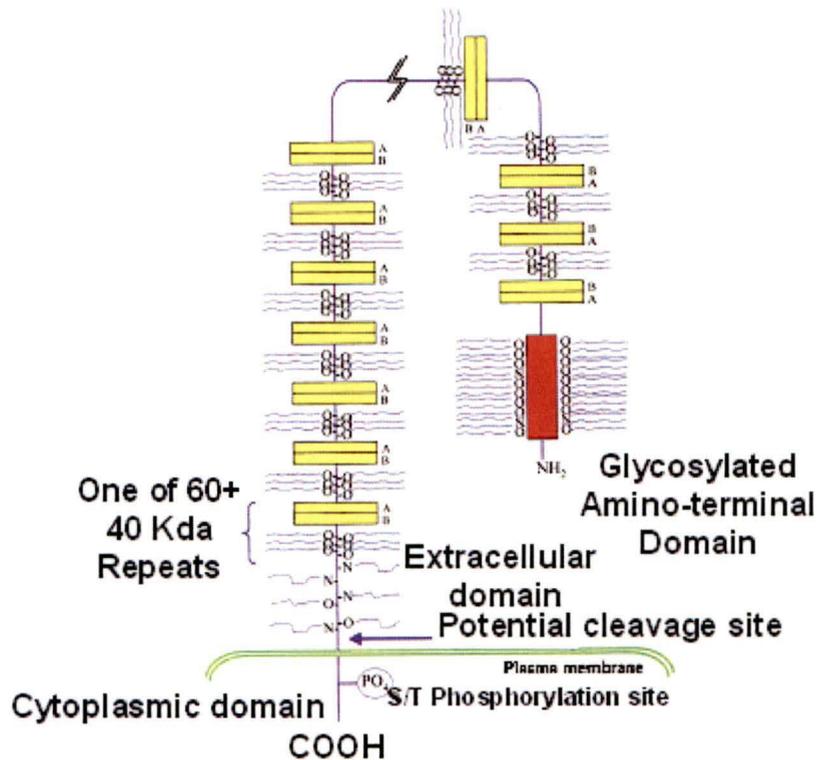


Figure 1 : Structure protéique proposée par le groupe de O'BRIEN et *al*, 2001 pour la glycoprotéine CA125.

La taille de l'ADN complémentaire et le grand nombre de glycosylations de la protéine rendent l'étude de CA125 compliquée. L'étude est encore plus difficile si la possibilité que l'ARN messager soit épissée de manière alternative est incluse. L'électrophorèse de CA125 sur un gel de polyacrylamide dénaturant produit toujours une traînée caractéristique. De plus, à cause de son énorme taille (au-dessus de 200kDa), nous ne sommes pas certains que le transfert protéique lors d'un immunobuvardage de type Western soit complet. Donc, plusieurs méthodes pour avoir une meilleure évaluation des niveaux d'expression protéique de CA125 à la membrane ont été envisagées. L'utilisation de la cytométrie de flux a permis d'avoir une mesure des niveaux membranaire de CA125 qui est relativement constante contrairement au immunobuvardage de type Western.

En prenant MUC1 et MUC4 comme exemple, on constate déjà que ces deux mucines semblent impliquées au niveau du développement tumorale. En fait, d'autres mucines comme MUC2 et MUC20 semblent aussi impliquées dans la biologie du cancer. Les fonctions généralement affectées par la dérégulation de ces protéines sont reliées aux phénotypes métastatiques. Étant donné que plusieurs mucines semblent impliquées dans les processus métastatiques, nous avons voulu vérifier si CA125 pouvait jouer un rôle dans ce phénomène tumoral.

1.2 La cascade métastatique

La cascade métastatique est un phénomène tumoral qui permet à une masse tumorale primaire de produire des tumeurs secondaires à des sites non adjacents (TANTIVEJKUL et *al.*, 2004). Ce phénomène cellulaire requiert différentes étapes durant lesquelles les cellules subiront une adaptation. Pour chacune des étapes, les cellules devront posséder une série de caractéristiques leur permettant de survivre, de proliférer et même de pouvoir se déplacer à travers des composantes de la matrice extracellulaire ou des jonctions cellulaires (voir la figure 2). Initialement, les majorités des cellules épithéliales et endothéliales sont ancrées à une lame basale qui leur transmet des signaux de survie via les intégrines. La première caractéristique que les cellules doivent acquérir est la capacité à digérer cette matrice composée de différentes protéines (point 1 de la figure 2). La dégradation de cette matrice sera effectuée par l'intermédiaire de protéases extracellulaires activées (BAIR E.L et *al.*, 2005). Ensuite, pour pouvoir se propager au travers du tissu lâche, les cellules doivent pouvoir ce

déplacer librement^(point 2 de la figure 2) (BAIR E.L et *al.*, 2005 et BOURGUIGNON et *al.*, 2001). Ce processus est régulé par une polarisation des protéines membranaires et par la réorganisation du cytosquelette. Lorsque les cellules tumorales arrivent à proximité des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, elles doivent pouvoir passer au travers des jonctions serrées^(point 3 de la figure 2) (DUA et *al.*, 2005). À l'intérieur de la circulation, les cellules se retrouvent sans adhésion et parfois isolées l'une par rapport à l'autre. Les cellules cancéreuses doivent donc résister à l'anoïkose qui est une forme d'apoptose soit en formant des masses cellulaires ou en s'associant aux cellules dans le sang (LOBERG et *al.*, 2004). Ensuite, les cellules tumorales doivent traverser à nouveau la couche endothéliale des vaisseaux pour pouvoir aller former un nouveau foyer^(point 5 et 6 de la figure 2) (WEIS et *al.*, 2005). Durant cette étape, les cellules devront avoir les mêmes capacités que durant les étapes 2 et 3 mais les composantes cellulaires utilisées par les cellules pourront être différentes. Étant donné que les métastases d'un type cancéreux sont souvent retrouvées dans des tissus spécifiques, les cellules tumorales doivent être attirées par certaines molécules dans leur environnement. Finalement, pour pouvoir proliférer^{(point}

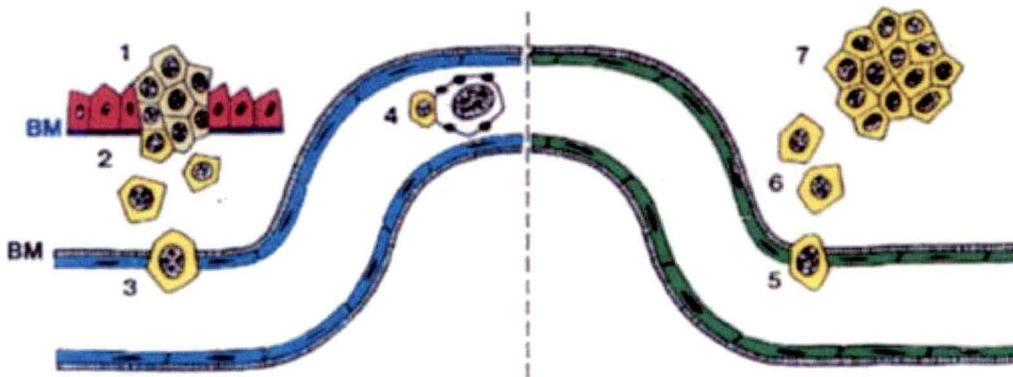


Figure 2 : Schématisation de la cascade métastatique conventionnelle

7 de la figure 2) correctement dans le nouveau site, la masse tumorale doit avoir les nutriments nécessaires. Généralement, les masses secondaires possèdent une bonne vascularisation. La formation des vaisseaux sanguins nécessite la production de certains stimuli comme la sécrétion de VEGF.

Au niveau du cancer ovarien, ce modèle n'est pas complètement valide. Contrairement au modèle précédemment, les métastases des tumeurs ovariennes n'utilisent pas les vaisseaux lymphatiques ou les vaisseaux sanguins pour se propager dans l'organisme. En fait, les cellules restent localisées dans la cavité péritonéale où leur déplacement sera provoqué par le mouvement du diaphragme lors de la respiration. La figure 3 représentent donc un meilleur modèle de la cascade métastatique au niveau du cancer de l'ovaire.

À partir de résultats obtenus dans notre laboratoire (BEAUDIN et al., non publié), la cascade métastatique semblait une voie intéressante à investiguer. En fait, nous avons observé par une analyse du profil d'expression génique différentes variations dans des gènes qui pouvaient être associés avec la cascade métastatique. De plus, la perte de CA125 observé à la membrane cellulaire pouvait empêcher la formation d'interaction homotypique cellule-cellule. Ce phénomène pourrait être associé avec la capacité des cellules à se détacher de la masse primaire lors de la formation des métastases. Vu que ce processus tumoral est composé de différentes étapes, nous nous sommes concentrés à mieux comprendre l'implication des capacités migratoires des cellules et sur la protéolyse de la matrice extracellulaire dans le cadre du cancer ovarien.

1.2.1 Motilité des cellules

Pour que les cellules puissent se déplacer entre deux sites distincts, elles doivent pouvoir modifier certaines de leurs structures. Ce processus est régulé par l'expression de protéines membranaires mais aussi par la polarisation de ces mêmes protéines. Plusieurs protéines sont associées à ces mouvements dont les intégrines, quelques glycoprotéines et même certains récepteurs cellulaires. La présence de ces protéines à la membrane permet l'interaction des cellules avec les cellules voisines ou avec les composantes de la matrice extracellulaire. De plus, ces protéines doivent être clivées par des protéases ou subir des changements conformationnels pour pouvoir briser les interactions. Certaines protéines membranaires comme les intégrines peuvent se regrouper pour transmettre des signaux cellulaires affectant différentes voies dont la migration cellulaire (SCHLAEPFER et *al*, 2004). Les multiples interactions entraînent souvent la réorganisation du cytosquelette cellulaire nécessaire à la formation des lamellipodes. La modification du cytosquelette est gouvernée par différentes molécules dont les protéines de la famille des GTPases Rho (Rho, Rac et cdc42), FAK et la famille des Src. Le signal est souvent perçu par FAK qui pourra par la suite recruter d'autres kinases dont plusieurs Src et des éléments nécessaires à la régulation des GTPase comme ASAP1 et Graf (SCHLAEPFER et *al*, 2004). Certaines protéines impliquées dans le cycle cellulaire pourraient aussi permettre la régulation de la migration. Parmi ceux-ci, p27kip2 et p57kip2 pourrait inhiber les fonctions de Rho et de Rac lorsqu'elles sont dans le cytoplasme (BESSON et *al*, 2004). Généralement, ces protéines sont retrouvées dans le noyau des cellules mais leur localisation peut varier selon les phosphorylations qu'elles ont subies.

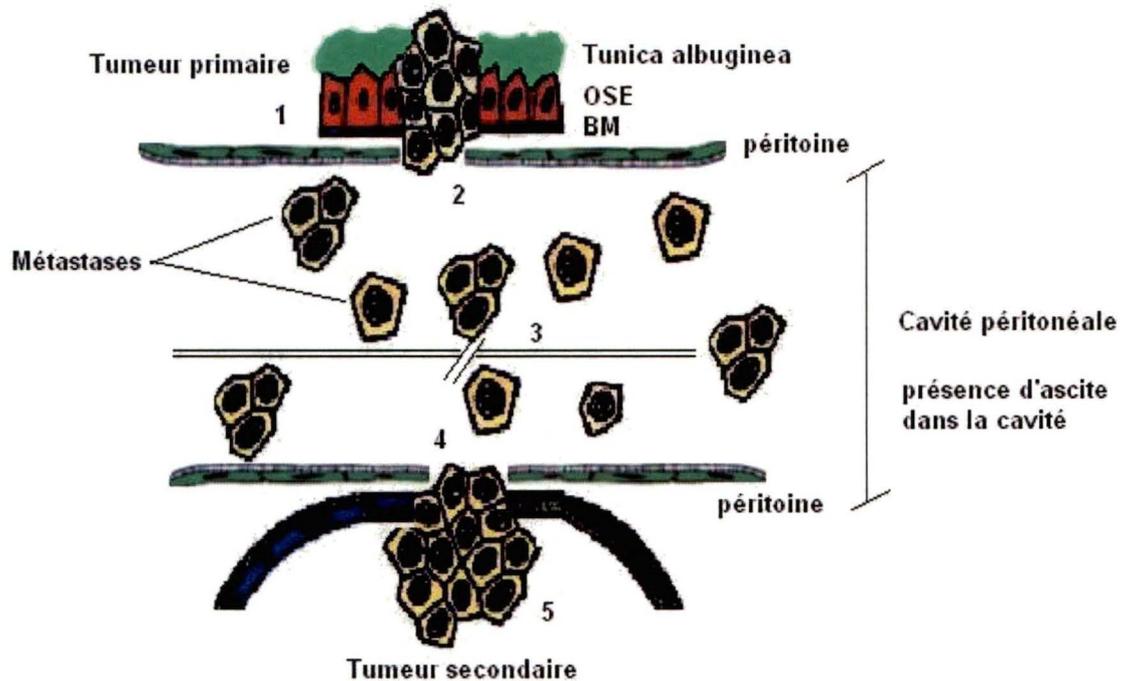


Figure 3 : Schématisation de la cascade métastatique au niveau du cancer ovarien

Parmi toutes les protéines membranaires, celle qui est la plus connue pour être impliquée dans la migration cellulaire est probablement la glycoprotéine CD44. Son implication dans la migration a déjà été montrée dans différents systèmes cellulaires dont le cancer de l'ovaire (BOURGUIGNON et *al*, 2001). Cette protéine possède différents isoformes produits par épissage alternatif, mais il a peu d'information connue sur les fonctions de chacun des isoformes. CD44 peut aussi interagir avec son environnement via l'acide hyaluronique qui se retrouve sur plusieurs protéines de la matrice extracellulaire. Cette molécule peut être retrouvée sur certaines protéines membranaires. Au niveau du cancer ovarien, la migration via CD44 passerait par l'interaction avec c-Src. L'association aurait lieu lorsque CD44 lie l'acide hyaluronique. Le complexe CD44/c-Src modifierait la structure du cytosquelette en phosphorylant entre autre la cortactine. Cette molécule

permet la bonne polymérisation des filaments de F-actin (BOURGUIGNON et *al*, 2001). Au niveau moléculaire, la portion extracellulaire de CD44 peut être clivée par différentes protéases dont la MT1-MMP (Membrane type 1-MMP). Lorsque CD44 est clivé, sa queue cytoplasmique peut se transloquer au noyau où elle peut servir de facteur de transcription (OKAMOTO et *al*, 2001). Elle reconnaît des éléments TRE (TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) responsive element) dans la région promotrice de plusieurs gènes. Parmi les gènes qui peuvent être régulés par cet élément, on retrouve la métalloprotéinase de matrice 9 (CHINTALA et RAO, 1999).

D'autres molécules peuvent être associées avec la migration cellulaire. Certaines intégrines comme l' $\alpha_v\beta_3$ (ZHENG et *al*, 1999) a été montrée dans certains systèmes. La motilité cellulaire est induite lorsque cette intégrine lie la vitronectine. La réponse serait modulée par la phosphorylation de la protéine FAK (focal adhesion kinase). En plus de certaines intégrines, certains récepteurs membranaires pourraient aussi jouer un rôle dans la migration cellulaire. En effet, le récepteur aux facteurs de croissance hépatocytaire (HGF-R) serait impliqué dans la motilité de certaines cellules lors de sa stimulation avec du HGF (UEOKA et *al*, 2003). Dans ce modèle, la migration des cellules passerait partiellement par ras et la voie des MAPK.

La migration des cellules cancéreuses ne serait probablement pas aléatoire. En effet, comme pour les cellules immunitaires ou neuronales, les cellules tumorales pourraient donc se déplacer en fonction de gradient moléculaire. La présence de différents chémoattractants dans l'environnement pourrait permettre aux cellules

cancéreuses de se déplacer de manière ordonnée. En fait, se sont les récepteurs CXCR qui sont responsables de cette reconnaissance extracellulaire. Au niveau de cellules tumorales de l'ovaire, CXCR4 serait exprimé par une portion des cellules. De plus, son ligand CXCL12 est souvent présent dans l'ascite des patientes (SCOTTON *et al*, 2001).

1.2.2 Invasion cellulaire

Afin de traverser les membranes basales adjacentes, les cellules doivent produire des protéases spécifiques. Ces molécules sont associées dans des conditions normales avec la réparation des tissus, dans la réorganisation cellulaire et aussi dans le développement fœtal. Les protéases font parties de différentes familles comme les MMP (métalloprotéase de matrice) (STACK *et al*, 1998), les activateurs plasminogènes (STACK *et al*, 1998), la famille des ADAM (BECK *et al*, 2005) et les Kallikreins (DONG *et al*, 2001). Plusieurs études ont montré que ces familles joueraient un rôle dans la tumorigénèse de l'ovaire. L'activation de ces protéases peut être associée avec différents phénotypes comme la migration cellulaire et le potentiel invasif des cellules.

Au niveau du cancer ovarien, les MMP-2 et MMP-9 ont été montrées comme étant les protéases impliquées dans la digestion de la membrane basale. Ces protéases pourraient aussi digérer la membrane basale du péritoine étant donné qu'il est composé de collagène de type I, d'élastine et de fibronectine (FREEDMAN *et al*, 2004) qui sont les substrats de ces deux protéases. De plus, il y aurait aussi de la MMP-1 et de la MMP-3

qui pourraient permettre la dégradation de la tunique albuginée. Par contre, ce processus qui permet l'invasion du stroma ovarien est moins fréquent. Comme pour la MMP-2 et la

Tableau 2 : Différents types de métalloprotéinases de matrice connues dans la littérature.

MMP	Synonyms	EC Classification	Latent M.W. (kDa)	Active M.W. (kDa)	Substrates
MMP-1	Interstitial Collagenase	3.4.24.7	55	45	Fibrillar collagens, casein, gelatin, proteoglycan
MMP-2	Gelatinase A, 72 kDa Type IV Collagenase	3.4.24.24	72	66	Denatured collagens, collagens IV, V, VII, X, gelatin
MMP-3	Stromelysin-1	3.4.24.17	57	45	Proteoglycan, collagens X, XI, procollagens, gelatin, laminin, collagenase, gelatinase B
MMP-7	Matrilysin ; PUMP	3.4.24.23	28	19	As stromelysin 1, elastin
MMP-8	Neutrophil collagenase	3.4.24.34	75	58	Fibrillar collagens, gelatin, proteoglycan
MMP-9	Gelatinase B, 92 kDa Type IV Collagenase	3.4.24.35	92	86	Denatured collagens, collagens IV, V, VII, X
MMP-10	Stromelysin 2	3.4.24.22	57	44	As Stromelysin 1
MMP-11	Stromelysin 3		62	47	Unknown
MMP-12	Macrophage metalloelastase	3.4.24.65	54	22	Elastin, gelatin, collagen IV, fibronectin, laminin, vitronectin, proteoglycan
MMP-13	Collagenase 3	--	66	48	Fibrillar collagens, gelatin, aggrecan
MMP's 14-17	Membrane-type Metalloproteinases (MT1-, MT2-, MT3-, and MT4-MMP)	--	--	--	--
Collagenase 4	--	--	55	--	Collagen I, gelatin

Tiré du site internet

<http://www.chemicon.com/techsupp/MMPChart.asp?TXTSEARCH=nomenclature>

MMP-9, ces deux autres MMPs pourraient aider à la dégradation de la membrane basale du péritoine à cause de la présence de collagène de type III et de laminine. Parmi la famille des métalloprotéinases de matrice, il existe plusieurs protéines comme le montre le tableau 2. Les protéases MMP-2 et MMP-9 font parties de la famille des métalloprotéinases de matrice. Ces enzymes ont la particularité d'être sécrétées par les cellules sous une forme inactive nommée zymogène. La proMMP-2 et la proMMP-9 deviennent actives seulement lorsque leur domaine catalytique est libéré par le clivage induit par des activateurs enzymatiques spécifiques. Dans le cas contraire, les protéases sont inactives à cause d'un peptide (PRCXXPD) qui masque le site actif de l'enzyme. En fait, il s'agit de la présence du résidu cystéine qui vient bloquer l'ion divalent de la protéase (CHINTALA et RAO, 1999). Pour avoir son activité catalytique, il faut que ces protéases soient en présence d'un cofacteur métallique divalent, le zinc. La quantité d'enzyme sécrétée est régulée par différents éléments dont des éléments TRE qui répond à différentes cytokines et à plusieurs facteurs de croissance. Par contre, la proMMP-2 ne possède pas ces éléments contrairement à la proMMP-9.

L'activation de la proMMP-2 en MMP-2 s'effectue par la MT1-MMP qui est déjà active à la membrane des cellules. Dans ce cas, la MT1-MMP est activée par la furine qui est une sérine protéase dans le système de sécrétion. Cet enzyme reconnaît un site spécifique (RXKR) qui est retrouvé que chez certaines MMP. La présence de la TIMP-2 dans le milieu extracellulaire permet d'augmenter l'efficacité du clivage protéique (CHINTALA et RAO, 1999). En fait, l'association MT1-MMP/TIMP-2 forme un complexe qui permet le recrutement de la proMMP-2 à la membrane cellulaire. Une fois

que le trimère est formé, il aura clivage de la proMMP-2 par une autre MT1-MMP à proximité. Fait à noter, la TIMP-2 est l'inhibiteur de la MMP-2. Par conséquent, une faible concentration de l'inhibiteur de même qu'une trop grande quantité de TIMP-2 pourraient nuire à l'activation de la proMMP-2.

1.3 Anticorps monovalent modifié ou scFv

Étant donné qu'il n'avait que très peu d'information initialement sur la protéine CA125, nous avons dû trouver des nouvelles approches pour pouvoir étudier ces deux mécanismes. À ce moment, il avait différentes méthodes qui étaient utilisées dans la littérature pour diminuer l'expression d'une protéine. Les ribozymes, les antisens, le scFv et plus récemment l'interférence à l'ARN sont des approches qui sont envisageables. Nous avons sélectionné différentes méthodes dont le scFv. Initialement, cette méthode a été préconisée car il avait peu d'information sur la génétique de CA125. Le scFv nous permettait de produire un outil qui pouvait cibler la directement la protéine.

Cette méthode utilise le même concept que les anticorps monoclonaux. En fait, en isolant la partie variable d'un anticorps et en les reliant par un peptide flexible, la protéine qui est produit est encore capable de reconnaître les mêmes épitopes que l'anticorps original. Le scFv ou anticorps monovalent modifié a déjà été utilisé dans la littérature pour diminuer les fonctions de plusieurs protéines.

Dans notre modèle, nous savons que CA125 doit passer par la voie de sécrétion pour être localiser à la membrane cellulaire pour pouvoir avoir ces fonctions normales. Le scFv a donc été ciblé dans le réticulum endoplasmique pour permettre de séquestrer CA125 dans ce compartiment cellulaire. Pour ce faire, un peptide signal a été ajouté à l'une des extrémités du scFv pour lui permettre de passer par le ER. Après, une séquence peptidique KDEL a aussi été ajoutée. Ce signal peptidique de quatre acides aminés permet la rétention du scFv dans le réticulum endoplasmique. En liant la protéine dans le ER, la localisation naturelle à la membrane plasmique est altérée. La construction est insérée en aval d'un promoteur inductible ce qui permet de contrôler l'expression du gène d'intérêt. Dans notre cas, l'ajout de doxycycline permet l'activation du promoteur et la transcription du scFv.

Jusqu'à ce jour plusieurs clones ont été produits dans la lignée cellulaire NIH:OVCAR 3 mais seulement un clone avait été validé. Pour s'assurer des résultats qui avaient été obtenus précédemment, un autre clone qui semblait avoir les mêmes caractéristiques que le clone KDEL 1:9 #9 a été sélectionné. Le nouveau clone KDEL 1:9 #7 sera caractérisé et utilisé dans l'étude des fonctions de CA125 dans le cancer de l'ovaire. Pour pouvoir valider notre modèle, nous avons voulu utiliser une autre approche pour diminuer les niveaux d'expression de CA125 soit l'interférence à l'ARN.

1.3.1 L'interférence à l'ARN

L'interférence à l'ARN fut initialement découverte chez les mammifères par le groupe de Fire et al. en 1998. Pourtant, le mécanisme était déjà connu par certains groupes car ce processus était déjà étudié chez les plantes (ANGELL S.M. et BAULCOMBE D.C., 1997).

L'interférence à l'ARN débute lorsqu'un double brin d'ARN se retrouve dans le cytoplasme d'une cellule. À ce moment, la ribonucléoprotéine DICER reconnaîtra le double brin et s'associera à l'ARN sous forme d'homodimère. Une fois positionné sur le brin d'ARN, il aura clivage à deux sites différents relâchant un duplexe ayant entre 19 et 21 nucléotides. Ces duplexes possèdent des extrémités non appariées à cause du positionnement des sites de clivage sur l'homodimère. Ce produit pourra par la suite s'associer avec le complexe protéique RISC (RNA induced silencing complex). L'ARN sera ensuite séparé en deux fragments simple brin par une hélicase qui est associée au complexe protéique. L'un des fragments sera libéré dans le cytoplasme tandis que le second brin restera associé au complexe. Le choix du brin qui restera associé au complexe est décidé par la stabilité des extrémités de l'ARN double brin (SCHWARZ et al, 2003). Le brin qui sera relâché dans le cytoplasme est rapidement dégradé par les exonucléases cellulaires, tandis que le second brin restera associé au complexe protéique. Sous cette forme, le complexe pourra reconnaître l'ARN cible et le cliver. Pour cliver l'ARN cible, il faut que l'appariement entre les deux brins soit parfait. La présence d'un nucléotide non apparié inhibe l'activité catalytique du complexe RISC. Par contre, ce

phénomène pourrait provoquer une diminution des niveaux d'expression par le blocage de la traduction. Ce processus est produit par les microARN qui sont des éléments régulateurs produits par les cellules qui permettent de moduler les niveaux d'expression de plusieurs protéines. Ce sont des duplexes d'ARN avec une forme tige-boucle-tige possédant des nucléotides non appariés (TOMARI et ZAMORE, 2005).

Dans certains cas, l'ajout d'un fragment double brin dans la cellule peut aussi activer des voies de protections. La voie de l'interféron gamma est généralement activée lors d'une infection par un virus à ARN. La protéine effectrice de cette voie, PKR, peut lier des molécules d'ARN double brin à partir d'un domaine dsRBD (HITTI *et al*, 2004). Lorsqu'il y a formation d'un dimère sur l'ARN, PKR peut s'autophosphoryler. À ce moment, PKR peut phosphoryler d'autres protéines comme IKK β qui pourra par la suite phosphoryler la protéine NF- κ B et permettre l'activation de différentes voies de signalisation. L'apoptose et la prolifération cellulaire sont des voies qui peuvent être activées. De plus, la phosphorylation de PKR peut amener à la phosphorylation du facteur de transcription EIF2 α ce qui bloquera la traduction.

Pour pouvoir cibler CA125, plusieurs portions de l'ADN complémentaire à partir de différents programmes offerts sur internet ont été analysées. Finalement, nous avons sélectionné un site dans la portion N-Terminale de CA125 et un autre site dans la région encodant pour les répétitions. Ce second choix a été fait en fonction des multiples répétitions et de leur forte homologie.

Il existe différentes manières pour utiliser les siRNA. Ils peuvent être produit sous la forme de courts duplexes d'ARN qui pourront être transfectés de façon transitoire dans les cellules d'intérêt. Le désavantage de cette approche, c'est que nous perdons l'efficacité dans le temps. Par contre, il s'agit d'une manière rapide pour valider des séquences pouvant produire de l'interférence à l'ARN. Pour pouvoir faire des études à long terme, la méthode doit être modifiée. Maintenant, il est possible de fabriquer des shRNA qui sont des courts duplexes possédant une extrémité en forme de boucle. Cette forme de siRNA peut être utilisée pour la formation de lignée cellulaire à expression stable. Pour permettre une bonne expression de ces transcrits dans les cellules, nous devons utiliser des promoteurs spécifiques. Les promoteurs utilisés sont U6 (MIYAGISHI *et al.*, 2002) et H1 (BRUMMELKAMP *et al.*, 2002) qui sont des régions reconnues par la polymérase III qui sert dans la transcription des petits ARN. De plus, il est maintenant possible d'avoir des plasmides qui permettent d'avoir une expression inductible de ces shRNA. Ce système permet de comparer les cellules en présence et en absence de la protéine d'intérêt.

1.4 Objectif du projet

La majorité des cancers ovariens épithéliaux expriment et sécrètent dans le milieu extracellulaire l'antigène tumoral CA125. Cette mucine fait partie d'une famille comprenant plusieurs membres dont plusieurs ont une implication directe avec des processus métastatiques comme MUC1 et MUC4. Étant donné qu'il y a peu d'information connue sur les fonctions possibles de la protéine CA125 dans la littérature, on s'est intéressés à la possibilité que CA125 pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans la cascade

métastatique. Parmi les nombreuses composantes de la cascade métastatique, nous nous sommes concentré sur la migration des cellules et sur leur capacité à pouvoir digérer la matrice extracellulaire.

Pour pouvoir approcher ce problème, deux clones ont été produits à partir de la lignée parentale NIH:OVCAR 3. Ces clones expriment un scFv qui est retenu dans le réticulum endoplasmique (ER) ciblant un épitope de CA125. Le scFv peut séquestrer CA125 au ER et empêcher sa localisation naturelle à la membrane cellulaire. L'un des clones utilisés avait déjà été caractérisé dans le laboratoire. Finalement, nous avons aussi mis au point un nouvel outil pour induire une diminution des niveaux de CA125 par interférence à l'ARN soit le siRNA.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2 Culture cellulaire et transfection cellulaire

Les différentes lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C et en présence de 5% CO₂. Pour la lignée NIH:OVCAR 3 et les clones dérivés stables de cette lignée, du RPMI 1640 (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada) contenant 20% de FBS (BioMedia, Drummondville, Québec, Canada), un mélange d'antibiotique (100 U de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine), 1,6mM de L-glutamine, 2µg/mL d'Amphotericin B et de 10µg/mL d'insuline (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) a été utilisé. Les lignées cellulaires SKOV3 et SKOV3 pLTRFLR14303 #1 ont été cultivées dans du DMEM/F12 (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada) avec 10% FBS, les antibiotiques et la glutamine. Tous les clones stables ont été maintenus en présence de 1µg/mL de blasticidine (Calbiochem, Mississauga, Ontario) et de 10µg/mL de doxycycline (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). La doxycycline a été ajoutée 48 hrs avant chaque expérience pour s'assurer de la production maximale des scFv dans les clones.

Les cellules ont été décollées à l'aide de trypsine diluée (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada), dénombrées etensemencées. Les quantités de cellulesensemencées dépendaient des lignées cellulaires utilisées (voir tableau 3). La méthodologie pour la transfection variait selon les types cellulaires (voir tableau 3).

Tableau 3 : Conditions expérimentales utilisées pour transfecter les différentes lignées cellulaires.

Types cellulaires	Ensemencement des cellules	Quantité de cellules ensemencées
NIH:OVCA 3	Suspension	300 000 cellules
CaOV 3	Adhérée	120 000 cellules
OVCA 433	Suspension	150 000 cellules

En suspension, les cellules ont été ensemencées dans 1,8mL de milieu sans antibiotique. La préparation des siRNA (IDT, Coralville, IA) s'effectue de manière à avoir une concentration finale de 50nM. Pour une réaction, 4 μ L d'Oligofectamine (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada) a été mélangé à 11 μ L d'OPTI-MEM (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada). Le mélange a été incubé 10 minutes à température de la pièce pendant ce temps, 5 μ L de siRNA a été mélangé à 175 μ L d'OPTI-MEM. L'Oligofectamine est ajouté au siRNA et incubé pendant 20 minutes. Le 200 μ L a finalement été ajouté aux cellules. Les cellules ont été incubées pendant 96 heures et utilisées pour différentes expériences dont les buvardages par point de type Northern et les essais de cytométrie de flux.

En adhésion, la quantité appropriée de cellules a été ensemencée la journée avant la transfection dans du milieu sans antibiotique pour avoir 30 à 50% de confluence le jour de la transfection. La préparation des siRNA s'est effectuée de manière à avoir une concentration finale de 50nM. Pour une réaction, 4 μ L d'Oligofectamine a été mélangé à 11 μ L d'OPTI-MEM. Le mélange a été incubé 10 minutes à température de la pièce. Pendant ce temps, 5 μ L de siRNA a été mélangé à 175 μ L d'OPTI-MEM. Ensuite, l'Oligofectamine a été ajouté au siRNA et incubé pendant 20 minutes. Le milieu de

culture des cellules a été changé avant d'ajouter le mélange contenant le transfectant et les siRNA. Les réactifs de transfection ont été ajoutés aux cellules et 4 heures post-transfections, 1mL de milieu contenant 30% de FBS est ajouté pour obtenir une concentration de FBS finale de 10%. Les cellules ont été incubées pendant 96 heures et utilisées dans les différents essais.

2.1 Production d'une sonde par random priming

Deux manières ont été utilisées pour obtenir l'ADN nécessaire à la formation de la sonde: soit par une digestion enzymatique pour sortir un fragment d'intérêt ou par une amplification PCR. Les deux méthodes ont été suivies par une extraction sur gel d'agarose. L'électrophorèse a été effectuée sur un gel contenant 0,6% d'agarose pendant 30 minutes à 120 volts constant et les bandes d'intérêt ont été extraites et dosées par spectrophotométrie. Cinquante nanogramme de cette ADN a servi à produire la sonde par l'incorporation de dCTP radiomarqués (Mandel, Saint-Laurent, Québec). L'ADN a été dénaturé à 95°C pendant 5 minutes et transféré sur la glace pour 5 minutes. Le volume d'ADN a été complété à 46µL et utilisé pour resuspendre la bille contenant les réactifs nécessaires à la réaction d'incorporation provenant du kit Ready-to-go DNA labelling Bead (-dCTP) (Amershan Bioscience, Baie d'Urfe, Québec). 4µL de dCTP radiomarqué a été ajouté à l'ADN et incubé à 37°C pendant 15 minutes. La sonde radiomarquée a été purifiée sur une colonne sépharose G-50 (Amershan Bioscience, Baie d'Urfe, Québec). La solution a été centrifugée pendant 2 minutes à 2700 RPM puis l'efficacité

d'incorporation a été ensuite évalué par un compteur à scintillation (PerkinElmer, Wellesley, MA).

2.1.1 Digestion enzymatique

Le fragment antisens de FLJ14303 a été cloné dans les sites NotI et BglII dans le vecteur pAdtrack-CMV. Les conditions suivantes ont été utilisées pour digérer et extraire le fragment. Pour 5µg d'ADN de pAdtrack-CMV antisens, 5µL de tampon NEB 10X #2, 5µL de BSA 10X fourni avec l'enzyme et 10U de chaque enzyme approprié (NotI et BglII) ont été ajoutés. Le volume a été complété à 50µL avec de l'eau et la réaction a été incubée à 37°C pendant une heure. La réaction de digestion a été déposée sur un gel et extraite comme discuté précédemment. L'ADN a été purifié à l'aide du kit d'extraction sur gel (QIAGEN, Mississauga, On, Ca) selon les recommandations du manufacturier.

2.1.2 Extraction d'ARN

Les cellules ont été cultivées jusqu'à l'obtention de la confluence. Elles ont été lavées avec du PBS 1X puis 1mL de Trizol (Invitrogen Life Technology, Burlington, Ontario, Canada) a été ajouté. Les cellules ont été récoltées et mélangées avant d'être transférées dans un tube de 1,5mL ARNase Free. Le mélange a été incubé 5 minutes à température pièce. 200µL de chloroforme a été rajouté à chaque tube, agité puis incubé 10 minutes à température pièce. Le mélange a été centrifugé 15 minutes (à 4°C) à 13000 RPM puis la phase supérieure contenant l'ARN a été transférée dans un tube ARNase

Free. 500 μ L de chloroforme a été ajouté, agité puis centrifugé quelques secondes. La phase supérieure a été transférée dans un tube puis 500 μ L d'isopropanol a été ajouté. La solution a été mélangée puis incubée 10 minutes à température pièce. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes (à 4°C) à 13000RPM. Le surnageant a été enlevé et le culot a été lavé avec 900 μ L d'éthanol 75%. Les tubes ont été centrifugés pendant 5 minutes (à 4°C) à 13000RPM. L'éthanol 75% a été enlevé puis les culots ont été séchés à l'air. Le culot a été finalement dissout dans 30 μ L d'eau ARNase Free et chauffé à 55°C pendant 10 minutes.

2.1.3 Production d'ADN complémentaire

L'ARN a été d'abord dosé et vérifié sur gel pour s'assurer de sa qualité par les ARN ribosomaux. Les échantillons ont été dilués à une concentration de 2 μ g/ μ L. Deux microgrammes d'ARN a été déposés dans un tube à PCR ARNase Free puis 0,5 μ g d'amorces dégénérées (Roche, Laval, Québec) par μ g d'ARN a été ajouté. Le volume a été complété à 12 μ L avec de l'eau ARNase free. Le mélange a été incubé à 94°C pendant 5 minutes puis placé sur glace durant 5 minutes. Les composantes suivantes ont été rajouté à l'ARN soit 1 μ L d'inhibiteur de RNase à 40U/ μ L (BioCan, Mississauga, On, Ca), 2 μ L de transcriptase inverse AMV à 10U/ μ L (BioCan, Mississauga, On, Ca), 1 μ L de dNTPs à 20mM et 4 μ L du tampon pour transcriptase inverse 5X. Le mélange a été incubé pendant 1 heure à 42°C.

2.1.4 Réaction de PCR

La β -actine a été amplifiée à partir des amorces 5'- GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG et 3'- GAG AAG GTC GGA AGG AAG GA. 10% de l'ADN complémentaire produit précédemment par transcriptase inverse a été utilisé. À l'ADN, 2,5% de DMSO, 200nM finale de dNTPs, 1 μ M de chacune des amorces et 5 μ L de tampon 10X pour TAQ polymérase a été ajouté. Le volume est complété à 49,5 μ L avec de l'eau. Le programme utilisé comprend une étape de dénaturation de 4 minutes à 94°. Après ce cycle, 2,5U de TAQ polymérase (produit par Catherine Desrosier) a été ajouté. Le programme utilisé consistait à : 1 minute à 94°C, 1 minute à 55°C et 2 minutes à 72°C. Ces trois étapes ont été répétées 30 fois et après le trentième cycle, le mélange a été incubé 15 minutes à 72°C. Dix pourcents de la réaction PCR a été soumise à une électrophorèse de 30 minutes à 120 volts sur un gel d'agarose 0,6% avec 0,01% de bromure d'éthidium pour vérifier l'efficacité du PCR. Le fragment de β -actine de 144pb a été découpé et extrait selon la méthode expliquée précédemment (section 2.1.1).

2.1.5 PCR en temps réel

La proMMP-2 a été amplifiée à partir des amorces 5'-CGGAGTCAACGGATTT GGTCGTAT et 3'- AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC tandis que la MT1-MMP a été amplifiée à partir des amorces 5'-CGCTACGCCATCCAGGGTCTAAAA et 3'-CGG TCATCATCGGGCAGCACAAAA. Dix pourcents de l'ADN complémentaire produit précédemment a été utilisé avec des réactifs du kit Quantitect™ SYBR® Green PCR Kit

(Roche Applied Science, Laval, Québec). Le programme utilisé pour les deux gènes comprend une étape de dénaturation de 1 minute à 94°C, 1 minute d'appariement à 62°C et 60°C, respectivement et 2 minutes à 72°C. Ces trois étapes seront répétées 30 fois. Après les 30 cycles, le mélange a été incubé pendant 15 minutes à 72°C. Les PCR ont été effectués avec un LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Laval, Québec) et les valeurs ont été analysées à partir du logiciel LightCycler® Software 4.0.0.23 (Roche Applied Science, Laval, Québec). Pour contrôler les quantités d'ARN utilisées, un contrôle interne GAPDH a été inclus à l'expérience. Le contrôle a été amplifié avec les amorces 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT et 3'-AGCCTTCTCCATGGTCCTGAAGAC suivantes. Les paramètres du programme étaient identiques à ceux utilisés pour amplifier la proMMP-2.

2.2 Northern slot blot

L'ARN a initialement été dosé et vérifié sur gel 0,8%. Après la vérification de l'état de l'ARN sur gel, l'appareil est assemblé avec une membrane de 11cm X 7cm préalablement trempée dans du SSPE 20X (1,8M de NaCl, 190mM de NaH₂PO₄, 10mM d'EDTA). 500µL de SSPE 20X a été ajouté dans chacun des puits avant d'ajouter l'ARN. Après avoir aspiré le SSPE 20X, 5µg d'ARN a été déposé dans les puits de l'appareil. Une fois que le liquide a été complètement aspiré, la membrane a été retirée et "cross-linkée" dans un strata Linker (Stratagen, Kirkland, WA) pendant 4 minutes.

Pour l'hybridation avec nos deux différentes sondes soit: la sonde FLJ14303 et la sonde contre la β -actine, la membrane a été placée dans un tube d'hybridation en présence de la solution de pré-hybridation (SET 1X, DenHart 10X, 250ng/ μ L d'ADN de sperme de hareng bouilli et 0,1% de SDS). Le tube a été incubé sous rotation dans un four à 68°C pendant 2 heures puis 1×10^7 CPM de la sonde radiomarquée appropriée a été ajouté à la membrane. L'incubation avec la sonde s'est faite à 68°C durant environ 16 heures. La membrane a été ensuite lavée 6 fois avec du SET 4X contenant 0,5% de SDS. La membrane a été exposée dans une cassette contenant un écran de phosphore durant 48 heures. La cassette a été scannée par un STORM (Amershan Bioscience, Baie d'Urfe, Québec) et les bandes ont été analysées à l'aide du logiciel ImageQuant 5.0 (Amershan Bioscience, Baie d'Urfe, Québec).

2.3 Cytométrie de flux

Les cellules ont été cultivées jusqu'à l'obtention de la confluence. Les cellules ont été lavées à 2 reprises avec du PBS stérile et détachées avec 2 mL de PBS contenant 0,53mM d'EDTA, de la versène (Wisent, Saint-Bruno, Québec, Canada). Les cellules ont été récoltées et culottées à 1000 RPM pendant 5 minutes. Elles ont été par la suite fixées pendant 20 minutes à température pièce en présence de 250 μ L de paraformaldéhyde 2% dissout dans du PBS. 500 μ L d'anticorps primaire dilué dans du PBS/BSA 2% (dilution 1:500 pour l'anticorps anti-CA125 M11 (Dako, Carpinteria, CA) et 1:1000 pour l'anticorps anti-CD44 clone F 10-44-2 (Abcam, Cambridge, MA)) et a été ajouté dans chacun des tubes et incubé 45 minutes à température pièce. Les cellules ont été

centrifugées à 8500 RPM pendant 2 minutes puis les culots cellulaires ont été resuspendus avec 500µL de PBS. Les cellules ont été centrifugées à 8500 RPM pendant 2 minutes. Le surnageant a été retiré et 500µL d'anticorps secondaire anti-souris couplé au PE (R-Phycoérythrine) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) dilué dans du PBS/BSA 2% a été ajouté dans chacun des tubes et incubé 45 minutes à température pièce. Les cellules ont été centrifugées à 8500 RPM pendant 2 minutes. Le surnageant a été retiré et le culot a été resuspendu avec 500µL de PBS. Les cellules ont été centrifugées à 8500 RPM pendant 2 minutes puis le surnageant a été retiré. Finalement, les culots ont été resuspendu dans 400µL de PBS. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un FACS Scan Cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, ON).

2.4 Zymographie

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 80 à 100%, le milieu a été changé pour du milieu Clonetic (Cedarlane(cambrex), Hornby, Ontario, Canada) sans FBS et complémenté avec du MEGM single Quots sans insuline (Cedarlane(cambrex), Hornby, Ontario, Canada). Le milieu conditionné a été récolté après 48 heures, centrifugé pendant 5 minutes à 1000 RPM et transféré dans un autre tube pour l'utilisation dans les essais de zymographie.

Le gel natif utilisé pour faire un zymographe a été produit à partir d'espaceur de 0,75mm et le gel séparateur était composé de 375mM Tris-HCl pH8,8, 12% acrylamide 19:1 40% et 2µg/mL de gélatine. Le gel concentrateur était composé de 330mM Tris-HCl

pH6,8 et 4% d'acrylamide 19:1 40%. Le gel a été polymérisé à l'aide de 0,4% d'APS et 0,05% de TEMED. Avant l'électrophorèse, le gel a subi une électrophorèse préliminaire de 15 minutes à 150 volts pour uniformiser la gélatine dans le gel. Les échantillons ont été dilués dans un tampon de chargement sans β -mercaptoéthanol (20% glycérol, 0,0004% de bleu de bromopnéol) et la même quantité de protéines a été chargée dans chaque piste. De la proMMP-2 purifié (Chemicon International, Temecula, CA) a été utilisé comme contrôle interne de même que de la proMMP-2 activé pendant 2 heures à 37°C avec 10mM d'APMA (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) dilué dans 0,1N de NaOH. L'électrophorèse des milieux conditionnés a été effectuée à 4°C pendant 3 heures. Les protéines ont été renaturées avec 2,5% de Triton X-100 pendant 30 minutes. La solution de Triton 2,5% a ensuite été remplacée par du tampon d'activation (50mM de Tris pH 7,6, 0,2M de NaCl, 5mM de CaCl₂, 0,02% Brij35) et le gel a été incubé 30 minutes à la température de la pièce. Le tampon d'activation a été remplacé par du tampon frais et le gel a été incubé à 37°C sous agitation pendant environ 16 heures. Par la suite, le tampon d'activation a été finalement retiré et le gel a été coloré avec 0,1% de bleu de Coomassie R-250 (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) (dilué dans 40% méthanol, 10% acide acétique). Le gel a été incubé 30 minutes à température pièce puis décoloré avec une solution contenant 40% de méthanol et 10% d'acide acétique jusqu'à l'obtention d'un contraste satisfaisant.

2.4.1 Zymographie inverse

Le gel natif a été produit à partir d'espaceur de 0,75mm et le gel séparateur était composé de 375mM Tris-HCl pH8,8, 12% acrylamide 19:1 40%, 2µg/mL de gélatine et 160ng/mL de proMMP-2 alors que le gel concentrateur du gel était composé de 330mM Tris-HCl pH6,8 et 4% d'acrylamide 19:1 40%. Le gel a été polymérisé à l'aide de 0,4% APS et 0,05% de TEMED. Avant l'électrophorèse, le gel avait subi une électrophorèse préliminaire de 15 minutes à 150 volts pour uniformiser la gélatine dans le gel. Les échantillons ont été dilués dans un tampon de chargement sans β -mercaptoéthanol et la même quantité de protéines a été chargée dans chaque piste. La TIMP-2 (Calbiochem, Mississauga, Ontario) a été utilisé comme contrôle interne dans ce gel. L'électrophorèse des milieux conditionnés a été effectuée à 4°C pendant 1 heure. Les protéines ont été renaturées avec 2,5% de Triton X-100 pendant 3 heures. La solution de Triton 2,5% a ensuite été remplacée par du tampon d'activation et le gel a été incubé 30 minutes à la température de la pièce. Le tampon d'activation a été remplacé par du tampon frais et le gel a été incubé à 37°C sous agitation pendant environ 16 heures. Par la suite, le tampon d'activation a été finalement retiré et le gel a été coloré avec 0,1% de bleu de Coomassie R-250 (dilué dans 40% méthanol, 10% acide acétique). Le gel a été incubé 30 minutes à température pièce puis décoloré avec une solution contenant 40% de méthanol et 10% d'acide acétique jusqu'à l'obtention d'un contraste satisfaisant.

2.5 Essai de clonogénécité sur plastique

Après avoir décollé les cellules, 100, 200, 300, 400, 500 et 1000 cellules ont été ensemencées dans une plaque 6 puits et incubé pendant 14 jours à 37°C. Les colonies formées ont été lavées à 2 reprises avec du PBS et fixées pendant 10 minutes avec 1 mL de buffered formalde fresh (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). Les colonies ont été par la suite lavées avec du PBS et colorées pendant 15 minutes avec une solution de cristal violet 1% dilué dans de l'éthanol 70% (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Les puits ont été lavés à l'eau courante pour enlever le maximum de colorant dans les puits. Les plaques ont été séchées à l'air libre pendant environ 16 heures. Le nombre de colonies a été évalué à l'aide d'un microscope à contraste de phase.

2.6 Préparation de plaques recouvertes de Matrigel

Les plaques ont été produites la journée même de l'expérience. Tout d'abord, le Matrigel (Becton Dickinson, Mississauga, ON) a été décongelé sur glace puis il a été dilué 1:2 avec du milieu de culture froid. Le mélange a été déposé dans un puits de plaque 6 puits et étendu à l'aide d'un embout de 1000µL stérile. Les bulles qui se sont formées sont crevées à l'aide d'une aiguille. La plaque a été ensuite incubée à 37°C pendant une heure. Les cellules ont été décollées à l'aide de la versène, récoltées et dénombrées manuellement. Ensuite, 1 million de cellules a été ensemencés pour les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 tandis que 2 millions de cellules NIH:OVCAR 3 et KDEL 4:5 #12 ont été ensemencés comme contrôles sur le Matrigel. Après 24 heures, les

photos ont été prises à un grossissement de 10X à l'aide d'un microscope à contraste de phase et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500.

2.7 Essai de migration cellulaire par blessure sur monocouche

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits et laissé croître jusqu'à l'obtention de la confluence puis une marque cruciforme a été générée à l'aide d'un embout de 10 μ L stérile. La monocouche est lavée puis du milieu frais a été rajouté dans chacun des puits délicatement pour ne pas endommager la monocouche cellulaire. Pour bloquer la prolifération cellulaire, 20 μ M d'hydroxyurée (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) a été ajouté au milieu. À différent temps, des photos ont été prises à un grossissement de 10X à l'aide d'un microscope à contraste de phase et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500.

2.8 Essai de migration à l'aide des chambres de Boyden, blocage de CD44 et invasion

Les cellules ont été décollées à l'aide de versène, récoltées et dénombrées manuellement à l'aide d'un hémacimètre. Les chambres de Boyden (Becton Dickinson, Mississauga, ON) ou les chambre d'invasion (Becton Dickinson, Mississauga, ON) ont été déposées dans une plaque 24 puits et différentes quantités de cellules ont été déposées selon l'expérience. Pour l'essai de migration, 20000 et 40000 cellules ont étéensemencées dans les puits. Pour l'essai d'invasion, 40000 cellules ont étéensemencées

dans chacune des chambres. Pour le blocage de CD44, 20000 cellules ont été ensemencées dans les chambres de Boyden et des quantités croissantes de 0 à 2µg d'anticorps bloquant anti-CD44, clone KM 201, ont été utilisées. Les chambres ont été incubées à 37°C pendant 16, 24 ou 48 heures.

Suites aux différentes incubations, les cellules à l'intérieur des chambres ont été enlevées à l'aide d'un coton tige et les cellules à l'extérieur de la chambre ont été fixées avec de l'éthanol 70% pendant 2 minutes. Les cellules ont été ensuite lavées dans du PBS et colorées avec du cristal violet 0,5% filtré. Les cellules ont été par la suite lavées à plusieurs reprises dans du PBS pour enlever le maximum de colorant. Les membranes poreuses ont été découpées avec une lame de rasoir et conservées entre une lame et une lamelle. Les photos ont été prises à un grossissement de 10X à l'aide d'un microscope à contraste de phase et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500. La quantité de cellules a été dénombrée à l'aide d'un microscope à contraste de phase à un grossissement de 10X.

2.9 Essai de prolifération par XTT

2500 cellules des lignées étudiées ont été ensemencées dans 200 µl de RPMI 1640 avec ou sans doxycycline (1 µg/ml) dans plusieurs plaques 96 puits (une plaque pour chaque temps d'incubation). Les plaques ont été incubées à 37°C et les essais de viabilité ont été effectués à différents temps soit 24, 48, 72, 124, 144 et 172 heures en utilisant la méthode XTT (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). L'essai XTT doit être effectué à la

noirceur. 10 mg de XTT a été dissous dans 10 ml de PBS et incubé pendant 30 min à 60°C. À 10 ml de milieu DMEM/F-12 sans rouge de phénol (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), la solution de XTT/PBS chauffée et filtrée a été ajoutée avec 15 µl de PMS (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). Ensuite, après avoir aspiré le milieu, 100 µl du mélange a été ajouté dans chaque puits d'une plaque 96 puits. La plaque a été incubée pendant 30 min à la température ambiante pour ensuite détecter la DO à 450nm avec un lecteur de plaque ELISA *Sunrise* (TECAN U.S. Inc., Research Triangle Park, NC).

RÉSULTATS

3.1 Évaluation des niveaux d'expression de CA125 dans les clones stables

Avant d'utiliser le nouveau clone, nous devons être sur que les niveaux d'expression de CA125 à la surface des cellules étaient diminués à l'aide du scFv. Il ne faut pas oublier que notre scFv est ciblé et séquestré au reticulum endoplasmique dans le but d'y retenir CA125 et l'empêcher d'être exprimé à la membrane cytoplasmique. Dans le laboratoire, le clone KDEL 1:9 #9 avait déjà été caractérisé mais le clone KDEL 1:9 #7 n'avait pas encore été validé. Ces deux clones ont été générés à partir de la lignée parentale NIH:OVCAR 3 qui est une lignée de cancer ovarien humaine. Les cellules ont été isolées à partir de l'ascite d'une patiente ayant un cancer ovarien avancé. Comme les immunobuvardages de type western ne sont pas toujours fiables à cause du poids moléculaire de CA125, les niveaux d'expression de CA125 à la membrane cellulaire ont été mesurés par une analyse de cytométrie de flux sur des cellules qui n'ont pas été perméabilisées. En analysant la figure 4, on peut fixer la quantité de CA125 chez la lignée parentale NIH:OVCAR 3 à environ 1000 unités de fluorescence. Cette expérience a été reproduite plusieurs fois sur cette lignée cellulaire et l'intensité en fluorescence variait très peu d'une expérience à l'autre. Ensuite, l'intensité de fluorescence obtenue pour le clone KDEL 4:5 #12 était autour de 400 unités tandis que des intensités plus faibles de 50 et 2 unités furent obtenues pour les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 respectivement. Ces résultats sont en partie similaires avec ce qui avait déjà été obtenu dans notre laboratoire pour le clone KDEL 4:5 #12 et pour le clone KDEL 1:9 #9. Nous

avons maintenant montré que le clone KDEL 1:9 #7 exprimait faiblement le CA125 à sa surface. De plus, cette diminution était plus importante que chez le clone KDEL 1:9 #9. Le clone KDEL 4:5 #12 a été utilisé comme contrôle car il exprime aussi un scFv qui est séquestré dans le réticulum endoplasmique mais qui ne peut pas lier la protéine CA125. Ces résultats ont été effectués sur des cellules induites à la doxycycline depuis 48hrs pour permettre l'expression maximale du scFv et de pouvoir comparer chacun des clones. De plus, la présence d'un seul pic sur les graphes indique que les populations cellulaires sont homogènes et clonales.

3.2 Évaluation des niveaux sécrétés de CA125 dans les milieux conditionnés

CA125 peut se retrouver aussi dans le milieu extracellulaire par une voie encore inconnue. Par contre, notre laboratoire croit que le domaine extracellulaire serait clivé à la surface des cellules. La forme soluble peut donc provenir de la protéine membranaire mais elle pourrait aussi être traduite sans domaine transmembranaire par un transcript alternatif de CA125 possédant quand même les nombreuses répétitions en tandem. Étant donné que les deux formes doivent passer par le réticulum endoplasmique et qu'elles possèdent les épitopes reconnus par le scFv, il fallait vérifier si le scFv pouvait aussi affecter cette forme soluble et diminuer ces niveaux dans le milieu extracellulaire. Pour ce faire, la quantité de CA125 dans les milieux conditionnés des différents clones a été quantifiée par le laboratoire de biochimie clinique du CHUS. Le dosage des échantillons est effectué par un essai ELISA de type sandwich automatisé. Les deux anticorps utilisés pour l'essai sont M11 et OC125. La quantité de CA125 obtenue pour chaque lignée est

rationalisée par rapport au volume et au nombre de cellules puis comparé l'une avec l'autre sur l'histogramme représenté à la figure 5. Les niveaux de CA125 sécrétés obtenus par dosage du CA125 extracellulaire indiquent que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 sécrètent beaucoup moins de CA125, soit 5,65 et 1,70 unité/mL/million de cellules, respectivement; alors que les niveaux de sécrétion de CA125 chez la lignée parentale et le clone KDEL 4:5 #12 sont de 96,85 et 65,26 unité/mL/million de cellules, respectivement. L'analyse par cytométrie de flux et le dosage des milieux conditionnés assurent que le scFv est fonctionnel et qu'il affecte autant la forme membranaire que la forme soluble de CA125.

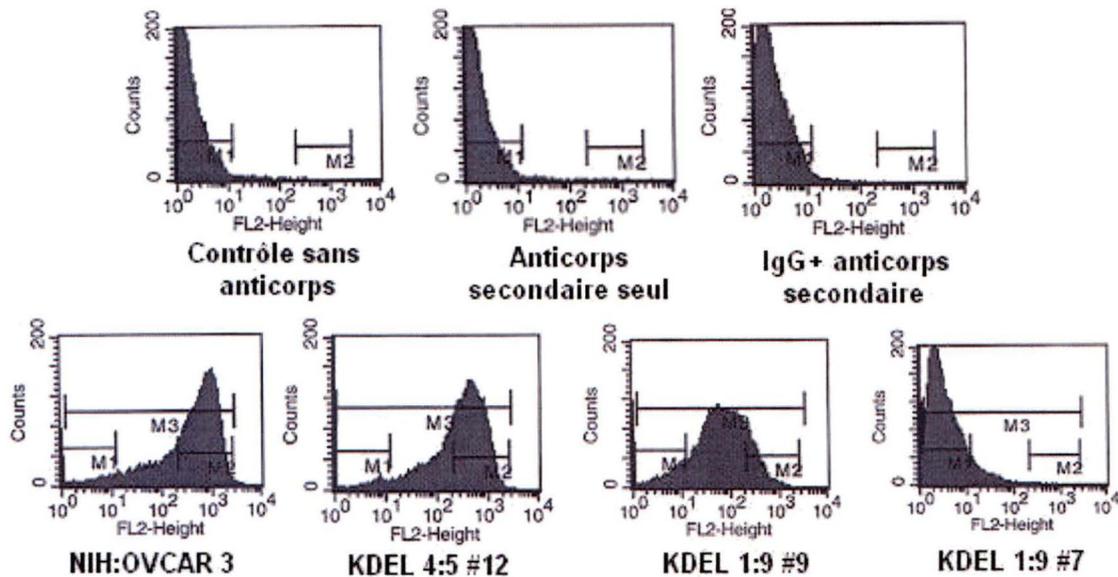


Figure 4. Évaluation des niveaux d'expression de CA125 à la membrane cellulaire des différents clones par une analyse de cytométrie de flux. Les cellules ont été décollées en présence de versène (0,53mM d'EDTA) et fixées avec du formaldéhyde 2%. L'expression de CA125 a été détectée avec l'anticorps anti-CA125 M11 diluée 1:500 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au PE 1:1000. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un FACS scan et du programme Cell quest.

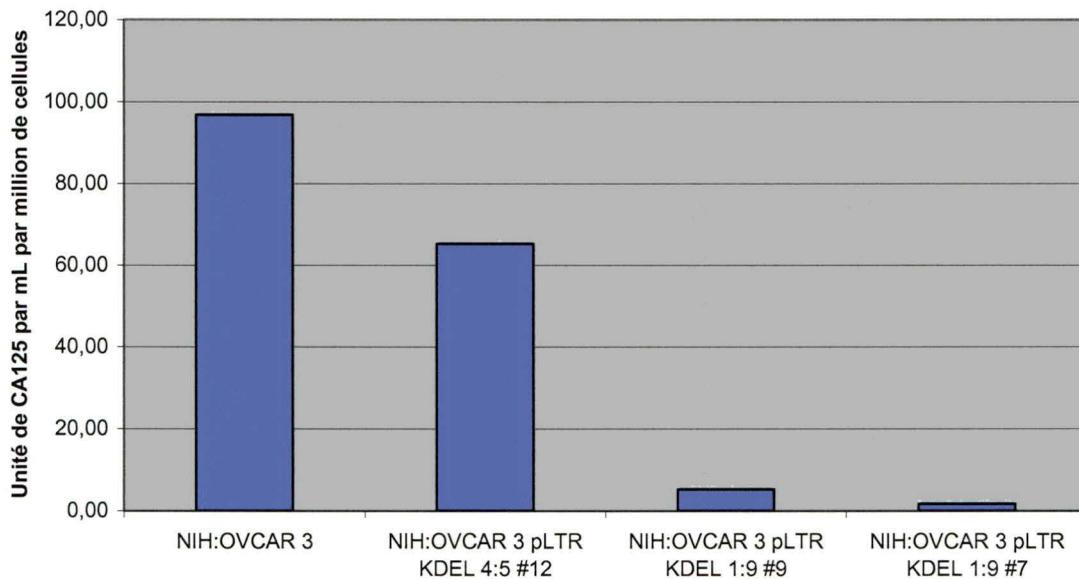


Figure 5. Dosage du CA125 soluble dans les milieux conditionnés des différents clones cellulaires. Après une incubation de 48 heures, les milieux conditionnés ont été récoltés, centrifugés, transférés et 500 μ L a été envoyé au laboratoire de biochimie clinique pour doser les niveaux de CA125 par un essai ELISA automatisé (ADVIA Centaur).

3.3 Comparaison des profils de croissance des différents clones

Pour pouvoir comparer les deux clones, nous devons être sûr qu'il avait un comportement similaire dû à la diminution de CA125. Pour faire cette vérification, certaines expériences qui avaient déjà été effectuées ont été refaite mais, en y incluant le clone KDEL 1:9 #7. Ces essais comprenaient la prolifération cellulaire par XTT et un essai de clonogénéicité sur plastique.

L'essai de prolifération par XTT avait déjà été effectué pour le clone KDEL 1:9 #9 dans le laboratoire du Dr. Claudine Rancourt. À ce moment, il avait été observé que ce clone semblait avoir un plus grand potentiel prolifératif comparé à la lignée parentale NIH:OVCAR 3. Cet essai nous informe indirectement sur la prolifération des cellules en regardant l'activité métabolique des cellules. Pourtant, c'est un essai qui est reconnu dans la littérature pour évaluer la prolifération cellulaire. Les expériences ont donc été refaites en y incluant le clone KDEL 1:9 #7 et les courbes représentées dans le graphique de la figure 6 ont été obtenues. Ce que nous pouvons observer, c'est que les courbes de prolifération du clone KDEL 1:9 #9 (noir) et du clone KDEL 1:9 #7 (rouge) atteignent plus rapidement la confluence représenté par l'obtention d'un plateau que la lignée parentale (bleu) et que le clone KDEL 4:5 #12 (rose). Les cellules qui produisent un plateau sont en phase stationnaire et elles ne prolifèrent plus. L'arrêt de croissance observé chez les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 pourrait être expliqué par la taille des cellules et leur incapacité à se compacter. Finalement, en regardant la portion exponentielle des courbes, on constate que la lignée parentale, le clone KDEL 4:5 #12 et le clone KDEL 1:9 #9 auraient une prolifération cellulaire similaire tandis que le clone KDEL 1:9 #7 semble se diviser moins rapidement que les autres. Ces résultats suggèrent donc que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 ont un temps de génération (temps qu'il faut pour que la population cellulaire puisse doubler) similaire aux lignées contrôles NIH:OVCAR 3 et KDEL 4:5 #12 mais que ces clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 atteignent plus rapidement la confluence.

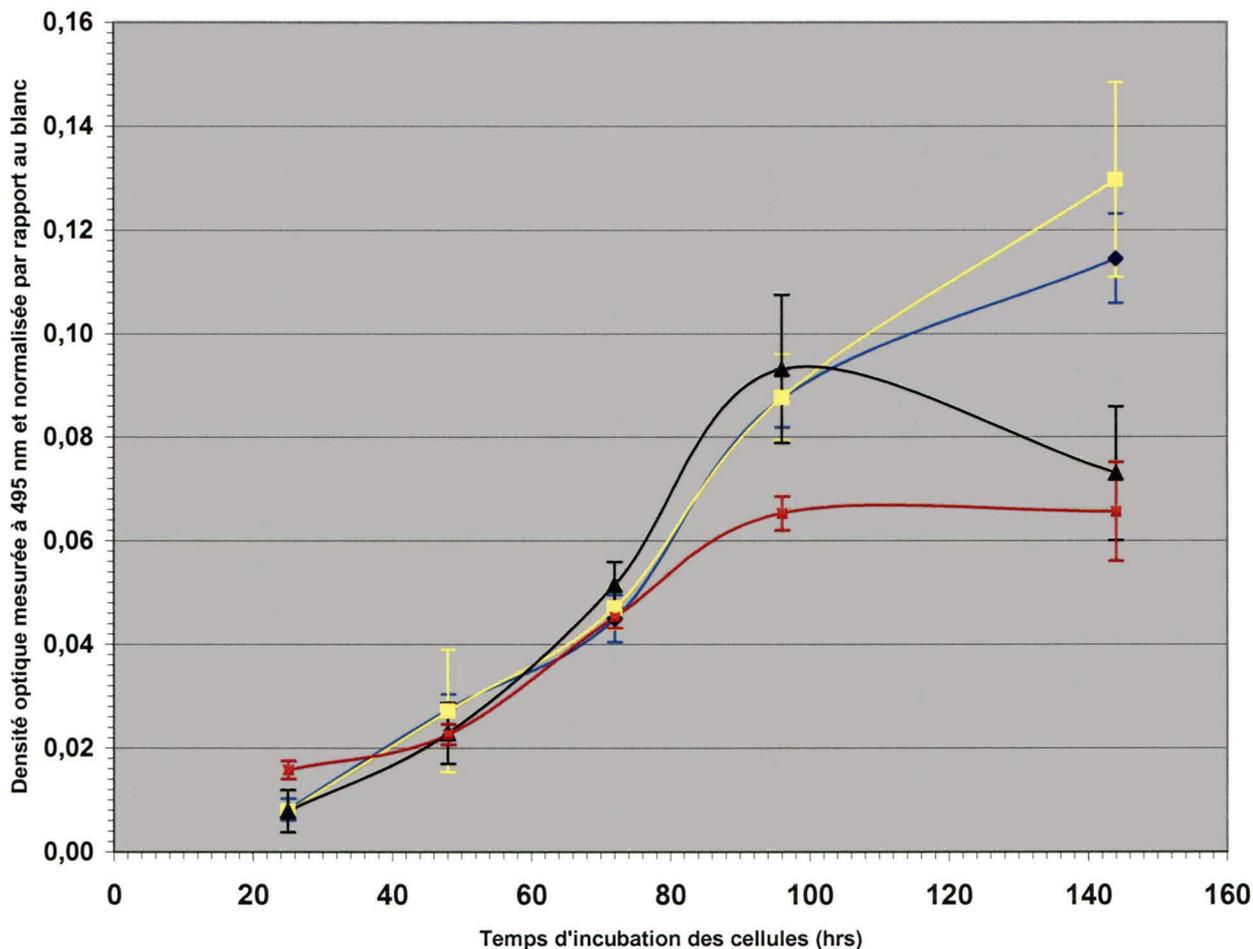


Figure 6 : Courbe de prolifération cellulaire des clones dérivés de la lignée parentale NIH:OVCAR 3. La lignée parentale (bleu), le clone KDEL 4:5 #12 (jaune), le clone KDEL 1:9 #9 (noir) et le clone KDEL 1:9 #7 (rouge) ont été ensemencées dans des plaques 96 puits. La survie cellulaire a été quantifiée par un essai XTT aux temps 25, 48, 72, 96 et 144 heures.

Nous avons fait par la suite l'essai de clonogénéicité sur plastique. Cet essai permet d'évaluer la capacité des cellules à former des colonies isolées. Cet essai pourrait aussi nous informer aussi sur les capacités prolifératives des lignées cellulaires en mesurant la quantité de cellules dans chacune des colonies. Les différents clones ont été ensemencés à plusieurs densités cellulaires et incubés pendant 14 jours. Les résultats présentés à la

figure 7 permettent de constater que le nombre de colonies formées par les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 est plus important. De plus, le dénombrement des colonies obtenues lors de trois expériences indépendantes a permis de constater que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 produisent 2 à 4 fois plus de colonies que les contrôles (tableau 4) suggérant que les clones ont une plus grande capacité à former des colonies isolées ce qui est une caractéristique importante dans la formation de masse tumorale. De plus, la taille des colonies semblait plus grande chez ces deux clones comme observé sur la figure 7 ce qui suggère que les cellules pourraient avoir une prolifération plus importante ou que les cellules poussent plus facilement sans la présence de cellules avoisinantes. Malheureusement, le nombre moyen de cellules par colonies n'a pas été calculé pour chacune des lignées utilisées dans cette expérience donc, on ne peut pas conclure avec certitude. Pour tirer des conclusions, il faudrait refaire des expériences de comptage manuel pour mesurer le temps de génération de chaque lignée. Cette expérience permet de mesurer directement la prolifération car on regarde le temps qu'il faut pour qu'une cellule puisse se diviser.

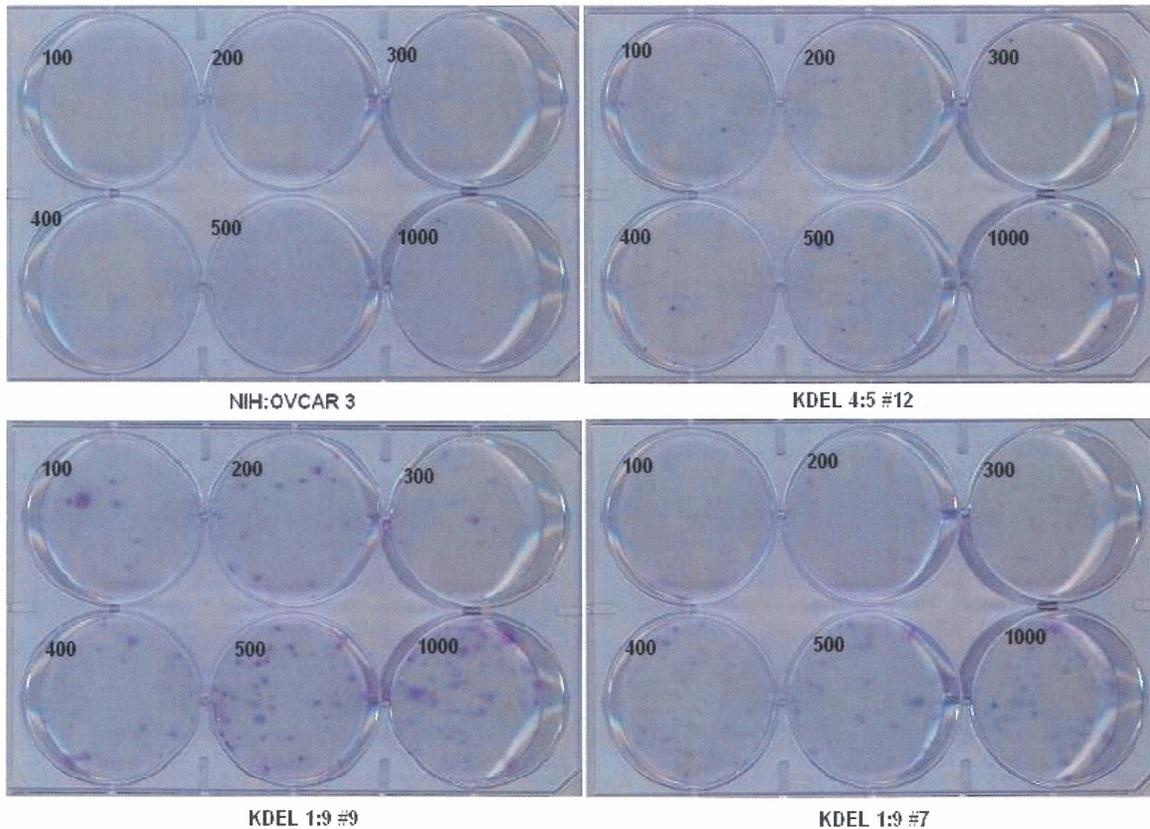


Figure 7 : Essai de clonogénécité sur plastique de la lignée parentale NIH:OVCAR 3 et des différents clones cellulaires. 100, 200, 300, 400, 500 et 1000 cellules ont été ensemencées dans une plaque 6 puits puis incubées à 37°C pendant 14 jours. Les colonies formées ont été colorées au cristal violet 1% et comptées manuellement l'aide d'un microscope à contraste de phase.

Tableau 4 : Dénombrement des colonies de plus de 50 cellules obtenues dans l'essai de clonogénécité sur plastique.

Lignée cellulaire	Nombre de cellules ensemencées par puits*					
	100	200	300	400	500	1000
NIH:OVCAR 3	2±1	5±1	7±5	11±7	12±5	25±8
KDEL 4:5 #12	4±3	8±1	8±4	15±3	17±3	45±18
KDEL 1:9 #9	12±2	15±9	22±5	29±12	38±18	69±7
KDEL 1:9 #7	18±5	37±8	45±9	57±14	77±28	---

* moyenne de 3 expériences indépendantes en triplicata

3.4 Changement morphologique des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7

Nous avons montré jusqu'à maintenant que les deux clones ont une diminution de CA125 à la membrane cellulaire et dans le milieu conditionné que ces diminutions semblaient affectées les capacités prolifératives des cellules. De plus, après plusieurs passages cellulaires, la morphologie des deux clones était différente de celle observée chez les lignées contrôles. En observant la figure 8, on constate que les cellules parentales et le clone KDEL 4:5 #12 ont la capacité de se compacter et qu'elles croissent sous la forme d'îlots. De plus, il est possible de constater parfois que dans les cultures les cellules peuvent s'empiler les unes sur les autres. Finalement, les cellules des lignées contrôles deviennent relativement petites lorsqu'elles se rapprochent de la confluence. Même si les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 sont dérivés de la même lignée parentale, lorsqu'elles atteignent la confluence, les cellules ne s'entassent pas et elles ne forment pas d'amas cellulaire. De plus, les cellules sont plus grosses et plus étalées que les lignées contrôles et elles ne se compacteront pas même lorsqu'elles auront atteint la confluence. Lorsque les cellules sont moins confluentes, on constate que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 semblent s'étaler de manière plus uniforme et les cellules sont dispersées. Les cellules produisent parfois des extensions cellulaires comme montrées par les flèches sur la figure 8. Ces extensions sont probablement des lamellipodes, des extensions cellulaires formées lors de la migration des cellules.

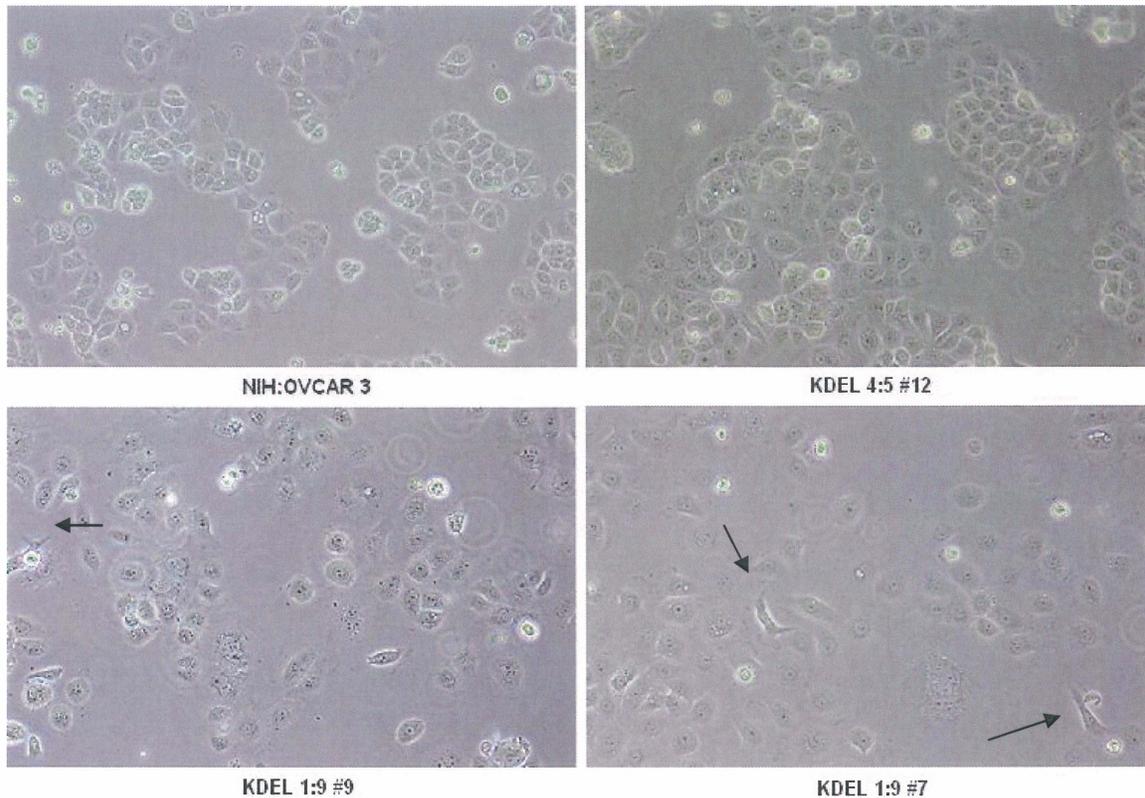


Figure 8 : Morphologie des différentes lignées cellulaires cultivées sur plastique. Les cellules ont été ensemencées sur plastique et cultivées jusqu'à l'obtention d'une confluence d'environ 70%. Les photos ont été prises à partir d'un microscope à contraste de phase à un grossissement de 10X et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500.

Étant donné la différence marquée de morphologie entre les contrôles et les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7, le comportement des cellule a été vérifié sur un autre type de matrice pour facilité l'observation d'extensions qui sont une évidence que les cellules ont une motilité plus importante. Généralement, les cellules épithéliales des organismes vivants sont adhérentes à une membrane basale. Une des matrices qui représente le mieux cette membrane est le Matrigel. Celui-ci contient tous les éléments d'une membrane basale conventionnelle. Lorsque nos cellules sont cultivées sur une matrice de Matrigel,

les lignées contrôles ne semblent pas subir aucun changement morphologique significatif tandis que le clone KDEL 1:9 #9 et le clone KDEL 1:9 #7 sont affectés par cette variation. Les lamillepodes qui étaient observés sporadiquement sur une matrice de plastique semblent être plus nombreux sur Matrigel. De plus, les extensions observées sur Matrigel semblent plus longues comme montré à l'extrémité des flèches sur la figure 9.

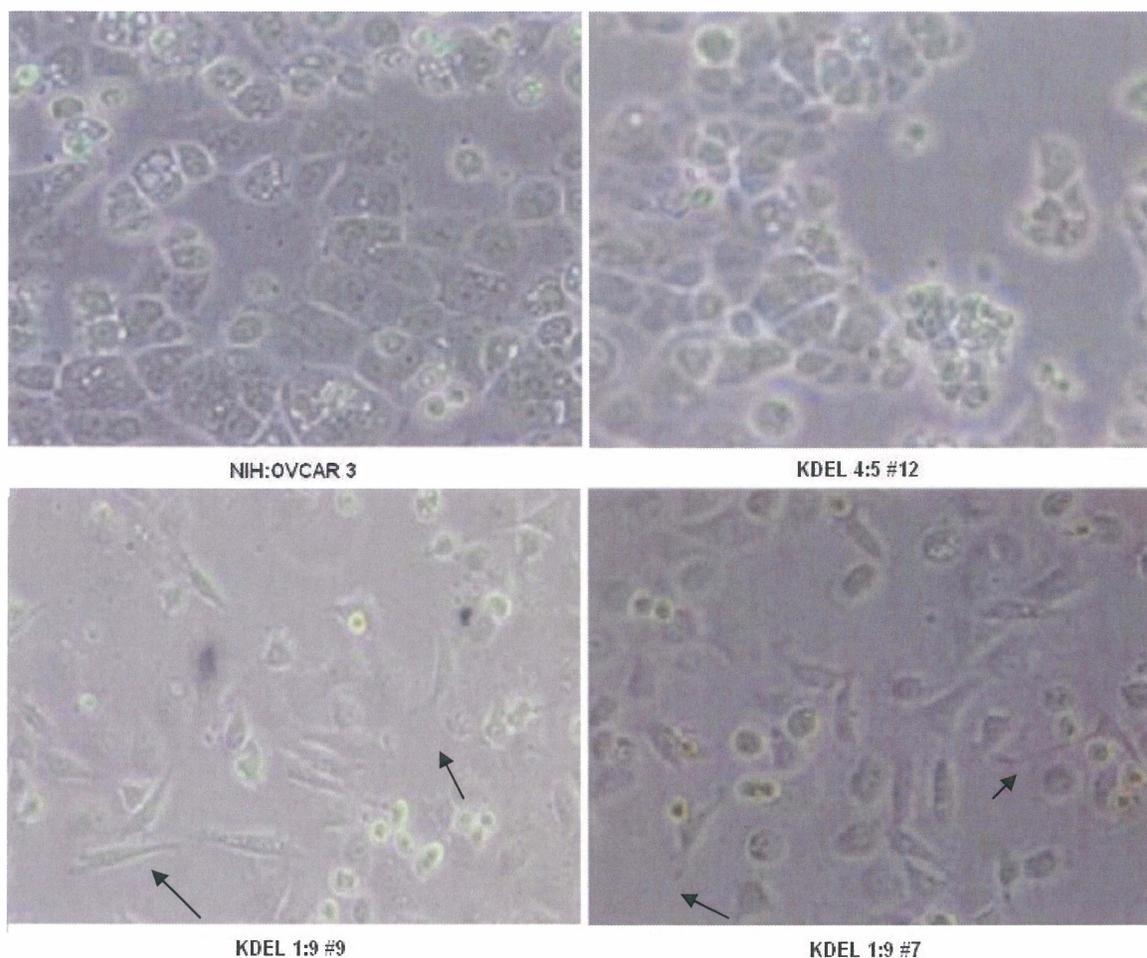


Figure 9 : Morphologie des différentes lignées cellulaires cultivées sur du Matrigel. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits préalablement recouvertes de Matrigel et cultivées dans le milieu approprié. Les cellules sont incubées pendant 24 heures pour qu'elles puissent adhérer correctement à la matrice. Les photos ont été prises à partir d'un microscope à contraste de phase à un grossissement de 10X et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500.

3.5 Comparaison des profils d'expression génique des différents clones

Les résultats jusqu'à maintenant ont montré qu'il y avait plusieurs différences phénotypiques entre les clones et les contrôles. À ce moment, nous avons voulu regarder s'il était possible de trouver des variations au niveau de l'expression de certains gènes et les relier aux changements phénotypiques observés jusqu'à maintenant. L'analyse des profils d'expression génique a permis d'identifier certains gènes dont l'expression fut affectée par la diminution des niveau d'expression de CA125 à la surface des cellules. L'analyse des profils d'expression génique avait été réalisée par Julie Beaudin lorsqu'elle était dans le laboratoire du Dr Claudine Rancourt (résultats non publiés).

Parmi certains de ces gènes qui sont présentés dans le tableau 5, on y retrouve la glycoprotéine CD44 dont l'expression semble être augmentée d'environ 10 fois. Cette augmentation pourrait avoir un impact sur les capacités migratoires des clones. Pour valider l'augmentation des niveaux d'expression de CD44 dans le clone KDEL 1:9 #9 et vérifier si nous pouvons observer une telle augmentation dans le clone KDEL 1:9 #7, une analyse par cytométrie de flux a été effectuée sur des cellules non perméabilisées. La figure 10 montre que le niveau d'expression à la surface cellulaire est très faible pour la lignée NIH:OVCAR 3 et le clone KDEL 4:5 #12, soit d'environ 10 unités et de 30 unités de fluorescence respectivement tandis qu'il y a une augmentation de l'intensité à 300 unités de fluorescence pour le clone KDEL 1:9 #9 et pour le clone KDEL 1:9 #7. Ces valeurs suggèrent que CD44 pourrait avoir un rôle à jouer dans la migration de cellules et la formation des extensions cellulaires.

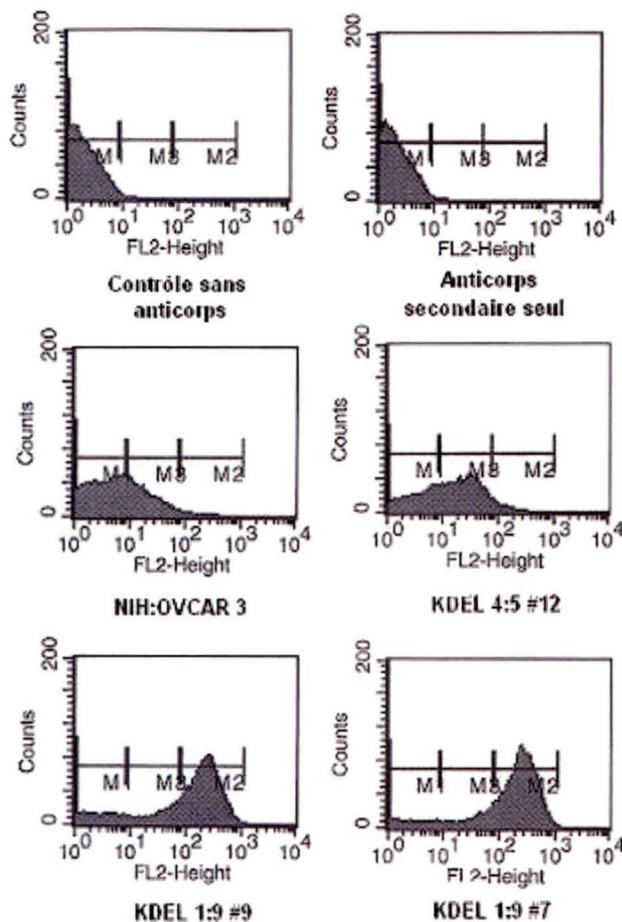


Figure 10 : Mesure de la quantité de la glycoprotéine CD44 membranaire dans les différents clones par cytométrie de flux. Les cellules ont été décollées en présence de versène (0,53mM d'EDTA) et fixées par de la formaldéhyde 2%. L'expression de CD44 a été évaluée avec l'anticorps anti-CD44 diluée 1:2000 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au PE 1:1000. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un FACS Scan et du programme Cell quest.

Tableau 5 : Certains gènes repêchés lors de l'analyse du profil d'expression génique entre les deux lignées contrôles et le clone KDEL 1:9 #9

Gène	Variation	Ratio	Voies biologiques
CD44	↑	10X	Adhésion et motilité cellulaire
proMMP-2	↑	5-10X	Digestion de la matrice
TIMP-3	↓	3-5X	Digestion de la matrice
uPA	↑	3-5X	Digestion de la matrice
PAI1	↑	2,5-3X	Digestion de la matrice
P57	↓	3-10X	Cycle cellulaire/prolifération
Cyclin D1	↑	2-2,5X	Cycle cellulaire/prolifération

3.6 Évaluation des capacités migratoires

Avec l'augmentation des niveaux d'expression de CD44 à la surface des cellules et la variation morphologique des clones, nous avons voulu voir si les cellules avaient acquis une plus grande capacité migratoire. Pour ce faire, deux approches différentes fréquemment utilisées dans la littérature (UEOKA *et al.*, 2003, ALPER *et al.*, 2001) ont été utilisées.

La première méthode, le "scratch assay" ou "blessure de monocouche", est peu coûteuse et produit des résultats qualitatifs. Nous avons initialement laissé croître les cellules pour permettre la formation d'une monocouche cellulaire puis une blessure en forme de cruciforme a été générée sur la monocouche cellulaire. Au temps 0, chacune des blessures produit sur les monocouches ont été regardées pour s'assurer qu'elles étaient toutes similaires. Par la suite, un agent anti prolifératif, l'hydroxyurée, a été ajouté pour pouvoir observer seulement la migration cellulaire. Par la suite, des photos ont été prises

à des intervalles de temps très courts pour s'assurer que les cellules n'avaient pas le temps de se diviser et ce, même en présence de l'inhibiteur de prolifération cellulaire. La figure 11 montre qu'à 5 et 16 heures, la lignée parentale n'a pas réussi à combler le trou formé par la marque. Par contre, les deux clones ont commencé à remplir les extrémités de la croix après 5 heures en plus d'avoir complètement recouvert celle-ci après 16 heures. Le clone KDEL 4:5 #12 n'a pas été utilisé pour cet essai car les cellules sont tellement compact qu'il est difficile de faire une marque convenable pour cet essai. C'est l'une des raisons qui a amenés à faire un second essai de migration cellulaire à l'aide des chambres de Boyden.

La deuxième méthode consiste à utiliser des chambres de Boyden avec des membranes poreuses avec des pores d'une dimension de $8\mu\text{m}$ pour mesurer la capacité des cellules à se déplacer. Initialement, pour vérifier si toutes les cellules avaient la capacité de traverser la membrane par les pores, des conditions extrêmes pour les premières expériences ont été utilisées. 40 000 cellules a donc étéensemencées dans chaque puits et les cellules ont été incubées pendant 48 heures. Comme le montre la figure 12, même après de telles conditions, les cellules parentales NIH:OVCAR 3 et la lignée contrôle KDEL 4:5 #12 ne sont pas capable de migrer au travers des pores. Par contre, un grand nombre de cellules pour les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 ont été observées. Pour pouvoir quantifier la migration des cellules, d'autres conditions expérimentales ont été utilisées. En ensemençant 20 000 cellules et en laissant incubé seulement 16 heures, la quantité de cellules obtenues est facile à dénombrer. Pour deux essais indépendants, nous avons obtenu les valeurs répertoriées dans le tableau 6. Ce qui est constaté, c'est que le clone KDEL 1:9 #7 semble avoir une plus grande capacité

migratoire que le clone KDEL 1:9 #9 étant donné que le nombre de cellules ayant traversées la membrane est 5 à 6 fois plus élevées. Les deux dernières expériences permettent d'affirmer que les clones ont réellement une plus grande capacité migratoire. Par contre, ces expériences n'indiquent pas quelles molécules à la surface des cellules sont importantes pour le déplacement cellulaire.

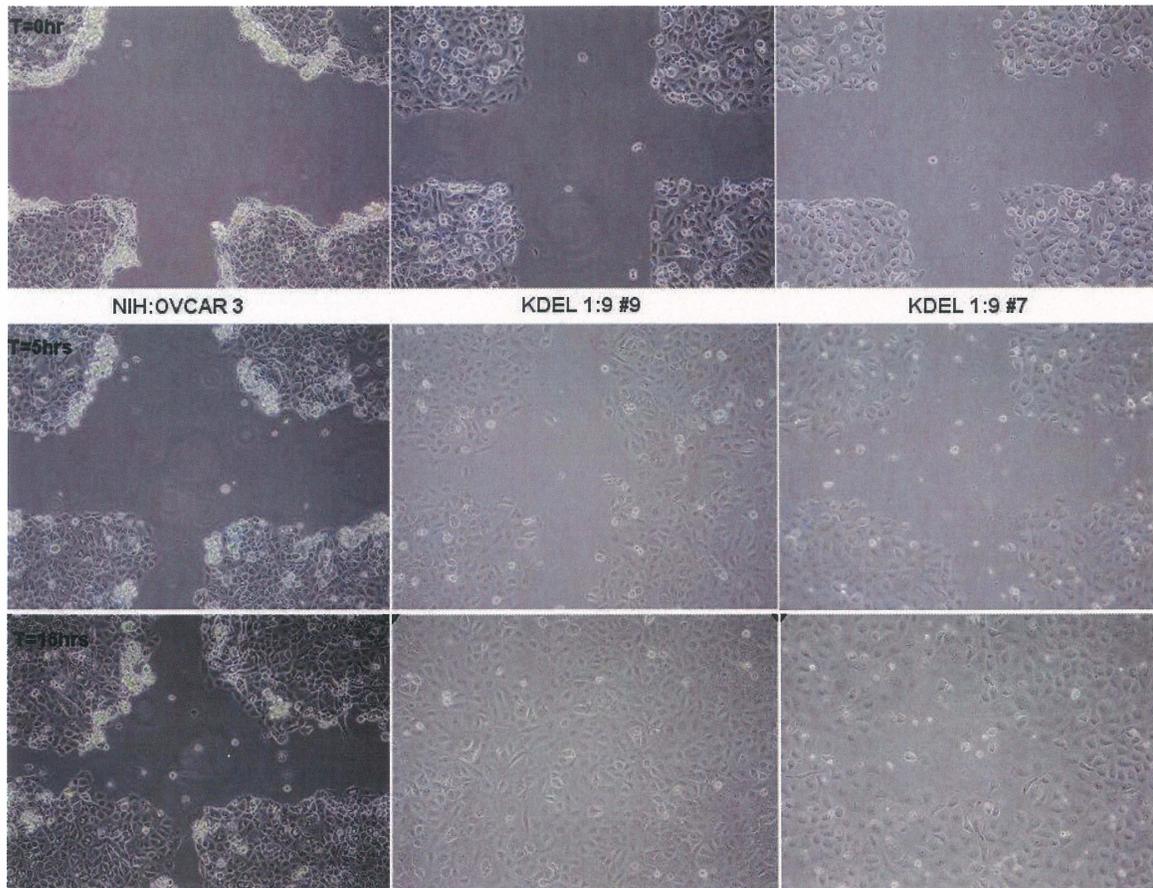


Figure 11 : Évaluation des capacités migratoires des différentes lignées cellulaires par un essai de blessure sur une monocouche cellulaire. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 6 puits de manière à produire une monocouche. À l'aide d'un embout de 10 μ L, une marque cruciforme a été générée et la monocouche a été lavée. Du milieu frais contenant 20 μ M d'hydroxyurée a été ajouté dans les puits. Les cellules ont été incubées à 37°C et après 0, 5 et 16 heures. Des photos de la monocouche cellulaire ont été prises à l'aide d'un microscope à contraste de phase et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500.

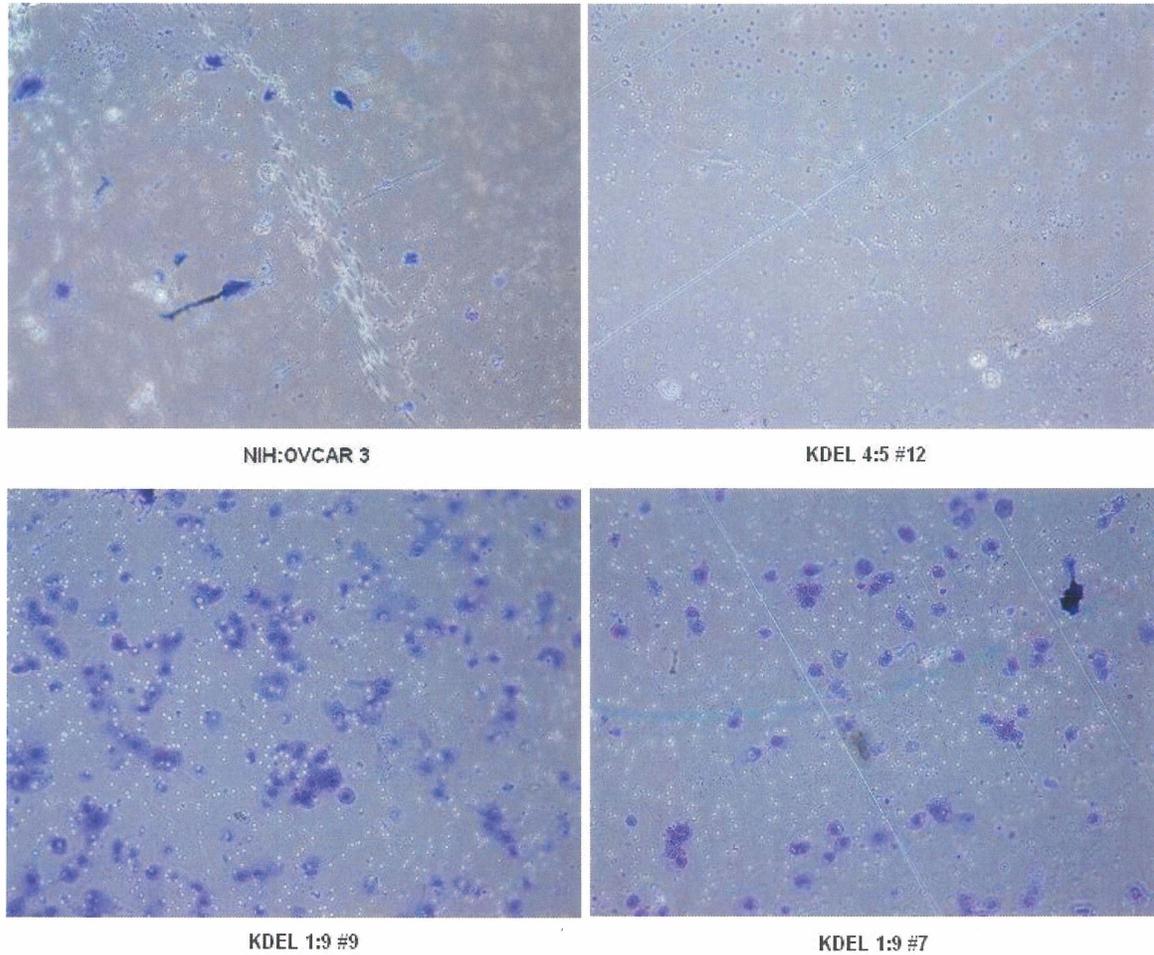


Figure 12 : Évaluation des capacités migratoires des différentes lignées cellulaires par l'utilisation des chambres de Boyden. 40000 cellules ont étéensemencées dans chacune des chambres de Boyden puis incubées à 37°C pendant 48 heures. Les cellules ont été fixées à l'éthanol 70% et colorées avec du cristal violet 0,5% filtré. Les photos ont été prises à un grossissement de 10X à l'aide d'un microscope à contraste de phase et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500.

Tableau 6 : Dénombrement des cellules ayant traversées les pores après 16 heures d'incubation à 37°C.

Migration	16 heures	
Échantillons	20000 cellules	
	Essai #1	Essai #2
NIH:OVCAR 3	0	0
KDEL 4:5 #12	0	0
KDEL 1:9 #9	31	97
KDEL 1:9 #7	208	536

Étant donné que nous avons confirmé l'augmentation de CD44 dans les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 par cytométrie de flux et que dans la littérature, la glycoprotéine CD44 est souvent associée avec les capacités migratoires de plusieurs lignées cellulaires, nous avons voulu vérifier l'implication de CD44 dans la motilité de nos cellules. Pour ce faire, nous avons répété l'essai de migration à l'aide des chambres de Boyden en présence d'un anticorps bloquant contre CD44. Le clone KM 201 de l'anticorps anti-CD44 peut se lier à proximité du site de liaison à l'acide hyaluronique (CULTY et al, 1990) et bloquer l'adhésion des cellules (CULTY et al, 1990) mais aussi sa migration (LADEDA et *al.*, 1998). La présence de l'anticorps diminuera la quantité de cellules pouvant traverser la membrane poreuse des chambres de Boyden si CD44 est nécessaire au mouvement des cellules. Pour montrer l'effet de l'anticorps, nous avons tracé une courbe du nombre de cellules ayant traversées la membrane poreuse en fonction de la quantité d'anticorps bloquant utilisé. La courbe préliminaire obtenue pour le clone KDEL 1:9 #9 à la figure 13 indique que la migration cellulaire peut être bloquée de

seulement 50%. Ce résultat nous suggère que CD44 est directement impliquée dans la migration cellulaire du clone KDEL 1:9 #9 mais que d'autres protéines pourraient aussi avoir un rôle dans la capacité migratoire du clone KDEL 1:9 #9.

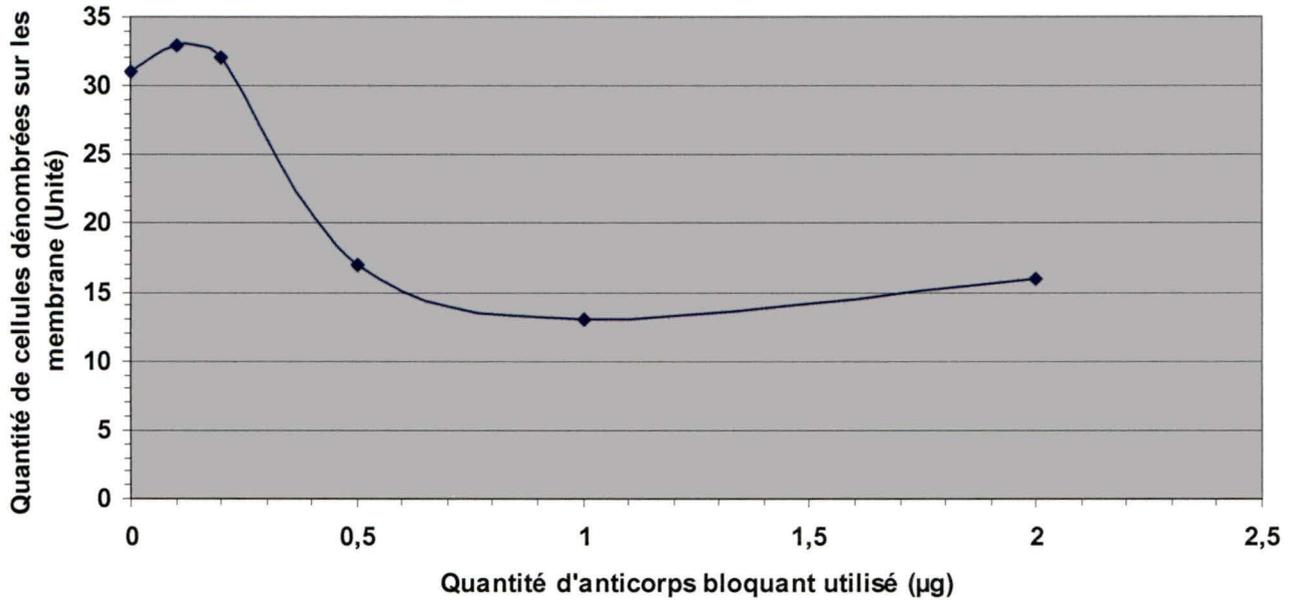


Figure 13 : Implication de CD44 dans la migration cellulaire des différentes lignées cellulaires étudiées. 20000 cellules ont étéensemencées dans chacune des chambres de Boyden en présence de 0, 200, 500, 1000 et 2000 nanogramme d'anticorps bloquant anti-CD44 puis incubées à 37°C pendant 48 heures. Les cellules ont été ensuite fixées avec de l'éthanol 70% et colorées avec du cristal violet 0,5%. Les cellules ont été dénombrées à l'aide d'un microscope à contraste de phase.

3.7 Le potentiel invasif

3.7.1 Niveaux d'expression des composantes de l'hétérotrimère proMMP-2, TIMP-2 et MT1-MMP

Après avoir montré la corrélation entre les niveaux d'ARN obtenus par l'analyse d'expression génique et les niveaux protéiques membranaires de CD44, nous avons voulu vérifier si les niveaux de la proMMP-2 étaient bel et bien augmentés. Comme pour la glycoprotéine CD44, l'analyse des profils d'expression génique (tableau 5) suggérait une augmentation du niveau d'expression de la proMMP-2 de 5 à 10 fois chez le clone KDEL 1:9 #9.

Suite à cette constatation, nous avons voulu vérifier les niveaux d'expression de la proMMP-2 dans les milieux conditionnés des différentes lignées étudiées. Pour évaluer la présence des protéases, nous avons décidé d'utiliser un essai de zymographie, un essai qui est plus sensible que les immunobuvadage de type Western et qui peut détecter jusqu'à des nanogrammes de protéases (OLIVER *et al*, 1997). Après l'électrophorèse des différents milieux conditionnés sur un gel d'acrylamide 12% contenant 2µg/mL de gélatine et la coloration au bleu de Coomassie R-250, nous avons obtenus les résultats présentés à la figure 14. Point à noter, les échantillons sont préparés avec du milieu sans FBS car les protéines contenues dans le FBS pourraient nuire à la coloration du gel. De plus, certaines protéases peuvent être retrouvées dans le FBS dont les métalloprotéases de

matrice qui pourrait interférer avec les protéases de nos échantillons. Les bandes blanches sur fond bleu produites sur le gel sont générées par la dégradation de la gélatine grâce aux protéases qui migrent à cette hauteur dans le gel. Étant donné qu'il n'a plus de gélatine à cet endroit, il n'aura pas coloration de cette portion contrairement au reste du gel. Ce que nous pouvons observer sur la figure 14A, c'est que la lignée parentale et que le clone KDEL 4:5 #12 ont de faibles niveaux de sécrétion de proMMP-2 mais que le niveau est similaire entre les deux lignées. Par la suite, on peut constater qu'il y a une augmentation des niveaux de sécrétion de la proMMP-2 chez les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7. Pour s'assurer que la bande que nous avons observée était bien de la proMMP-2, deux contrôles internes ont été utilisés, le sang qui contient toutes les métalloprotéinases sécrétées dont la proMMP-2 et la proMMP-9 (MAKOWSKI et RAMSBY, 1996) et de la proMMP-2 purifié.

Cette augmentation est similaire à celle notée dans l'analyse du profil d'expression génique du clone KDEL 1:9 #9. Nous pouvons aussi constater une augmentation de la proMMP-9 dans le clone KDEL 1:9 #9 et dans le clone KDEL 1:9 #7. La forme inactive des protéases peut aussi être observée dans le gel car l'électrophorèse libère le site actif des enzymes et que la renaturation effectuée par la suite ne suffit pas à masquer à nouveau le site catalytique.

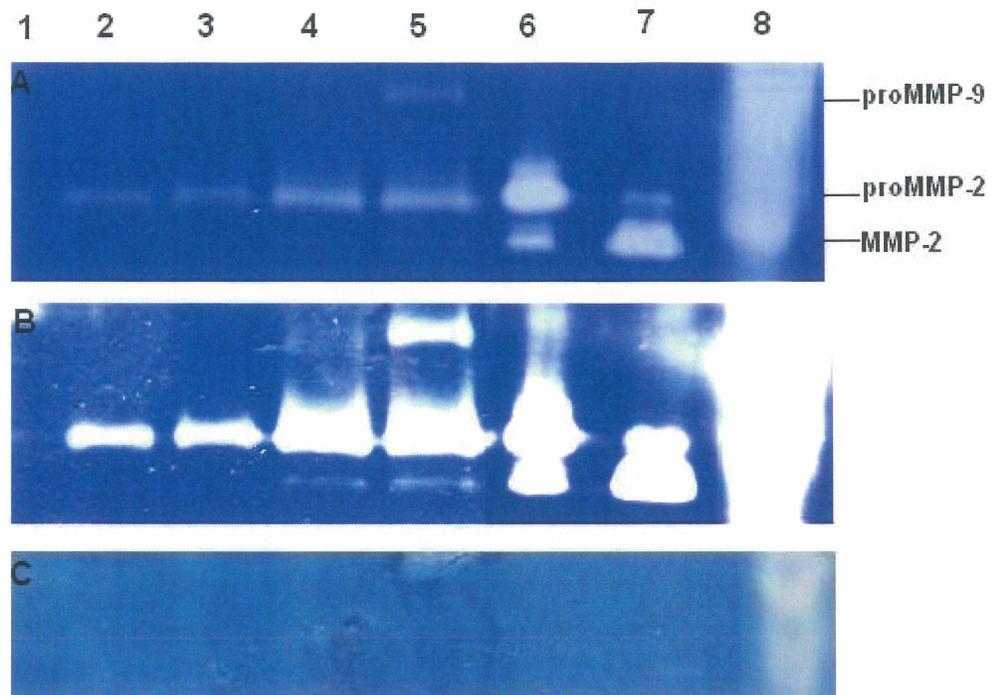


Figure 14 : Mesure de la quantité de métalloprotéinases dans les milieux conditionnés des clones à partir de zymographie. Les milieux conditionnés subissent une électrophorèse de 3 heures sur un gel d'acrylamide 12% contenant 2 μ g/mL de gélatine. Les protéines sont renaturées en présence de 2,5% Triton. On incube à 37°C avec 50mM de CaCl₂ en absence de 0,1mM de 1,10-phénanthroline (inhibiteur de MMPs) (A,B) ou en présence d'inhibiteur(C) pour 16 heures. Le gel est coloré avec du bleu de Coomassie et décoloré pour obtenir un bon contraste. Puits 1 : Sang dilué 1:3; puits 2 : NIH:OVCAR 3; puits 3 : KDEL 4:5 #12; puits 4 : KDEL 1:9 #9; puits 5 : KDEL 1:9 #7; puits 6 : proMMP-2 purifié; puits 7 : proMMP-2 purifié activé avec de l'APMA; puits 8 ; Trypsine dilué.

De plus, une bande plus basse que la proMMP-2 a pu être observée dans le gel au niveau des pistes du KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7. Pour mieux la voir, nous avons intensifié le contraste de la figure 14A (figure 14B). En comparant la bande en dessous de la proMMP-2 avec la piste contenant la MMP-2 activée par de l'APMA, on constate que la bande dans nos échantillons et la bande du bas dans le contrôle sont à la même hauteur.

Cette constatation suggère que la seconde bande au niveau des clones est la forme active de la proMMP-2. Ceci indique que le clone KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 produisent donc plus de proMMP-2 comme observé avec l'analyse du profil génique, mais en plus ils ont la capacité de l'activer.

Pour confirmer que l'activité enzymatique détectée par zymographie est causée par des métalloprotéinases de matrice, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique, la 1,10-phénanthroline. Cet inhibiteur des métalloprotéinases de matrice permet de bloquer l'activité enzymatique des protéases dans le gel. En utilisant de la trypsine, une sérine protéase, dans l'une des pistes, nous avons pu nous assurer de la spécificité de notre inhibiteur pour les MMP. La figure 14C permet de constater que l'activité enzymatique a été perdue dans toutes les pistes sauf dans celle contenant la trypsine. Ce contrôle confirme que la digestion de la gélatine lors de la zymographie est causée par l'activité des métalloprotéases.

Dans un contexte physiologique, la proMMP-2 est activé par la MT1-MMP (MMP14) en présence de TIMP-2. Étant donné qu'il avait une activation accrue de la proMMP-2 dans les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7, nous avons voulu mieux comprendre pourquoi les clones sont capables d'activer la proMMP-2 dans le milieu. Pour ce faire, les niveaux d'expression des deux autres activateurs de la proMMP-2 impliqués dans l'hétérotrimère ont été mesurés.

Pour mesurer les niveaux de TIMP-2, l'inhibiteur de la MMP-2 de 21kDa, un essai de zymographe inverse a été effectué. Cet essai consiste à bloquer l'activité catalytique

des protéases ajoutées dans le gel à partir des inhibiteurs qui sont présent dans les milieux conditionnés étudiés. Donc, le gel séparateur contient, en plus de 2µg/mL de gélatine, 160ng/mL de proMMP2 purifié permettant de digérer la gélatine. L'emplacement où l'inhibiteur migrera sur le gel permettra d'inhiber la digestion de la gélatine par la proMMP-2 qui est activée lors de la migration. Pour s'assurer que les bandes observées soient les bonnes, nous avons inclus un contrôle interne qui était de la TIMP-2 commerciale. En analysant les résultats présentés à la figure 15, il est possible d'observer que l'intensité des bandes appartenant à la lignée parentale et au clone KDEL 4:5 #12 est très faible et similaire. Par contre, les niveaux de sécrétion de la TIMP-2 sont augmentés chez le clone KDEL 1:9 #9 tandis que l'augmentation de la TIMP-2 est plus faible pour le clone KDEL 1:9 #7, mais néanmoins supérieure aux niveaux de TIMP-2 sécrétés par les cellules contrôles.

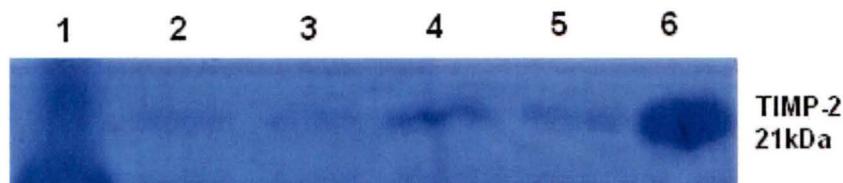


Figure 15 : Mesure de la quantité d'inhibiteur de métalloprotéinases dans les milieux conditionnés des clones à partir d'un essai de zymographie inverse. Les milieux conditionnés subissent une électrophorèse de 1 heure sur un gel d'acrylamide 12% contenant 2µg/mL de gélatine et 160ng/mL de proMMP-2 purifié. Les protéines sont renaturées en présence de 2,5% de triton pendant 3 heures et par la suite incubées à 37°C en présence de CaCl₂ pour 16 heures. Le gel est coloré avec du bleu de coomassie et décoloré pour obtenir un bon contraste. Puits 1 : Sang dilué 1:3; puits 2 : NIH:OVCAR 3; puits 3 : KDEL 4:5 #12; puits 4 : KDEL 1:9 #9; puits 5 : KDEL 1:9 #7; puits 6 : TIMP-2 purifié.

Pour avoir une image plus complète du processus d'activation de la proMMP-2, les niveaux d'expression de la MT1-MMP ont été vérifiés chez les différents clones. Le tableau 7 résume la moyenne des valeurs obtenues pour trois PCR en temps réel indépendants et il ne semble pas avoir de différence majeure entre chacun des clones étudiés mais la lignée parentale est deux fois plus élevée que les autres clones. Pour être certain que les valeurs obtenues n'étaient pas causées par un problème technique, nous avons déterminé les niveaux d'expression de la proMMP-2 en utilisant les mêmes conditions expérimentales (sauf pour l'utilisation de différentes amorces). Les valeurs obtenues pour la proMMP-2 sont similaires à celles obtenues par zymographie (figure 14) et suggérées par les profils d'expression génique. Ce contrôle indique que la méthode de PCR en temps réel utilisé est fiable et qu'il n'y a pas de variation de la MT1-MMP dans nos différents clones.

Tableau 7 : Niveau d'expression de la MT1-MMP et de la proMMP-2 par une analyse de PCR en temps réel.

Échantillons	Niveau d'expression cellulaire	
	MT1-MMP	proMMP-2
NIH:OVCAR 3	4.75 ± 1.18	0.25 ± 0.06
KDEL 4:5 #12	1.09 ± 0.29	0.15 ± 0.02
KDEL 1:9 #9	2.05 ± 0.55	3.61*
KDEL 1:9 #7	1.76 ± 0.12	8.37 ± 2.77

* Cette valeur a été effectuée une seule fois

3.7.2 Capacité invasive des différents clones stables

Nous avons montré jusqu'à maintenant que les cellules ont une plus grande capacité migratoire et qu'elles peuvent produire plus de proMMP-2. De plus, les métalloprotéases semblent plus actives dans le milieu conditionné des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7. Ces deux éléments suggèrent que les cellules pourraient être plus invasives assumant que les MMP sont à proximité de la matrice pour permettre une invasion efficace. Pour vérifier si les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 avaient un plus grand potentiel invasif, nous avons utilisé des chambres d'invasion de Boyden dans lesquelles la membrane poreuse est recouverte par une mince pellicule de Matrigel. Pour traverser les pores, les différentes cellules doivent pouvoir digérer la matrice avant de migrer au travers des pores.

Comme pour l'essai de migration, des conditions extrêmes (40000 cellules avec une incubation de 48 heures) ont été utilisées pour vérifier si les cellules contrôles avaient la capacité de traverser les pores. Après une incubation de 48 heures, la lignée parentale et le clone KDEL 4:5 #12 n'ont pas réussi à traverser les pores (figure 16) tandis que de nombreuses cellules invasives ont pu être observées avec les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7. Pour pouvoir dénombrer le nombre de cellules qui avaient migrées au travers des pores (tableau 8), les mêmes quantités de cellules ont été utilisées mais le temps d'incubation a été réduit à 24 heures. L'essai n'a pas été fait avec des conditions temps plus court car dans cette expérience, les cellules doivent pouvoir digérer la matrice en premier lieu ce qui rallonge le temps avant que les cellules puissent se déplacer. Pour

deux expériences indépendantes, nous avons observé que le clone KDEL 1:9 #9 à une plus grande capacité invasive (279 ± 43 cellules) que le clone KDEL 1:9 #7 (185 ± 11). De plus, le potentiel invasif des deux clones est nettement supérieur aux lignées contrôles étant donné que celles-ci ne sont pas capable de traverser les pores après 48 heures. Ces résultats suggèrent donc que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9#7 ont un potentiel invasif plus important.

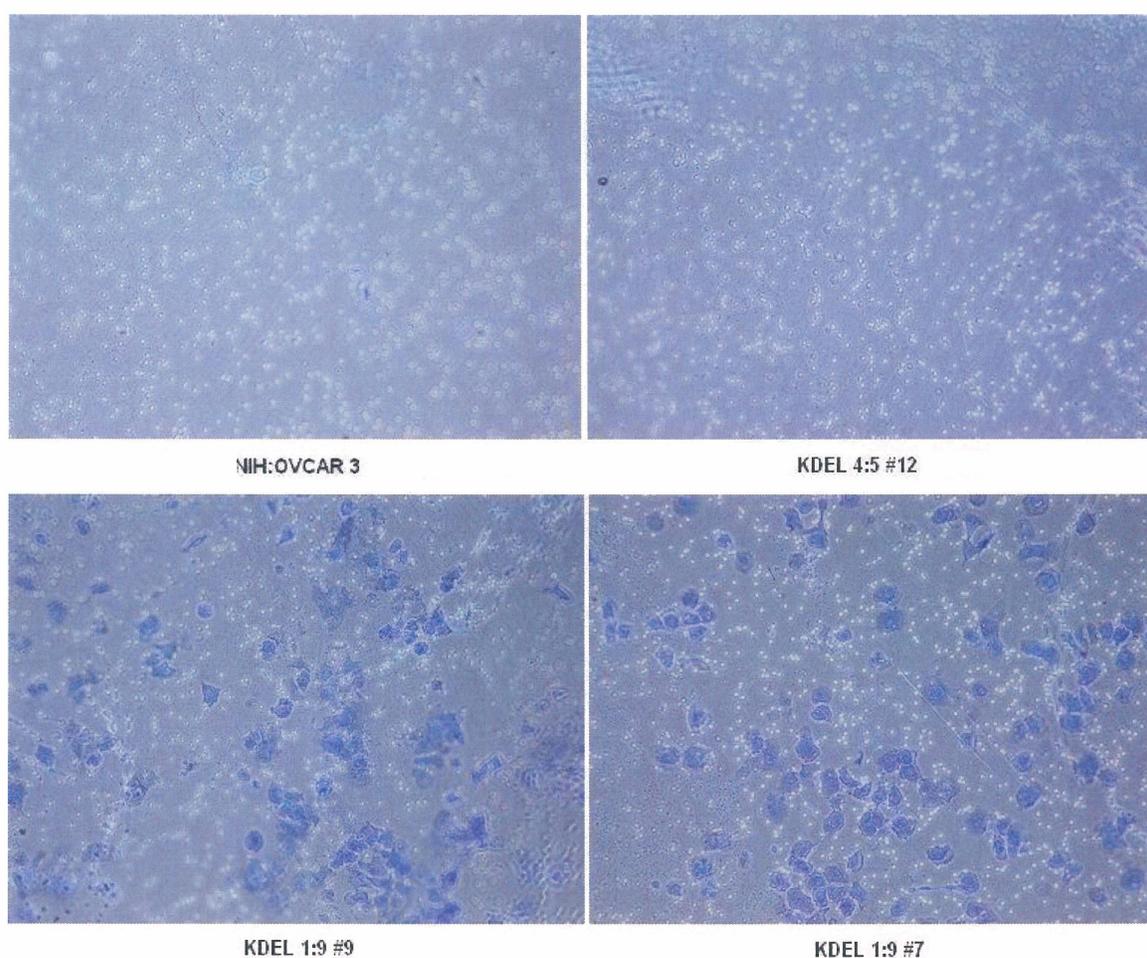


Figure 16 : Évaluation des capacités invasives des différentes lignées cellulaires par l'utilisation des chambres d'invasion. 40000 cellules ont étéensemencées dans chacune des chambres d'invasion puis incubées à 37°C pendant 48 heures. Les cellules ont été fixées à l'éthanol 70% et colorées avec du cristal violet 0,5% filtré. Les photos sont prises à un grossissement de 10X à l'aide d'un microscope à contraste de phase et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500.

Tableau 8 : Dénombrement des cellules ayant traversées les pores après 24 heures d'incubation à 37°C.

Migration	24 heures	
Échantillons	40000 cellules	
	Moyenne	Ecart type
NIH:OVCAR 3	0	0
KDEL 4:5 #12	0	0
KDEL 1:9 #9	279	43
KDEL 1:9 #7	185	11

3.8 Interférence à l'ARN

3.8.1 Production et validation des siRNA

Nous avons montré que la perte de CA125 à la surface des cellules pouvait induire plusieurs changements phénotypiques dans les cellules. Pour valider les résultats obtenus à l'aide du scFv ciblé au reticulum endoplasmique, nous avons voulu utiliser une autre approche expérimentale. Nous avons donc mis au point des courts duplexes d'ARN (siRNA) pour permettre de diminuer les niveaux d'ARN messager de CA125 par de l'interférence à l'ARN.

Premièrement, différentes régions dans la séquence de *MUC16* ont été sélectionné à partir de plusieurs logiciels informatiques fournis sur plusieurs sites internet de compagnie synthétisant des siRNA. Plusieurs séquences étaient suggérées par les

Tableau 9 : Emplacement des siRNA sur l'ADNc de CA125.

Séquence de CA 125	# de la séquence du siRNA	Position du siRNA sur 66749 pb	# de séquences ciblées
O'Brien	23	577-597	1 région
O'Brien	1142	22862-22882	4 régions

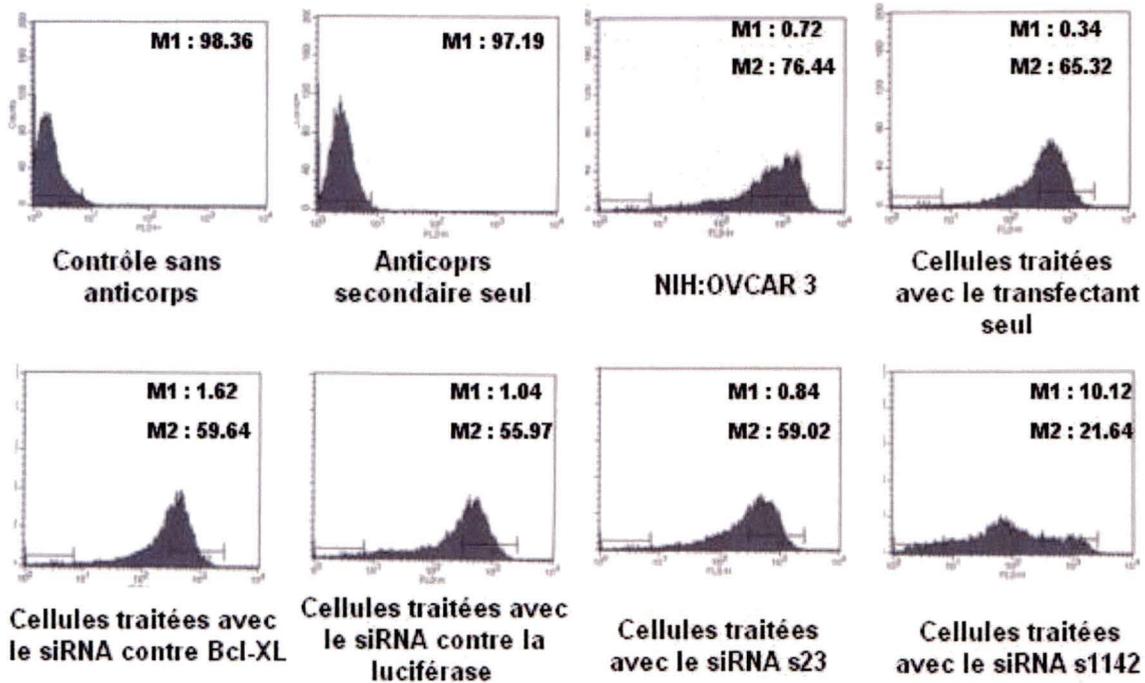


Figure 18 : Évaluation des niveaux d'expression de CA125 à la membrane cellulaire par analyse de cytométrie de flux de transfections transitoires. Les cellules NIH:OVCAR 3 ont été transfectées avec différentes conditions et incubées 96 heures. Elles ont été décollées en présence de versène et fixées avec du formaldéhyde 2%. L'expression de CA125 a été évaluée avec l'anticorps anti-CA125 M11 diluée 1:500 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au PE 1:1000. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un FACS scan et du programme Cell quest.

Par la suite, l'efficacité des siRNA a été validée en mesurant leur capacité à induire une diminution des niveaux d'expression de la protéine CA125. Pour vérifier la diminution des niveaux d'expression de CA125, une analyse par cytométrie de flux du CA125 membranaire fut effectuée sur des cellules non perméabilisées. La figure 18 permet de constater que les cellules des transfections transitoires contrôles soit: le transfectant seul et les cellules traitées avec un siRNA contre la luciférase n'ont pas subi de modulation des niveaux d'expression membranaire de CA125. L'ajout de 50nM de siRNA s1142 dans les cellules par transfection transitoire a permis d'induire une diminution des niveaux d'expression de CA125 à la membrane cellulaire de 300 fois puisque l'intensité des pics de fluorescence est passée de 1000 unités pour les contrôles à environ 30 unités pour les cellules traitées avec le siRNA s1142. Cette diminution est similaire à ce qui avait été obtenu dans les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 induit par la séquestration de CA125 par le scFv dans le réticulum endoplasmique. Par contre, aucune diminution n'a été observée lorsque les cellules ont été transfecté avec 50nM de siRNA s23 étant donné que l'intensité des pics de fluorescence était similaire à ceux de tous les contrôles. Ces résultats suggèrent donc que le siRNA s1142 est un outil efficace pour induire une diminution des niveaux d'expression de CA125 à la membrane des cellules tandis que le siRNA s23 qui n'est pas fonctionnel pourrait servir de contrôle pour les prochaines expériences.

À l'aide des scFv, nous avons seulement réussi à observer la diminution de CA125 dans la lignée cellulaire NIH:OVCA3 qui expriment fortement la protéine même si différents clones exprimant le même scFv avaient été générés dans plusieurs

lignées cellulaires dont les SKOV 3 ip1 et les OVCA 433 qui expriment faiblement la protéine CA125. En sachant que les niveaux d'expression de CA125 dans la lignée cellulaire NIH:OVCA 3 pouvait être diminués, nous avons voulu déterminer si le siRNA s1142 pouvait aussi affecter l'expression membranaire de CA125 dans d'autres lignées cellulaires de cancer de l'ovaire. Pour ce faire, la même quantité de siRNA a été transfectée dans différentes lignées cellulaires dont les SKOV 3 ip1 (résultat non présenté), les CaOV 3 et les OVCA 433 (figure 19). Chacune de ces lignées possèdent des niveaux d'expression variables de CA125 membranaire comme on peut le constater en regardant le contrôle positif pour chaque lignée. Comme pour les NIH:OVCA 3 transfectées dans la figure 18, les contrôles utilisés ne sont pas capable d'induire une diminution des niveaux d'expression de CA125. Dans la figure 19, seulement le contrôle s23 est présenté car les autres contrôles sont similaires. En ajoutant 50nM de siRNA s1142 dans ces différentes lignées cellulaires, on obtient une diminution des niveaux d'expression membranaire de CA125, mais celle-ci est plus faible que ce qui est obtenu dans la lignée NIH:OVCA 3. De plus, l'observation de deux pics de fluorescence dans chacun des graphiques serait reliée probablement avec l'efficacité des transfections. Néanmoins, la transfection du siRNA s1142 induit une diminution de l'expression de CA125 membranaire et ce dans différentes lignées cellulaires indépendamment des niveaux d'expression de la protéine.

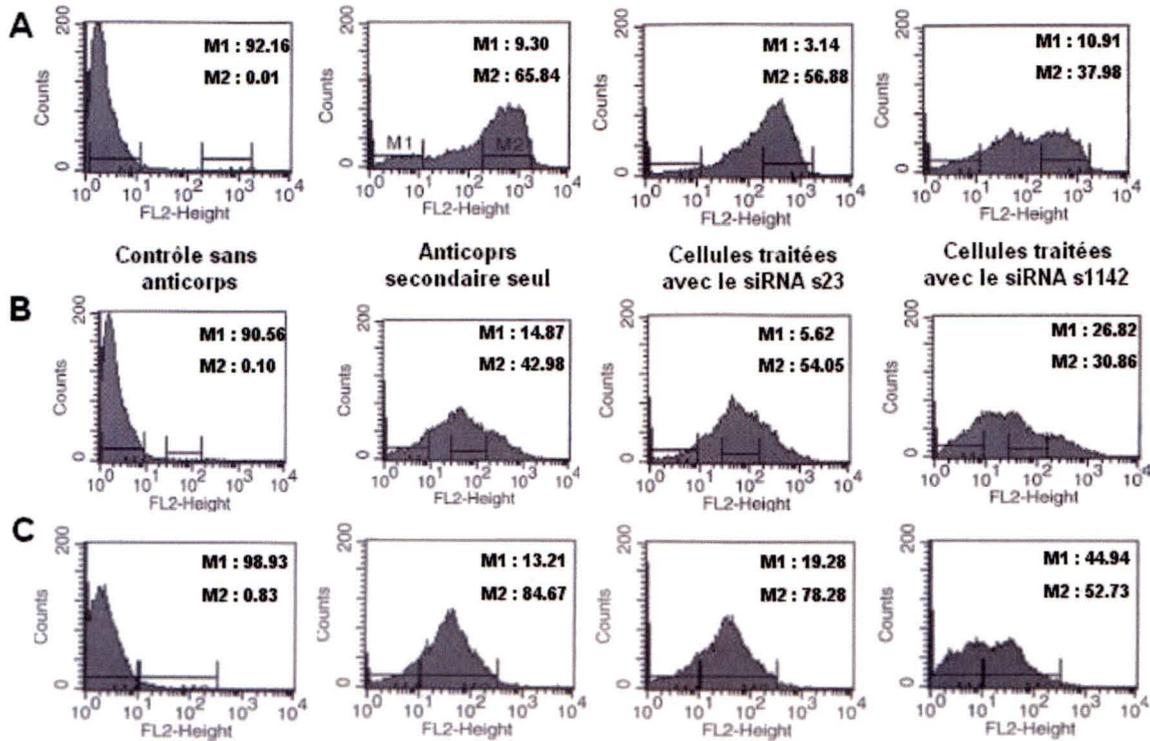


Figure 19 : Diminution des niveaux d'expression de CA125 par analyse de cytométrie de flux dans différentes lignées cellulaires par le siRNA s1142. Les différentes lignées cellulaires soit NIH:OVCAR 3 (A), CaOV 3 (B) et OVCA 433 (C) ont été transfectées avec différentes conditions et incubées 96 heures. Elles ont été décollées en présence de versène et fixées avec du formaldéhyde 2%. L'expression de CA125 est évaluée avec l'anticorps anti-CA125 M11 diluée 1:500 suivi de l'anticorps secondaire anti-souris couplé au PE. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un FACS scan et du programme Cell quest.

Ensuite, pour valider d'avantage l'efficacité du siRNA, nous avons voulu savoir si la transfection du siRNA s1142 dans les NIH:OVCAR 3 pouvait diminuer les niveaux d'ARN messager de CA125. Les niveaux d'ARN cellulaire ont été comparés dans les cellules transfectées avec les quantités protéiques de CA125 à la membrane des cellules. Étant donné que l'ARN de CA125 est très grand soit 66kb (Af414442, GenBank), nous avons utilisé des Northern slots blots. Cette méthode permet d'éviter la migration de même que le transfert qui peut être problématique pour un ARN de cette taille. Pour pouvoir quantifier la quantité d'ARN dans chaque échantillon, la membrane qui avait été hybridée avec une sonde radiomarquée (FLJ14303 ou β -actine) a été exposé dans une cassette avec un écran phosphore. Par la suite, l'écran fut scanné à l'aide d'un Storm 860 et l'analyse de nos bandes fut produite à l'aide du logiciel Imagequant 5.0.

À partir d'une portion des cellules, une analyse de CA125 par cytométrie de flux sur des cellules non perméabilisées a été effectué et avec l'autre, nous avons extrait l'ARN avant que les cellules ne soient fixées. Comme montré à la figure 20A, nous avons induit une diminution des niveaux d'expression de CA125 à la membrane des cellules similaire aux autres essais qui avaient déjà été effectués. Cette diminution suggère que la transfection des siRNA a bien fonctionné et que le siRNA s1142 peut induire de l'interférence à l'ARN dans les cellules.

Pour le Northern slot blot, 5 μ g d'ARN total a été déposé dans chacune des fentes sauf pour les contrôles (figure 20B). Les contrôles servaient à s'assurer que la sonde FLJ14303 ciblé contre la portion C-terminale de CA125 n'avait pas la capacité de

s'apparier sur n'importe quel ARN. Nous avons utilisé 30 μ g d'ARN de la lignée SKOV 3 comme contrôle négatif et 2 μ g d'ARN du clone SKOV 3 pLTRFLJ14303 #1 comme contrôle positif. La lignée SKOV 3 n'exprime pas la protéine CA125 tandis que le clone pLTRFLJ14303#1 exprime de manière inductible la protéine FLJ14303 lorsque la lignée est en présence de doxycycline qui a été montré par cytométrie de flux, par immunobuvardage de type Western et par immunofluorescence. La protéine FLJ14303 contient la queue cytoplasmique, le domaine transmembranaire, le domaine unique et trois répétitions de CA125. Étant donné que nous utilisons la sonde FLJ14303, ce clone est le contrôle idéal pour s'assurer que la sonde FLJ14303 est fonctionnelle. Pour s'assurer que la même quantité d'ARN a été déposée dans chaque puits, nous avons refait une autre hybridation, deux mois après la première hybridation pour mesurer les niveaux de β -actine (figure 20C). Après avoir effectué trois expériences indépendantes, nous avons quantifié et normalisé les quantités de CA125 à l'aide de la β -actine (figure 21). La diminution observée des niveaux d'ARN de CA125 est d'environ 25% lorsque les cellules sont traitées avec 50nM de siRNA s1142 qui est significative ($p < 0,01$) si les valeurs sont comparées avec celles des cellules non transfectées ou des cellules traitées avec le transfectant seul. Malheureusement, à cause des barres d'erreurs des contrôles cellules traitées avec le siRNA contre la luciférase et celles traitées avec le siRNA s23 rendant l'interprétation des résultats difficiles ($p > 0,1$). Il n'est donc pas possible de conclure avec certitude si la diminution observée des niveaux d'ARN de CA125 est causée par le siRNA s1142. Pourtant, ces résultats semblent suggérer que le siRNA s1142 peut avoir une certaine efficacité sur les niveaux d'expression de CA125.

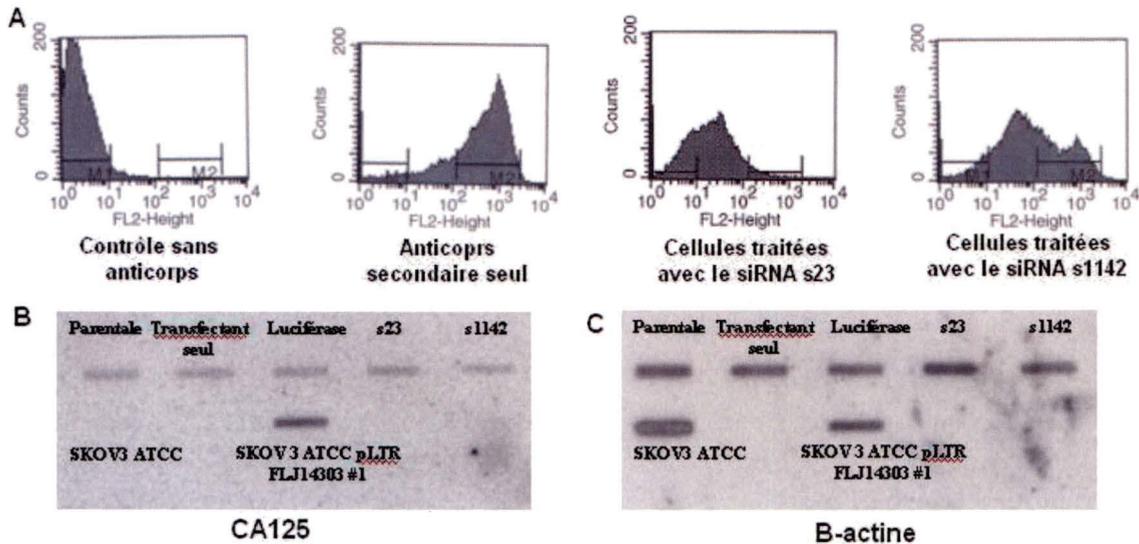


Figure 20 : Vérification des siRNA par une analyse protéique et une analyse des ARN totaux. Les NIH:OVCAR 3 ont été transfectées avec différentes conditions et incubées 96 heures. Elles ont été décollées en présence de versène et une portion a été fixée avec du formaldéhyde 2%. L'ARN a été extrait dans l'autre portion des cellules. L'expression de CA125 a été évaluée avec l'anticorps anti-CA125 M11 diluée 1:500 suivi de l'anticorps secondaire anti souris couplé au PE. Les cellules sont analysées à l'aide d'un FACS scan et du programme Cell quest (A). Différentes quantités d'ARN ont été déposées sur un slot blot et la membrane a été incubée avec 1×10^7 cpm d'une sonde radiomarquée contre le C-terminal de CA125 soit FLJ14303 (B) ou contre la β -actine (C).

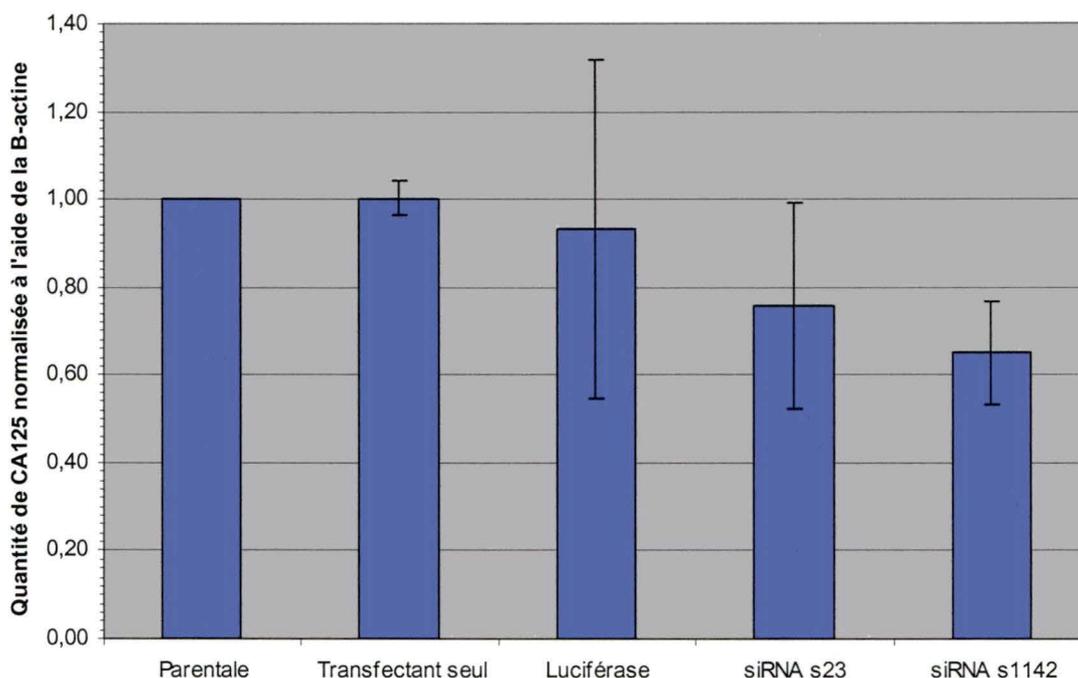


Figure 21 : Quantification de l'ARN de CA125 à partir des Northern slot blot en normalisant avec la β -actine. Les barres sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

3.8.2 Vérification des effets phénotypiques après transfection transitoire des siRNA

Nous avons montré que les siRNA était efficace pour diminuer les niveaux d'expression de la protéine CA125. Même si les niveaux d'ARN n'étaient pas certains à cause des énormes barres d'erreurs, nous avons voulu vérifier si nous pouvions récupérer les effets phénotypiques observés chez les clones exprimant le scFv contre la protéine CA125.

La première expérience entreprise était d'évaluer les niveaux d'expression de la glycoprotéine CD44 après une transfection avec le siRNA s1142. Comme pour les autres

analyses de cytométrie de flux, nous avons regardé les niveaux membranaires de la protéine. Pour s'assurer que les résultats n'étaient pas causés par une mauvaise transfection des cellules, la protéine CA125 a été regardée sur une des portions des cellules transfectées (résultat similaire à ce que nous avons obtenu pour toutes les autres transfusions). Les résultats obtenus pour CD44 (figure 22) suggèrent que la diminution de CA125 par le siRNA n'est pas suffisante pour induire une augmentation des niveaux d'expression de CD44. Pour être sûr que l'anticorps était efficace, un contrôle positif fut inclus, le clone KDEL 1:9 #9.

Au même moment, les capacités migratoires des cellules ont été évaluées. Comme le montre l'essai avec les chambres de Boyden (figure 23), la transfection des NIH:OVCAR 3 avec le siRNA s1142 n'a pas permis d'observer de migration cellulaire. Il est possible que les conditions utilisées lors de cet essai n'étaient pas les bonnes. Finalement, la même constatation peut être faite avec l'essai de zymographie (figure 24). La diminution de CA125 à l'aide du siRNA ne semble pas affecter les taux de sécrétion de la proMMP-2 dans le milieu extracellulaire. En fait, l'intensité des bandes dans chacune des pistes est similaire suggérant que les niveaux soluble de la proMMP-2 est identique entre les cellules non traitées et celles traitées avec 50nM de siRNA s1142. De plus, nous n'avons pas d'activation de la proMMP-2 comme observé dans les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7.

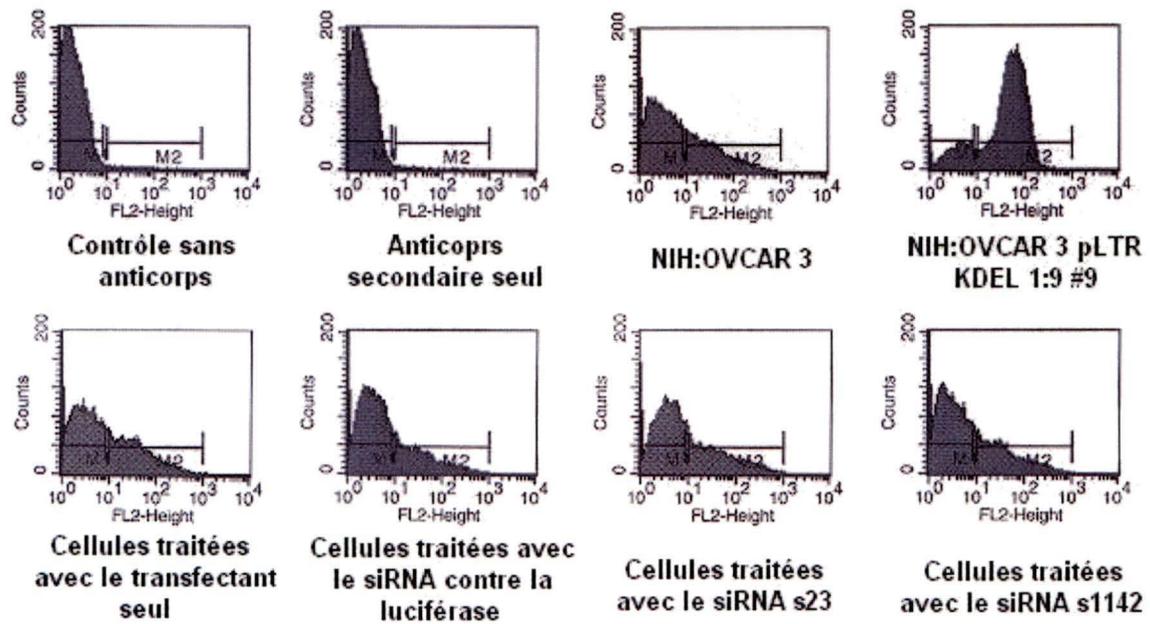


Figure 22 : Mesure de la quantité de la glycoprotéine CD44 membranaire dans les NIH:OVCAR 3 après différentes transfections. Les NIH:OVCAR 3 ont été transfectées avec différentes conditions et incubées 96 heures. Elles ont été ensuite décollées avec de la versène et fixées avec du formaldéhyde 2%. L'expression de CD44 a été évaluée avec l'anticorps anti-CD44 diluée 1:1000 suivi de l'anticorps secondaire anti-souris couplé au PE. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un FACS scan et du programme Cell quest.

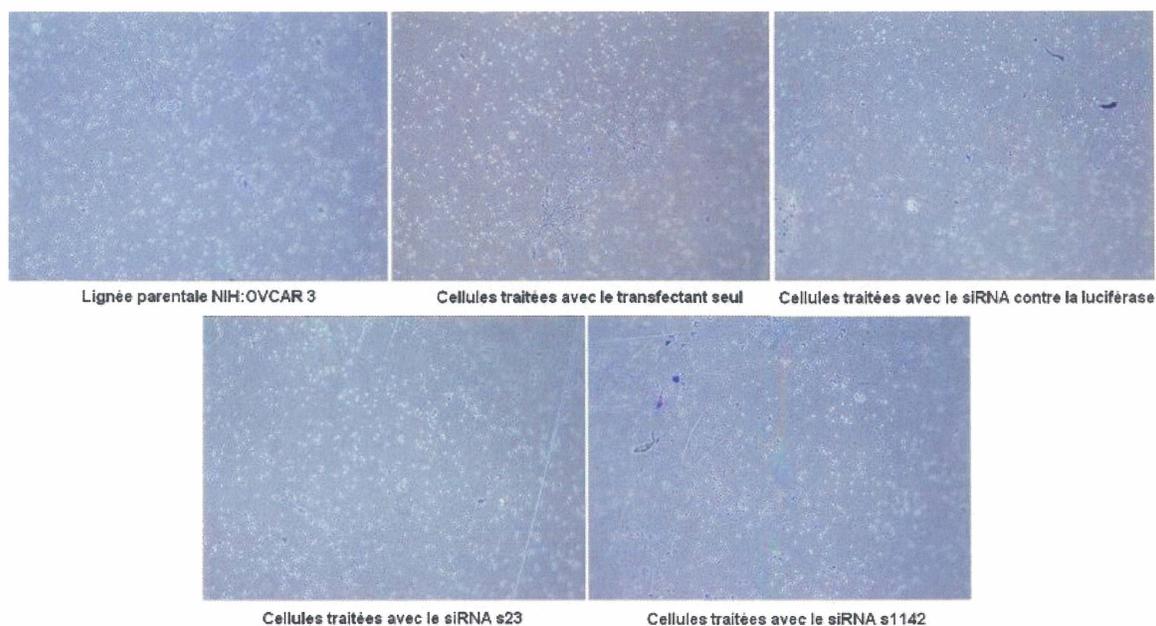


Figure 23 : Évaluation des capacités migratoires des cellules NIH:OVCAR 3 transfectées avec différentes conditions par l'utilisation des chambres de Boyden. Les NIH:OVCAR 3 ont été transfectées avec différentes conditions et incubées 96 heures. Les cellules ont été décollées avec de la versène et 20000 cellules ont étéensemencées dans chacune des chambres de Boyden et incubées à 37°C pendant 48 heures. Les cellules ont ensuite été fixées à l'éthanol 70% et colorées avec du cristal violet 0,5% filtré. Les photos ont été prises à un grossissement de 10X à l'aide d'un microscope à contraste de phase et d'un appareil photo numérique Nikon Coolpix 4500.

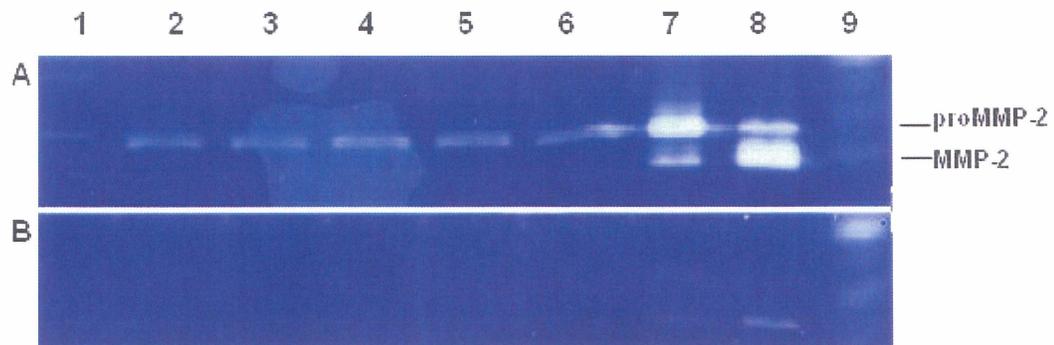


Figure 24 : Mesure de la quantité de métalloprotéinases dans les milieux conditionnés des cellules NIH:OVCAR 3 transfectées avec différentes conditions à partir de zymographie. Les NIH:OVCAR 3 ont été transfectées avec différentes conditions et incubées 72 heures. Les milieux ont été remplacés par du milieu frais sans FBS et incubé 48 heures. Les milieux conditionnés ont subi une électrophorèse de 3 heures sur un gel d'acrylamide 12% contenant 2 μ g/mL de gélatine. Les protéines ont été renaturées en présence de 2,5% de triton et incubées à 37°C en présence de CaCl₂ en absence de 0,1mM de 1,10-phénanthroline (inhibiteur spécifique des MMPs) (A) ou en présence d'inhibiteur (B) pour 16 heures. Le gel a été coloré avec du bleu de Coomassie et décoloré pour obtenir un bon contraste. Puits 1 : sang dilué 1:3; puits 2 : NIH:OVCAR 3; puits 3 : cellules traitées avec l'agent de transfection seulement; puits 4 : cellules traitées avec le siRNA contre la luciférase; puits 5 : cellules traitées avec le siRNA s23; puits 6 : cellules traitées avec le siRNA s1142; puits 7 : proMMP-2 purifié; puits 8 : proMMP-2 purifié activé avec de l'APMA; puits 9 ; Trypsine dilué.

DISCUSSION

En clinique, la réponse aux traitements de chimiothérapie des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire est effectuée par l'analyse des niveaux sériques de la protéine CA125. Même si ce marqueur est fortement utilisé, les connaissances moléculaires en son égard sont peu nombreuses et peu d'information sont connues sur les rôles possibles de CA125 pourrait avoir dans la progression de la maladie. L'analyse sérique des niveaux de CA125 n'indique pas sa provenance et en plus, plusieurs types cellulaires peuvent contribuer à la présence du CA125 sérique comme les cellules mésothéliales (ZEIMET et *al.*, 1996).

Chez toutes les patientes, les cancers ovariens produisent des métastases qui se retrouvent dans la cavité péritonéale. Par contre, il y a peu d'information sur les protéines impliquées dans l'acquisition des capacités métastatiques des cellules ovariennes. Pourtant, parmi plusieurs types cancéreux comme le cancer du pancréas et le cancer du sein, certaines mucines semblent avoir une implication dans la cascade métastatique. Des études sur les protéines MUC1 (KOHLGRAF et *al.*, 2003) et MUC4 (SINGH et *al.*, 2004) dans des modèles *in vivo* ont montré que la présence de MUC1 ou de MUC4 pouvait augmenter l'agressivité des tumeurs. La diminution de MUC4 par un antisens diminue les capacités migratoires de même que le potentiel métastatique des cellules cancéreuses du pancréas. Dans le cas de MUC1, l'expression ectopique de MUC1 dans des cellules peu agressives augmente le caractère agressif des cellules car une augmentation des masses tumorales est observée dans des sites distants. Etant donné que

CA125 est une mucine, on s'est intéressé à évaluer son implication dans ce processus cancéreux. Dans notre cas, nous avons voulu non seulement déterminer si CA125 était impliquée dans la cascade métastatique des tumeurs ovariennes, mais nous avons aussi voulu connaître les protéines associées à chacune des étapes étudiées.

Pour étudier les fonctions possibles de la protéine CA125 dans la cascade métastatique, différents clones stables qui avaient été produits précédemment par Julie Beaudin du laboratoire de Claudine Rancourt ont été utilisés. Ces clones expriment un scFv qui peut lier un épitope retrouvé dans les répétitions de la protéine CA125. Le scFv a été produit de manière à pouvoir passer par la voie de sécrétion grâce à un peptide signal et il restera séquestré au reticulum endoplasmique par une séquence KDEL. Le scFv peut donc lier CA125, le séquestrer dans le réticulum endoplasmique et l'empêcher de se localiser à la membrane cellulaire où il pourrait effectuer ces fonctions. Au début de l'étude, un seul des deux clones stables avait été caractérisé. Dans l'étude des fonctions protéiques, la perte de fonction est souvent une approche utilisée dans la littérature. Par contre, la production de cellules dérivées stables exprimant un scFv est un modèle très peu utilisé dans la littérature mais qui a déjà été utilisé par plusieurs groupes dont le groupe de Hynes et celui de Hemler (JANNOT et al., 1996, YUAN et al., 1996). Pourtant, l'insertion du gène d'intérêt dans le génome peut être problématique. En effet, l'ajout du gène pourrait jouer sur le niveau d'expression de d'autres protéines non désirées. Avoir un seul clone était donc un problème majeur. Alors, pour pouvoir compenser cette limite, nos expériences ont été effectuées en présence d'un second clone soit le clone KDEL 1:9 #7. Les analyses de cytométrie de flux en plus du dosage du

CA125 contenu dans le milieu conditionné des différentes lignées étudiées ont permis de confirmer que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 produisaient moins de CA125 que la lignée parentale ou le clone contrôle KDEL 4:5#12. En fait, une diminution de 80 à 500 fois a été observé aux niveaux de l'expression membranaire de CA125 tandis que les niveaux sécrétés de CA125 étaient de 15 à 45 fois plus faible chez les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7. Étant donné que les expériences ont été fait à l'aide de deux clones indépendants, on peut affirmer que le scFv peut vraiment séquestrer CA125 à l'intérieur de la cellule et empêcher sa translocation à la surface des membranes cytoplasmiques. En plus, le scFv pourrait aussi séquestrer différentes formes alternatives de CA125 qui pourraient être produites. Par contre, les formes alternatives pourraient aussi ne pas avoir les épitopes reconnus par le scFv et permettent la formation d'une protéine qui aurait certaines fonctions au niveau des cellules. Par contre, cette possibilité n'a pas pu être vérifiée présentement, mais il serait intéressant d'avoir un meilleur portrait de ce qui séquestré par le scFv dans la cellule. Plusieurs essais ont été effectués dans le but d'observer la protéine à l'intérieur des cellules, malheureusement aucun d'entre eux a permis de confirmer la présence de CA125 dans le réticulum endoplasmique tandis que le scFv a déjà été observé lors d'une précédente étude dans le réticulum endoplasmique par immunofluorescence indirecte sur lames. Ce phénomène n'est pas un cas isolé car plusieurs groupes dans la littérature observent une diminution du signal de la protéine ciblée dans le RE (BEERLI et al. 1994).

En reprenant quelques expériences dont l'essai de clonogénécité sur plastique et les courbes de croissance cellulaire par XTT, on a pu constater que les deux clones

avaient des comportements similaires. L'essai de clonogénéicité a montré qu'il y a une plus grande quantité de cellules chez les colonies produites par les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7. Par contre, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée de manière expérimentale. Cette essai suggère donc que les cellules ont moins besoin des facteurs qui seraient fournis par les cellules. Par la suite, la pente de la portion exponentielle des courbes des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 obtenues par XTT suggèrent que ces clones ont une prolifération similaire aux contrôles. La différence observée entre les deux essais pourrait s'expliquer par une plus grande capacité à croître de manière isolée des clones qui est une étape importante dans la formation tumorale. Ce phénotype pourrait s'expliquer par une perturbation du cycle cellulaire au niveau de certains régulateurs qui lui permet d'être actif sans les signaux cellulaires habituels. Dans le cas du clone KDEL 1:9 #9, l'analyse du profil génique a montré que la cycline D1 était augmentée de 2 à 2,5 fois tandis que son inhibiteur, p57^{kip2}, était diminué de 3 à 10 fois. Pour confirmer ces résultats, il faudrait vérifier les niveaux d'expression des deux protéines par immunobuvardage de type Western et la progression du cycle cellulaire par une coloration de l'ADN avec du PI qui permet de différencier les phases du cycle cellulaire selon le contenu en ADN des cellules. Une autre hypothèse envisageable serait que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 adhèrent plus vite à leur matrice. Les cellules qui adhèrent plus rapidement pourront initier le cycle cellulaire plus tôt ce qui pourrait être confondu avec une croissance plus rapide.

Dès le début, lors des premières immunofluorescences pour valider l'expression des scFv et de CA125 dans les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7, nous avons pu

observer que la morphologie des cellules n'était plus similaire avec celles des lignées cellulaires contrôles. L'observation des multiples photos a permis de conclure que la perte de CA125 à la membrane cellulaire ou dans le milieu extracellulaire avait une implication sur la morphologie des cellules. Suite à cette constatation, les phénotypes cellulaires ont été vérifiés sur une matrice avec la même composition que la majorité des membranes basales, le Matrigel. Les résultats obtenus à partir de cette expérience suggèrent que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 ont une motilité plus importante étant donné que les cellules possèdent beaucoup plus de lamellipodes dans ces conditions de croissance cellulaire. Le groupe de Stetler-Stevenson avait déjà suggéré que la formation d'extensions pouvait être un signe d'un plus grand potentiel migratoire pour les cellules (ALPER et al., 2001). En fait, non seulement plusieurs extensions sont retrouvées dans les cultures cellulaires mais la taille de celles-ci est plus importante. Dans le but de vérifier si la motilité était affectée dans ces clones, plusieurs expériences de motilité cellulaire ont été effectuées. Nous avons montré que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 avaient une migration plus importante à l'aide de deux méthodes différentes. Même si nos résultats montrent que le clone KDEL 1:9 #7 possède une motilité de 5 à 8 fois plus grande que le clone KDEL 1:9 #9, l'augmentation est encore plus significative lorsqu'on compare les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 avec la lignée parentale et le clone KDEL 4:5 #12. Cette différence est encore plus marquée quand nous utilisons beaucoup de cellules et que ces cellules sont incubées durant une longue période de temps (40000 cellules incubé pendant 48 heures). Ces conditions ne sont pas suffisantes pour permettre la migration des deux contrôles tandis qu'on observe une très forte migration chez les deux clones. Finalement, il n'est pas toujours facile de dissocier la

prolifération des cellules et la migration cellulaire dans des périodes de temps prolongées et ce, même en présence d'hydroxyurée, un inhibiteur de la prolifération cellulaire en phase S. En fait, il est difficile de bloquer la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses en général vues qu'elles ont des altérations dans des gènes impliquées dans la régulation du cycle cellulaire comme la protéine p53 ou les cyclins. Étant donné que nous avons utilisé des temps très courts d'incubation dans nos expériences soit 5 et 16 heures en plus de l'inhibiteur, on peut affirmer que la diminution de CA125 à la membrane des cellules a permis aux cellules d'acquérir un plus grand potentiel migratoire.

Ensuite, une augmentation des niveaux d'expression de CD44 a été observée. Dans la littérature, la glycoprotéine CD44 a déjà été associée avec la motilité des cellules cancéreuses ovariennes (BOURGUIGNON *et al.*, 2001) mais aussi de plusieurs autres types cancéreux (WANG *et al.*, 2005). Au niveau des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7, nous avons observé une élévation plus importante des niveaux d'expression d'environ 10 fois autant par le profil d'expression génique que par l'essai de cytométrie de flux. Afin de vérifier l'implication de cette protéine dans la motilité, des anticorps bloquant anti-CD44 ont été utilisés lors d'un essai de migration avec des chambres de Boyden. Par manque de temps, nous avons seulement effectué une étude préliminaire. Par contre, l'ajout de l'anticorps bloquant anti-CD44 a permis d'observer une inhibition de la migration cellulaire d'environ 50%. On peut conclure que CD44 a bien une fonction dans la motilité des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 mais ils auraient d'autres protéines membranaires qui pourraient aussi jouer un rôle dans la migration. Dans l'analyse de profil d'expression génique, nous avons aussi observé une

augmentation de la protéine membranaire c-Met (le récepteur aux facteurs de croissance hépatocytaires), aussi impliqué dans la migration de certains modèles cellulaires (UEOKA et *al.*, 2003). Il serait possible que ce récepteur est un rôle dans la motilité de nos clones. Par contre, cette hypothèse n'a pas été validée expérimentalement.

Point de vue intéressant, une étude pronostique a déjà été effectuée sur les niveaux de la glycoprotéine CD44 dans les masses tumorales (SARI et *al.*, 2003). Comparé avec l'étude produite sur les niveaux de CA125 sérique (BUT, Igor et Borut GORISEK, 1996), il aurait un taux très faible de CD44 (stade III et IV) lorsque les niveaux sérique de CA125 sont élevés (stade II, III et IV) et lorsque les niveaux sérique de CA125 (stade I) sont relativement faibles, les quantités de CD44 dans les tumeurs seraient plus élevées (stade I et II). Étant donné que nous avons mesuré une baisse des niveaux de CA125 et démontré l'augmentation des niveaux d'expression membranaire de la protéine CD44 par cytométrie de flux, on constate que nos lignées ont un comportement similaire avec la progression de la maladie. L'étude des niveaux d'expression membranaire des deux protéines de même que les niveaux de sécrétion de CA125 dans les ovaires normaux ou dans les tumeurs ovariennes pourraient permettre de mieux comprendre l'évolution des tumeurs ovariennes. De plus, ces informations pourraient permettre d'avoir une meilleure compréhension du processus de réparation après l'ovulation.

Par la suite, nous avons constaté autant par le profil d'expression génique que par l'essai de zymographie une augmentation marquée des niveaux d'expression de la proMMP-2. Cette augmentation a même été confirmée par des essais de PCR en temps

réel. Si on ne peut pas quantifier le zymographe, le PCR en temps réel indique que les niveaux d'expression de la proMMP-2 dans le clone KDEL 1:9 #7 est au moins deux fois plus élevés que l'expression dans le clone KDEL 1:9 #9. Le fait que nous n'ayons pas vu cette variation au niveau des zymographes pourrait s'expliquer par une moins grande sensibilité de cet essai. Regroupé ensemble, tous ces résultats indiquent qu'il y a une importante augmentation des niveaux d'expression de la proMMP-2 dans les deux clones comparativement aux deux lignées contrôles qui ont eu 0,25 unité pour les NIH:OVCAR 3 et 0,15 unité pour le clone KDEL 4:5 #12 par PCR en temps réel contrairement à 3,61 unités pour le clone KDEL 1:9 #9 et 8,37 unités pour le clone KDEL 1:9 #7.

L'évaluation des différentes composantes de l'hétérotrimère nécessaire à l'activation de la proMMP-2 a donné des résultats plutôt intéressants. En effet, dans le milieu conditionné des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7, il y a une augmentation dans les niveaux de sécrétion de la proMMP-2 mais cette augmentation serait inutile dans un contexte physiologique si la protéase reste inactive. Nos résultats permettent de constater pourtant qu'il y a une bande qui est à la hauteur de la forme active de la proMMP-2 soit la MMP-2. Cette bande suggère que les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 auraient un plus grand potentiel invasif. Pour avoir une maturation de la proMMP-2, il faut qu'il y ait une variation dans l'une des composantes permettant le clivage du fragment protégeant le site catalytique de l'enzyme. Initialement, l'étude de PCR en temps réel a indiqué que l'activation de la protéase ne devait pas être causée par une augmentation de la MT1-MMP puisque les niveaux de celle-ci ne sont pas augmentés. Les niveaux de MT1-MMP que nous observés étaient très peu variables entre chacune des lignées cellulaires étudiées et en

plus, les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 avaient une expression similaire, 2,05 et 1,76 respectivement, en plus d'avoir un niveau d'expression plus faible que la ligné parentale (4,75). La variation était peu significative si elle était comparée aux valeurs obtenues pour les niveaux d'expression de la proMMP-2. Par contre, lorsque les niveaux pour la TIMP-2 ont été analysé par zymographie inverse, nous avons constaté une bonne augmentation de la TIMP-2 dans les milieux conditionnés du clone KDEL 1:9 #9 et une augmentation moins intense pour le clone KDEL 1:9 #7. L'élévation de la TIMP-2 dans les deux clones peut être l'élément occasionnant l'activation de la proMMP-2 dans les deux clones.

Comme énoncé précédemment, la présence de MMP-2 active dans le milieu pourrait augmenter le potentiel invasif des cellules. Par contre, même si la présence de l'inhibiteur est essentielle à l'activation de la proMMP-2, la TIMP-2 peut inhiber l'activité catalytique de la MMP-2 dans un cadre physiologique. La dégradation de la matrice par les métalloprotéinase est dépendant de la balance entre les enzymes actives et l'inhibiteur. Dans le but de vérifier le potentiel invasif, nous avons utilisé des essais d'invasion. Les résultats obtenus permettent de conclure que même si les niveaux de sécrétion de la TIMP-2 sont augmentés, les cellules ont un plus grand potentiel invasif. Même si le clone KDEL 1:9 #7 avait une plus grande capacité migratoire, c'est le clone KDEL 1:9 #9 qui avait le plus grand potentiel d'invasion. Cette constatation peut être expliquée probablement par l'importance des niveaux de TIMP-2. Il est possible que cette augmentation entraîne une activation plus importante et plus rapide de la proMMP-2, ce qui aura comme conséquence, une dégradation plus rapide de la matrice. Pour pouvoir

vérifier cette hypothèse, il faudrait mesurer la quantité de Matrigel digéré par les différentes lignées car les chambres d'invasion ne nous informe pas quantitativement sur la capacité à digérer la matrice. De plus, cette expérience pourrait servir à vérifier si les lignées contrôles ont la capacité de digérer la matrice. En effet, dans l'essai d'invasion, on s'attendait à ce que les lignées contrôles ne puissent pas traverser étant donné leur incapacité à pouvoir migrer au travers des pores. Par contre, même si nous n'avons pas observé de MMP-2 active sur les zymographes, la croissance des cellules sur Matrigel avant le test de migration pourrait activer certaines voies cellulaires permettant l'activation des proMMP-2. La liaison de la faible proportion de CD44 dans les lignées contrôles avec l'un de ses ligands pourrait permettre l'augmentation de la production de la proMMP-2. En fait, le groupe de Tanabe a déjà montré que CD44 pouvait réguler l'expression de la proMMP-2 (TAKAHASHI et *al.*, 1999). Dans le cas des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7, l'augmentation de 30 fois des niveaux d'expression de CD44 pourrait être la cause à l'augmentation continue des niveaux de la proMMP-2.

Comme pour MUC1 et MUC4, l'altération de l'expression membranaire de CA125 a eu un effet sur les comportements cellulaires des cellules cancéreuses. Par contre, contrairement aux autres mucines, les effets observés n'allaient pas dans la même direction. Contrairement aux deux autres mucines, lorsque la protéine CA125 est perdue à la membrane cellulaire, les cellules semblent acquérir une plus grande capacité migratoire et un potentiel invasif plus important. Les résultats présentés dans ce document suggèrent que CA125 jouerait un rôle dans le contrôle du potentiel invasif des cellules en altérant les capacités migratoires et les niveaux de sécrétion de certaines

métalloprotéinases de matrice. Par contre, nous sommes incapables de déterminer pour l'instant si la diminution des niveaux d'expression de CA125 induit directement ou indirectement les changements phénotypiques observés. En plus, les résultats semblent suggérer que l'un des éléments nécessaire à l'acquisition des comportements serait CD44. Malheureusement, il y a très peu d'information dans la littérature sur ce qui régule l'expression de la glycoprotéine CD44 et nous ne savons pas si CA125 peut faire de la signalisation dans les cellules.

L'utilisation d'un seul modèle d'étude peut être risquée. Pour compenser ce problème, nous avons tenté de mettre au point des siRNA pouvant induire une diminution des niveaux d'expression de CA125. Après avoir utilisé différentes approches pour produire ces ARN doubles brins, nous avons décidé de les faire synthétiser par la compagnie IDT et de les transfecter dans les cellules sous la forme d'oligoduplexes d'ARN. Une fois en possession des siRNA, leur efficacité a été vérifiée en mesurant les niveaux d'expression de la protéine CA125 à la membrane cellulaire sur des cellules non-perméabilisées. En regardant les graphiques obtenus par cytométrie de flux, on constate que le siRNA s23 n'affecte pas les niveaux d'expression de CA125 car les courbes sont similaires à tous les contrôles contrairement au siRNA s1142 qui peut induire une diminution d'environ 10 fois. Il est important de se rappeler que le siRNA s1142 a la possibilité de s'apparier à plusieurs séquences dans les répétitions en tandem de CA125, ce qui pourrait expliquer l'efficacité de cette séquence. De plus, il ne faut pas oublier que la séquence du N-terminale de CA125 n'est pas encore certaine et que cette incertitude pourrait être la clé pour expliquer l'inefficacité du siRNA s23. En effet, si la portion N-

terminale n'est pas présente, le siRNA ne pourra pas s'apparier et avoir ses fonctions. Par la suite, nous avons vérifié si ce nouvel outil pouvait être utilisé dans différentes lignées cellulaires exprimant des niveaux variables de CA125. Comme les résultats l'indiquent, le siRNA s1142 a la capacité d'induire une diminution dans plusieurs lignées cellulaires.

Nous voulions ensuite confirmer l'efficacité des siRNA en regardant les niveaux d'ARN dans les cellules qui avaient été transfectées transitoirement. Malheureusement, à cause des importantes barres erreurs obtenues pour deux de nos contrôles, il est difficile de conclure sur l'efficacité du siRNA s1142 même si les niveaux protéiques sont très faibles. Par contre, en comparant les cellules non transfectées et les cellules traitées avec le transfectant seul avec les cellules traitées avec le siRNA s1142, on peut voir une certaine tendance. Cette différence associée avec les multiples analyses par cytométrie de flux suggère que les siRNA sont efficaces. Pour s'assurer de leur validité, les buvardages par ligne de type Northern devront être refaits. Ce qui est marquant par contre, c'est que les niveaux d'ARN ne semblent pas refléter la diminution observée au niveau de la protéine. En théorie, les niveaux d'expression d'ARN auraient dû être équivalents ou plus faible que les niveaux protéiques observés par cytométrie. La spécificité de la sonde était vérifiée en utilisant comme contrôle négatif la lignée cellulaire SKOV-3 qui n'exprime pas la protéine CA125. Il serait possible que les siRNA deviennent moins efficaces après un certain temps. Pourtant, des essais qui avaient déjà été effectués dans le laboratoire par Philippe Bernier-Dodier indiquaient que certains siRNA pouvaient être efficaces jusqu'à 5 jours. Pour vérifier si les siRNA perdent de leur efficacité, il faudrait faire un buvardage par point de type Northern avec des extraits de cellules transfectées

transitoirement à différents temps. Une autre explication possible serait que les siRNA auraient d'autres mécanismes d'action. Présentement, dans la littérature, plusieurs auteurs suggèrent que les siRNA pourraient fonctionner comme des miRNA (SHARP et *al.*, 2003). Il ne faut pas oublier que pour être fonctionnel, un siRNA doit avoir un appariement de 100% tandis que le miRNA n'a pas besoin d'être complètement apparié pour pouvoir inhiber la traduction protéique. Au niveau de CA125, chacune des répétitions possède environ 80% d'homologie et le siRNA s1142 reconnaît cette portion de l'ADN complémentaire. Il est donc imaginable que le siRNA pourrait lier différentes régions avec une homologie plus ou moins parfaite et induire un arrêt de la traduction au lieu de générer seulement de l'interférence à l'ARN.

Avec en main un nouvel outil, nous avons voulu reproduire les expériences effectuées avec les clones exprimant un scFv liant CA125. Contrairement à nos attentes, nous n'avons pas constaté d'effets phénotypiques sur les cellules qui ont été transfectées transitoirement avec le siRNA s1142. Les niveaux d'expression de CD44 de même que les niveaux de sécrétion de la proMMP-2 n'ont pas été affecté non plus et ce, même si les niveaux d'expression de CA125 étaient aussi faible que ceux observés dans les clone KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9#7. Finalement, nous ne sommes pas surpris par l'incapacité des cellules à pouvoir traverser les pores des chambres de Boyden après avoir constaté que les niveaux d'expression de CD44 n'étaient pas affectés. Il est possible que le siRNA s1142 n'entraîne pas la dégradation de tous les transcrits d'ARN de CA125. L'un des transcrits pourrait donc générer une forme de CA125 qui serait généralement retenu par

le scFv. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas pu observer d'effet phénotypique.

Par contre, on peut imaginer aussi que l'action de CA125 passerait par l'interaction de la forme soluble avec un récepteur à la membrane cellulaire. Cette interaction pourrait activer certaines voies de signalisation comme AKT ou les MAPK puis finir par induire la suppression de plusieurs gènes. Au niveau des clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7, les niveaux de sécrétion de CA125 soluble sont très faibles comme le démontre l'analyse des milieux conditionnés des différentes lignées cellulaires. Selon l'hypothèse émise précédemment, cette diminution permettrait l'activation de plusieurs gènes dont CD44. En contre partie, aux niveaux des transfections transitoires avec les siRNA, les cellules restent constamment en présence de CA125. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait refaire les transfections avec les siRNA mais en remplaçant cette fois-ci le milieu après 48 heures pour diminuer les niveaux de CA125 dans le milieu conditionné. La perte de CA125 soluble pourrait alors induire l'activation de certains signaux cellulaires et altérer l'expression de différents gènes. Une autre manière de vérifier l'hypothèse serait de placer les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 en présence de CA125 et vérifier s'il y a renversement des changements phénotypiques observables.

Les explications précédentes pourraient bien expliquer les fonctions normales aux niveaux de l'ovaire de même que la réaction des cellules tumorales. Dans un contexte normal, CA125 pourrait produire une barrière comme pour toutes les mucines. Même si la protéine n'est pas détectée dans l'ovaire avec nos anticorps actuels, on ne peut pas

exclure que la protéine n'est pas présente. Lors d'un bris de l'épithélium ovarien pendant l'ovulation, la perte du CA125 soluble à la proximité des cellules pourrait générer une augmentation de la migration et une plus grande sécrétion de métalloprotéinases pour permettre la réparation du tissu épithélial ovarien endommagé. Dans le cas des tumeurs ovariennes, la perte du CA125 soluble à proximité des masses tumorales pourrait augmenter l'agressivité des tumeurs et favoriser la dégradation de la membrane basale du péritoine et la formation des multiples métastases retrouvées généralement dans l'ascite des patientes. La diminution du CA125 soluble à proximité des tumeurs pourrait être occasionnée par la réaction inflammatoire à cause de la masse tumorale qui diluerait le CA125 soluble.

En cherchant à trouver le lien entre CA125 et la glycoprotéine CD44, on pourrait mieux comprendre certaines fonctions possibles de la protéine CA125 dans les tissus épithéliaux. On pourrait montrer que le CA125 membranaire et que le CA125 soluble pourraient avoir des fonctions distinctes dans l'épithélium ovarien normal ou tumoral. Finalement, la compréhension des fonctions possibles de CA125 permettrait d'avoir une meilleure idée sur la progression de la maladie.

CONCLUSION

Suite à la constatation que plusieurs mucines pouvaient être impliqués dans des comportements cellulaires associées avec la cascade métastatique, nous avons étudié la possibilité que la mucine CA125 puisse, elle aussi, avoir un rôle dans ce processus. Initialement, nous avons caractérisé un second clone (KDEL 1:9 #7) exprimant un scFv pouvant lier la protéine CA125 et montré, que ce clone avait des comportements similaires au clone (KDEL 1:9 #9) qui avait déjà été caractérisé.

À l'aide des différentes approches utilisées dans cette étude, nous avons par la suite montré que la diminution du CA125 à la membrane des cellules et dans le milieu extracellulaire permettait d'accroître les capacités migratoires des cellules et augmentait les niveaux de sécrétion de certaines métalloprotéinases de matrice dont la proMMP-2. Ces altérations permettent aux cellules d'acquies un plus grand potentiel invasif dans un contexte *in vitro*. Malheureusement, ces comportements n'ont pas été reproduits par les transfections transitoires du siRNA s1142 qui peut diminuer les niveaux d'expression membranaire de CA125 au même niveau que les deux clones exprimant le scFv pouvant lier CA125.

En perspective, la génération des clones stables avec les siRNA est envisagée pour permettre d'induire une diminution du CA125 membranaire à plus long terme. Ces clones permettront de constater si la diminution induite par le siRNA s1142 permettra la modulation des gènes observés chez les clones exprimant le scFv. Par la suite, il faudra

tenter de trouver le lien possible entre la diminution d'expression de la protéine CA125 et l'élévation de CD44. L'une des manières serait de vérifier l'implication du CA125 soluble sur les clones KDEL 1:9 #9 et KDEL 1:9 #7 en cultivant les clones en présence de milieux conditionnés contenant du CA125 soluble. Cette vérification permettra de constater si l'augmentation de CD44 ou des MMPs est induite par l'interaction de CA125 avec un récepteur cellulaire. Finalement, il faudra vérifier si les lignées contrôles sont capables de dégrader la matrice.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, le Dre Claudine Rancourt pour m'avoir accepté dans son laboratoire pendant ces trois dernières années pour son soutien et pour l'intérêt qu'elle a mis vis-à-vis mon projet. J'aimerais souligner que j'ai appris énormément au point de vue scientifique de même que personnel pendant la durée de ma maîtrise et que je suis devenu meilleur dans les présentations orales ce qui est pour moi une très grande réussite. Évidemment, je n'aurais jamais fait autant de progrès si Claudine ne m'avait pas aidé à l'aide de ses nombreux conseils.

Je veux aussi remercier le Dr Benoît Paquette et son laboratoire pour les nombreuses discussions que nous avons eues. Ils m'ont aidé à mieux comprendre plusieurs concepts sur la migration et l'invasion cellulaire. De plus, j'aimerais remercier Catherine Batiste pour avoir effectué et analysé les PCR en temps réel que j'ai présenté dans ce mémoire.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes (stagiaires, techniciens, assistant de recherche) du laboratoire que j'ai eu la chance de côtoyer dont Julie Beaudin, une ancienne, pour avoir produit les clones que j'ai utilisés et qui m'ont permis la réalisation d'une bonne partie de mon projet. Je veux ensuite remercier particulièrement Philippe Bernier-Dodier, Sylvain L'Espérance, Michel Paquette, Maxime Tremblay, Geneviève Levasseur et Julie Drouin qui sont tous devenus mes bons amis et avec qui j'ai passé énormément de temps à discuter autant de science que de divers sujets.

Finalement, je tiens à remercier mes parents qui m'ont toujours encouragés à étudier et pour leur support moral et financier qu'ils m'ont offert tout le long de mes études.

BIBLIOGRAPHIES

AGRAWAL B. GENDLER S.J. et LONGUENECKER B.M. *The biological Role of Mucins in Cellular Interactions and Immune Regulation: Prospect for Cancer Immunotherapy*, Molecular medicine today, p.397 à 403, 1998.

ALPER Ö., BERGMANN-LEITNER E.S., BENNETT T.A., HACKER N.F., STROMBERG K., et STETLER-STEVENSON W.G. *Epidermal Growth Factor Recertor Signalling and the Invasive Phenotype of Ovarian Carcinoma Cells*, Journal of the National Cancer Institute, 93(18), p. 1375 à 1384, 2001.

ANGELL S.M. et BAULCOMBE D.C. *Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA*. EMBO Journal, 16, 3675–3684, 1997.

ARGÜESO P., SPURR-MICHAUD S., RUSSO C.L., TISDALE A. et GIPSON I.K. *MUC16 Mucin Is Expressed by the Human Ocular Surface Epithelia and Carries the H185 Carbohydrate Epitope*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 44(6), p.2487 à 2495, 2003.

AUERSPERG N., WONG A.S.T., CHOI K., KANG S.K. et LEUNG P.C.K. *Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology*, Endocrine reviews, 22(2), p.255 à 288, 2001.

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. Jr., KNAPP R.C. *A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer*, The New England Journal of Medicine, 309(15), p. 883-887, 1983.

BECK V., HEROLD H., BENGE A., LUBER B., HUTZLER P., TSCHESCHE H., KESSLER H., SCHMITT M., GEPPERT H. et REUNING U. *ADAM15 decreases integrin $\alpha V\beta 3$ /vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RDG-dependent fashion*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37, p.590 à 603, 2005.

BEERLI R.R., WELS W. et HYNES N.E. *Intracellular Expression of Single Chain Antibodies Reverts ErbB-2 Transformation*, The Journal of Biological Chemistry, 269(39), p. 23931 à 23936, 1994.

BESSON A., ASSOIAN R.K. et ROBERTS J.M. *Regulation of the cytoskeleton: An oncogenic function for CDK inhibitors?*, Nature Reviews Cancer, 4, p. 948 à 955, 2004.

BOURGUIGNON L.Y.W., ZHU H., SHAO L. et CHEN Y. *CD44 Interaction with c-Src Kinase Promotes Cortactin-mediated Cytoskeleton Function and Hyaluronic Acid-*

dependent Ovarian Tumor Cell Migration, The Journal of Biological Chemistry, 276(10), p. 7327 à 7336, 2001.

BRUMMELKAMP T.R., BERNARDS R. et AGAMI R. *A System for Stable Expression of short Interfering RNAs in Mammalian Cells*, Science, 296, p.550 à 553, 2002.

BUT I. et GORISEK B. *Preoperative Value of CA125 as a Reflection of Tumor Grade in Epithelial Ovarian Cancer*, Gynecologic Oncology, 63, p. 166 à 172, 1996.

CHINTALA S.K. et RAO J.S. *Matrix metalloproteinases: Regulation and biological function*, Procedure in Indian Academy of Science, 111(1), p. 263 à 273, 1999.

CRAMER D.W. et WELCH W.R. *Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis*, Journal of the National Cancer Institute, 71(4), p. 717 à 721, 1983.

CULTY M., MIYAKE K., KINCADE P.W., SILORSKI E., BUTCHER E.C. et UNDERHILL C. *The Hyaluronate Receptor is a Member of the CD44(H-CAM) Family of Cell Surface Glycoproteins*, The Journal of Cell Biology, 111(6), p. 2765 à 2774, 1990.

DUA R.S., GUI G.P.H. et ISACKE C.M. *Endothelial adhesion molecules in breast cancer invasion into the vascular and lymphatic systems*, ESJO, 31, p. 824 à 832, 2005.

DEKKER J., ROSSEN J.W.A., BÜLLER H.A. et EINERHAND A.W.C. *The MUC family: an obituary*, Trends in Biochemical Sciences, 27(3), p.126 à 131, 2002.

DOENCH J.G., PETERSEN C.P. et SHARP, P.A. *siRNAs Can Function as miRNAs*, *Genes & Development*, 17, p. 438 à 442, 2003.

DONG Y., KAUSHAL A., BUI L., CHU S., FULLER P.J., NICKLIN J., SAMARATUNGA H. et CLEMENTS J.A. *Human Kallikrein 4 (KLK4) Is Highly Expressed in Serous Ovarian Carcinomas*, *Clinical Cancer Research*, 7, p.2363 à 2371, 2001.

FATHALLA M.F. *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?*, *Lancet*, 2(7716), p163, 1971.

FREEDMAN R.S., DEEVERS M., LIU J. et WANG E. *Peritoneal inflammation – A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC)*, *Journal of Translational Medicine*, 2(23), 2004.

HANISCH F. et MÜLLER S. *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin*, *Glycobiology*, 10(5), p.439 à 449, 2000.

HITTI E.G., SALLACZ N.B., SCHOTF V.K. et JANTSCH M.F. *Oligomerization activity of a double-stranded RNA-binding domain*, *FEBS Letter*, 574, p.25-30, 2004.

HOLLINGSWORTH M.A. et SWANSON B.J. *Mucins in cancers : Protection and control of the cell surface*, Nature Reviews Cancer, 4, p. 45 à 60, 2004.

JANNOT C.B., BEERLI R.R., MASON S., GULLICK W.J., HYNES N.E. *Intracellular Expression of a Single Chain Antibodies Directed to the EGFR Leads to Growth Inhibition of Tumor Cells*, Oncogene, 13, p. 275 à 282, 1996.

KANEKO S.J., GERASIMOVA T., SMITH T., LLOYD K.O., SUZUMORI K. et YOUNG S.R. *CA125 UQCRFS1 FISH Studies of Ovarien Carcinoma*, Gynecologic Oncology, 90, p. 29 à 36, 2003.

KOHLGRAF K.G., GAWRON A.J., HIGASHI M., MEZA J.L., BURDICK M.D., KITAJIMA S., KELLY D.L., CAFFREY T.C. et HOLLINGSWORTH M.A. *Contribution of the MUC1 Tandem Repeat and Cytoplasmic Tail to Invasive and Metastatic Properties of a Pancreatic Cell Line*, Cancer Research, 63, p. 5011 à 5020, 2003.

KONISHI I., FRENDRICK J.L., PARMLEY T.H., QUIRK Jr J.G. et O'BRIEN T.J. *Epidermal Growth Factor Enhances Secretion of the Ovarian Tumor-Associated Cancer Antigen CA 125 From the Human Amnion WISH Cell Line*, Journal of Society for Gynecologic Investigation, 1(1), p. 89 à 96, 1994.

LADEDA V., AGUIRRE GHISO J.A. et BAL de KIER JOFFÉ E. *Function and expression of CD44 during Spreading, Migration, and Invasion of Murine Carcinoma Cells*, Experimental Cell Research, 242, p.515 à 527, 1998.

LI Y. REN J., YU W., LI Q., KUWAHARA H., YIN L., CARRAWAY III K.L. et KUFÉ D. *The Epidermal Growth Factor Receptor Regulates Interaction of the Human DF3/MUC1 Carcinoma Antigen with c-Src and β -Catenin*, The Journal of Biological Chemistry, 276(38), p. 35239 à 35242, 2001.

LI Y., YU W., REN J., CHEN W., HUANG L., KHARBANDA S., LODA M. et KUFÉ D. *Heregulin Targets γ -Catenin to the Nucleolus by a Mechanism Dependent on the DF3/MUC1 Oncoprotein*, Molecular Cancer Research, 1, p. 765 à 775, 2003.

LOBERG R.D., FRIDMAN Y., PIANTA B.A., KELLER E.T., McCAULEY L.K., TAICHMAN R.S. et PIANTA K.J. *Detection and Isolation of Circulating Tumor Cells in Urologic Cancer: A Review*, Neoplasia, 6(4), p. 302 à 309, 2004.

MAEDA T. et al. *Solution Structure of the SEA Domain from the Murine Homologue of Ovarian Cancer Antigen CA125 (MUC16)*, The Journal of Biological Chemistry, 279(13), p. 13174 à 13182, 2004.

MAKOWSKI G.S. et RAMSBY M.L. *Calibrating Gelatin Zymograms with Human Gelatinase Standards*, Analytical Biochemistry, 236, p. 353 à 356, 1996.

MENSDORFF-POUILLY S.V., SNJEWINT F.G.M., VERSTRAETEN A.A., VERHEIJEN R.H.M. et KENEMANS P. *Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein*, The International Journal of Biological Markers, 15(4), p. 343 à 356, 2000.

MIYAGISHI M. et TAIRA K. *U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells*, Nature Biotechnology, 19, p.497 à 500, 2002.

MONIAUX N., VARSHNEY G.C., CHAUHAN S.C., COPIN M.C., JAIN M., WITTEL U.A., ANDRIANIFAHANANA M., AUBERT J. et BATRA S.K. *Generation and Characterization of Anti-MUC4 Monoclonal Antibodies Reactive with Normal and Cancer Cells in Humans*, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 52(2), p.253 à 261, 2004.

O'BRIEN T.J., TANIMOTO H., KONISHI I. et GEE M. *More than 15 years of CA 125: What is known about the antigen, its structure and its function*, The International Journal of Biological Markers, 13(4), p. 188 à 195, 1998.

O'BRIEN T.J. BEARD J.B., UNDERWOOD L.J., DENNIS R.A., SANTIN A.D. et YORK L. *The CA125 Gene: An Extracellular Superstructure Dominated by Repeat Sequences*, Tumor Biology, 22, p. 348 à 366, 2001.

O'BRIEN, T.J., BEARD J.B., UNDERWOOD L.J. et SHIGEMASA K. *The CA125 Gene: A newly Discovered Extension of the Glycosylated N-Terminal Domain Doubles the Size of This Extracellular Superstructure*, Tumor Biology, 23, p. 154 à 169, 2002.

OKAMOTO I., KAWANO., MURAKAMI D., SASAYAMA T., ARAKI N., MIKI T., WONG A.J. et SAYA H. *Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway*, The journal of Cell Biology, 155(5), p. 755 à 762, 2001.

OLIVER G.W., LEFERSON J.D., STETLER-STEVENSON W.G., et KLEINER D.E. *Quantitative Reverse Zymography: Analysis of Picogram Amounts of Metalloproteinase Inhibitors Using Gelatinase A and B Zymograms*, Analytical Biochemistry, 244, p. 161 à 166, 1997.

OZOLS R.F. *American Cancer Society : Atlas of Clinical Oncology Ovarian Cancer*, BC Decker Inc, Philadelphia, p. 39 à 40, 2003.

OZOLS R.F., BOOKMAN M.A., CONNOLLY D.C., DALY M.B., GODWIN A.K., SCHILDER R.J., XU X., HAMILTON T.C. *Focus on epithelial ovarian cancer*, Cancer Cell, 5, p. 19 à 24, 2004.

RAINA D., KHARBANDA S. et KUFÉ D. *The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic PI3K and Bcl-XL pathways in rat 3Y1 fibroblasts*, JBC Paper in Press, p. 1 à 31, 2004.

REN J., AGATA N., CHEN D., LI Y., YU W., HUANG L., RAINA D., CHEN W., KHARBANDA S., KUFU D. *Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents*, *Cancer Cell*, 5, p. 163 à 175, 2004.

RUMP A., MORIKAWA Y., TANAKA M., MINAMI S., UMESAKI N., TAKEUCHI M. et MIYAJIMA A. *Binding of Ovarian Cancer Antigen CA125/MUC16 to Mesothelin Mediates Cell Adhesion*, *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10), p. 9190 à 9198, 2004.

SCHLAEPFER D.D., MITRA S. et ILIC D. *Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase*, *Biochimica et Biophysica Acta* in press, p.1 à 26, 2004.

SARI S., ANTTILA M.A., VOUTILAINEN K., TAMMI R.H., TAMMI M.I., Seppo V. SAARIKOSKI S.V et KOSMA V. *CD44 Expression Indicates Favorable Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer*, *Clinical Cancer Research*, 9, p. 5318 à 5324, 2003.

SCHWARZ D., HUTVAGNER G., DU T., XU Z., ARONON N. et ZAMORE P.D. *Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex*, *Cell*, 115, p. 199 à 208, 2003.

SCOTTON C.J., WILSON J.L., MILLIKEN D., STAMP G. et BALKWILL F.R. *Epithelial Cancer Cell Migration: A Role for Chemokine Receptors?*, *Cancer Research*, 61, p. 4961 à 4965, 2001.

SEELENMEYER C., WEGEHINGEL S., LECHNER J. et NICKEL W. *The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1*, Journal of Cell Science, 116(7), p. 1305 à 1318, 2003.

SINGH A.P., MONIAUX N., CHAUHAN S.C., MEZA J.L. et BATRA S.K. *Inhibition of MUC4 Expression Suppresses Pancreatic Tumor Cell Growth and metastasis*, Cancer research, 64, p.622 à 630, 2004.

SPICER A.P., ROWSE G.J., LIDNER T.K. et GENDLER S.J. *Delayed Mammary Tumor Progression in Muc-1 Null Mice*, The Journal of Biological Chemistry, 270(50), p. 30093 à 30101, 1995.

STACK M.S. ELLERBROEK S.M. et FISHMAN D.A. *The role of proteolytic enzymes in the pathology of epithelial ovarian carcinoma (Review)*, International Journal of Oncology, 12, p. 569 à 576, 1998.

TAKAHASHI K., ERO H. et TANABE K.K. *Involvement of CD44 in Matrix Metalloprotéinase-2 Regulation in Human Melanoma Cells*, Int J. Cancer, 80, p.387 à 395, 1999

TANTIVEJKUL K., KALIKIN L.M. et PIENTA K.J. *Dynamic Process of Prostate Cancer Metastasis to Bone*, Journal of Cellular Biochemistry, 91, p. 706 à 717, 2004

TOMARI Y. et ZAMORE P.D. *Perspectiv: machines for RNAi*, Genes & Development, 19, p. 517 à 529, 2005.

UEOKA Y., KATO K. et WAKE N. *Hepatocyte Growth Factor Modulates Motility and Invasiveness of Ovarian Carcinomas via Ras Mediated Pathway*, Molecular and Cellular Endocrinology, 202, p. 81 à 88, 2003.

WANG, H., HUNG Y., SU C., PENG S., GUO Y., LAI M., LIU C., HSU J. *CD44 Cross-Linking Induces Integrin-Mediated Adhesion and Transendothelial Migration in Breast Cancer Cell Line by Upregulation of LPA-1(α L β 2) and VLA (α 4 β 1)*, Experimental Cell Research, 304, p. 116 à 126, 2005.

WEIS S., CUI J., BARNES L. et CHERESH D. *Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis*, The journal of cell biology, 167(2), p. 223 à 229, 2005.

WEN Y., CAFFREY T.C., WHEELOCK M.J., JOHNSON K.R., et HOLLINGSWORTH M.A. *Nuclear Association of the Cytoplasmic Tail of MUC1 and β -Catenin*, The Journal of Biological Chemistry, 278(39), p. 38029 à 38039, 2003.

YIN B. et LLOYD K.O. *Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen*, Journal of Biological Chemistry, 276(29), p. 27371-27375, 2001.

YUAN Q., STRAUCH K.L., LOBB R.R. et HEMLER M.E. *Intracellular Single-Chain Antibody Inhibits Integrin VLA-4 Maturation and Function*, *Biochemistry Journal*, 318, p. 591 à 596, 1996.

ZEIMET A.G., MARTH C., OFFNER F.A. OBRIST P., UHL-STEIDL M., FEICHTINGER H., STADLMANN S., DAXENBICHLER G. et DAPUNT O. *Human Peritoneal Mesothelial Cells Are More Potent Than Ovarian Cancer Cells in Producing Tumor Marker CA-125*, *Gynecologic Oncology*, 62, p. 384 à 389, 1996.

ZHENG D., WOODARD A.S., FORNARO M., TALLINI G. et LANGUINO L.R. *Prostatic Carcinoma Cell Migration via $\alpha_v\beta_3$ Integrin Is Modulated by a Focal Adhesion Kinase Pathway*, *Cancer Research*, 59, p. 1655 à 1664, 1999.