

FACULTÉ DE MEDECINE ET DES SCIENCES DE LA SANTÉ
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**Le rôle de la partie C-terminale de la mucine MUC16 (CA125) dans la transformation
des cellules et dans la tumorigénèse du cancer ovarien**

par

Panagiota Giannakouros

mémoire présenté au Département d'anatomie et de biologie cellulaire en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Sherbrooke, Québec, Canada, Juillet 2015

Évaluateurs: Du département de microbiologie et d'infectiologie, Dr. Alain Piché (Directeur des
travaux) Du département d'anatomie et de biologie cellulaire, Dre Nathalie Perreault et Dr.
Benoît Paquette

Résumé

Le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus mortel. La mortalité associée à ce cancer est en grande partie relié au diagnostic tardif de la maladie. Malgré l'évolution des traitements durant les 30 dernières années, le cancer de l'ovaire reste difficile à traiter et à dépister.

Pendant les premiers événements de la transformation tumorale et dans les stades ultérieurs de la progression du carcinome ovarien, il se produit plusieurs changements. Les caractéristiques épithéliales des cellules seront favorisées, l'expression de N-cadhérine sera favorisée et le profil d'expression de plusieurs protéines sera influencé. Notamment l'expression des mucines, dont l'apparition de l'expression de la mucine MUC16. MUC16 (CA125) est une glycoprotéine de type mucine qui est surexprimée dans 80 % des cancers ovariens épithéliaux (CEO) et par les cellules de la surface de l'ovaire transformé. Cependant, elle n'est pas exprimée dans l'épithélium des ovaires normaux. Puisque les cellules épithéliales de l'ovaire ne l'expriment pas, il est logique de se demander si son expression ne confère pas un avantage aux cellules cancéreuses or, on connaît très peu de son rôle dans la pathogenèse des CEO.

Des résultats préalablement obtenus par notre laboratoire indiquent que la partie C-terminale de MUC16 joue un rôle important dans la migration, l'invasion, le processus métastatique et dans la tumorigénèse. Ces observations suggèrent un rôle précoce de MUC16 dans la pathogenèse du CEO. Toutefois, son rôle précis dans la transformation cellulaire n'a pas été établi. Afin d'approfondir nos connaissances sur les fonctions de MUC16 dans la transformation cellulaire, la partie C-terminale de MUC16 (MUC16-CTD) a été exprimée de façon stable dans un modèle classique utilisé afin de déterminer le potentiel ontogénique d'une protéine, soit les fibroblastes de souris NIH3T3 et dans les cellules ovariennes de la surface épithéliale (OSE) immortalisées par la télomérase. Des clones indépendants ont été sélectionnés et l'expression de MUC16-CTD a été validée. Par la suite, nous avons procédé à des essais standards de transformation, soit la formation de foyers en conditions adhérees et non-adhérees, la prolifération cellulaire en présence de concentrations faibles et normales de sérum et la formation de tumeurs sous-cutanées. Des clones stables ont été obtenus et évalués pour l'expression de MUC16-CTD. Deux clones indépendants ont été sélectionnés (CTD1 et CTD2) et l'expression de MUC16-CTD a été validée par immunobuvardage, PCR et immunofluorescence. Les cellules exprimant MUC16-CTD ont formé significativement plus de foyers en conditions adhérees et non-adhérees. On a aussi observé une augmentation de la prolifération dans les cellules exprimant MUC16-CTD en conditions normales et appauvries de sérum. Finalement, nous avons observé la formation de tumeurs sous-cutanées dans les souris NUDE.

En conclusion, ces résultats suggèrent que MUC16-CTD est suffisant pour induire la transformation des cellules NIH3T3 et des cellules OSE immortalisées.

Mots Clés: Cancer de l'ovaire, MUC16, transformation, tumorigénicité, oncogène

Tables des Matières

Résumé	III
Liste de figures	IX
Liste des tableaux	X
Liste des signes, abréviations et symboles	XI
Introduction	1
1. Cancer de l'ovaire.....	1
1.1 Les statistiques.....	1
1.2 Le développement du cancer de l'ovaire.....	2
1.3 Pathologie et classification.....	4
1.3.1 Classification histopathologique.....	4
1.3.2 Le stade.....	5
1.3.3. Le grade.....	7
1.4 Diagnostic, suivi et traitement.....	7
2. Cancer épithélial de l'ovaire.....	9
2.1 L'origine du cancer épithélial de l'ovaire.....	9
2.2 Les sous-types du cancer épithélial de l'ovaire.....	10
2.3 Modèle moléculaire.....	12
2.3.1 Tumeurs de type 1.....	13
2.3.2 Tumeurs de type 2.....	14
2.4 L'épithélium de l'ovaire et la transformation maligne des cellules OSE.....	16
2.5 Modèle pour étudier la transformation.....	17
3.0 Les mucines.....	18
3.1 La famille des mucines.....	18
3.2 Le rôle des mucines dans le cancer.....	19
4.0 MUC16 (CA125).....	22
4.1 Historique et importance clinique.....	22
4.2 Expression de MUC16.....	23
4.3 Structure de MUC16.....	25
4.4 Rôles de MUC16 dans le cancer de l'ovaire.....	29
4.4.1 Rôle associé à la partie extracellulaire.....	29

4.4.2 Rôle associé à la partie C-terminale.....	32
4.5 Voie signalisation de MUC16.....	35
5. Modèles cellulaires établis au laboratoire pour l'étude fonctionnelle de MUC16	40
5.2 Modèle perte de fonction (knockdown)	41
5.3 Résultats obtenus au laboratoire	42
6. Hypothèse et objectifs.....	44
Matériel et Méthodes	45
7. Lignées cellulaires utilisées et culture cellulaire.....	45
8. Construction des lentivirus	48
8.1 Construction du vecteur pLenti6V5 avec les tags.....	48
8.2 Construction du vecteur pLenti6V5-tags-CTD.....	51
8.3 Transformation des bactéries	53
8.4 Analyse des vecteurs pLenti/Adapteur CTD positifs.....	54
8.5 Production des lentivirus.....	54
9. Infection des lignées cellulaires et établissement de populations stables	57
10. Extraction d'ARN	58
11. RT-PCR.....	59
12. Immunobuvardage de type Western	60
13. Immunofluorescence.....	63
14. Comparaison de la morphologie	65
15. Formation de foyers post confluence	65
16. Croissance en présence d'ancrage limité.....	65
17. Formation de sphéroïdes	66
17.1 Méthode de la goutte inversée	66
17.2 Test d'agrégation	66
19. Formation de tumeurs chez les souris	67
20. Évaluation des tumeurs	68
20.1 Coupe histologique	68
20.2 Extraction de l'ARN	69
21. Micropuce	70
Résultats	71
22. Infection et validation de la lignée cellulaire immortalisées non-transformée NIH3T3	71

22.1 Infection et validation des populations	72
22.2 Validation des clones indépendants	74
22.2.1 RT-PCR.....	74
22.2.2 Immunobuvardage	75
22.2.3 Immunofluorescence	76
23. Expériences d'évaluation de la transformation.....	77
23.1 Changement de morphologie	77
23.2 Formation de foyers post-confluence.....	78
23.3 Prolifération	79
23.4 Croissance en absence d'ancrage.....	81
24. Évaluation des différentes caractéristiques associées à la tumorigénèse	82
24.1 Formation de sphéroïdes	82
24.2 Croissance chez les souris NUDE.....	84
24.2.1 Analyse de l'expression de différentes protéines dans les tumeurs.....	86
25. Analyse de l'expression protéique de différentes protéines	88
26. Infection et validation de la lignée cellulaire OVN non-immortalisées non-transformée	91
26.1 Infection des OSE	91
26. Validation.....	93
26.2.1 RT-PCR.....	93
26.2.2 Immunofluorescence	94
27. Expériences d'évaluation de la transformation.....	95
28.1 Infection	96
28.2 Validation.....	97
28.2.1 RT-PCR.....	97
28.2.2 Immunobuvardage	98
28.2.3 Immunofluorescence	100
29. Expériences d'évaluation de la transformation.....	101
29.1 Changement de morphologie	101
29.2 Formation de foyers post-confluence.....	102
29.3 Prolifération	103
29.4 Croissance en absence d'ancrage.....	105
30. Évaluations des différentes caractéristiques associées à la tumorigénèse.....	106

30.1 Formation de sphéroïde.....	107
32. Analyse patron d'expression des protéines d'adhésion.....	109
32.1 IF et Western pour la N-cadhérine.....	109
31.2 IF et Western pour la E-cadhérine	111
31.3 IF et Western pour la β -caténine.....	112
32. Analyse de différentes composantes du cytosquelette.....	114
32.1 IF pour les cytokératines 8 et 18	114
32.2 IF pour la vimentine.....	115
32.3 IF pour l'actine	116
33. Gènes identifiés par la Micropuce	117
Discussion	125
Rappel	125
34. La lignée cellulaire immortalisées non-transformée NIH3T3	126
34.1 MUC16-CTD induit un léger changement de morphologie.....	126
34.2 MUC16 -CTD favorise la perte d'inhibition de contact.....	127
34.3 MUC16-CTD stimule la prolifération.....	127
34.4 MUC16-CTD favorise la capacité de croissance en absence d'ancrage.....	128
34.5 MUC16-CTD favorise la formation de sphéroïdes.....	130
34.6 MUC16-CTD semble favoriser la formation de tumeurs.....	131
34.7 MUC16-CTD semble stimuler la prolifération via la phase G1.	132
35. La lignée cellulaire non-immortalisée et non-transformée OSE.....	133
35.1 La partie C-terminale de MUC16 n'est pas suffisante pour immortaliser et transformer les OSE	133
36. La lignée cellulaire immortalisée non-transformée OVNT-95-hTERT	134
36.1 MUC16-CTD induit un changement de morphologie.....	134
36.2 MUC16-CTD favorise la perte d'inhibition de contact.....	135
36.3 MUC16-CTD stimule la prolifération.....	135
36.4 MUC16-CTD favorise la capacité de croissance en absence d'ancrage.....	136
36.5 MUC16-CTD favorise la formation de sphéroïdes.....	137
36.6 Analyse de l'expression des protéines adhésion.....	138
36.6.1 L'expression de la N-cadhérine et de la E-cadhérine n'est pas influencée par MUC16-CTD	138
36.6.2 L'expression de la β -caténine n'est pas influencée par MUC16-CTD.....	139

36.7 Analyse de l'expression des protéines adhésions	141
36.7.1 MUC16-CTD favorise une EMT chez les populations OVNT95 hTERT	141
36.7.2 Le patron d'expression de la F-actine.....	142
37. Micropuce	143
Conclusion	146
Perspectives	148
Remerciements	150
Annexes	152
Références.....	152

Liste de figures

Figure 1 : Localisation des ovaires dans le corps.....	3
Figure 2: Origine des trois principaux types de tumeurs ovariennes et leurs sous-types	4
Figure 3: Les différents sous-types histopathologique du cancer épithélial de l'ovaire	12
Figure 4: Structure schématique de MUC16.....	26
Figure 5: Comparatif des structures des mucines MUC1, MUC4 et MUC16	28
Figure 6: Construction de MUC16-CTD et MUC16 TMU ainsi que le vecteur utilisé	41
Figure 7: Les différentes étapes de la construction du plasmide plenti6V5-tags-MUC16-CTD	52
Figure 8: Les plasmides utilisés pour la production de lentivirus.....	56
Figure 9: Efficacité d'infection des NIH3T3.....	72
Figure 10: Validation des populations des populations NIH3T3-CTD par RT-PCR	73
Figure 11 : Validation des clones indépendants NIH3T3-CTD par RT-PCR	74
Figure 12: Validation des clones indépendants NIH3T3-CTD par Immunobuvardage	75
Figure 13: Validation des clones indépendants NIH3T3-CTD.....	76
Figure 14: Morphologie des différentes populations NIH3T3	77
Figure 15: Formation de foyers de transformation	79
Figure 16: Courbe de croissance	80
Figure 17: Formation de colonies en absence d'ancrage	82
Figure 18: Formation de sphéroïdes.....	83
Figure 19: . Croissance chez les souris NUDE	86
Figure 20: Coupe histologiques des tumeurs	87
Figure 21: L'expression protéique de différentes protéines.....	90
Figure 22: Efficacité d'infection des OSE	92
Figure 23: Validation des populations des populations OSE-CTD par RT-PCR.....	93
Figure 24: Validation des populations OSE-CTD	94
Figure 25: . Morphologie des OSE	95
Figure 26: Efficacité d'infection des OVNT95 hTERT.....	97
Figure 27: Validation des clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD par RT-PCR	98
Figure 28: Validation par Immunobuvardage	99
Figure 29: Validation des clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD	100
Figure 30: Morphologie des différentes populations OVNT95hTERT	101
Figure 31: Formation de foyers de transformation	103
Figure 32: Courbe de croissance	104
Figure 33: Formation de colonies en absence d'ancrage	106
Figure 34: Formation de sphéroïdes.....	107
Figure 35: Blessure sur monocouche.....	109
Figure 36: IF pour la N-cadhérine	110
Figure 37: Western de la N-cadhérine.....	110
Figure 38: IF de la E-cadhérine	111
Figure 39: Western de la E-cadhérine.....	112

Figure 40: IF de la β-cadhérine.....	113
Figure 41: Western de la β-cadhérine	113
Figure 42: IF des cytokératines 8 et 18.....	115
Figure 43: IF de la vimentine.....	116
Figure 44: IF de l'actine.....	117
Figure 45: Analyse fonctionnelle des gènes régulées.....	121
Figure 46: Gènes activés dans les clones OVNT95 hTERT-CTD	122
Figure 47: Gènes impliqué dans la mort cellulaire.....	124

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différents stades du cancer ovarien.....	6
Tableau 2: Résultats obtenus au laboratoire pour les deux modèles	42
Tableau 3: Description des différentes lignées cellulaires utilisées	45
Tableau 4: Description des différents milieux utilisés	46
Tableau 5: Séquences des différentes amorces et adapteurs utilisés.	49
Tableau 6: Différents anticorps et dilutions utilisés pour l'immunobuvardage et l'immunofluorescence	62
Tableau 7: Anticorps secondaires utilisés pour l'immunofuorescence.....	64
Tableau 8: Anticorps utilisés pour la coloration des coupes histologiques.....	69
Tableau 9: Gènes augmentés dans les clones OVNT95 hTERT-CTD.....	119
Tableau 10: Gènes diminués dans les clones OVNT95 hTERT-CTD	120

Liste des signes, abréviations et symboles

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

BRAC1: Breast cancer 1

BRAC2: Breast cancer 2

Cellules NK: Cellules natural killer

C-terminale: Carboxy terminal

CTD: Domaine carboxy-terminal

DAPI: 4'6-diamidino-2-phenylindole 2HCL

DEPC: Diethylpytcarbonate

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: Ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)tetraacetic acid

EMT: Transition éthélio-mésenchymateuse

EV: Empty vector

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GFP: Green fluorescent protein

IF: Immunofluorescence

MAPK: mitogen-actived protein kinase

MEC: Matrice extracellulaire

MET: Transition mésenchymateuse-épithéliale

N-terminale: Amino terminal

NUDE: Nue / sans pelage

OSE: Cellules épithéliales de l'ovaire

PCR: Polymerase chain reaction

PBS: Phosphate buffered saline

PDGF: Platelet-derived growth factor

pRb: Retinoblastoma protein

PVDF: Polyvinylidene difluoride

RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

scFv: Single-chain fragment variable

SDS: Sodium dodecyl sulphate

SEA: Sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin

TAE: Tris-acetate-EDTA buffer

TGF β : Transforming growth factor β

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Introduction

1. Cancer de l'ovaire

1.1 Les statistiques

Le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus mortel. Selon Statistique Canada, il est estimé que plus de 2700 nouveaux cas seront diagnostiqués l'année prochaine et 1750 cas en décéderont (Statistique canadienne sur le cancer, 2014). Ce qui classe le cancer de l'ovaire comme étant la 5^e cause de mortalité par cancer chez les femmes. Cette forte mortalité est en grande partie due au diagnostic tardif de la maladie. En effet, 80 % des cas sont diagnostiqués à des stades avancés, où la maladie a déjà formé des métastases (Cho *et al.*, 2009). Ce qui est étonnant, c'est que malgré l'évolution des traitements depuis les 30 dernières années, il y a eu très peu de changement dans le nombre d'années de survie des patientes atteintes du cancer de l'ovaire. En effet, une étude a illustré que les taux de survie après 5 ans du diagnostic du cancer de l'ovaire, et ce, de trois cohortes différentes, ne varie pratiquement pas des années 1980 à 2004. Ils ont également démontré que la même tendance était observable pour le pourcentage de survie après 1 an et 3 ans du diagnostic. De plus, ils ont observé que le pourcentage de survie après 5 ans du diagnostic était seulement de 30-40 % (Vaughan *et al.*, 2011). Ces données illustrent bien l'importance de la recherche sur le cancer de l'ovaire afin de mieux comprendre le développement de la maladie, d'améliorer la prévention, la détection et le traitement, qui par la suite permettront d'améliorer la qualité de vie des personnes atteintes.

1.2 Le développement du cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire peut se développer dans l'un ou les deux ovaires. Les ovaires plus précisément, sont localisés de part et d'autre de l'utérus, dans la cavité péritonéale, accolée aux trompes de Fallope. Ils ont une forme ovoïde et leur taille varie entre 3 et 5 cm (Figure 1). Les ovaires possèdent une double fonction: d'une part, ils produisent et stockent les ovules en cours de maturation et d'autre part, ils sécrètent la majeure partie des hormones sexuelles féminines, dont l'estrogène et la progestérone (Leung et Adashi, 2003). Plusieurs facteurs peuvent augmenter les chances de développer un cancer de l'ovaire. Par exemple, l'incidence augmente avec l'âge, la nulliparité, l'utilisation de certaines drogues pour traiter l'infertilité et certains désordres endocriniens (Montes *et al.*, 2012). Parmi les facteurs de risques génétiques associés, un petit nombre de cancers de l'ovaire (environ 5 à 10 %) sont héréditaires et liés à une anomalie génétique. On peut retrouver des mutations dans les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Partridge *et al.*, 1999 ; Montes *et al.*, 2012). La présence de mutations dans le gène *p53* peut également augmenter le risque du cancer de l'ovaire (Bast Jr *et al.*, 2009; Montes *et al.*, 2012). Malgré tous ces facteurs de risques connus, il est encore à ce jour difficile de diagnostiquer les patientes à un stade précoce. Une des raisons est que le cancer de l'ovaire peut évoluer pendant une longue période de temps sans aucun signe ou symptôme. Lorsque les symptômes apparaissent, ils sont souvent vagues et peuvent être facilement confondus avec des troubles courants, tels que des saignements vaginaux anormaux, des maux de ventre, une perte d'appétit, la constipation et la fatigue (Partridge *et al.*, 1999). Les meilleures façons de détecter un cancer de l'ovaire à un stade précoce sont de reconnaître les symptômes et passer régulièrement un examen de santé. Malheureusement, quand une femme éprouve des symptômes, le cancer de l'ovaire est habituellement rendu à un stade avancé avec des métastases déjà présentes dans la cavité péritonéale.

En fait, du à la proximité des ovaires aux autres organes présents dans la cavité péritonéale, les cellules tumorales ont une tendance à se disséminer vers ceux-ci. Cette capacité à se propager serait en outre favorisée par l'environnement tumoral et l'ascite. L'ascite est un liquide intra abdominal qui lors du cancer de l'ovaire est souvent accumulé en grande quantité. Les cellules de la tumeur et les cellules avoisinantes vont se retrouver dans un microenvironnement où l'on retrouve une quantité anormale d'hormones, de facteurs inflammatoires et angiogéniques qui favorisent l'invasion. Les cellules tumorales pourraient donc facilement quitter la tumeur puis par l'ascite, atteindre la paroi de la cavité péritonéale et ainsi former des métastases (Matte *et al.*, 2014 ; Kipps *et al.*, 2013).

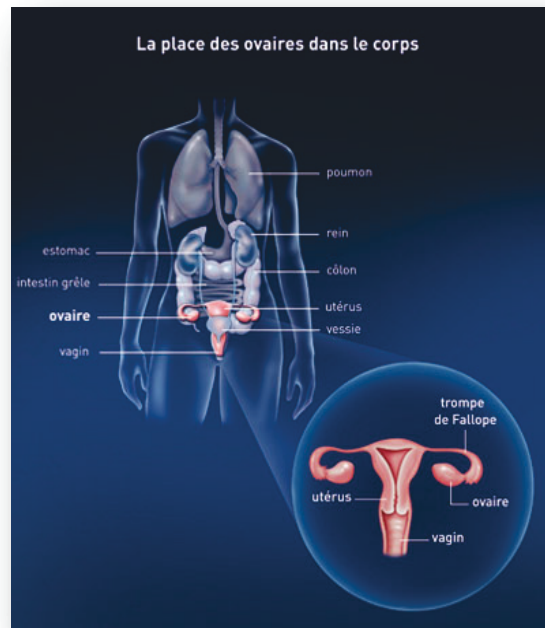


Figure 1 : Localisation des ovaires dans le corps. Les ovaires sont localisés de part et d'autre de l'utérus, dans la cavité péritonéale, accolés aux trompes de Fallope (www.medicinet.com).

1.3 Pathologie et classification

La classification du cancer de l'ovaire est assez complexe; elle se base selon l'évolution, le type de tumeur et le pronostique.

1.3.1 Classification histopathologique

Le cancer de l'ovaire est très hétérogène et de nature complexe. Il existe en fait plusieurs types de cancer de l'ovaire, cette diversité provient du fait que ce cancer peut se développer à partir des différents types cellulaires qui composent l'ovaire (Figure 2). Le cancer de l'ovaire va ainsi être classé selon sa morphologie et selon son histopathologie. Les trois principaux types sont : les tumeurs germinales qui se développent dans les cellules productives d'ovules et touchent généralement les jeunes femmes. Ce type de tumeur peut même se développer chez des fillettes (De Vita *et al.*, 2009). Les tumeurs stromales, se développent dans les cellules des tissus conjonctifs qui lient les différentes composantes de l'ovaire. Finalement, les tumeurs épithéliales se développeraient à partir des cellules qui constituent le revêtement externe (l'épithélium) de l'ovaire, soit les cellules OSE (Chen *et al.*, 2003). Les tumeurs épithéliales représentent 90 % des tumeurs de l'ovaire. C'est en fait le type de cancer de l'ovaire le plus fréquent, mais également le plus mortel (Auersperg *et al.*, 2001).

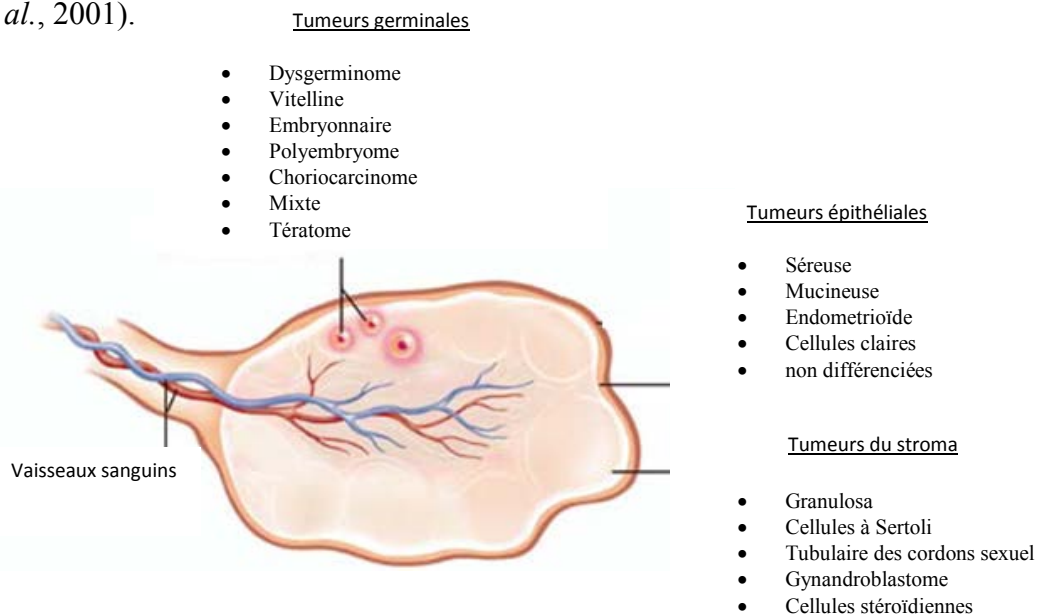


Figure 2: Origine des trois principaux types de tumeurs ovariennes et leurs sous-types. Tumeurs germinales, stromales et épithéliales. Modifiée de Chen *et al.*, 2003

Selon l'Organisation mondiale de la santé (l'OMS), il existe une variété de sous-types histologiques tumoraux. Ces derniers sont déterminés selon le tissu auquel les tumeurs s'apparentent le plus. Pour le cancer épithélial de l'ovaire (CÉO), on retrouve les sous-types : séreux, endométrioïde, mucineux, cellules claires, cellules transitionnelles (ou de Brenner), mixtes, et indifférenciées (Bast *et al.*, 2009). Les quatre sous-types histopathologiques du CÉO les plus communs sont décrits au point 2.2.

1.3.2 Le stade

Suite à cette classification histologique, un stade et un grade seront attribués. Le stade et le grade peuvent avoir une conséquence non négligeable sur les traitements à prescrire pour chaque patiente (Prat, 2014).

Le stade représente la taille et son degré de propagation. Il y a quatre stades dans le cancer de l'ovaire (Tableau 1). Pour déterminer le stade du cancer de l'ovaire, les caractéristiques prises en compte sont la localisation précise de la tumeur et son étendue, l'atteinte ou non des organes voisins et la présence ou non de métastases dans les organes voisins ou ailleurs dans le corps. Les 4 stades ont été définis par la Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique (FIGO). Ces stades sont numérotés I à IV. Les stades I et II sont considérés comme précoces, alors que les stades III et IV sont des formes avancées du cancer de l'ovaire (Prat, 2014).

Tableau 1: Les différents stades du cancer ovarien. Modification de: The 2013 International Federation of Obstetricians and gynaecologists (FIGO) Staging system for Ovarian Cancer.

Stade	Description et Caractéristique FIGO
Stade 1	La tumeur est confinée à l'ovaire / ovaires ou trompes de Fallope
1A	- Seulement un ovaire ou une trompe de Fallope est affectés par la tumeur, la capsule de l'ovaire est intacte - Aucune tumeur n'est détectée sur la surface de l'ovaire ou de la trompe de Fallope - Aucune cellule maligne n'est présente dans l'ascite ou le fluide péritonéal
1B	- Les deux ovaires ou les trompes de Fallope sont affectés par la tumeur, la capsule de l'ovaire est intacte - Aucune tumeur n'est détectée sur la surface de l'ovaire ou de la trompe de Fallope - Aucune cellule maligne n'est présente dans l'ascite ou le fluide péritonéal
1C	La tumeur est limitée à un ou deux ovaires ou aux trompes de Fallope, avec une de ces caractéristiques : - Renversment chirurgical - La capsule de l'ovaire est rompue avant la chirurgie - Présence de tumeur sur la surface ovarienne ou sur les trompes de Fallope - Présence de cellules malignes dans l'ascite ou dans le fluide péritonéal
Stade 2	La tumeur implique un ou les deux ovaires ou trompes de Fallope avec l'extension dans la région pelvienne (au-dessous du bord pelvien) ou un cancer péritonéal primaire
2A	La tumeur implique extension et/ou implants à l'utérus et/ou aux trompes de Fallope et/ou aux ovaires
2B	La tumeur s'est étendue aux autres organes de la cavité pelvienne
Stade 3	La tumeur implique un ou les deux ovaires ou trompes de Fallope ou un cancer péritonéal primaire, qui se sont propagés au-delà du pelvis avec des métastases confirmées à l'extérieur de la région pelvienne, jusqu'à l'abdomen ou au péritoine et/ou aux ganglions lymphatiques proximaux.
3A1	Ganglions lymphatiques retro péritonéaux positifs seulement - métastase jusqu'à 10 mm dans sa plus grande dimension - métastase plus que 10 mm dans la plus grande dimension
3A2	Métastase péritonéale microscopique avec ou sans métastases dans ganglions lymphatiques retro péritonéaux
3B	Métastase péritonéale microscopique au-delà de la cavité péritonéale mesurant 2 cm dans sa plus grande dimension, avec ou sans métastases dans ganglions lymphatiques retro péritonéaux
3C	Métastase péritonéale microscopique au-delà de la cavité péritonéale mesurant 2 cm dans sa plus grande dimension, avec ou sans métastases dans ganglions lymphatiques retro péritonéaux (inclus extension de la tumeur à la capsule du foie et de la rate sans métastases à d'autres organes)
Stade 4	Ceci est la forme de cancer de l'ovaire le plus avancé, avec présence de métastase distante au-delà de la cavité péritonéale, incluant les métastases au foie, à la rate, aux poumons et extra abdominale
4A	- Pleurale effusion avec cytologie positive
4B	- Des métastases au foie, à la rate, aux poumons et extra-abdominale (incluant les ganglions lymphatique à proximité et en dehors de la cavité abdominale)

3.2.3. Le grade

Le grade représente le statut de différenciation et le degré d'agressivité de la tumeur. Il existe trois grades, numérotés de 1 à 3. Le grade 1 correspond aux tumeurs les moins agressives, qui se développent lentement et sont bien différenciées, le grade 2 est un grade intermédiaire et le grade 3 correspond aux tumeurs les plus agressives qui se développent rapidement et présentent un risque élevé de se disséminer dans d'autres parties du corps. Le grade du cancer de l'ovaire est important pour le choix d'un traitement complémentaire après la chirurgie, en particulier lorsque le cancer est découvert à un stade précoce (Silverberg, 2000).

1.4 Diagnostic, suivi et traitement

L'hétérogénéité reliée au cancer de l'ovaire complique le diagnostic. Les symptômes tardifs et non spécifiques ainsi que la relative inaccessibilité des ovaires à l'examen physique, le rendent encore plus difficile à diagnostiquer à un stade précoce. En fait, c'est seulement 25-30 % des femmes atteintes qui sont diagnostiquées à un stade précoce (Cancer Statistiques, 2014). Plusieurs marqueurs sont utilisés pour faciliter la prise en charge du cancer de l'ovaire, dont le marqueur MUC16 mieux connu sous le nom CA125. Ce dernier, détecte l'expression de la protéine MUC16 dans le sang, qui est surexprimé dans 80 % des cas de cancers épithéliaux de l'ovaire (Bast Jr. *et al.*, 1981). Malheureusement, ce marqueur manque de spécificité et de sensibilité. En effet, on peut trouver une augmentation de MUC16 dans des cas bénins comme la menstruation ou lors du premier trimestre de grossesse (Bagdwell *et al.*, 2007; Xiaofang *et al.*, 2007). La surexpression de MUC16 est également retrouvée dans d'autres types de cancer, par exemple le cancer du pancréas (Wu *et al.*, 2009) et du sein (Moritani *et al.*, 2008). Donc malheureusement encore à ce jour, aucun marqueur fiable ne peut diagnostiquer le cancer de l'ovaire.

Le traitement du cancer ovarien repose sur la combinaison de la chirurgie et la chimiothérapie. La chimiothérapie est souvent utilisée comme premier traitement, qui fait appel à la combinaison de deux médicaments; le paclitaxel et le cisplatine (Colombo *et al.*, 2006). Malgré que ce traitement soit très efficace et que les patientes répondent bien, la menace d'une chimiorésistance demeure réelle. En effet, 80 % des patientes font une rechute et la reprise de la maladie est souvent létale chez la plupart des patientes (Ozols *et al.*, 2004). Le fait de détecter et de traiter le cancer de l'ovaire à un stade précoce reste la meilleure solution. Lorsque la tumeur cancéreuse est encore limitée à l'ovaire, le taux de survie à cinq ans est aux environs de 90 % (Bast *et al.*, 2009). Or comme mentionné précédemment une grande majorité des femmes présentant un cancer de l'ovaire, sont diagnostiquées à un stade avancé (III/IV) et le taux de survie à cinq ans va chuter aux environs de 30 % (Bast *et al.*, 2009).

Suite aux traitements de chirurgie ou chimiothérapie, les patientes sont suivies régulièrement lors de divers examens gynécologiques, d'échographies et de dosage de MUC16 sérique. Même si le marqueur MUC16 n'est pas un marqueur de dépistage assez sensible et spécifique pour le cancer de l'ovaire, il est utilisé pour le suivi post-traitement (Bast *et al.*, 1983). Il a, en effet, été démontré pour la première fois en 1983 par l'équipe de Robert C Bast, que l'augmentation ou la diminution du niveau de MUC16 corrèle avec la progression et la régression du cancer épithélial ovarien (Bast *et al.*, 1983). Le dosage du marqueur tumoral MUC16 est ainsi utilisé pour évaluer l'efficacité thérapeutique, la détection des récurrences et la surveillance des tumeurs épithéliales ovariennes. L'importance clinique de MUC16 sera abordée plus en détail au point 4.1.

2. Cancer épithélial de l'ovaire

Comme mentionné, le cancer épithélial de l'ovaire est le type de cancer de l'ovaire le plus fréquent.

Puisque mon projet de recherche porte sur ce type de cancer, les prochaines sections détailleront plus précisément le cancer épithélial de l'ovaire.

2.1 L'origine du cancer épithélial de l'ovaire

Plusieurs hypothèses ont été émises pour définir l'origine du développement des cancers épithéliaux de l'ovaire. Ces dernières suggèrent que les tumeurs pourraient survenir à partir de : la transformation maligne des cellules OSE, des kystes d'inclusion ou invaginations, des trompes de Fallope ou suite à la progression d'une tumeur bénigne ou à faible potentiel de malignité présente ailleurs dans le corps.

L'hypothèse généralement acceptée est que le cancer de l'ovaire proviendrait de la prolifération et de la transformation maligne des cellules épithéliales à la surface de l'ovaire (OSE), ou bien de ses invaginations ou kyste d'inclusion (Auersperg *et al.*, 2001; Murdoch W., 2002). Cette hypothèse se base sur le fait que lors de l'ovulation il y a rupture et un remodelage répétitif de la surface épithéliale de l'ovaire. Ceci implique un processus de réparation ce qui pourrait entraîner la formation de lésions précurseurs du cancer ovarien. Les cellules OSE qui constituent l'épithélium joueraient donc un rôle important dans le développement et la progression du cancer ovarien.

Une hypothèse plus controversée suggère que le cancer de l'ovaire se forme et se développe à divers sites anatomiques pour ensuite progresser au niveau des ovaires. Ces tumeurs correspondent à des tumeurs secondaires métastatiques dont le site primaire est autre que l'ovaire; tels que le colon, l'appendice, l'estomac, l'endomètre ou encore les trompes de Fallope (Vaughan *et al.*,

2011). En effet, certains chercheurs suggèrent la possibilité que l'origine de certains cancers de l'ovaire soit les trompes de Fallope. Les analyses microscopiques et histologiques montrent que les tumeurs des trompes de Fallope s'apparentent à ceux des cancers épithéliaux de l'ovaire de type séreux. De plus, ceux-ci semblent avoir le même pronostic ainsi que le même comportement tumoral (Kurman RJ., 2010). Bien que l'origine du cancer de l'ovaire soit un sujet essentiel dans la recherche, aucune des théories émises à ce jour n'est entièrement satisfaisante, les connaissances doivent être approfondies. Ce qui est important de retenir c'est que le cancer de l'ovaire épithélial n'est pas une maladie unique, mais est composé d'un groupe varié de tumeurs. Ces dernières peuvent être classées sur la base de leurs caractéristiques morphologiques distinctives et de leurs génétiques moléculaires.

2.2 Les sous-types du cancer épithélial de l'ovaire

Au cours de l'évolution du cancer épithélial, les cellules tumorales deviennent de plus en plus différenciées et chacune de ces classes se différencie en plusieurs sous-types pouvant être regroupés selon l'aspect histologique. Le cancer épithélial de l'ovaire (CÉO) est sous-divisé en 4 principaux sous-types soit de type : séreux, endométrioïde, mucineux et à cellules claires (Figure 3).

Le sous-type le plus fréquent est le sous-type séreux, il représente plus de 50 % des tumeurs épithéliales de l'ovaire, ce qui correspond à plus de 80 % de tous les cas de cancers ovariens. Les tumeurs séreuses peuvent être bénignes, frontières ou malignes. Dans la majorité des cas, elles vont se présenter sous forme de kyste et sont bénignes. Cependant, plus du quart des tumeurs séreuses sont bilatérales et malignes. Ces tumeurs sont souvent associées à un mauvais pronostic.

Les tumeurs séreuses frontières quant à elles ne représentent qu'une petite proportion des tumeurs séreuses (Auesperg *et al.*, 2001).

Les tumeurs de sous-type endométrioïde possèdent des cellules qui ressemblent aux cellules qui constituent la paroi interne de l'utérus, l'endomètre. Ces tumeurs représentent le deuxième histotype le plus commun, soit environ 10-25 % de tous les cancers ovariens. Elles sont souvent sous forme maligne et unilatérale, mais sont associées à un meilleur pronostic que les tumeurs malignes de sous-type séreux (Auesperg *et al.*, 2001).

Le sous-type mucineux est le troisième type de cancer le plus courant. Il représente 5-10 % des cas de cancer de l'ovaire. Les cellules de ces tumeurs ont l'apparence des cellules de l'épithélium intestinal ou de l'épithélium endocervical. Elles aussi peuvent être bénignes, frontières ou malignes (Auesperg *et al.*, 2001).

Finalement, les tumeurs du sous-type à cellules claires sont les plus rares et ne représentent que 4-5 % des tumeurs de l'ovaire. Les cellules de ces tumeurs sont polygonales et leur cytoplasme est riche en glycogène et en lipides. La plupart de ces tumeurs sont malignes et associées à un taux de survie assez faible, ce qui peut être expliqué par le fait que c'est l'histotype le plus résistant à la chimiothérapie (Auesperg *et al.*, 2001).

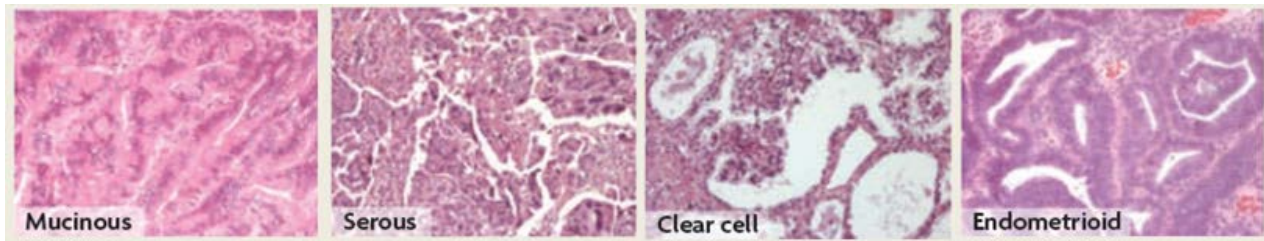


Figure 3: Les différents sous-types histopathologique du cancer épithélial de l'ovaire.
 Les sous-types séreux, mucineux, à cellules claires et endométriöide. Modifiée de Robert C. Bast Jr, Nature Reviews 2009.

2.3 Modèle moléculaire

Les caractéristiques moléculaires des tumeurs de l'ovaire sont aussi à l'origine d'une classification. Cette dernière améliore notre compréhension des tumeurs épithéliales de l'ovaire et également complète les classifications histologiques.

Cette classification moléculaire se divise en deux groupes; les tumeurs de type I et les tumeurs de type II. De façon intéressante, ce modèle se superpose aux différents types histologiques et grades déjà identifiés. Ainsi, les tumeurs séreuses de bas grade, les tumeurs endométriöides de bas grade, les tumeurs à cellules claires, les tumeurs du type mucineux et transitoires (Brenner) formeraient le groupe des tumeurs de type I (Bast Jr. *et al.*, 2009). Alors que les tumeurs séreuses de haut grade (HSOC), les tumeurs endométriöides de haut grade, les carcinosarcomse et les carcinomes indifférenciés composeraient le groupe des tumeurs de type II (Bast Jr. *et al.*, 2009).

2.3.1 Tumeurs de type 1

Les tumeurs de type I sont des tumeurs génétiquement stables, caractérisées surtout par une prolifération cellulaire incontrôlée (Kurman et Shih Ie, 2010). Les anomalies moléculaires rencontrées se distinguent de celles des carcinomes de haut grade qui constitue le deuxième groupe. Les inactivations de p53 ou des gènes génétiques comme *BRCA1* sont rarement rencontrées. On retrouve plutôt une activation dérégulée de la voie Ras-Raf-MAP kinases. En effet, une mutation de *KRAS* ou de *BRAF* est retrouvée dans respectivement 33 % et 35 % des carcinomes séreux de bas grade, mais presque jamais dans les carcinomes séreux de haut grade. Par contre, la fréquence des mutations de *KRAS* atteint 50 % dans les carcinomes mucineux (Bast Jr *et al.*, 2009). Les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* vont entraîner l'activation constitutive de la voie de signalisation des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) ce qui promeut la survie cellulaire et le cycle cellulaire (Kurman et Shih Ie, 2010; Vakiani et Solit, 2011). On retrouve également des mutations du gène *ERBB2* (*HER2*) dans les tumeurs ovariennes de type I qui mènent aussi à l'activation constitutive de la voie MAPK (Bast Jr *et al.*, 2009).

Les tumeurs endométrioides ainsi que les tumeurs à cellules claires se distinguent par une fréquence élevée de mutations du gène suppresseur *PTEN* (Bast Jr *et al.*, 2009 ; Suzuki *et al.*, 1998). *PTEN* a de multiples fonctions, elle a est une activité phosphatase qui lui permet de déphosphoryler à la fois des protéines avec des résidus tyrosine, sérine ou thréonine, mais également des phospholipides de la voie des phosphatidylinositols (Maehama et Dixon, 1998). Son activité de protéine phosphatase lui permet d'inhiber la voie Ras/Mek/Erk, ainsi que la protéine FAK (kinase d'adhésion focale), agissant ainsi sur les interactions de la cellule avec la matrice extracellulaire, ce qui lui confère un rôle dans les mécanismes invasifs (Maehama et Dixon, 1998). Son activité phosphatase lipidique est quant à elle responsable du blocage de la voie PI3K/Akt, provoquant un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire. Il a été démontré qu'elle participe au contrôle

de divers processus cellulaires incluant la prolifération, l'adhésion, la migration, l'invasion, l'apoptose, la polarisation épithéliale, la synthèse protéique et le contrôle de la taille cellulaire. La capacité de *PTEN* d'agir comme antagonisme de PI3K explique principalement de quelle façon elle peut influencer ces divers processus. En résumé, la perte de fonction de la protéine PTEN va donc engendrer un accroissement de la prolifération, de la survie, de la migration (Whang *et al.*, 1998). Ces caractéristiques vont ainsi rendre les cellules susceptibles à la transformation maligne, mais aussi favoriser l'apparition d'altérations secondaires qui vont induire l'apparition ou la progression de cancers (Kwabi-Addo *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 1998).

2.3.2 Tumeurs de type 2

Les tumeurs de type 2 vont présenter surtout des instabilités chromosomiques et des mutations dans le gène *TP53*. En fait, 80 % des tumeurs épithéliales séreuses de haut grade sont mutées en *TP53* (Bast *et al.*, 2009). Ces mutations du gène *TP53* sont également présentes dans les autres carcinomes de type II, dont les tumeurs endométrioïdes de haut grade (Bast *et al.*, 2009; Kurman et Shih Ie, 2010). Le rôle normal de p53 est d'arrêter le cycle cellulaire en fin de phase G1 en cas de dommage cellulaire et d'induire l'apoptose ou la sénescence si ce dommage est irréparable (Vousden and Lane, 2007). Lorsque *TP53* est muté, généralement ces fonctions sont perdues (Vousden and Lane, 2007). Les conséquences des mutations du gène *TP53* sont toutefois plus complexes puisque les protéines p53 mutantes ont aussi des fonctions oncogéniques qui, entre autres, augmentent l'instabilité génomique (Muller et Vousden, 2013). Mais de façon générale, les mutations du *TP53* sont associées à l'instabilité génomique (Hall et McCluggage, 2006; Muller et Vousden, 2013)

Les carcinomes ovariens de type II présentent aussi des altérations des gènes associés à la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, tels les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Berns et

Bowtell, 2012). Ces gènes jouent un rôle central dans la réparation des lésions double brin, ils peuvent entraîner l'arrêt du cycle cellulaire ou entraîner la recombinaison homologe. Les formes héréditaires représentent seulement 10 % des cancers de l'ovaire et sont presque toujours associées aux tumeurs séreuses de haut grade (HGSOC). Dans les tumeurs séreuses sporadiques, *BRAC1* et *BRAC2* sont rarement mutés, mais leur expression serait diminuée dans 50 à 90 % des cas. Les mécanismes moléculaires menant à cette diminution sont encore mal définis, mais semblent impliquer une perte d'hétérozygotie ou une hyperméthylation du promoteur. (Cancer Genome Atlas Research, 2011).

On retrouve également les gènes *HER1* et *HER2* surexprimés dans les tumeurs de haut grade. Ce sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (Bast Jr. *et al.*, 2009). La fixation d'un ligand tel que EGF (*epidermal growth factor*) sur la partie extracellulaire du récepteur HER1 (EGFR pour *epidermal growth factor receptor* ou HER1) va induire un changement de conformation du récepteur et une homodimérisation ou une hétérodimérisation avec un autre récepteur de la même famille (HER2, HER3, HER4). Les résidus tyrosines intracellulaires s'autophosphorylent et deviennent des points d'ancrage pour des complexes protéiques qui vont, à leur tour, activer de nombreuses cascades de signalisation, dont les voies MAPK ou AKT. Finalement, l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse ou le processus métastatique sera par la suite induite (Ménard *et al.*, 2003). L'interaction entre le récepteur de l'EGF (EGFR pour *epidermal growth factor receptor* ou HER1) et HER2 lorsqu'ils sont co-exprimés à la surface membranaire et leurs rôles dans l'induction des signaux intracellulaires semblent être responsables d'une plus grande agressivité tumorale. Dans le cancer du sein, on retrouve souvent des mutations dans le gène *HER2*, mais ce ne semble pas être le cas dans le cancer de l'ovaire (Ménard *et al.*, 2003).

2.4 L'épithélium de l'ovaire et la transformation maligne des cellules OSE

L'épithélium de la surface externe de l'ovaire est constitué d'une couche simple de cellules épithéliales; les cellules OSE. Elles sont aplaties et cuboïdes, supportées par une membrane basale et une tunique albuginée (Auesperg *et al.*, 2001). Elle est caractérisée par des kératines de type 7, 8, 18 et 19. L'intégrité de cet épithélium est maintenue par des desmosomes, des intégrines, des jonctions incomplètes serrées, et des cadhérines (Auesperg *et al.*, 2001). Contrairement à la plupart des épithéliums, l'épithélium de l'ovaire n'exprime pas la E-cadhérine, mais plutôt la N-cadhérine, qui est une protéine surtout associée aux cellules mésenchymateuses. Ce caractère mésenchymateux des cellules épithéliales de l'ovaire leur confère la capacité de modifier leur stade de différenciation et d'effectuer des transitions épithéliales-mésenchymateuses (EMT). Ce caractère permet aux cellules de réagir adéquatement lors de l'ovulation. Pendant le processus de réparation post-ovulatoire et juste avant l'ovulation, les cellules OSE subissent une EMT et atteignent des caractéristiques semblables aux fibroblastes (Auersperg *et al.*, 2001). Cette transition est caractérisée par un changement de morphologie et permet aux cellules d'augmenter leur motilité et leur capacité de prolifération. Cette dynamique rend cet épithélium particulièrement susceptible à la transformation maligne.

Pendant les premiers événements de la transformation tumorale et dans les stades ultérieurs de la progression du carcinome ovarien, il se produit plusieurs changements. Lors de la transformation des OSE en cellules cancéreuses, ce sont les caractéristiques épithéliales qui seront favorisées. L'expression de la E-cadhérine sera favorisée, le profil d'expression de plusieurs protéines est influencé, notamment l'expression des mucines. En particulier, il y a l'apparition de l'expression

de la mucine MUC16 qui normalement n'est pas exprimée à la surface des cellules OSE de l'ovaire (Auesperg *et al.*, 2001).

Les événements moléculaires menant à la transformation des cellules ne sont pas bien compris dans le cancer de l'ovaire. Une des raisons pour expliquer cela est l'utilisation de modèle de transformation plus ou moins adéquat.

2.5 Modèle pour étudier la transformation

Les cellules OSE ont déjà été utilisées comme modèle pour diverses études afin de mieux comprendre les étapes de la transformation maligne. Certaines études ont démontré la transformation des cellules OSE en présentant l'antigène SV40T, la télomerase reverse transcriptase humaine (hTERT) et l'oncogène KRAS ou HMGA2. Dans des études plus récentes, les cellules OSE immortalisées avec hTERT, la cyclin D1 et la cdk4 ont induit la formation de tumeur *in vivo* lorsqu'ils étaient co-exprimés avec les mutants KRAS et BRAF (Sasaki *et al.*, 2009). Cependant, la mesure à laquelle ces modèles reflètent l'hétérogénéité moléculaire des tumeurs séreuses de haut grade (HGSOC) doit encore être établie. Particulièrement dans le contexte où SV40T et KRAS/BRAF sont utilisés, puisqu'ils ne correspondent pas aux gènes qui sont généralement mutés dans les HGSOC. De plus, les tumeurs qui se développent avec ces modèles restent surtout non différenciées, ce qui n'est pas généralement le cas dans les tumeurs ovariennes (Auesperg *et al.*, 2001). La transformation des cellules OSE immortalisées (avec SV40 T) a aussi été réalisée en exprimant HER2/neu (Zherg *et al.*, 2010). Or, la différenciation dans le carcinome séreux a seulement lieu si les cellules subissent une EMT avant l'addition de HER2/NEU. Par contraste avec d'autres types de carcinomes où l'expression de la E-cadhérine est perdue et où la différenciation diminue avec la progression de la tumeur, le cancer de l'ovaire acquiert des caractéristiques épithéliales complexes assez tôt dans la progression néoplasique, il y

a un maintien de l'expression de la E-cadhérine et reste surtout différencié. (Auersperg *et al.*, 2001). Récemment, il a été démontré que le facteur de transcription Kruppel (KLF-8) serait un oncogène faible et coopérerait avec c-myc pour transformer et immortaliser (par SV40 et hTERT) les cellules OSE (Lu *et al.*, 2014). Malheureusement, les événements moléculaires menant au développement du cancer de l'ovaire sont toujours peu clairs et les modèles sont souvent imparfaits, puisqu'ils impliquent souvent l'utilisation d'oncogènes viraux et d'autres oncogènes plus ou moins pertinents.

3.0 Les mucines

3.1 La famille des mucines

Comme mentionnée plus tôt, suite à la transformation maligne des cellules épithéliales de l'ovaire, la protéine MUC16 est exprimée. Puisque les cellules épithéliales de l'ovaire ne l'expriment pas normalement, il est logique de se demander si son expression ne confère pas un avantage aux cellules cancéreuses.

MUC16 fait partie de la famille des mucines, 19 à ce jour ont été identifiées. Les mucines sont divisées en deux catégories; les mucines sécrétées et les mucines associées à la membrane. Les mucines sécrétées vont assurer une protection à la surface des cellules en aidant à former un mucus visqueux. On y retrouve les mucines MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 et MUC19 dans cette catégorie (Jonckheere *et al.*, 2013).

Les mucines associées aux membranes ont les principaux rôles de lubrifier, hydrater et protéger les membranes, mais vont également agir comme des senseurs de l'environnement extracellulaire et ainsi répondre aux différents stimuli et transmettre des signaux vers le milieu intracellulaire. Dans cette catégorie, on y retrouve les mucines MUC1, MUC3, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13,

MUC15, MUC16, MUC17 (Jonckheere *et al.*, 2013). Ces mucines sont plus spécifiquement des glycoprotéines de haut poids moléculaire et ont une structure assez typique. Elles sont composées d'un grand domaine extracellulaire qui comprend des répétitions en tandem. Les répétitions en tandem sont caractérisées par de nombreuses glycosylations. Chaque répétition peut compter de 5 à 100 sites de glycosylation et une mucine peut contenir entre 5 et 500 répétitions en tandem. Les nombreuses glycosylations confèrent le haut poids moléculaire des mucines (Batra, 2010). La structure contient également une petite partie extracellulaire qui contient des domaines SEA (Sea urchin sperm protein enterokinase and agrin) ou EGF (epithelial growth factor), un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique (Bafna *et al.*, 2010). Les mucines peuvent être relâchées et sécrétées dans le milieu extracellulaire, et ce, par clivage protéolytique. C'est en fait ainsi qu'on peut doser MUC16 dans le sang des patientes atteintes de cancer de l'ovaire. L'expression des mucines est retrouvée dans différents organes du corps, dont les surfaces oculaires, les surfaces respiratoires et dans l'endoderme, or elles sont absentes dans les ovaires (Bafna *et al.*, 2010). En conditions normales, l'expression des mucines est spécifique au tissu, au stade du développement et au temps, alors qu'une expression dérégulée des mucines est une caractéristique importante dans certains types de cancer. En effet ces mucines peuvent engendrer des signaux de réponse aux stimuli externes qui conduisent alors une variété de réponses cellulaires comme la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Ces effets suggèrent que l'expression aberrante de mucines peut être impliquée dans le développement et la progression de certains cancers (Bafna *et al.*, 2010).

3.2 Le rôle des mucines dans le cancer

On retrouve plusieurs mucines surexprimées dans divers cancers. C'est le cas de MUC1 dans le cancer du sein, de MUC4 dans le cancer du pancréas et de MUC16 dans le cancer de l'ovaire (Bafna *et al.*, 2010).

Les mucines pourraient avoir plusieurs rôles à jouer au niveau du développement et de la progression du cancer. Puisque les mucines à la base ont le rôle de protéger les cellules qui constituent les membranes, il est possible que les mucines lorsque surexprimé dans certains cancers protègent les cellules cancéreuses de différentes molécules toxiques comme les molécules cytotoxiques, des acides, et dans certains cas, même de certains agents chimiothérapeutiques. En effet, il a été démontré que MUC1 (Ren et *al.*, 2004) et MUC16 (Boivin et *al.*, 2009) protègent les cellules cancéreuses de certains agents génotoxiques.

De plus, la surexpression des mucines peut interférer avec la fonction des molécules d'adhésion cellulaire. Par encombrement stérique, les mucines peuvent bloquer l'interaction des molécules de surface cellulaire. En fait, MUC1 est connu pour supprimer l'agressivité des cellules et des propriétés d'adhérence cellulaire en interférant avec les fonctions de la E-cadhérine et d'autres molécules d'adhérence cellulaire dans des cellules du cancer du sein surexprimant MUC1 (Kondo et *al.*, 1998).

En plus de cela, les mucines peuvent également être impliquées dans l'invasion. Afin de progresser et de faire des métastases, les cellules cancéreuses doivent perdre leurs contacts cellulaires avec les cellules voisines, traverser la membrane basale et migrer à travers le stroma pour atteindre les vaisseaux sanguins ou le système lymphatique. Grâce à leur grand domaine extracellulaire, qui peut faire saillie vers le haut à 200-2000 nm au-dessus de la surface de la cellule, les mucines peuvent être impliquées dans l'exfoliation, la diffusion et l'invasion des cellules. Les mucines pourraient donc jouer un rôle important au niveau de la dissémination et du développement des métastases (Bafna et *al.*, 2010; Kufe, 2009).

Les mucines peuvent également avoir un effet immunosuppresseur, en recouvrant la surface de cellules tumorales par leur grande taille. Ainsi, les mucines vont empêcher le système immunitaire de reconnaître les cellules cancéreuses en créant un écran protecteur (Hollingsworth *et al.*, 2004).

Il a également été démontré que les mucines sont en mesure d'augmenter la différenciation et la prolifération des cellules cancéreuses. C'est en fait le cas de MUC1 et MUC4 par leur domaine juxtamembranaire, elles favorisent la prolifération cellulaire par la signalisation intercellulaire médiée par l'un de leurs deux/trois domaines de type EGF (Bafna *et al.*, 2010; Kufe, 2009).

En outre, la queue cytoplasmique des mucines comme MUC1 est connue pour induire l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire, qui favorisent la croissance et la prolifération cellulaire dans une variété de cellules cancéreuses (Hollingsworth *et al.*, 2004; Bafna *et al.*, 2010; Kufe, 2009).

Ainsi, plusieurs mucines semblent posséder des rôles importants dans la pathogénicité de divers cancers. Ces mucines peuvent également jouer un rôle dans le développement du cancer. Il a été démontré que MUC1 et MUC4 étaient suffisants pour induire la transformation des cellules (Kufe, 2009). Il a été en effet démontré que MUC1 transformait les fibroblastes de rat 3Y1 et était un oncogène (Li *et al.*, 2003; Kufe, 2009), alors que MUC4 induit la transformation des fibroblastes de souris NIH3T3 (Bafna *et al.*, 2008). Or les rôles de MUC16 dans le cancer sont moins bien connus que les rôles de MUC1 et MUC4. Par leur structure similaire, il est logique de s'attendre à un rôle de MUC16 dans le cancer. Mais comme on le voit plus loin (point 4.3), MUC16 possèdent plusieurs particularités, qui pourraient laisser supposer des rôles qui vont différer de MUC1 et MUC4 dans le cancer.

4.0 MUC16 (CA125)

Malgré son utilité dans la surveillance des tumeurs ovariennes depuis les 30 dernières années, la compréhension de la structure de MUC16 n'a pu débuter que lors du clonage du gène en 2001 (Yin et Llyod, 2001; O'Brien *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2002). Ce n'est que récemment qu'on a pu commencer à étudier les fonctions et les caractéristiques de MUC16.

4.1 Historique et importance clinique

MUC16 est aussi reconnue cliniquement sous le nom CA125. Elle a été découverte par l'équipe du Dr. Robert C. Blast Jr en 1981 (Bast *et al.*, 1981) suite à l'utilisation d'un anticorps (OC125) dirigé contre la lignée cellulaire OVCA433. Cet anticorps réagissait avec un antigène de surface des cellules cancéreuses épithéliales de l'ovaire de type séreux. Par la suite, cet antigène, MUC16 (CA125), a été détecté dans plusieurs tissus normaux, ainsi que dans d'autres carcinomes, ce qui a mené à l'utilisation de MUC16 comme marqueur tumoral dans le cancer de l'ovaire. Une variété d'anticorps a été créée pouvant reconnaître MUC16 incluant VK8, M11 et 4H11 (Dharma Rao *et al.*, 2010; Nustad *et al.*, 2002). À part 4H11, les anticorps reconnaissent des épitopes dans le domaine non clivé de la protéine ou la partie glycosylée de la protéine. Le dosage sérique de MUC16 est un élément important dans le suivi des patientes atteintes COE. Les niveaux sériques sont augmentés dans 90 % des patientes atteintes du cancer épithélial de type séreux. Il diminue cependant à 50-60 % chez les patientes dans les stades précoces du cancer ovarien. De plus, les niveaux sériques de MUC16 peuvent être élevés dans divers cas bénins, incluant la menstruation, le premier trimestre de grossesse, l'endométriose, la salpingite, l'insuffisance rénale chronique ou dans l'inflammation du pleura et le péritoine (Badgwell *et al.*, 2007; Xiaofang *et al.*, 2007). Donc, dû à un manque de spécificité et de sensibilité, MUC16 n'est pas utilisé comme marqueur pour diagnostiquer le cancer de l'ovaire. Mais l'utilisation de MUC16 a été reconnue efficace, par plusieurs groupes, pour le suivi des patientes atteintes de COE (Bast *et al.*, 1983; Rustin *et al.*,

1996). En effet, une concentration sérique de MUC16 < 35 U/ml est considérée comme étant dans la limite de la normale. Les concentrations sériques de MUC16 s'élèvent généralement avec la charge tumorale et lorsque la concentration diminue, elle reflète une régression de la tumeur et donc possiblement une bonne efficacité thérapeutique. En effet chez les patientes qui ont eu une réponse complète suite au traitement primaire, les taux sériques diminués de MUC16 sont associés à une plus longue survie sans progression et à une plus longue survie globale (Rustin *et al.*, 1996; Krivak *et al.*, 2009; Van Altena *et al.*, 2010). Tandis que lorsque la concentration augmente, on dénote une progression de la tumeur; possiblement une rechute de la maladie. Ainsi, le dosage du marqueur tumoral MUC16 est utilisé pour évaluer l'efficacité thérapeutique, la détection des récurrences et la surveillance des tumeurs épithéliales ovariennes.

4.2 Expression de MUC16

Les mucines sont normalement exprimées par les cellules épithéliales où elles jouent un rôle protecteur. Les nombreuses glycosylation des mucines offrent un environnement idéal pour l'hydratation et la lubrification des épithéliums. MUC16 est exprimée à de faibles niveaux dans les voies respiratoires. Mais les niveaux de MUC16 peuvent augmenter dans certaines maladies chroniques comme la fibrose kystique (Hattrup *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2007; Gronowitz *et al.*, 2003). MUC16 est aussi exprimée à la surface apicale de l'épithélium oculaire conjonctival où il fait partie du glycocalyx, qui a le rôle de protéger les cellules de la cornée contre les infections bactériennes et la sécheresse (Argueso *et al.*, 2003; Blalock *et al.*, 2007). MUC16 se retrouve également dans les glandes lacrymales (Jäger *et al.*, 2007). L'immunohistochimie des tissus humains en utilisant l'anticorps OC125 détecte l'expression de MUC16 dans d'autres épithéliums tels que l'épithélium coelomique foetal et ses dérivés tels que le Müllerian canal, les trompes de Fallope, l'endomètre, et l'endocol. MUC16 est exprimé aussi par les cellules mésothéliales du péritoine, de la plèvre et du péricarde (Kabawat *et al.*, 1983; Nap *et al.*, 1998). Cependant, en

utilisant l'anticorps OC125 ou 4H11, l'expression de MUC16 est indétectable dans le colon, le rectum, le col utérus, l'intestin grêle, le foie, les canaux pancréatiques, la rate, les reins, la peau et les ovaires (Dharma *et al.*, 2010). L'expression de MUC16 dans les tissus COE varie selon le type histologique (Hogdall *et al.*) ont rapporté que MUC16 est exprimée dans les tissus dans 85 % des types séreux, 65 % des types endométrioides, 40 % des types à cellules claires (Hogdall *et al.*, 2007) du cancer épithélial de l'ovaire. Des auteurs ont également démontré que l'expression de MUC16 dans les tissus corrèle de façon significative avec le stade FIGO, mais pas avec le grade histologique (de la Cuesta *et al.*, 1999; Hogdall *et al.*, 2007). Dans une autre étude, Rao *et al.* ont constaté que 56-66 % des COE séreux de haut grade expriment MUC16 en fonction de l'anticorps utilisé, OC125 vs 4H11(Dharma *et al.*, 2010). MUC16 est également exprimée dans un faible pourcentage (3-4 %) des carcinomes du sein invasifs, et 13 % des carcinomes du poumon (Dharma *et al.*, 2010). Cependant, comme mentionné précédemment, MUC16 est un marqueur utile pour surveiller la réponse au traitement, et ce, par le dosage sérique de la protéine. En revanche, l'expression élevée de MUC16 dans les tissus a été associée de manière incompatible avec la survie globale (de la Cuesta *et al.*, 1999). Dans une cohorte de 50 échantillons de COE, les patientes qui expriment de façon tissulaire MUC16 ont eu un risque plus élevé de décès par rapport aux patientes sans expression (de la Cuesta *et al.*, 1999). Or, dans une plus grande cohorte soit de 778 échantillons de COE, Hogdall *et al.*, ont montré que les patientes de stade avancé qui n'avait pas d'expression élevée de MUC16 au niveau des tissus avaient une survie significativement moins bonne (Hogdall *et al.*, 2007). Puisque la détection immunohistochimique de MUC16 dans les tissus est basée sur des anticorps qui reconnaissent des épitopes glycosylés de la région N-terminale, l'expression de MUC16 clivé n'aurait pas pu être détectée. Ainsi, l'expression de la partie C-terminale n'a pas été prise en compte dans ces études. De plus, puisqu'il

a été récemment démontré que la partie C-terminale de MUC16 était suffisante pour promouvoir la tumorigénicité (Thériault *et al.*, 2011), il n'est pas surprenant qu'à un stade avancé du COE, l'absence d'expression de MUC16 dans le tissu évalué par immunohistochimie a été liée à un plus mauvais pronostic. Nous verrons plus loin son rôle dans le cancer ovarien.

4.3 Structure de MUC16

MUC16 a été reconnue comme une glycoprotéine de haut poids moléculaire quelques années après la découverte de l'anticorps monoclonal OC125 (Davis *et al.*, 1986), et sa structure fut confirmée par des études ultérieures (Lloyd *et al.*, 1997; Lloyd *et al.*, 2001), il a fallu près de 20 ans avant que le gène MUC16 soit cloné (Yin et Lloyd, 2001; O'Brien *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2002). Le gène est localisé sur le chromosome 19p13.2 (Yin et Lloyd, 2001).

MUC16 est la plus grosse mucine membranaire connue à ce jour avec un poids moléculaire de plus de > 2MDa (O'Brien *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2002). La structure de MUC16 (Figure 4) ressemble beaucoup aux autres mucines avec des séquences d'acides aminés riches en sérine, thréonine et proline. Elle est composée de trois grands domaines : un domaine N-terminal (constitué de 1 637 acides aminés), un domaine de répétition multiple (jusqu'à 60 répétitions en tandem de 156 acides aminés chacune) et un domaine C-terminal (O'Brien *et al.*, 2001). Le domaine N-terminal et le domaine de répétition sont hautement glycosylés, avec des N — et O oligosaccharides (Kui *et al.*, 2003). Le domaine C-terminal est composé de trois parties : premièrement, on retrouve un domaine extracellulaire composé de domaines SEA (Sperm protein Enterokinase, Agrin), puis un domaine transmembranaire permettant d'ancrer la protéine à la membrane cellulaire et finalement une courte queue cytoplasmique de 31 acides aminés. Cette dernière possède des sites potentiels de phosphorylation de la sérine, la thréonine et la tyrosine. La phosphorylation de la queue cytoplasmique MUC16 a été associée à sa sécrétion (Fendrick *et*

al., 1997) et serait stimulée par le facteur de croissance EGF ou par des tyrosines phosphatases (Konishi *et al.*, 1994).

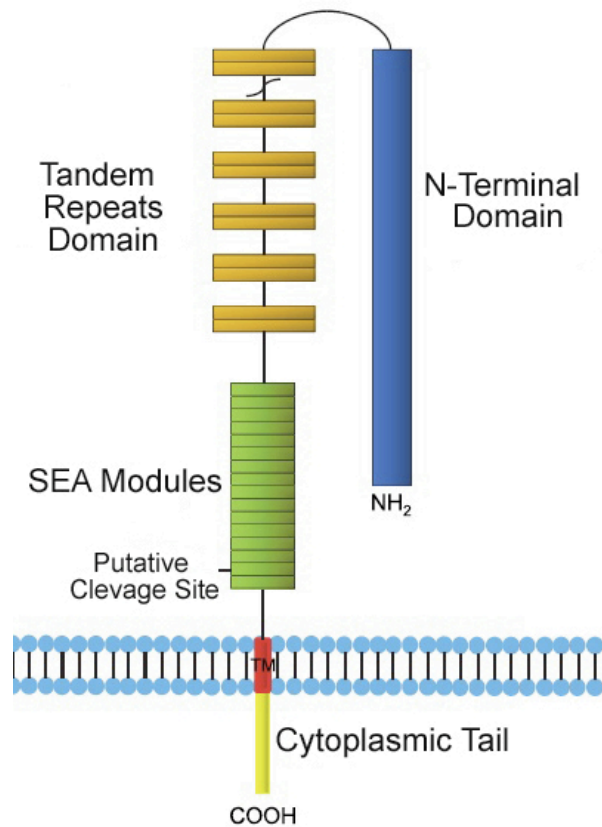


Figure 4: Structure schématique de MUC16. Les domaines majeurs de MUC16 incluent un domaine N-terminal (>12,000 a.a), un domaine de répétitions en tandem (156 a.a chacun) et un domaine C-terminal (1148 a.a). Le domaine C-terminal est composé d'un domaine extracellulaire qui contient plusieurs domaines SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) dans lesquels se trouvent un ou plusieurs sites de clivage protéolytique, un domaine transmembranaire ainsi qu'une queue cytoplasmique (31 a.a) avec des sites potentiels de phosphorylation. Tiré de Piché *et al.*, 2012

Malgré la structure similaire des mucines, MUC16 possède quelques particularités (Figure 5). Notamment, elle diffère des autres mucines en ayant premièrement 16 domaines SEA alors que les autres mucines n'en contiennent pour la plupart seulement un. L'analyse de ces séquences a révélé une certaine variabilité, le 2^e domaine SEA est relativement conservé et est retrouvé chez les autres mucines. Ce domaine pourrait être le site de clivage, comme pour MUC1 et MUC3, qui

permettrait la libération de MUC16 dans le milieu extracellulaire et permettrait la détection de MUC16 dans le sang des patientes, mais ceci reste à confirmer. Contrairement à MUC1 et MUC4, MUC16 ne possède pas de domaine EGF-like. Grâce à leur motif EGF-like situé dans le domaine C-terminal (partie extracellulaire), MUC1 et MUC4 peuvent se lier au récepteur de croissance tyrosine kinase (RTK); à la famille ErbB et aux récepteurs du facteur de croissance des fibroblastes 3 (FGFR3) (Li *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2001; Pochampalli *et al.*, 2007). La formation d'hétérodimère avec les RTK provoque une phosphorylation conduisant à l'activation de diverses voies de signalisation (Bafna *et al.*, 2010).

Plus précisément, MUC1 interagit avec ErbB1 par sa queue cytoplasmique et augmente la prolifération des cellules par l'intermédiaire de l'activation d'ERK (Jepson *et al.*, 2002). MUC4 interagit avec ErbB2 probablement grâce à son domaine extracellulaire, qui conduit à l'activation de ERK et Akt pour promouvoir la croissance des cellules (Carraway *et al.*, 2007). Puisque MUC16 est dépourvue d'un motif de liaison aux RTK, il n'est pas clair si la signalisation induite par MUC16 est affectée par les RTK bien que, tel que mentionné, la sécrétion de MUC16 est stimulée par l'EGF. Conformément à l'absence d'un motif de liaison RTK, l'interaction intracellulaire entre MUC16 et la E-caténine ou la β -caténine n'est pas non plus affectée par EGF (Comamala *et al.*, 2011). La queue cytoplasmique de MUC16 contient une séquence d'acides aminés (RRRKK) qui peut potentiellement se lier à la famille de protéines des ERM (Ezrin/radixine/moésine). Ce motif n'est pas présent dans MUC1 et MUC4. Les protéines ERM peuvent interagir avec de nombreuses protéines associées à la membrane et au cytosquelette d'actine. En effet, il a été récemment démontré que MUC16 interagit avec la E-cadhérine et la β -caténine, et provoque des altérations dans le cytosquelette d'actine (Comamala *et al.*, 2011). Cependant, il reste à savoir si l'interaction MUC16/ β -caténine et MUC16/E-cadhérine

est médiée par le motif ERM de la queue cytoplasmique MUC16. La queue cytoplasmique de MUC1 peut se lier à la β -caténine via un motif riche en sérine, SXXXXXSSL (Yamamoto *et al.*, 1997; Wen *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Ce motif est par compte absent chez MUC16. Cependant, la liaison de MUC1 à β -caténine dans les cellules serait indépendante du motif riche en R-K (Huang *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent que l'interaction avec MUC16 et la β -caténine pourrait être médiée par un mécanisme indirect, probablement par l'intermédiaire d'une autre protéine. La région riche en RK de la queue cytoplasmique de MUC16 possède également un motif de localisation nucléaire potentiel (Bafna *et al.*, 2010). Il a été démontré que la queue cytoplasmique de MUC1 pouvait se localiser au noyau (Wen *et al.*, 2003). La localisation nucléaire de MUC1 suggère qu'elle est clivée et libérée de la membrane pour par la suite circuler de la membrane vers le cytoplasme et finalement au noyau. La possibilité que MUC16 se localise elle aussi au noyau reste encore à être déterminée. Bien que les mucines partagent des structures communes, MUC16 contient plusieurs caractéristiques différentes qui pourraient suggérer qu'elle interagit et ait des fonctions différentes des autres mucines.

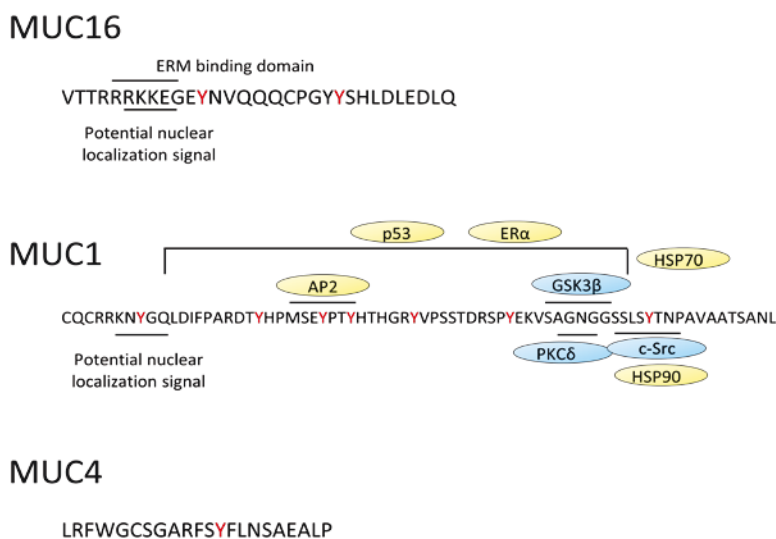


Figure 5: Comparatif des structures des mucines MUC1, MUC4 et MUC16

4.4 Rôles de MUC16 dans le cancer de l'ovaire

Les mucines associées aux membranes comme MUC1 et MUC4 sont des molécules multifonctionnelles. Leur grand domaine extracellulaire est hautement glycosylé et participe à l'hydratation, la lubrification et la protection des membranes. D'autre part, grâce à leur queue cytoplasmique, ils activent différentes voies de signalisations. MUC16 est également considéré comme une molécule multifonctionnelle, ces différents domaines vont être impliqués dans des fonctions spécifiques.

4.4.1 Rôle associé à la partie extracellulaire

La partie extracellulaire de MUC16 est hautement glycosylée et peut interagir avec plusieurs protéines. Il a été démontré que MUC16 avait la capacité d'interagir avec la galectine-1 et avec la mésothéline (Seelenmeyer *et al.*, 2002; Rump *et al.*, 2004.; Gubbels *et al.*, 2006). Les galectines font partie de la famille des lectines qui sont des protéines à la fois intracellulaires et sécrétées au niveau extracellulaire. Dans le milieu extracellulaire, elles interagissent avec des glycoprotéines situées au niveau de la matrice extracellulaire et à la surface des cellules. Dans le milieu intracellulaire, elles peuvent interagir avec les protéines cytoplasmiques ou nucléaires. Le domaine C-terminal MUC16 (1148 derniers acides aminés) semble être suffisant pour lier la galectine-1, mais cette interaction nécessite des chaînes d'oligosaccharides O— lié qui se retrouvent dans les répétitions dans la partie extracellulaire de MUC16. L'importance biologique de cette interaction n'est pas encore très claire, mais le recrutement des galectines est impliqué dans de nombreux processus tels que l'adhésion cellulaire, la prolifération, l'apoptose, le développement embryonnaire et peut également influencer la progression tumorale.

MUC16 lie également la mesothéline via une liaison dépendante de la glycosylation. Le site de liaison pour la mesothéline sur MUC16 serait probablement situé dans les répétitions en tandem ou nombreuses de glycolysations sont présentes (Gubbels *et al.*, 2006). Quant à MUC16 elle lie principalement l'extrémité N-terminale du domaine extracellulaire de la mésothéline (résidus 296-359) (Kaneko *et al.*, 2009). La mésothéline est un antigène de différenciation présent sur les cellules mésothéliales normales, elle est exprimée en excès dans plusieurs tumeurs humaines y compris l'adénocarcinome de l'ovaire. Il a été démontré que cette liaison favorise l'adhésion cellulaire et également le processus métastatique associé au cancer de l'ovaire. Puisque les cellules mésothéliales tapissent la cavité péritoine, l'interaction mésotheline-MUC16 pourrait faciliter l'adhésion cellulaire et les métastases péritonéales par l'adhérence des tumeurs ovariennes avec les cellules mésothéliales (Chang *et al.*, 1996). Ceci est cohérent avec la récente observation que le knockdown de la protéine MUC16 abolit l'adhésion cellulaire homotypique (Comamala *et al.*, 2011). Le "knockdown" de MUC16 favorise aussi la motilité cellulaire dans le COE et le caractère invasif (Comamala *et al.*, 2011). En régulant l'adhérence cellulaire, la motilité cellulaire et le caractère invasif, la partie extracellulaire de MUC16, à travers son interaction avec la galectine-1 et la mésotheline, peut donc jouer un rôle important dans les métastases dans le cancer ovarien (Rump *et al.*, 2004.; Gubbels *et al.*, 2006).

MUC16 posséderait également des propriétés immunosuppressives en inhibant la réponse cytotoxique des cellules "natural killers" (NK) (Patankar *et al.*, 2005). En effet, lorsque MUC16 est incubée avec les cellules NK elle entraînerait la diminution de 50-70 % de la lyse des cellules tumorales (Patankar *et al.*, 2005). Les cellules OSE exprimant MUC16 sont également protégées de la lyse par les cellules NK primaires (Gubbels *et al.*, 2010). Ainsi, MUC16 semble être un puissant inhibiteur de la réponse des cellules NK *in vitro*. De plus, il a été démontré que MUC16

régule négativement l'expression de CD16 qui est exprimée par les cellules NK dans les fluides péritonéaux des patientes avec COE, dont l'ascite (Patankar *et al.*, 2005; Bélisle *et al.*, 2007). La protéine MUC16 sécrétée dans ces fluides se lie aux cellules NK mais également aux lymphocytes B et aux monocytes, et ce, via Siglec-9. Le Siglec-9 est un récepteur présent sur les cellules immunitaires qui inhibe la réponse des cellules NK (Belisle *et al.*, 2010). Il est possible que l'interaction de cellules NK et de MUC16 entraîne la sécrétion de facteurs angiogéniques et migratoires qui encourageaient le développement tumoral, favoriserait la formation de métastases et la progression COEs. Les niveaux élevés de MUC16 trouvés dans l'ascite pourraient être un des facteurs contribuant aux propriétés immunosuppressives de l'ascite.

Une étude récente a également montré que MUC16 confère une protection contre les agents génotoxiques comme le cisplatine (Boivin *et al.*, 2009). MUC16 régule négativement la sensibilité de la lignée cellulaire OVCAR3, une lignée cellulaire cancéreuse de l'ovaire surexprimant MUC16. La régulation à la baisse de MUC16 dans les cellules OVCAR3 active la voie PI3K/Akt (Comamala *et al.*, 2011). Ce qui est suggéré est que le "knockdown" de MUC16 sensibilise les cellules tumorales aux médicaments génotoxiques par l'activation de la voie Akt qui à son tour empêche FOXO3a de se localiser au noyau. En effet, les auteurs ont démontré que le «knockdown» de MUC16 diminue la localisation nucléaire de FOXO3a. La fonction de FOXO3a est en partie régulée par l'activation de la voie Akt; Akt phosphoryle FOXO3a, résultant à la liaison de FOXO3a aux protéines 14-3-3 et sa rétention dans le cytoplasme. En revanche, la déphosphorylation de FOXO3a induit sa localisation nucléaire où elle active l'expression de différents gènes, qui régulent la réponse cellulaire au stress et le point de contrôle G2-M du cycle cellulaire (Nemoto *et al.*, 2002). Ainsi, la prévention de la localisation nucléaire de FOXO3a

contribue à la réponse apoptotique aux médicaments génotoxiques (Comamala *et al.*, 2011). Le "knockdown" de MUC1 peut également sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par les agents génotoxiques (Yin *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2004). Inversement, l'expression ectopique du domaine C-terminal de MUC16 augmente la résistance de la lignée cellulaire SKOV3, qui n'exprime pas normalement MUC16, au cisplatine (Comamala *et al.*, 2011). Tous ces résultats suggèrent que MUC16 pourrait également jouer un rôle important dans la résistance à la chimiothérapie.

4.4.2 Rôle associé à la partie C-terminale

Différentes études ont démontré que la partie C-terminale de MUC16 joue un rôle essentiel dans la migration, l'invasion, la formation des tumeurs et le processus métastatique du cancer de l'ovaire (Comamala *et al.*, 2011; Thériault *et al.*, 2011).

L'expression ectopique du domaine C-terminal de MUC16 a augmenté la tumorigénicité des cellules de la lignée SKOV3 (qui n'expriment pas MUC16) dans un modèle de xénogreffe de souris (Thériault *et al.*, 2011), alors que la suppression de la queue cytoplasmique a complètement abrogé cet effet. Ces résultats ont démontré que le pouvoir tumorigénique renforcé est médié par la queue cytoplasmique, possiblement par l'interaction avec des molécules de signalisation intracellulaire. En accord avec ces résultats, le "knockdown" de MUC16 a complètement abrogé la formation de colonies en agar mou et des tumeurs sous-cutanées, des cellules OVCAR3 (qui surexprime MUC16), suggérant que MUC16 pourrait posséder des propriétés oncogéniques (Thériault *et al.*, 2011).

Il a été récemment montré que MUC16 exerçait une incidence sur les caractéristiques de croissance des cellules cancéreuses de l'ovaire (Thériault *et al.*, 2011). Bien que le taux de croissance des cellules OVCAR3 n'ait pas été affecté par le "knockdown" de MUC16, les cellules

"knockdown" ont atteint une phase de croissance stationnaire dans un temps plus court. Il n'y avait pas eu de différence significative dans l'apoptose entre les cellules "knockdown" MUC16 et les cellules témoins. Inversement, une expression stable du domaine C-terminal de MUC16 dans les cellules SKOV3 a prolongé la croissance avant d'avoir atteint la phase stationnaire alors que la suppression de la queue cytoplasmique abroge complètement l'effet du domaine C-terminal de MUC16 sur la croissance cellulaire. On ne sait pas comment MUC16 affecte la croissance des cellules tumorales. L'expression stable du domaine C-terminal MUC16 dans les cellules SKOV3 n'a pas modifié l'expression ou la phosphorylation de l'EGFR (Thériault *et al.*, 2011). Bien que ces observations n'excluent pas l'implication des récepteurs à activité tyrosine kinase, d'autres partenaires sont probablement nécessaires pour moduler la croissance des cellules.

COE est une maladie hautement métastatique (Naora *et al.*, 2005). Au cours de la progression vers un phénotype métastatique, les cellules cancéreuses subissent des changements morphologiques, deviennent mobiles et acquièrent la capacité de migrer et d'envahir afin d'établir des tumeurs secondaires à des sites distants. Cette transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est caractérisée par changements moléculaires et cellulaires coordonnés, y compris une réduction de l'adhérence cellule-cellule, la perte de polarité apicale-basolatérale, la perte de marqueurs épithéliaux et le gain de marqueurs mésenchymateux (Vergara *et al.*, 2010; Hugo *et al.*, 2007) L'EMT a également pour effet d'augmenter la motilité et l'invasion cellulaire. Il a été démontré que MUC16 agissait comme un régulateur important du processus EMT dans les cellules cancéreuses de l'ovaire (Comamala *et al.*, 2011). Les auteurs ont montré que la régulation négative de l'expression de MUC16 empêche l'agrégation cellulaire homotypique, entraîne une perturbation des jonctions cellule-cellule, augmente la motilité cellulaire et le caractère invasif. Ces effets ont été associés à la perte de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine et la cytokératine-18 et le gain de marqueurs

mésenchymateux tel que la N-cadhérine et la vimentine dans les cellules "knockdown". Ces données suggèrent que MUC16 est impliquée dans le processus métastatique (Comamala *et al.*, 2011). Le "knockdown" de MUC16 induit une relocalisation intracellulaire de la E-cadhérine. Il est possible que la liaison de MUC16 à la E-cadhérine conduit à la localisation de la E-cadhérine à la surface, qui ainsi assure le contact cellulaire et la suppression de la migration cellulaire (Comamala *et al.*, 2011). En revanche, en l'absence de MUC16, la E-cadhérine se retrouve relocalisée dans le cytoplasme, et ne peut plus jouer son rôle dans l'interaction cellule-cellule (Comamala *et al.*, 2011).

De plus, il est connu que le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine se lie à la β -caténine (Ozawa *et al.*, 1990), qui forme un complexe avec l'actine (Adams *et al.*, 1996), p120 (Staddon *et al.*, 1995), EGFR (Hoschuetzky *et al.*, 1994), et d'autres protéines. Il est possible qu'en formant un complexe avec la E-cadhérine et/ou la β -caténine, MUC16 redistribue EGFR et module en conséquence sa voie de signalisation. Bien que l'expression du domaine C-terminal de MUC16 dans les cellules SKOV3 ne change pas l'état de phosphorylation de l'EGFR, le "knockdown" de MUC16 active EGFR et entraîne l'augmentation de l'activation de Akt, ERK1/2 et de la MMP-2 et MMP-9 (Comamala *et al.*, 2011). Ces effets sont associés à l'augmentation de la migration cellulaire (Suyama *et al.*, 2002) ainsi qu'à l'induction de l'EMT (Grille *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2009). Ce qui suggère que MUC16 joue un rôle dans le processus métastatique.

Telles que mentionnées précédemment, les premières étapes des métastases de la tumeur de l'ovaire impliquent des altérations des propriétés cellulaires qui mènent au détachement des cellules de la tumeur primaire. Ces cellules se retrouvent dans l'ascite pour former des cellules

flottantes ou des agrégats multicellulaires. Sous cette forme, elles peuvent se déplacer et se lier à un site secondaire. Les cellules tumorales au site principal vont exprimer MUC16 et vont présenter un phénotype épithélial, donc vont exprimer la E-cadhérine. Le détachement des cellules du site primaire implique la perte de MUC16 et de l'expression de la E-cadhérine. Cela implique également le gain de marqueurs mésenchymateux conduisant à une augmentation de la motilité et la perte de propriétés adhésives. Suite à cette EMT, les cellules tumorales flottantes reviennent à un phénotype épithélial et expriment MUC16 conduisant à l'adhésion aux cellules mésothéliales via l'interaction MUC16/mésotheline et la formation d'implants tumoraux dans la cavité péritonéale. Ainsi, MUC16 joue un rôle important dans le processus métastatique. Le domaine C-terminal de MUC16 a été démontré comme suffisant pour promouvoir la diffusion des cellules tumorales dans toute la cavité péritonéale des souris SCID. Alors que la suppression de la queue cytoplasmique de MUC16 abolit ces effets. (Thériault *et al.*, 2011).

Bien que le mécanisme par lequel MUC16 affecte la tumorigénèse et le processus métastatique soit inconnu, ces études suggèrent que MUC16 joue un rôle crucial dans la progression de l'EOC.

4.5 Voie signalisation de MUC16

Bien que MUC1 et MUC4 affectent la progression tumorale par l'interaction de leur queue cytoplasmique avec diverses molécules de signalisation intracellulaires (Bafna *et al.*, 2010), il existe très peu de données disponibles sur les voies de signalisation activées par la queue cytoplasmique de MUC16.

Il a été démontré que dans le cancer du sein MUC16 interagit avec la protéine JAK2 (Janus kinase) qui contient un domaine ezrine/radixine/meosine. Cette interaction régule la phosphorylation de

STAT3 qui par la suite activerait le facteur de transcription c-jun, qui a pour rôle d'induire l'expression de la cyclin D1 et ainsi promouvoir la prolifération cellulaire. Donc, ceci serait potentiellement un mécanisme de prolifération induit par MUC16 dans les cellules du cancer du sein (Lakshmanan *et al.*, 2012). Il a également été démontré que suite au "knockdown" de MUC16 dans les cellules du cancer du sein, ceci induisait un arrêt en G2/M du cycle cellulaire. Cet arrêt se fait via une régulation négative de la cycline B1 et de la phosphorylation de la kinase Aurora (Lakshmanan *et al.*, 2012), deux protéines régulatrices de la transition G2/M (Ouchi *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2008). Ceci suggère un mécanisme supplémentaire par lequel MUC16 régule la prolifération, en promouvant la transition rapide en G2/M. Également, dans cette même étude, les auteurs ont démontré une augmentation significative de l'apoptose suite au "knockdown" de MUC16 dans les cellules cancéreuses du sein. Puisque les points de contrôle du cycle cellulaire sont connectés avec le processus apoptotique, ces résultats suggèrent que MUC16 augmente la croissance cellulaire en diminuant l'apoptose.

Dans le cancer de l'ovaire, des études ont également démontré un rôle de MUC16 dans l'apoptose. En fait, il a été démontré que MUC16 atténue l'apoptose induite par TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) dans les cellules COE (Matte *et al.*, 2014). TRAIL est une protéine du système immunitaire appartenant à la famille du TNF (Tumor necrosis factor) qui a la capacité d'induire la mort par apoptose des cellules tumorales, sans exercer de toxicité envers les cellules saines. Au niveau moléculaire, TRAIL va se lier aux récepteurs de mort TRAIL-R1 (DR4) et R2 (DR5). Lors de l'activation du récepteur, FADD et pro-caspase-8 sont recrutés pour former un complexe de signalisation induisant la mort (DISC) (Matte *et al.*, 2014). Ce complexe par la suite active les effecteurs en aval, soit les caspases-3, -6 et -7, conduisant à l'apoptose par la suite.

Il a été démontré que MUC16 atténue l'apoptose, l'activation de la caspase-8 et l'activation des mitochondries dans les cellules COE en réponse à TRAIL. MUC16 diminue plus spécifiquement le récepteur TRAIL-R2 (DR5) TRAIL et inhibe l'expression de la pro-caspase-8 et ainsi inhibe l'activation du complexe de signalisation induisant la mort (DISC). Il a été démontré que la partie C-terminale de MUC16 est suffisante pour atténuer la cascade de signalisation de TRAIL. Ils ont également démontré que le "knockdown" de MUC16 diminuait les niveaux de cFlip. Cette protéine régule à la fois le recrutement et le traitement des pro-caspase-8 dans le DISC (Matte *et al.*, 2014). Il existe deux variantes d'épissage exprimés dans les cellules humaines, cFLIP_S (25 kDa) et cFLIP_L (55 kDa) (Matte *et al.*, 2014). Les deux isoformes sont capables de bloquer, mais par des mécanismes différents, l'activation de la caspase-8 dans le disque. Par conséquent, les isoformes cFLIP sont de puissants régulateurs négatifs de la cascade de signalisation de TRAIL. Les auteurs ont démontré que le "knockdown" de MUC16 entraîne une augmentation de la dégradation des cFlip et augmente par conséquent l'apoptose induite par TRAIL (Matte *et al.*, 2014). Il a été récemment montré que le "knockdown" de MUC16 dans les cellules du cancer du sein est associé à une régulation négative de TRAIL-R1 (DR4) et des molécules pro-apoptotiques Bid et Bax et de Bcl-2 (Lakshmanan *et al.*, 2012). Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces changements pourraient favoriser l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules du cancer du sein, mais le niveau du blocage des récepteurs de la cascade de signalisation de la mort n'a pas été établi (Lakshmanan *et al.*, 2012). Dans les cellules de OSE, ni l'expression de MUC16-CTD ni le "knockdown" de MUC16 n'ont été associés à une expression altérée de Bax, Bcl-2 ou TRAIL-R1, le blocage a plutôt eu lieu en amont de la mitochondrie (Matte *et al.*, 2014). Ces résultats divergents ne sont pas très clairs, mais le rôle des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et

Bcl-XL dans la protection contre l'apoptose induite par les médicaments seraient dépendants du contexte cellulaire (Dodier et Piché, 2006).

Plusieurs facteurs de croissance induisent la phosphorylation des résidus tyrosines sur la queue cytoplasmique de la mucine MUC1 qui entraîne l'activation de certaines voies de signalisation (Ren *et al.*, 2006). Cette phosphorylation augmente en outre la liaison de MUC1 à la β -caténine et induit la co-translocation de la partie C-terminale de MUC1 et la β -caténine dans le noyau (Ren *et al.*, 2006). Lorsque la β -caténine se retrouve dans le noyau elle s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF, modulant ainsi leur activité et activant (ou inactivant) l'expression d'un grand nombre de gènes cibles qui promouvoit la tumorigénicité. Mais la plupart des gènes activés par la voie Wnt sont aussi régulés par d'autres voies de signalisation, alors leur activation seule n'est pas suffisante pour confirmer l'activation de la voie Wnt dans certains cancers (Barbolina *et al.*, 2011). Néanmoins l'expression de certains gènes, dont Cyclin D1, COx2 et MET est observée dans les cancers épithéliaux de l'ovaire, qui donne une évidence supplémentaire que la voie Wnt est activée (Gatcliffe *et al.*, 2008; Barbolina *et al.*, 2011). Les structures entre MUC1 et MUC16 diffèrent et la queue cytoplasmique de MUC16 ne possède pas les sites de liaison spécifique à la β -caténine comme MUC1. Donc, il n'est pas certain que MUC16 pourrait jouer un rôle similaire à MUC1 et activer la voie de Wnt. Néanmoins, il a été démontré que MUC16 interagit avec la β -caténine (Comamala *et al.*, 2011). De plus, le "knockdown" MUC16 induit la relocalisation de la β -caténine de la membrane cellulaire vers le cytoplasme (Comamala *et al.*, 2011). Il est donc possible que par régulation de l'activité de GSK3, MUC16 régule la localisation subcellulaire de la β -caténine ainsi que sa dégradation au protéasome. L'importante relocalisation de la β -caténine dans les cellules "knockdown" MUC16 a été associée à une augmentation de la motilité cellulaire,

de la migration et du caractère invasif *in vitro* (Comamala *et al.*, 2011). Jusqu'à présent, il n'y a aucune preuve que la queue cytoplasmique de MUC16 co-localise avec β -caténine dans le cytoplasme ou vers le noyau.

De plus, il a été démontré que MUC1 induisait la transformation des fibroblastes de rat, les 3Y1, et cette transformation était médiée en partie par l'interaction avec β -caténine (Li *et al.*, 2003). Il a été également démontré que la mucine MUC4 induisait la transformation des fibroblastes de souris NIH3T3 (Bafna *et al.*, 2008). Le rôle de MUC16 dans la transformation cellulaire n'a pas encore été établi et nous ne savons pas si MUC16 pourrait avoir les mêmes fonctions que MUC1 et MUC4.

Finalement, un rapport récent suggère que la queue cytoplasmique de MUC16 interagit avec les kinases de la famille src et induit la relocalisation de la E-cadhérine et de la β -caténine. Ce qui réduit l'adhérence cellulaire des cellules cancéreuses de l'ovaire, suggérant donc un rôle de MUC16 dans l'invasion et la migration cellulaire du cancer épithélial de l'ovaire (Akita *et al.*, 2013).

5. Modèles cellulaires établis au laboratoire pour l'étude fonctionnelle de MUC16

Au laboratoire, deux modèles cellulaires ont été mis au point afin d'étudier les diverses fonctions et interactions de MUC16 et de la partie C-terminale de MUC16 seule. Les résultats obtenus par ces modèles ont servi de base pour le projet décrit dans ce mémoire.

5.1 Modèles gain de fonction

Le premier modèle est un modèle de fonction où la partie C-terminale de MUC16 a été introduite dans une lignée cancéreuse de l'ovaire qui ne l'exprime pas normalement, les SKOV3. La construction utilisée pour exprimer la partie C-terminale de MUC16 dans les SKOV3 contient le domaine unique extracellulaire, le domaine transmembranaire ainsi que le la queue cytoplasmique de MUC16 (Figure 6). La construction contient aussi deux étiquettes : polyhistidine et c-myc toutes deux situées en C-terminal. Ces étiquettes sont utilisées pour détecter la construction puisqu'il n'y a pas encore à ce jour des anticorps spécifiques pour la partie intracellulaire de MUC16. Une autre construction a été utilisée soit la construction MUC16-TMU contenant seulement le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire. Cette construction est utilisée afin de déterminer si les effets observés sont bien attribuables à la partie cytoplasmique de MUC16.

Quatre populations stables ont ainsi été créées pour ce modèle. La population parentale les SKOV3, la population qui exprime le vecteur vide SKOV3-EV, la population qui exprime la partie C-terminale de MUC16 SKOV3-CTD et finalement la population qui exprime la partie C-terminale de MUC16, mais dépourvue de la queue cytoplasmique SKOV3-TMU. La description détaillée de ce modèle est retrouvée dans le mémoire de Marianne Boivin (Boivin, 2005).

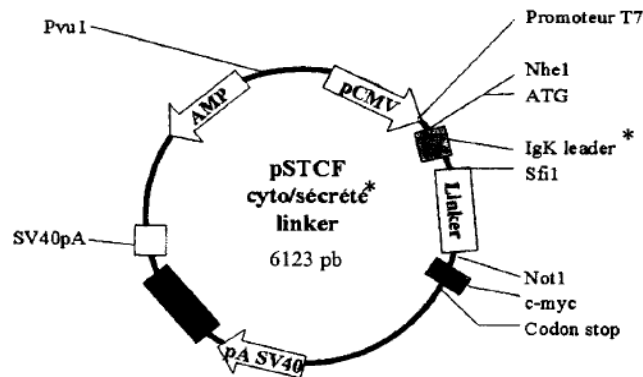
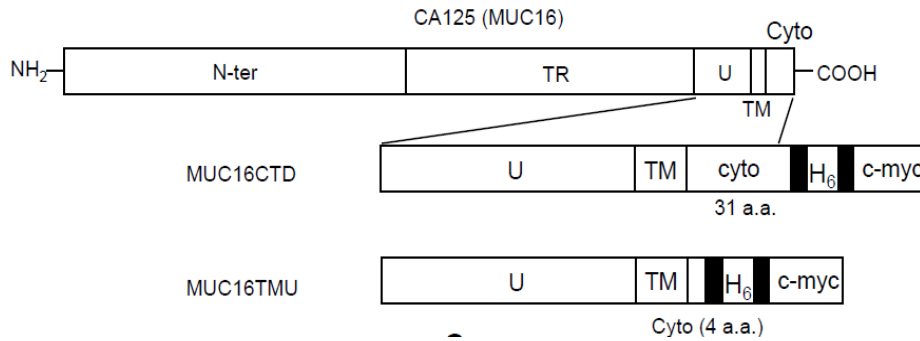


Figure 6: Construction de MUC16-CTD et MUC16 TMU ainsi que le vecteur utilisé.
Tiré du Mémoire Boivin 2005.

5.2 Modèle perte de fonction (knockdown)

Le deuxième modèle est un modèle de perte de fonction. Afin de déterminer l'effet d'un "knockdown" de MUC16 sur la tumorigénicité, la lignée cancéreuse de l'ovaire qui exprime fortement MUC16 soit OVCAR3 a été utilisée. La lignée a été transfectée de façon stable avec un "single-chain fragment variable" ou mini anticorps ScFV dirigé contre MUC16, afin d'effectuer un knockdown de MUC16. Un scFv est un mini anticorps six fois plus petit que l'anticorps parental, composé des parties variables de la chaîne lourde (VH) et de la chaîne légère (VL) d'un anticorps monoclonal. Ces parties variables sont liées par un polypeptide flexible. Les scFV utilisés par le laboratoire sont dotés d'un signal de localisation et de rétention au réticulum endoplasmique. La protéine contre laquelle ils sont dirigés soit MUC16 se voit alors séquestrée au réticulum

endoplasmique et vraisemblablement dégradée par le protéasome. Cette séquestration empêche la localisation membranaire habituelle de MUC16 et du même coup stimule un "knockdown" de la protéine.

Ce modèle de perte de fonction compte 4 populations et clones : La lignée parentale OVCAR3, le clone stable OVCAR3 #12 qui exprime un scfv qui ne lie pas MUC16. Les clones indépendants stables OVCAR3 #9 et OVCAR3 #7, où MUC16 est partiellement séquestrée au réticulum endoplasmique par un scFV.

La description détaillée de ce modèle est retrouvée dans le mémoire de Julie Beaudin (Beaudin, 2003).

5.3 Résultats obtenus au laboratoire

Les résultats obtenus par ces modèles sont résumés dans le tableau 2 qui suit.

Tableau 2: Résultats obtenus au laboratoire pour les deux modèles

Phénotype observé	Modèle gain de fonction (MUC16-CTD)	Modèle perte de fonction (Knockdown de MUC16)
Croissance en absence d'ancrage	↑	↓
Formation de foyers de transformation	↑	↓
Sensibilité à l'inhibition de contact	↓	↑
Aucun effet	Aucun effet	

Formation de sphéroïdes	↑	↓
Formation de tumeurs sous-cutanées dans les souris NUDE	↑	Non
Formation de tumeurs dans les souris SCID	↑	Non
Morphologie cellulaire	Mésenchymateuse ↓ Mésenchymateuse	Épithéliale ↓ Mésenchymateuse
Jonctions cellulaires	↓	↓
Migration	↑	↑
Sensibilité au cisplatine	↓	↑

Les résultats obtenus au laboratoire ont démontré que la partie C-terminale jouait un rôle primordial dans la migration, l'invasion, la tumorigénèse et le processus métastatique. Ces observations suggèrent un rôle dans la pathogénèse du CEO. Toutefois, son rôle précis dans la transformation cellulaire n'a pas été établi.

6. Hypothèse et objectifs

Pendant les premiers événements de la transformation tumorale et dans les stades ultérieurs de la progression du carcinome ovarien, il se produit plusieurs changements. Lors de la transformation des OSE en cellules cancéreuses, il y a l'apparition et la surexpression de la mucine MUC16 qui normalement n'est pas exprimée à la surface des cellules de l'ovaire. Puisqu'il a été démontré que la partie C-terminale de MUC16 joue un rôle important dans la tumorigénèse du cancer ovarien. Il est logique de penser que MUC16 pourrait jouer un rôle dans la transformation des cellules OSE et pourrait ainsi posséder des caractéristiques oncogéniques. Ce qui nous a amenés à poser l'hypothèse que MUC16 contribue à la transformation des cellules et que la partie C-terminale est suffisante pour induire ces effets. Notre objectif est d'exprimer la partie C-terminale de MUC16 (CTD) dans les fibroblastes de souris NIH3T3 et d'évaluer si MUC16-CTD est suffisant pour induire leur transformation. Si oui, nous évaluerons ensuite la capacité de MUC16 à transformer des cellules épithéliales de la surface ovarienne (OSE) et des cellules épithéliales de la surface ovarienne immortalisées avec la télomérase (OSE-hTERT).

Matériel et Méthodes

7. Lignées cellulaires utilisées et culture cellulaire

Les différentes lignées utilisées dans ce projet sont décrites dans le tableau 3.

Tableau 3: Description des différentes lignées cellulaires utilisées

Lignées cellulaires	Description	Provenance
SKOV3	Lignée cancéreuse de l'ovaire qui est négative pour MUC16 provenant de l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire.	American Type Culture Collection (Manassas, VA)
SKOV3-EV	Population stable SKOV3 (lignée cancéreuse de l'ovaire négative pour MUC16) qui exprime un vecteur vide.	Cellules établies à partir SKOV3 (American type culture collection (ATCC), Manassas, VA) (Boivin, 2005)
SKOV3-CTD	Population stable SKOV3 (lignée cancéreuse de l'ovaire négative pour MUC16) qui exprime la partie CTD de MUC16.	Cellules établies à partir SKOV3 (ATCC) (Boivin, 2005)
OVCAR3	Lignée cancéreuse de l'ovaire positive pour MUC16 provenant de l'ascite d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome séreux de l'ovaire.	American Type Culture Collection (Manassas, VA)
KDEL 4:5 #12	Population stable OVCAR3 (lignée cancéreuse de l'ovaire positive pour MUC16) avec scFv contrôle (qui ne cible pas MUC16).	Cellules établies à partir NIH:OVCAR3 (ATCC) (Beaudin, 2003)
KDEL 1:9 #7	Populations stables OVCAR3 (lignée cancéreuse de l'ovaire positive pour MUC16) avec un mini anticorps scFv qui cible spécifiquement MUC16, ce qui entraîne un knockdown de la protéine.	Cellules établies à partir NIH:OVCAR3 (ATCC) (Beaudin, 2003)
KDEL 1:9 #9		

NIH3T3	Fibroblastes embryonnaires de souris spontanément immortalisés.	ATCC
OVN221T	Lignées cellulaires OSE isolée à partir d'explant d'un ovaire normal provenant d'une patiente.	Banque d'échantillons biologiques (seins/ovaires) et de données de Sherbrooke qui fait partie de la Banque de tissus et de données du Réseau de Recherche en Cancer du FRSQ
OVN321T		
OVN225T		
OVNT95 hTERT	Lignée cellulaire d'OSE isolée à partir d'explant d'un ovaire normal provenant d'une patiente. Les cellules ont été immortalisées à l'aide d'un adénovirus qui entraîne l'expression de la télomérase. La lignée est non tumorigénique.	Banque d'échantillons biologiques (seins/ovaires) et de données de Sherbrooke qui fait partie de la Banque de tissus et de données du Réseau de Recherche en Cancer du FRSQ Réalisé par Sylvain L'Espérance, 2005
293T	Cellules qui proviennent de la lignée cellulaire 293 de cellules primaires embryonnaires du rein transformée avec l'ADN de l'adénovirus humain type 5. Les 293T ont également été infectées avec le SV40 large T antigen.	Obtenu du Laboratoire du Dr. François Boudreau de l'Université de Sherbrooke.

Les milieux de culture utilisés pour chaque lignée cellulaire sont décrits dans le tableau 4.

Tableau 4: Description des différents milieux utilisés

Lignées cellulaires	Milieux de culture (WISENT, St-Bruno, Canada)	Suppléments des milieux (WISENT, St-Bruno, Canada)	Ajouts spécifiques
SKOV3-EV	DMEM/F12 50/50 mix		100 mg/ml Zéocine™ (Invitrogen)
SKOV3-CTD			0,01 mg/ml d'insuline (Wisent) 1 µg/ml
KDEL 4:5 #12			

		10 % FBS	Doxycycline 1 µg/ml blasticidine
KDEL 1:9 #7	RMPI 1640	2,5 µg/ml amphotericine B	0,01 mg/ml d'insuline (Wisent) 1 µg/ml Doxycycline 0,5 µg/ml blasticidine
KDEL 1:9 #9		2 mM L-glutamine	
		100 µg/ml Streptomycin	0,01 mg/ml d'insuline (Wisent) 1 µg/ml de Doxycycline 1 µg/ml blasticidine
NIH3T3	DMEM		-----
OVN221T	OSE		0,1 µM β-Estradiol (Sigma)
OVN321T			
OVN225T			
OVNT95hert	OSE		0,1 µM β-Estradiol 50 µg/ml Hygromycin B (Wisent)
293 T	DMEM		0,1 mM MEM Non-Essentiel Amino Acids Solution (Invitrogen) 10 mM Hépès (WISENT)

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans des flacons T75 (Becton Dickinson, Missisauga, ON) dans des incubateurs à 37 °C, en présence de 5 % CO₂. Les passages ont été effectués lorsque les cellules atteignent 80-95 % de confluence. Ce qui représente un passage d'une fois semaine pour les cellules suivantes : OVNT225, OVNT221, OVNT321, OVNT95hTERT et

de deux fois par semaine pour celles-ci : SKOV3-EV, SKOV3-CTD, KDEL 4:5 #12, KDEL 1:9 #9, KDEL 1:9 #7, NIH3T3, 293 T. Lors du passage cellulaire, le milieu de culture a tout d'abord été retiré du flacon T75 et les cellules ont été lavées avec 5 ml de PBS (WISSENT, St-Bruno, Québec). Par la suite, 2 ml de 0,05 % de trypsine/0,53 mM EDTA (WISSENT) a été ajouté aux cellules afin qu'elles décollent de la paroi du flacon. Suite à une incubation de 30 secs. à 5 min. dans les incubateurs (37 °C et 5 % CO₂) selon le type cellulaire utilisé, les cellules maintenant en suspension ont été récoltées avec 8 ml de milieu de culture et placés dans un tube de 15 ml pour être centrifugé 5 min. à 1000 RPM dans une centrifugeuse Labofuge 400R (Heraeus). Ensuite, le surnageant des cellules a été aspiré et jeté. Le culot des cellules a été suspendu dans 3 ml de milieu de culture et le tiers a été réensemencé dans un T-75 avec un volume final de 10 ml.

8. Construction des lentivirus

8.1 Construction du vecteur pLenti6V5 avec les tags

Pour exprimer MUC16-CTD dans les cellules, un premier plasmide a été réalisé par Isabelle Matte. Ce plasmide est le pLenti6V5 (Invitrogen, Burlington, ON), obtenu et modifié par le laboratoire du Dr. François Boudreau (Département d'anatomie et biologie cellulaire, Université de Sherbrooke, QC), sur lequel ont été ajouté; un signal de sécrétion (IgK leader), des adaptateurs ainsi que deux étiquettes c-myc et Flag. Ces derniers sont séparés par des sites de restrictions où sera cloné l'ADN de la partie C-terminale de MUC16 par des adaptateurs (Integrated DNA Technologie, Coralville, IA). Les adaptateurs possèdent des extrémités à bouts cohésifs et sont donc prêts à être assemblés au plasmide par ligation. Le tableau 5 décrit toutes les séquences utilisées pour la formation de ce plasmide.

En résumé, le processus de clonage consiste à premièrement digérer le plenti6V5 avec les enzymes de restrictions qui correspondent aux sites de restriction (New England Biolabs inc., USA) de l'ADN à insérer. Les digestions enzymatiques ont été faites selon les protocoles de la compagnie New England Biolabs inc. Les produits de digestions ont été purifiés en utilisant le QIAquick PCR Purification kit (Quiagen, Maryland, USA) selon les instructions fournies. Ensuite, l'hybridation (*annealing*) de l'adapteur a été réalisée en incubant 10 min à 65 °C, suivi d'une incubation entre 1 h et 2 h à la température pièce. Par la suite, une ligation de l'adapteur a été effectuée toute la nuit à 16 °C. Finalement, les constructions ont été validées en digérant le plasmide avec les enzymes de restriction spécifiques suivi d'une électrophorèse de ce produit sur un gel d'agarose de 0,6 %/TAE. Une fois le plenti6v5+tags terminé et validé, la portion de MUC16-CTD a été ajoutée. Le tout a été réalisé par Isabelle Matte

Tableau 5: Séquences des différentes amorces et adaptateurs utilisés.

Amorces	Séquence
Linker (G ₃ S) ₃ (36 pb)	GGT GGC GGA TCT GGT GGC GGA TCT GGT GGC GGA TCT
Flag (24 pb)	GAT TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG
C-MYC (33 pb)	GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT
IgK Leader (63 pb)	ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC

Muc16-Cterm-XhoI-64	CAACTCGAGTTGCAGATCCTCCAGGTCTAG
Muc16-CTD-EcoRV-63	AACGATATCATCACCTGCTGAGGGACATC
Adapteurs	Séquence
XhoI-LinkerFlag-BstBI-SENS	TCGAGGGTGGCGGATCTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGATCTG ATTACAAGGACGACGATGACAAGTGACCCGGTT
XhoI-LinkerFlag-BstBI-ANTISENS	CGAACCCGGGTCACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAATCAGATCC GCCACCAGATCCGCCACCAGATCCGCCACCC
EcoRI-MycLinker-EcoRV-SENS	AATTCACTAGTGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGA ATGGTGGCGGATCTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGATCTGA
EcoRI-MycLinker-EcoRV-ANTISENS	ATCAGATCCGCCACCAGATCCGCCACCAGATCCGCCACCATT CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCCTAGTG
BamHI-IgK-EcoRI-SENS	GATCCGGTACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTAC TGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACG
BamHI-IgK-EcoRI-ANTISENS	AATTCGTCACCAGTGGAACCTGGAACCCAGAGCAGCAGTACC CATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCATGGTACCG
MUC16cytoN-Flaglinker-SENS	GATCCGGTACCATGGATTACAAGGACGACGATGACAAGGGT GGCGGATCTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGATCTGAT
MUC16cytoN-Flaglinker-ANTISENS	ATCAGATCCGCCACCAGATCCGCCACCAGATCCGCCACCCTT GTCATCGTCGTCCTTGTAATCCATGGTACCG
MUC16cytoC-LinkerFlag-SENS	ATCGGTGGCGGATCTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGATCTGAT TACAAGGACGACGATGACAAGTGAGCGGCCGCGC

Muc16cytoC- LinkerFlag- ANTISENS	TCGAGCGCGGGCCGCTCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCAG ATCCGCCACCAGATCCGCCACCAGATCCGCCACCGAT
--	---

8.2 Construction du vecteur pLenti6V5-tags-CTD

La construction du vecteur pLenti6V5-tags-CTD a été réalisée par Isabelle Matte. Brièvement, cette construction du domaine C-terminal de MUC16 (MUC16-CTD) contient les 284 derniers a.a de la protéine. Elle a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pME18S-FLJ14303 (Helix Research Institute, Japan) avec l'utilisation de l'amorce 5' qui a un site de restriction EcoRV: 5'- AAC GAT ATC ATC ACC CTG CTG AGG GAC ATC-3' et de l'amorce 3' qui possède un site de restriction XhoI : 3'- GAT CTG CTC CTA GAC GTT GAG CTC AAC-5'. Suite au PCR, le plenti6V5+tags ainsi que le produit PCR ont été digérés par EcoRV et XhoI (New England Biolabs inc). Les digestions enzymatiques ont été faites selon les recommandations de la compagnie dans une solution de 20 µl contenant de l'eau Baxter, 100 µg/ml de BSA et le tampon NEB2. Les produits de digestions ont été purifiés avec le PCR QIAquick PCR Purification kit (Quiagen) selon les instructions fournies. Ensuite, les amplicons digérés ont été insérés dans le vecteur pLenti6V5 + tags qui contiennent en 5' une séquence IgK leader, un tag c-myc et un petit linker (23 a.a) et en 3' un petit linker et un tag Flag (21 a.a) décrit précédemment. La figure 7 décrit plus en détail les différentes étapes de cette construction et l'image du plasmide terminé. Le vecteur contrôle quant à lui est dépourvu de la séquence amplifiée de MUC16-CTD.

ÉTAPES CONSTRUCTION – ajout des amplicons pour CTD

1. PCR pour amplifier CTD
2. Gel agarose 2% pour vérification de la réaction d'amplification.
3. Digérer plasmide plenti + Tags avec EcoRV et XhoI (37°C, 2h, NEB 2 + BSA).
4. Digérer amplicon CTD avec EcoRV et XhoI (37°C, 2h, NEB 2 + BSA).
5. PCR Clean Up.
6. Lier les amplicons digérés au plasmide (O/N, 16°C).
7. Digérer EcoRI (37°C, 2h, NEB 2 + BSA) et vérifier les tailles des bandes créées
CTD: 7996 pb → 7241 + 755

Digestion EcoRI – Vérification de la construction

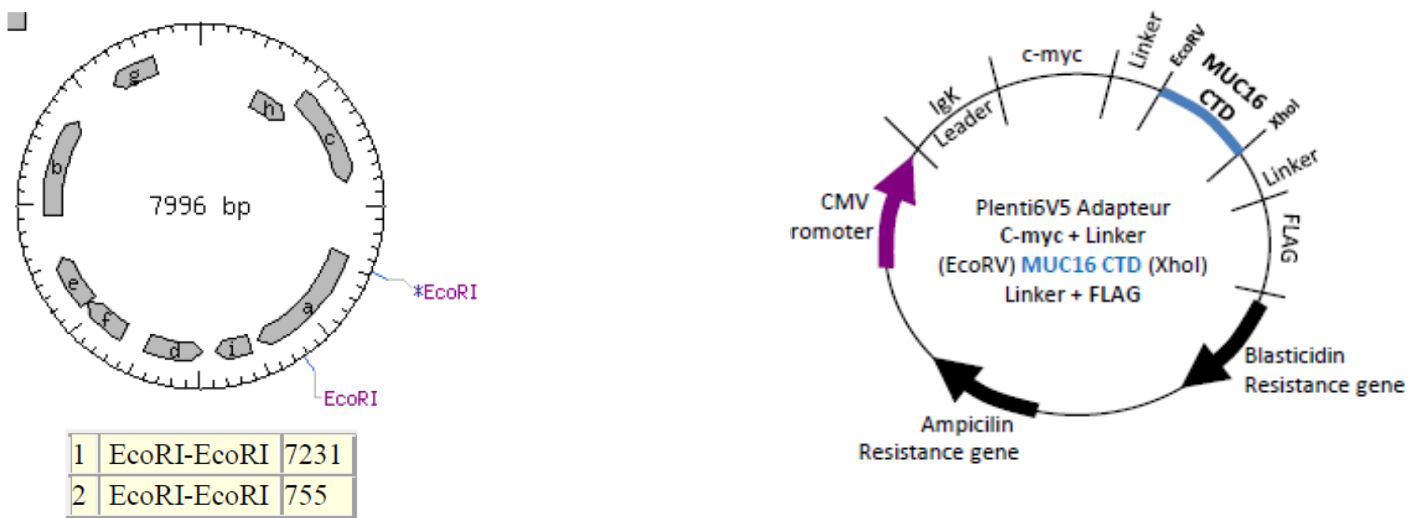


Figure 7: Les différentes étapes de la construction du plasmide plenti6V5-tags-MUC16-CTD

Réalisée par Isabelle Matte.

8.3 Transformation des bactéries

Des bactéries Stbl 3 (Invitrogen, fournie par Dr. François Boudreau) ont été rendues compétentes par choc thermique selon le protocole décrit par le livre Molecular cloning: A Laboratory Manual et entreposées à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Pour la transformation des bactéries Stbl3, elles ont tout d'abord été décongelées sur glace. Lorsqu'elles ont été décongelées, 20 µl de bactéries ont été ajoutés à chaque tube de réaction de ligation sur glace. Le mélange d'ADN et de bactéries a été par la suite déposé dans une cuvette d'électroporation froide. Le tout a été mis dans un électroporateur selon les conditions suivantes : 1,2 kV, 25 µF et 200 Ω, puis 1 ml de milieu SOC a été ajouté dans la cuvette d'électroporation. La solution a été transférée par la suite dans un tube de 1,5 ml et incubé avec agitation durant 1 h 30 à 30 °C. Ensuite les solutions ont été centrifugées 3 min. à 5000 rpm à température ambiante. Le culot a par la suite été resuspendu dans 200 µl de LB (0,17 M chlorure de sodium (Fisher Scientific, Markham, ON) , 1 % (m/v) Bacto Tryptone (Becton, Dickinson and compagny), 0,5 % (m/v) Yeast Extract granulated (EMD Chemicals Inc., Etobicoke, ON), 1,5 % (m/v) Agar-agar Granulated (EMD Chemicals Inc.) et 100 µl à été étendue sur des pétris LB contenant 0,27 mM d'ampicillin (USB corporation, Cleveland, Ohio). Les pétris ont été incubés toute la nuit à 30 °C en position inversée.

8.4 Analyse des vecteurs pLenti/Adapteur CTD positifs

Les colonies ont été prélevées pour inoculer des tubes de 5 ml de LB Both stérile contenant 0,27 mM ampicilline. Les cultures des clones Stb13-CTD ont été incubées O/N à 30 °C avec agitation. Les vecteurs ont été recueillis par des minipreps effectuées avec le QIAprep Spin Miniprep Kit (50) (QIAGEN), selon les instructions fournies. L'ADN obtenu a ensuite été analysé sur un gel d'agarose 0,6 %/TAE en faisant migrer 5 µl de chaque miniprep pour vérifier la présence de l'insert dans les vecteurs positifs. Le reste de la culture des clones positifs a été divisé en aliquots de 1 ml et congelée à -80 °C dans une solution 10 % (v/v) de glycérol stérile (Roche, Mississauga, ON).

8.5 Production des lentivirus

Des cellules 293T ont été utilisées pour la production de lentivirus. Ces dernières sont transfectées avec des plasmides codant pour différentes composantes virales soit pLP1, pLP2 et pLPVSVG (Invitrogen) qui ont été obtenus du laboratoire du Dr. François Boudreau et avec soit la construction pLenti6V5-MUC16-CTD, la construction pLenti6V5-EV ou la construction plenti-GFP. Pour la transfection, les cellules 293T ont été utilisées à 60-70 % de confluence. Les solutions qui suivent sont préparées pour chacune des transfections : 6 µg des plasmides; pLP1, pLP2, pLPVSVG (Invitrogen) et 6 µg de l'une des trois constructions illustrées à la figure 8, ont été ajoutés à 1,5 ml d'OPTIMEM (Wisent). Parallèlement, des solutions d'agent de transfection (48 µl de Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) dans 1,5 ml d'OPTIMEM) ont été préparées. Ces solutions ont été incubées 5 min. à température pièce. Par la suite les deux solutions (ADN-OPTIMEM et Lipofectamine-OPTIMEM) ont été mélangées ensemble et incubées pour 20 min. à température pièce.

Les cellules 293 T ont été rincées doucement avec l'OPTIMEN et 5 ml d'OPTIMEN ont été rajoutés à la solution ADN/Lipofectamine. Les cellules ont été incubées pendant 4 h à 37 °C et 5 % CO₂. Par la suite le milieu a été retiré, 10 ml de DMEM 10 % FBS (WISENT) a été ajouté doucement et incubé pendant 48 h à 37 °C, 5 % CO₂. Suite à l'incubation de 2 jours, le milieu des 293 T infectées a été prélevé avec une seringue de 10 ml et a été filtré à l'aide d'un filtre 0,45 µm (Pall, Mississauga, ON). Des aliquots de 700 µl ont été faits et conservés à -80 °C jusqu'à l'infection des lignées cellulaires.

Pour les lentivirus plenti6V5-MUC16-TMU, ils ont été décongelés pour l'infection, préalablement réalisée par Martine Migneault (Migneault, 2008).

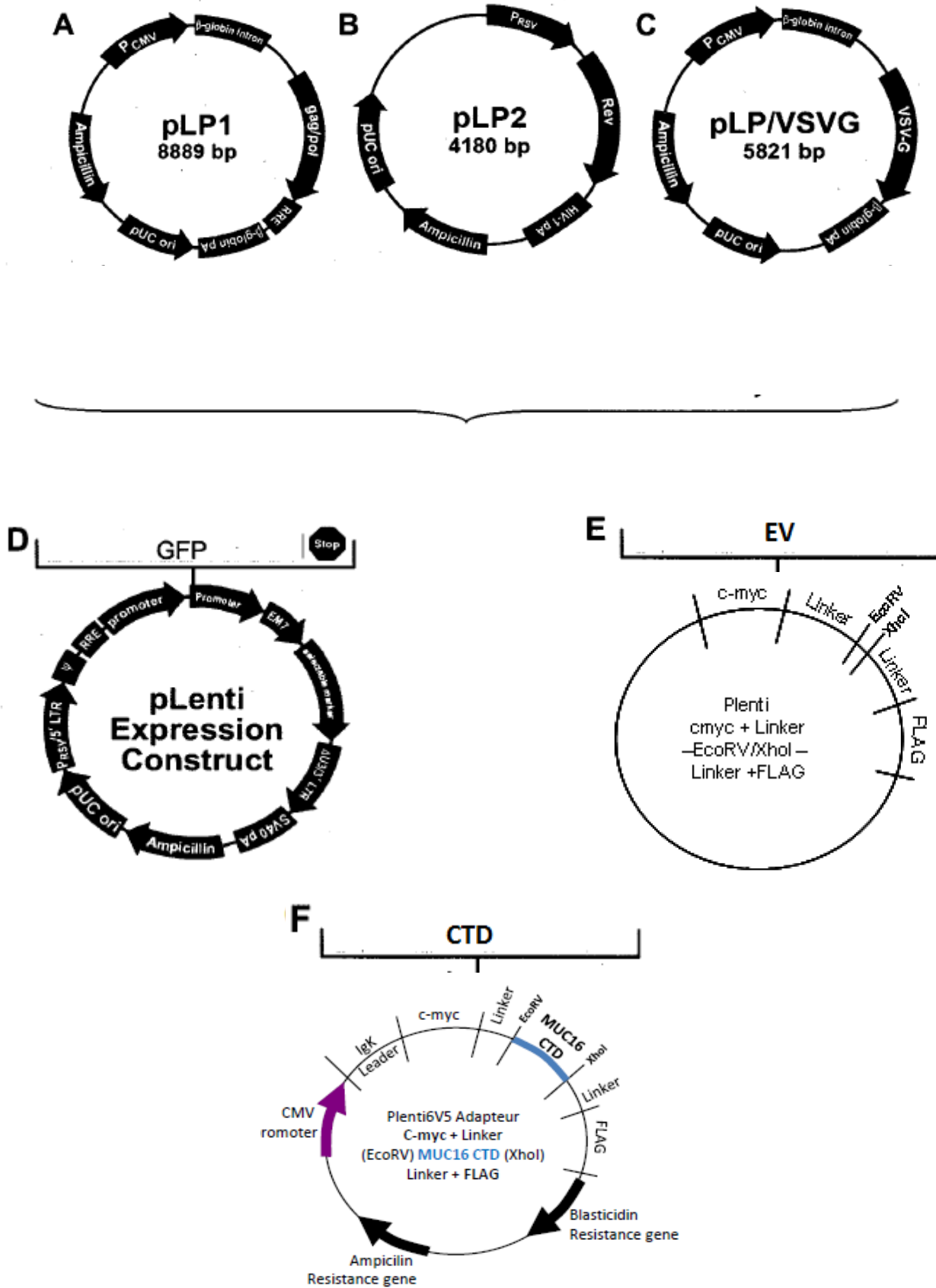


Figure 8: Les plasmides utilisés pour la production de lentivirus

A, B et C: Les plasmides pLP1, pLP2 et pLP/VSVG qui codent pour les différentes composantes des lentivirus. D, E et F: Les différentes constructions pLenti6V5 qui servent de contrôles (D et E) ou qui exprime le CTD (F) de MUC16.

9. Infection des lignées cellulaires et établissement de populations stables

Les différentes lignées cellulaires à infecter ont été ensemencées dans des plaques 6 puits. Lorsque les cellules atteignent une confluence de 50 %, des aliquots de virus ont été ajoutés suite à une décongélation rapide de ces derniers dans un bain à 37 °C et l'ajout de 4 µg/ml d'hexadiméthrine bromide (polybrène) (Sigma Canada Ltd, Oakville, Ontario, Canada). Ensuite, le surnageant des cellules a été retiré et 700 µl de solution virale avec le polybrène a été ajouté à chaque puits. Les plaques 6 puits ont par la suite été incubées 1 h à 37 °C et 5 % de CO₂. Ensuite, 2 ml de milieu complet avec 4 µl de polybrène ont été rajoutés à chaque puits. Les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37 °C et 5 % de CO₂, puis le milieu de culture a été remplacé par du milieu complet contenant de la blasticidine 0,5 µg/ml (Sigma). L'expression de MUC16-CTD, MUC16-TMU, du vecteur vide (EV) dans les cellules a été obtenue en maintenant la sélection à la blasticidine. La confirmation des populations a été faite par RT-PCR 10 jours après la sélection.

Des clones indépendants ont été obtenus à l'aide de deux méthodes différentes. Pour la population NIH3T3, les clones ont été obtenus en effectuant une dilution des populations dans des plaques de 96 puits afin d'obtenir une cellule par puits. Une sélection avec la blasticidine et une observation au microscope a été faite chaque jour, jusqu'à ce que la cellule présente dans le puits s'est divisé et aie atteint la confluence. Ensuite, les cellules sont prélevées selon la méthode utilisée pour un passage cellulaire et transféré dans des puits plus grands. Pour les OVNT95-hTERT, les clones indépendants ont été obtenus avec la méthode de cylindre de clonage qui consiste à isoler une petite colonie de cellules à l'aide de petits cylindres de métal préalablement stérilisés. Lorsque les cellules atteignent une confluence, elles sont prélevées dans les cylindres avec la même méthode d'un passage cellulaire et transférées dans des puits plus grands. Les clones ont été validés par RT-PCR, par immunofluorescence et par immunobuvardage décrit plus loin.

10. Extraction d'ARN

Suite à la sélection et selon les règles de sécurité, l'ARN des différentes populations a été extrait. Afin d'éviter une contamination avec la RNase, les manipulations ont toutes été effectuées avec des matériaux lavés avec une solution RNase free (Molecular Bio Products, Mexico). La monocouche cellulaire d'un T-75 à 95 % de confluence a été lavée avec 5 ml de PBS. Après le retrait du PBS, 1 ml de réactif Trizol (Invitrogen) a été ajouté sous la hotte chimique. Par la suite, le flacon a été doucement agité afin que le Trizol recouvre toutes les cellules. À l'aide d'un grattoir (Sarstedt, Montréal, QC), les cellules ont été décollées de la paroi du falcon et puis transférées dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. La solution ARN a été inversée pendant 15 secs puis incubée pendant 5 min. à la température ambiante. Toujours sous la hotte chimique, 500 µl de chloroforme A.C.S réactif (Fisher) a été ajouté à chaque échantillon, agité pendant 20 secs. et incubé 10 min. à la température ambiante. Après l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm durant 15 min. à 4 °C. La phase supérieure des échantillons a été transférée dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml. Puis, 500 µl de chloroforme a été ajouté à chaque échantillon le tout a été agité et centrifugé immédiatement. Les échantillons ont été centrifugés quelques secondes et ensuite la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml. Un volume d'isopropanol équivalent au volume de la solution d'ARN a été ajouté à chaque échantillon. Les tubes ont été agités pendant 20 secs. et puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min. à 4 °C. Le surnageant a été retiré et 900 µl d'éthanol 75 % a été ajouté afin de laver le culot. Les tubes ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 5 min. à 4 °C, puis l'éthanol a été retiré et les culots d'ARN ont été séchés à l'air ambiant quelques minutes. Une fois, les culots séchés, ils ont été resuspendus dans 25 µl d'eau traitée au DEPC et chauffés à 65 °C pendant 10 min. L'eau DEPC a été préalablement préparée avec du Diethyl Pyrocarbonate (SIGMA) en suivant les instructions de la page 7.84 de Sambrook et Russel, 2001. Les échantillons ont ensuite été légèrement mélangés avec

des *up and down*. Les échantillons ont été dosés avec un DU Series 600 Spectrophotometer (Beckman Instrument, California, USA). L'intégrité des échantillons a également été vérifiée en faisant migrer 1 µl d'ARN sur un gel d'agarose 0,6 % d'agarose/TAE RNase Free. L'ARN a par la suite été entreposé à -80 °C jusqu'à une future utilisation.

11. RT-PCR

Un RT-PCR a été réalisé sur les différents échantillons afin de valider l'expression du mRNA de la construction MUC16-TMU et MUC16-CTD. Dans des tubes de 1 ml, 2 µg ARN de chaque échantillon a été mélangé avec 1 µg d'Oligo (dt) 15 primer (Promega, Madison, WI). Le volume total de la solution a ensuite été porté à 15 µl avec l'eau DEPC. Les tubes ont été incubés pendant 5 min. à 70 °C. Après, 2,6 µl d'eau DEPC, 5,0 µl Buffer 5X MMuLV RT (Catherine Desrosiers, Département de microbiologie et infectiologie, Université de Sherbrooke), 2,4 µl dNTPs 25 mM et 90 U de MMuLV Reverse Transcriptase ont été ajoutés aux échantillons. Les tubes ont été incubés 1 h à 42 °C.

Par la suite, 2 µl des solutions d'ADN obtenus ont été utilisés pour effectuer une réaction PCR.

Les amorces utilisées pour l'amplification de MUC16-CTD sont :

5'-CAACTCGAGTTGCAGATCCTCCAGGTCTA-3' (sense) et

5'-AACGATATCACCCCTG CTGAGGGACAT -3' (antisense)

(IntegratedDNA technologies).

Alors que ceux pour l'amplification de MUC16-TMU sont:

5'-AATATCTTAAGCGGCCGCACCGGGTGGTCACCAGGAC-3'(sense) et

5'-ATGCGGCCATCTAGGCCACATCACCCCTGAGGGAC-3'(antisense)

(IntegratedDNA technologies).

Donc 2 µl d'ADN, 1,0 µl de l'amorce 3', 1,0 µl de l'amorce 5', 5,0 µl de tampon 10X Pfu Ultra, 0,4 µl dNTP 25 mM (GE Healthcare, Mississauga, ON) et 40,6 µl d'eau DEPC ont été premièrement incubés 5 min. à 94 °C dans un appareil PCR Eppendorf Mastercycler gradient (Brinkmann, USA). Ensuite, 2,5 U d'enzyme Pfu Ultra ont été ajoutés à chaque réaction de PCR. À 30 reprises, les échantillons ont été dénaturés à 94 °C pendant 1 min., hybridés à 65 °C pour 1 min et polymérisés à 72 °C pendant 1 min. Suite aux 30 répétitions, les échantillons ont été incubés pendant 15 min. à 72 °C et ensuite préservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

Afin de vérifier les réactions PCR, un gel d'agarose LE de 1,5 % (Roche) dans du TAE 1X ((40 mM Tris (Roche), 1 mM EDTA pH 8 (SIGMA), 20 mM acide acétique glacial (Fisher)) a été préparé avec du bromure d'éthidium 1:10 000 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Puis, 10 µl des produits de PCR ont été placés sur le gel d'agarose et le tout a été migré à 110 volts pendant 45 min. Les produits de PCR ont été observés sous la lumière ultraviolette de l'appareil High Performance UV transilluminator (UVP, Upland, CA).

12. Immunobuvardage de type Western

L'expression au niveau protéique a été évaluée par immunobuvardage de type Western. Afin d'obtenir un lysat, deux méthodes ont été utilisées. La première méthode, afin d'avoir un lysat plus concentré, débute avec les premières étapes d'un passage cellulaire. Lorsque le culot a été obtenu, il a été suspendu dans 200 µl de tampon de lyse (50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 1 % Triton X100) auquel a été ajouté les inhibiteurs de protéases suivants: 1 µg/ml 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (Sigma), 2 µg/ml aprotinine (Roche), 0,7 µg/ml pepstatine (Sigma) et 0,5 µg/ml leupeptine (Sigma). Pour la deuxième méthode, les cellules ont été mises préalablement dans une plaque 6 puits et ont été grattées avec

un grattoir suite à l'application du tampon de lyse dans chaque puits et une agitation de 15 min. à 4 °C.

Les lysats ont été transférés dans des tubes de 1,5 ml, agités 15 min. à 4 °C et centrifugés 10 min. à 5 000 rpm. Les surnageants ont été par la suite transférés dans des nouveaux tubes de 1,5 ml. Les échantillons ont soit été utilisés directement ou entreposés à -20 °C pour une utilisation future.

Pour l'immunobuvardage, les échantillons ont été dosés par la méthode de Bradford en utilisant le Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD, Mississauga, ON) selon les recommandations du fournisseur. De 10 µg à 50 µg de protéines ont été utilisés, les échantillons ont tout d'abord été incubés 5 min. à 95 °C avec du tampon de chargement (250 mM Tris-HCL pH 6,8, 5 % (m/v) SDS (Invitrogen), 50 % (v/v) glycérol, 681 mM β-mercaptoéthanol (SIGMA) et du rouge phénol (Fisher)). Les échantillons ont été placés sur des gels SDS-PAGE. Ces gels sont constitués d'un gel concentrateur 4 % et un gel séparateur 10 %, les échantillons migrent environ 1 h à 150 V à la température ambiante dans un tampon de migration (25 mM Tris, 0,2 M glycine (WISSENT), 0,1 % (m/v) SDS pH 8,3). Le transfert des gels sur une membrane PVDF (Roche) a ensuite été effectué pendant 1 h 30 à 300 mA à 4 °C, dans un tampon de transfert (20 % méthanol, 25 mM Tris et 192 mM glycine). Suite au transfert des protéines sur les membranes, ces dernières ont été bloquées dans un tampon de blocage (lait en poudre commercial 5 % (m/v), 0,1 % (v/v) Tween 20 (EMD)/PBS (9,1 mM phosphate de sodium dibasique (J.T Baker), 1,7 mM phosphate de sodium monobasique (Fisher), 15 mM chlorure de sodium; pH 7,4)) pendant 1 h avec agitation à la température ambiante.

Par la suite, l'anticorps a été dilué de façon appropriée, voir tableau 6, dans 5 % de lait et les membranes ont été incubées avec agitation O/N à 4 °C. Le lendemain, les membranes ont tout

d'abord été lavées, 3 fois durant 15 min., sous agitation et à température pièce avec du PBS/Tween (0,1 % Tween 20/PBS). Ensuite, elles ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (Tableau 6) dilué dans du lait 5 % durant 45 min. à température pièce sous agitation. Encore une fois, les membranes ont été lavées 3 fois pendant 15 min. avec du PBS/Tween. La révélation a été faite avec le kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) en suivant les instructions du fournisseur. Des films HyBlot CL autoradiography film (Denville scientific inc., Metuchen) ont été utilisés lors de l'exposition des membranes en ajustant le temps d'exposition selon l'anticorps utilisé et les bandes obtenues.

Tableau 6: Différents anticorps et dilutions utilisés pour l'immunobuvardage et l'immunofluorescence

Anticorps	Compagnie	Dilution pour l'immunobuvardage de type Western	Dilution pour l'immunofluorescence
c-myc (Mouse)	Invitrogen	1 : 2500	1 : 100
c-myc sc-789(Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	1 : 1000	1 : 200
M2	Sigma	1 : 500	1 : 100
Tubuline	Sigma	1 : 25000	-
N-cadhérine	Santa Cruz Biotechnology	1 : 200	1 : 100
E-cadherine	BD transduction Laboratories	1 : 200	1 : 100
β- caténine	Santa Cruz Biotechnology	1 : 500	1 : 800
Vimentin	Santa Cruz Biotechnology	1 : 1000	1 : 500
Cytokératine 8 et 18	Zymed Laboratories Inc.	-	1 : 250
a-actinin	Santa Cruz Biotechnology	-	1 : 50
ERK	Santa Cruz Biotechnology	1 : 2500	-
P-ERK	Cell Signaling	1 : 1000	-
Akt	Cell Signaling	1 : 1000	-
P-Akt (ser473)	Cell Signaling	1 : 1000	-
Kit Cycline	Cell Signaling	1 : 1000	-
mcl-1	BD pharmingen	1 : 500	-

Bcl-2	Dako	1 : 1000	-
Bcl-x1	Cell Signaling	1 : 1000	-
FOXO3	Upstate	1 : 1000	-
Elk	Cell Signaling	1 : 1000	-
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	1 : 1000	-
Anti-Mouse HRP	Cell Signaling	1 : 3000	-
Anti-Rabbit HRP	Cell Signaling	1 : 3000	-

13. Immunofluorescence

La validation des constructions a également été faite par immunofluorescence (IF). Ainsi, des lames des différentes populations ont été réalisées. Dans des pétris, les cellules ont été déposées sur des lames Precleaned Micro Slides (Surgipath, Concord, ON) dans 200 µl de milieu de culture complet et étalées à l'aide des tiges NO-CAP stérile (Simport, Beloeil, CA). Les lames dans les pétris ont été incubées de 3 à 5 h à 37 °C et 5 % CO₂, afin que les cellules adhèrent bien à la surface des lames. Après cette période d'incubation, 10 ml de milieu de culture complet a été ajouté à chaque pétri et le tout a été remis en incubation à 37 °C et 5 % CO₂ pour la nuit, ou jusqu'à ce que les lames atteignent une confluence entre 50-70 %.

Les lames ont en premier lieu été rincées deux fois dans du PBS froid (0,17 M chlorure de sodium, 3,3 mM chlorure de potassium, 10 mM phosphate de Potassium dibasique, 1,8 mM phosphate monobasique; pH 7,4). Par la suite, les lames ont été fixées avec du formaldéhyde (Fisher) 3,7 %/ PBS froid pour 10 min. Par la suite, elles ont été lavées 3 fois dans du PBS pendant 5 min. Les lames ensuite ont été directement utilisées ou entreposées à 4 °C dans du PBS jusqu'à utilisation.

Lors des IF, les lames ont été incubées dans une solution de glycine 0,1 M/PBS pendant 30 min. à la température ambiante. Par la suite, pour les constructions MUC16-TMU les lames ont été

perméabilisées dans une solution de 0,2 % Triton/PBS pendant 20 min. Ces dernières, ont été lavées 2 fois pendant 10 min. dans du PBS sur une plaque agitatrice et ont été bloquées dans une solution de sérum de chèvre 2 % dans du PBS toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, les lames ont été lavées 3 fois pendant 10 min. dans du PBS sur une plaque agitatrice. Après, une dilution adéquate de l'anticorps primaire (Tableau 6) dans la solution de blocage a été appliquée à chaque lame (200 µl). Les lames ont été incubées à la température pièce pendant 1 h, dans une boîte humide. Par la suite, les lames ont été lavées 3 fois avec du PBS pendant 10 min. sur une plaque agitatrice. Les prochaines étapes ont été effectuées à la noirceur. Premièrement, l'anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente a été dilué (Tableau 7) dans la solution de blocage, puis appliqué aux lames (200 µl) et incubé pendant 45 min. dans une boîte humide. Suite à cette incubation, les lames ont été lavées encore 3 fois pendant 5 min. avec du PBS sous agitation. Puis, les lames ont été incubées 2 min. avec une solution 0,002 % DAPI (4',6' Di amidino-2-phenyl indole) (Life Technologies, Burlington, ON) dans du BSA 2 % (WISSENT). Les lames ont été par la suite lavées 2 fois pendant 10 min. avec du PBS à la température ambiante, toujours à la noirceur. Finalement, les lames sont montées avec du milieu de montage contenant du p-phenylenediamine (Sigma) et observées au microscope Leica du département d'anatomie et biologie cellulaire (Université de Sherbrooke) sous le filtre adéquat.

Tableau 7: Anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence

Anticorps	Compagnie	Dilution pour Immunofluorescence
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse	Invitrogen	1 : 1000
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit	Invitrogen	1 : 1000

14. Comparaison de la morphologie

La morphologie des différentes populations a été évaluée par photographie à l'aide du microscope ECLIPSE TS 100 (Nikon corp.) avec un appareil numérique COOLPIX 4500 (Nikon corp.). Les photos ont été prises avec l'objectif 10X, les cellules d'une même lignée cellulaire avaient autant que possible une confluence similaire. La culture des cellules a été faite dans des plaques 6 puits et des T75; selon la méthode présentée au point 1.

15. Formation de foyers post confluence

Les cellules ont étéensemencées dans des pétris et incubées dans leurs conditions habituelles. Les cellules ont été suivies jusqu'elles atteignent leur confluence. Puis à 14 jours post-confluence, des photos ont été prises à 10X à l'aide du microscope ECLIPSE TS 100 (Nikon corp.) avec un appareil numérique COOLPIX 4500 (Nikon corp.). Les cellules ont été par la suite fixées avec la formaline (Fisher) et colorées avec du crystal violet 0,5 % (Sigma) pendant 15 min. Suite à cette coloration, les puits ont été pris en photos et les foyers contenant plus de 50 cellules ont été dénombrés.

16. Croissance en présence d'ancrage limité

La capacité des cellules en croître en absence d'ancrage a été évaluée. Tout d'abord, un mélange de 1,33 % d'agar et de milieu de culture 2X selon un ratio 1:1 a été déposé dans des plaques de 6 puits afin de recouvrir le fond des puits. Soit 1,5 ml du mélange a été ajouté par puits et incubé à température pièce jusqu'à la solidification. Puis les cellules ont été mélangées à 0,66 % d'Agar bacteriological grade (WISSENT) et du milieu de culture 2X (ratio 1:1) (WISSENT) pour obtenir 10^5 cellules par puits. Les plaques ont été incubées à température pièce jusqu'à solidification. Par la suite, 2 ml de milieu complet ont été ajoutés à chaque puits et les plaques ont été incubées à 37 °C et 5 % CO₂. Les plaques ont été incubées pendant 30 jours et le milieu a été changé aux 3-4 jours.

Suite à cette incubation, les puits ont été coloriés avec 1 mg/ml de MTT (3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-Diphényltétrazolium Bromide) (SIGMA)/PBS (WISSENT), 500 µl de réactif ont été déposés par puits et incubés pendant 3-4 h à 37 °C et 5 % CO₂. Les colonies colorées composées de 10 cellules et plus ont été dénombrées et des photos ont été prises.

17. Formation de sphéroïdes

Les sphéroïdes sont des agrégats de cellules cancéreuses souvent retrouvés au niveau de l'ascite des patientes atteintes du cancer de l'ovaire. Cette organisation permettrait aux cellules cancéreuses de survivre en absence d'ancrage à une matrice extracellulaire avant de former un foyer secondaire à distance, donc jouerait un rôle important dans le processus métastatique. Pour évaluer la capacité des cellules à former des sphéroïdes, deux méthodes ont été utilisées.

17.1 Méthode de la goutte inversée

Les cellules ont été comptées et suspendues dans du milieu complet afin d'avoir une concentration de 5×10^3 cellules par ml. Des gouttes de 15 µl de cette suspension ont été déposées dans le couvercle d'un pétri. Dans le pétri 10 ml de PBS ont été ajoutés pour éviter l'évaporation. Ainsi, le couvercle remis, les gouttes sont suspendues au couvercle et incubées à 37 °C avec 5 % CO₂. Des photos ont été prises à temps zéro et chaque jour durant 5 jours à l'aide du microscope ECLIPSE TS 100 (Nikon corp., CA) avec un appareil numérique COOLPIX 4500 (Nikon corp.).

17.2 Test d'agrégation

Des pétris ont été recouverts d'agar Agar bacteriological grade 1,2 % (WISSENT) et de milieu de culture sans sérum (WISSENT) selon le ratio 1 : 1 et laissé solidifier à la température de la pièce. Les cellules ont été comptées et suspendues dans du milieu complet afin d'obtenir une concentration de 270 000 cellules par ml. Par la suite, la suspension de cellules a été ajoutée au-dessus de l'agar et incubée à 37 °C avec 5 % CO₂. Des photos ont été prises à temps zéro ainsi qu'à

chaque jour sur une période de 2 jours avec l'aide du microscope ECLIPSE TS 100 (Nikon corp.) avec un appareil numérique COOLPIX 4500 (Nikon corp.)

18. Expérience de migration - Blessure sur monocouche

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 6 puits de façon qu'elles atteignent la confluence le lendemain. Une fois la confluence atteinte, un embout de 10 µl a été utilisé pour faire une blessure sur la monocouche. Une croix a été faite à l'aide de l'embout, puis lavée doucement au PBS. Ensuite, le milieu de culture contenant 40 mM d'hydroxyurée (Sigma) a été ajouté pour inhiber la prolifération cellulaire. Les cellules ont été incubées à 37 °C avec 5 % CO₂ pendant 48 h. Des photos ont été prises à 10X, le jour du traçage et les jours subséquents.

19. Formation de tumeurs chez les souris

Les différentes populations NIH3T3 ont été injectées de façon sous-cutanée à des souris NUDE (Charles River, St-Constant, QC, CA). Les souris NUDE sont des souris dépourvues de thymus et de lymphocytes T matures. Ces souris sont donc immunodéficientes au niveau du système immunitaire adaptatif, ces souris sont également dépourvues de pelage.

Les populations de NIH3T3 ont été envoyées à la compagnie IDEXX RADIL (Columbia, MO) afin de vérifier qu'elle était dépourvue d'agents pathogènes pour les souris. Par la suite, les cellules ont été concentrées en suivant le protocole de passage cellulaire, mis à part que la trypsine a été inactivée avec 2 ml de FBS, et les cellules ont été recueillies avec 5 ml de DMEM non supplémenté. Les culots des cellules ont par la suite été suspendus dans du milieu de culture non supplémenté et les décomptes cellulaires ont été effectués à l'aide d'un hémacymètre.

Les souris NUDE ont été injectées à quatre endroits sur le dos des souris avec 5 millions de cellules en suspension dans 100 µl de milieu (non complété) pour chaque injection. La croissance des tumeurs formées a été suivie jusqu'à ce que les tumeurs formées atteignent 1 cm³. Les tumeurs ont été par la suite retirées afin d'effectuer des coupes histologiques, mesurer leur poids et effectuer des extractions d'ARN.

20. Évaluation des tumeurs

20.1 Coupe histologique

Un morceau de tissu a été récolté à partir de chaque tumeur et mis entre deux éponges dans une cassette (Simport) préalablement mouillées dans PBS 1X, pH 7,4 (0,17 M chlorure de sodium, 3,3 mM chlorure de potassium, 10 mM phosphate de Potassium dibasique, 1,8 mM phosphate de monobasique). La cassette a par la suite été fermée et immergée dans une solution de fixation, soit du formaldéhyde frais 4 %/PBS à 4 °C pendant 18-24 h. Le lendemain matin, la solution de fixation a été changée pour de l'éthanol froid 70 %. Les cassettes ont été rincées 2 fois dans l'éthanol et par la suite remises au laboratoire de pathologie clinique (CHUS, Sherbrooke, QC) où les tumeurs ont été incluses dans la paraffine. Puis les blocs de paraffine ont été remis à la plateforme d'histologie et de microscopie électronique de la FMSS pour effectuer la coupe de plusieurs lames et la coloration à hématoxyline.

Pour déparaffiner, tout d'abord 3 lavages de 5 min. au xylène (Fisher) ont été effectués, suivi de 3 lavages de 10 min, à l'éthanol 95 % et de deux lavages de 5 min. à l'eau distillée. Par la suite pour exposer les antigènes les lames ont été incubées pendant 20 min. dans du citrate de sodium pH 6,0/0,05 % Tween chauffé. Les lames ont par la suite été refroidies à la température pièce pendant 10 à 20 min. Pour la coloration des lames; les lames ont été lavées 2 fois avec de l'eau distillée, puis une dilution d'anticorps approprié (Tableau 8) dans du TBS (Dako) /1 % albumine sérique

bovine (WISSENT) a été appliquées aux lames. Le tout a été incubé pendant 30 min. dans une boîte humide. Les prochaines étapes de la coloration ont été effectuées selon le protocole de Dako LSAB + System-AP (North America, Inc., CA, USA). Des photos sont prises à la fin de la coloration avec l'aide du microscope ECLIPSE TS 100 (Nikon corp.) avec un appareil numérique COOLPIX 4500 (Nikon corp.).

Tableau 8: Anticorps utilisés pour la coloration des coupes histologiques

Anticorps	Compagnie	Dilution
Tubuline	Sigma	1 : 500
α SMA	Dako	1 : 50
c-myc	Santa Cruz Biotechnology	1 : 50
moc31	Cappel ICN Pharmaceuticals inc.	1 : 10
E-cadhérine	BD transduction Laboratories	1 : 100
M2	Sigma	1 : 50

20.2 Extraction de l'ARN

L'homogénéisateur en verre et Teflon a été nettoyé avec ARNaway, suivi avec de l'éthanol 95 %, de l'eau stérile et finalement avec 1 ml de Trizol (Invitrogen). Le tissu a été par la suite ajouté et homogénéisé avec 800 μ l de Trizol. L'homogénéisation a été effectuée 1 min. à la fois afin que la solution ne devienne pas trop chaude. Suite à l'homogénéisation, la solution a été récoltée et mise à -80 °C. La suite de l'extraction de l'ARN est la même qu'avec les cellules décrites au point 4.

21. Micropuce

Des échantillons d'ARN des cellules OSE-hTERT ont été envoyés au Laboratoire du Dr. Dimcho Bachvarov (Département de médecine moléculaire, Université Laval, laboratoire oncogénomique, CHU-Q) afin d'effectuer un profil d'expression génique sur les deux clones indépendants qui expriment MUC16-CTD comparativement à la population contrôle qui exprime MUC16-TMU. Cet essai permet d'identifier les gènes et voies de signalisations augmentés ou diminués dans les différents clones qui expriment la partie C-terminale de MUC16. L'hybridation a été réalisée en utilisant le génome humain complet Oligonucléotides puce à ADN (Agilent), contenant ~ 44 000 gènes, au Centre de recherche sur le cancer, Hôpital Hôtel-Dieu de Québec. Après l'hybridation et le lavage, les ADN ont été analysés en utilisant une puce à ADN double-scanner laser (Agilent). Les données ont été extraites à partir d'images obtenues par le logiciel Feature Extraction 6.1 (Agilent). Le logiciel GeneSpring (Agilent) a été utilisé pour générer des listes de gènes choisis pour l'analyse statistique. Une normalisation de l'intensité dépendant (normalisation Lowess) a été appliquée afin de corriger les artefacts provoqués par des taux non-linéaires d'incorporation de colorant, ainsi que des incohérences de l'intensité de fluorescence relative entre les colorants. Les listes consécutives de gènes exprimés de manière différentielle ont été générés soit d'une expression 1,5 fois plus ou moins que les critères de sélection des gènes. Les gènes dans les listes de gènes ont été classés selon leur fonction en utilisant la Gene Ontology (GO SLIMS) système de classification. L'analyse de réseau des données de puces à ADN a été réalisée en utilisant le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com> WebCite). Les données de puces à ADN ont été déposés à la base de données GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> WebCite).

Résultats

22. Infection et validation de la lignée cellulaire immortalisées non-transformée NIH3T3

Des résultats préalablement obtenus par notre laboratoire indiquent que la partie C-terminale de MUC16 joue un rôle important dans la migration, l'invasion, le processus métastatique et dans la tumorigénèse du cancer ovarien. Ces observations suggèrent un rôle précoce dans la pathogenèse du CEO. Toutefois, son rôle précis dans la transformation cellulaire n'a pas été établi. Donc pour approfondir nos connaissances sur les fonctions de MUC16 dans la transformation cellulaire, la partie C-terminale de MUC16 (MUC16-CTD) a été exprimée de façon stable dans plusieurs types cellulaires.

Les fibroblastes de souris immortalisées NIH3T3 ont été utilisés en premier afin de vérifier la capacité de la partie C-terminale de MUC16 à transformer les cellules ou à leur conférer des caractéristiques de cellules cancéreuses. Cette lignée cellulaire a été choisie, car elle est un modèle cellulaire typiquement utilisé afin d'évaluer les propriétés oncogéniques de différentes protéines.

22.1 Infection et validation des populations

Les NIH3T3 ont été infectées avec les lentivirus plenti6V5-EV, plenti6V5-GFP, plenti6V5-MUC16-TMU et plenti6V5-MUC16-CTD, présentés dans la section matériel et méthode. Par la suite, une évaluation de l'efficacité des infections a été effectuée par l'observation de l'expression de la GFP chez les populations contrôles NIH3T3-GFP. Selon cette vérification, le pourcentage de cellules exprimant la GFP était de 30-40 % (Figure 9).

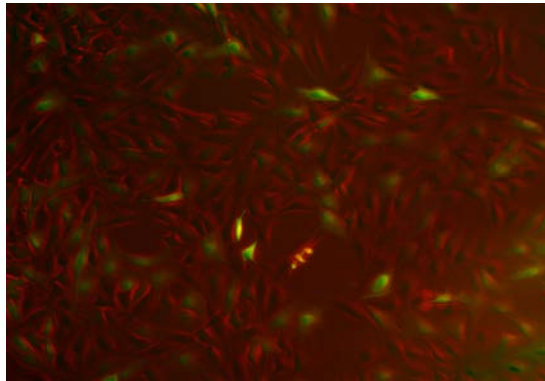


Figure 9: Efficacité d'infection des NIH3T3

Des photos des NIH3T3-GFP ont été prises 3 jours après l'infection des NIH3T3 à 20X pour évaluer l'efficacité d'infection par l'observation de la fluorescence verte des NIH3T3. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est de 30-40 %.

Une première validation a été faite après 10 jours de sélection avec la blasticidine, afin de confirmer la présence de la construction MUC16-CTD dans les 3 populations NIH3T3-CTD et l'absence de cette construction dans les populations contrôle NIH3T3-EV et NIH3T3-TMU. La construction dans les NIH3T3-TMU contenant seulement le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire de MUC16 est utilisée afin de déterminer si les effets observés sont bien attribuables à la partie cytoplasmique de MUC16. Cette validation a été faite par RT-PCR, les résultats sont présentés à la figure 10, on constate que les 3 populations NIH3T3-CTD infectées par le plenti6V5-MUC16-CTD expriment la construction MUC16-CTD alors que les populations contrôle NIH3T3-EV et NIH3T3-TMU ne l'expriment pas. Par choix arbitraire, nous avons choisi la deuxième population pour produire des clones indépendants.

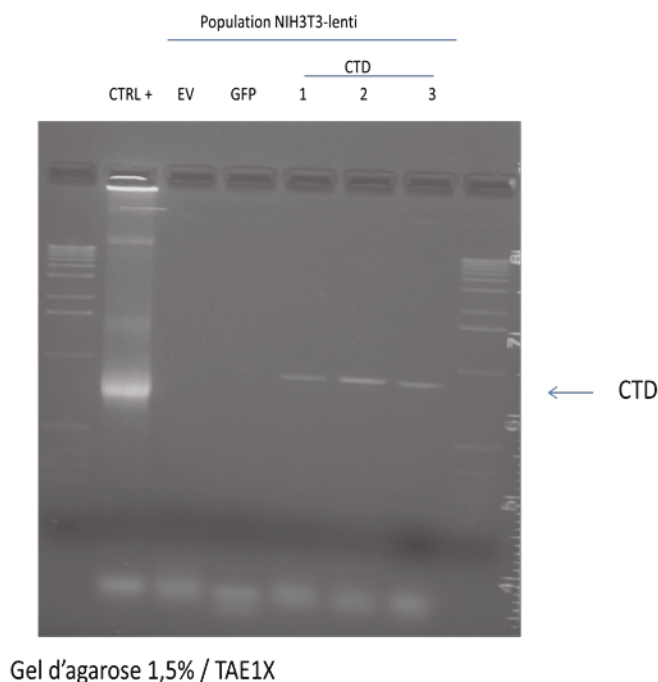


Figure 10: Validation des populations des populations NIH3T3-CTD par RT-PCR

Les produits du RT PCR ont été placés sur un gel d'agarose 1,5 % / TAE. L'expression de l'ARN de la construction de MUC16-CTD a été validée dans les trois populations NIH3T3-CTD. La population contrôle était les SKOV3-CTD. Les bandes sont aux alentours de 1000 pb, qui est la taille attendue pour la construction MUC16-CTD.

22.2 Validation des clones indépendants

Des clones indépendants NIH3T3-CTD ont été réalisés par la méthode de dilution. Plusieurs clones ont été obtenus et validés par RT-PCR, immunobuvardage et par immunofluorescence.

22.2.1 RT-PCR

Tout d'abord, les différents clones ont été vérifiés au niveau de la transcription à partir d'un RT-PCR. Les résultats sont présentés à la figure 11, on peut observer l'expression de la construction dans tous les clones indépendants obtenus. Nous avons décidé de conserver seulement les clones indépendants H9 et E9, par choix arbitraire, pour la suite des expériences et nous les avons nommés NIH3T3-CTD1 et NIH3T3-CTD2 respectivement.

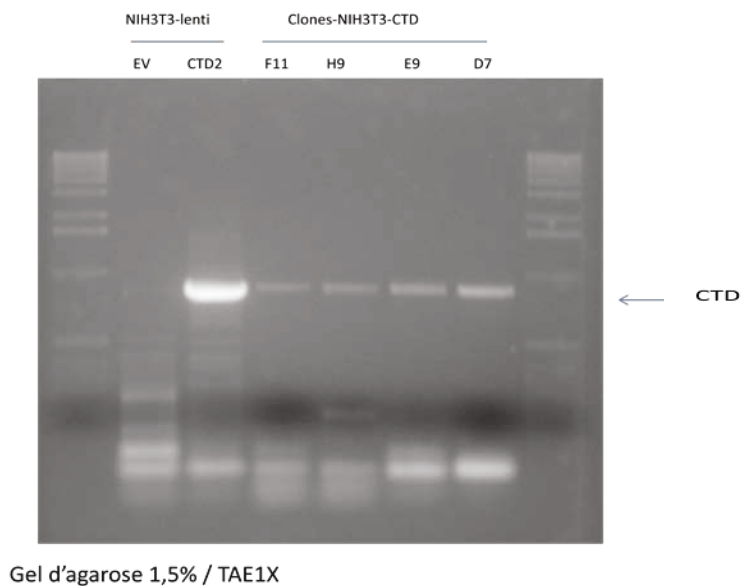


Figure 11 : Validation des clones indépendants NIH3T3-CTD par RT-PCR

Les produits du RT PCR ont été placés sur un gel d'agarose 1,5 %/TAE. L'expression de l'ARN de la construction de MUC16-CTD a été validée dans tous les clones indépendants NIH3T3-CTD. Les bandes sont aux alentours de 1000 pb, qui est la taille attendue pour la construction MUC16-CTD.

22.2.2 Immunobuvardage

L'expression de MUC16-CTD dans les clones NIH3T3 a ensuite été validée au niveau protéique par immunobuvardage de type Western. L'expression de MUC16-CTD a été détectée en utilisant les anticorps; anti-c-myc et anti-M2 (FLAG) qui sont spécifiques aux étiquettes dans la construction. On peut constater à la figure 12 qu'il y a expression de MUC16-CTD dans les deux clones indépendants NIH3T3-CTD1 et NIH3T3-CTD2.

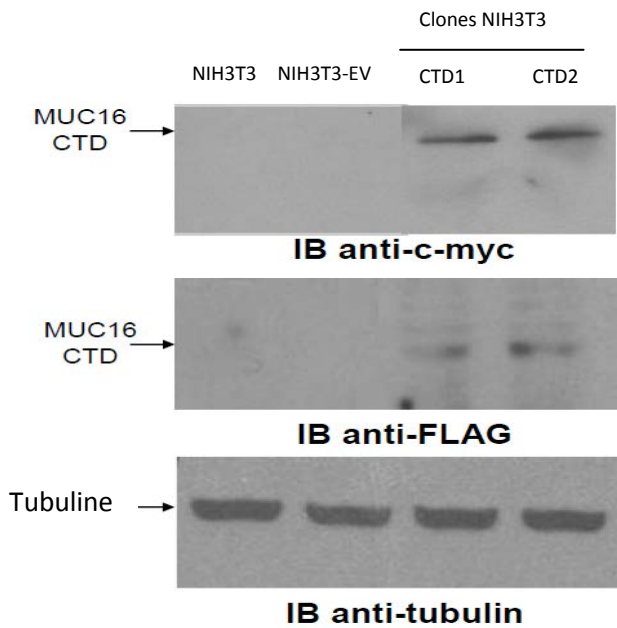


Figure 12: Validation des clones indépendants NIH3T3-CTD par Immunobuvardage

L'expression de MUC16 CTD a été détectée en utilisant un anticorps anti-c-myc ainsi qu'un anticorps anti-M2 (FLAG). Tubuline a été utilisé pour s'assurer que les niveaux protéiques étaient équivalents.

22.2.3 Immunofluorescence

Finalement, nous avons validé l'expression de MUC16-CTD dans les clones indépendants NIH3T3-CTD par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-c-myc. Les deux constructions MUC16-TMU et MUC16-CTD possèdent une étiquette c-myc (Figure 8). On détecte l'expression de MUC16-CTD dans les deux clones indépendants NIH3T3-CTD1 et NIH3T3-CTD2, ainsi que l'expression de MUC16-TMU dans la population NIH3T3-TMU (Figure 13).

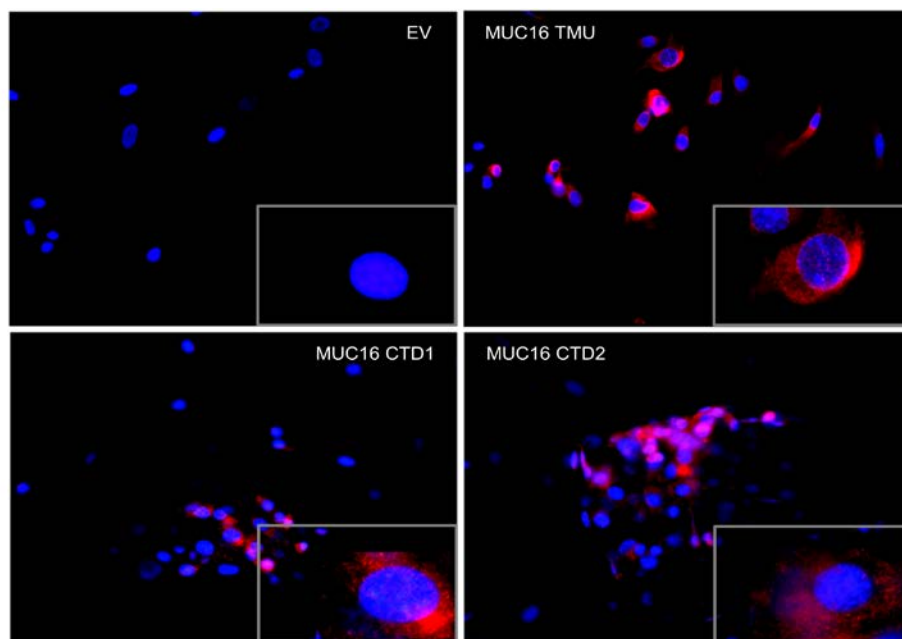


Figure 13: Validation des clones indépendants NIH3T3-CTD

Détection de l'expression de MUC16 CTD dans les clones NIH3T3-CTD et de l'expression de MUC16-TMU dans la population NIH3T3-TMU par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-c-myc. Les deux constructions (MUC16-TMU et MUC16-CTD) possèdent l'étiquette c-myc. La coloration bleue représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de la protéine c-myc.

23. Expériences d'évaluation de la transformation

Suite à la validation des clones indépendants, nous avons effectué plusieurs expériences afin d'évaluer la capacité de la partie C-terminale de MUC16 à transformer les NIH3T3.

23.1 Changement de morphologie

La morphologie des différentes populations NIH3T3 a été comparée et photographiée. On note des petites différences (Figure 14), les clones NIH3T3-CTD semblent avoir une morphologie plus épithéliale, les cellules sont plus regroupées et en forme d'étoile, alors que les populations NIH3T3-EV et NIH3T3-TMU semblent avoir une morphologie fibroblastique typique de la lignée cellulaire NIH3T3, soit des cellules plus allongées.

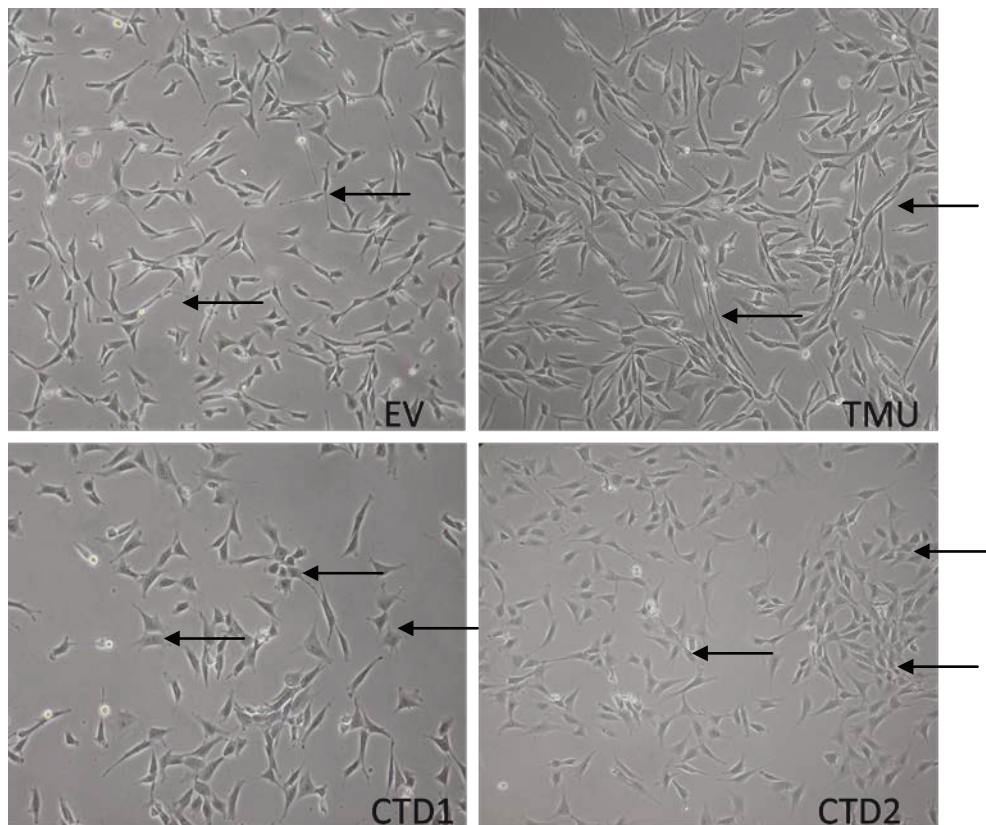


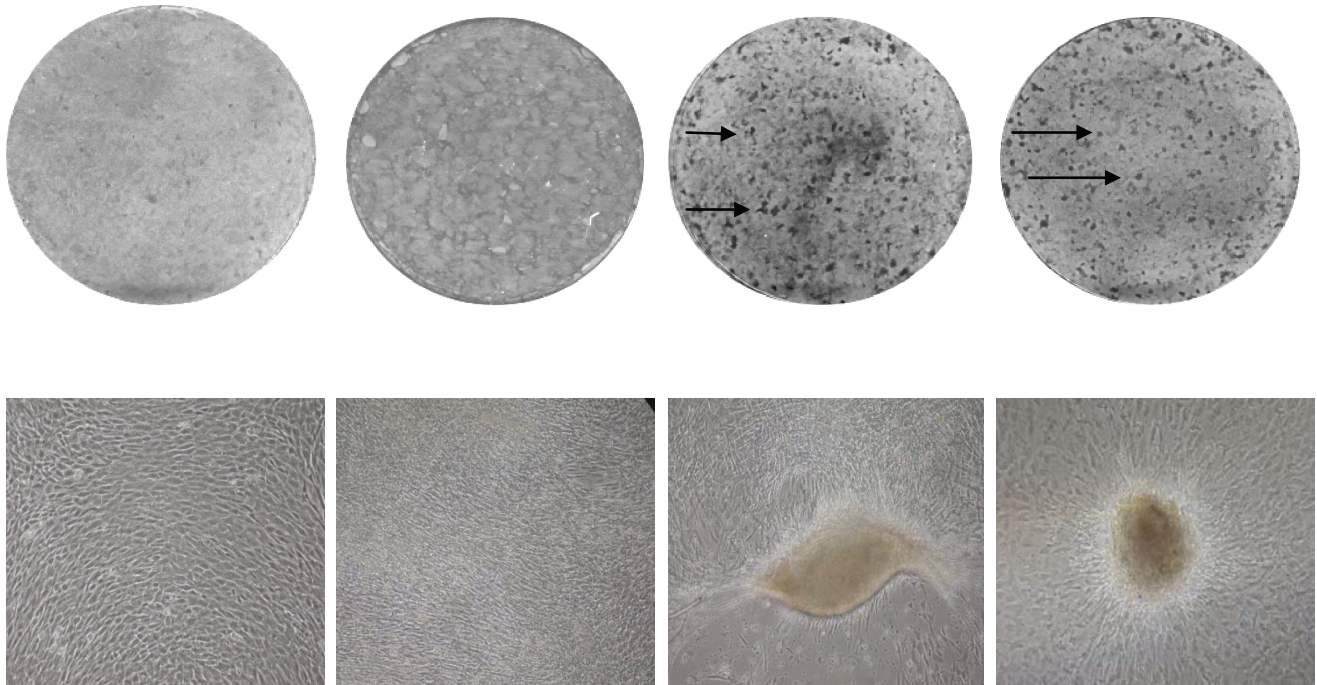
Figure 14: Morphologie des différentes populations NIH3T3

Des photos des NIH3T3 ont été prises à 10X des différentes population afin d'observer leur morphologie. Les flèches démontrent une morphologie fibroblastique typique de la lignée cellulaire NIH3T3, soit des cellules plus allongées chez les populations NIH3T3-EV (EV) et NIH3T3-TMU (TMU), alors qu'elles démontrent une morphologie plus épithéliale et en forme d'étoile; dans les populations NIH3T3-CTD (CTD1 et CTD2).

23.2 Formation de foyers post-confluence

Une expérience typiquement utilisée afin de vérifier la transformation des cellules consiste à laisser celles-ci croître à confluence et à déterminer si elles sont en mesure de former des foyers de croissance en condition adhérent. On peut constater à la figure 15 A, que plusieurs foyers chez les deux clones indépendants exprimant la partie CTD de MUC16 ont été formés et quelques un pour les populations qui expriment le vecteur vide et la partie TMU de MUC16. Si l'on se réfère au graphique à la figure 15 B, on peut constater que les deux clones NIH3T3-CTD1 et CTD2 ont formés significativement plus de foyers de transformation, comparativement aux populations contrôles. Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de MUC16 favorise la formation de foyer en condition adhérent et ainsi la perte d'inhibition de contact.

A



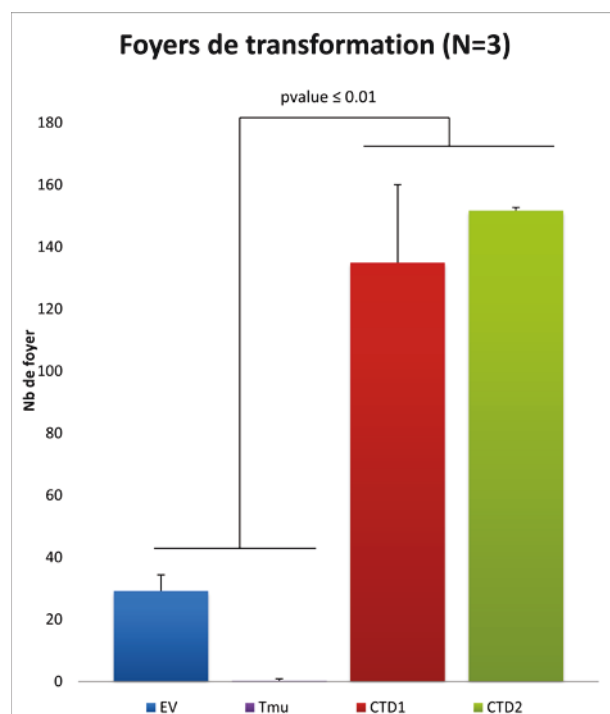
B

Figure 15: Formation de foyers de transformation

(A) Les cellules ont étéensemencées dans des pétris et incubées dans leurs conditions habituelles. Les photos à 100X ont été prises à 14 jours. Les cellules ont été fixées avec la formaline et colorées au crystal violet, 14 jours après l'atteinte de leur confluence. Les flèches désignent plusieurs foyers formés chez les deux clones indépendants exprimant la partie CTD de MUC16 (B) Graphique moyen des foyers de transformation formés dans chaque population (NIH3T3-EV (EV), NIH3T3-TMU (TMU), NIH3T3-CTD1 (CTD1) et NIH3T3-CTD2 (CTD2)) pour trois essais indépendants. P=0.003

23.3 Prolifération

Par la suite, la prolifération des différentes populations a été évaluée à l'aide d'un essai XTT sur 6 jours. Tout d'abord à la figure 16 A, on observe une augmentation de la prolifération en condition normale de sérum soit 10 %, et ce, significativement à partir de 72 h pour les deux clones indépendants NIH3T3-CTD1 et NIH3T3-CTD2 comparativement aux populations contrôle NIH3T3-EV et NIH3T3-TMU. Nous avons vérifié si MUC16-CTD pourrait également promouvoir la prolifération en condition faible de sérum. Nous avons donc effectué la même expérience, cependant avec du milieu contenant seulement 1 % de sérum. Les résultats présentés à la figure 16 B, démontrent une augmentation significative de la prolifération des deux clones

indépendants, et ce, dès 48 h. Alors que les populations contrôles semblent avoir de la difficulté à proliférer en présence de seulement 1 % de sérum.

Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de MUC16 est suffisante pour stimuler la prolifération en condition normale et en condition réduite en sérum, ainsi MUC16 pourrait conférer aux cellules une certaine indépendance à différents signaux de croissance.

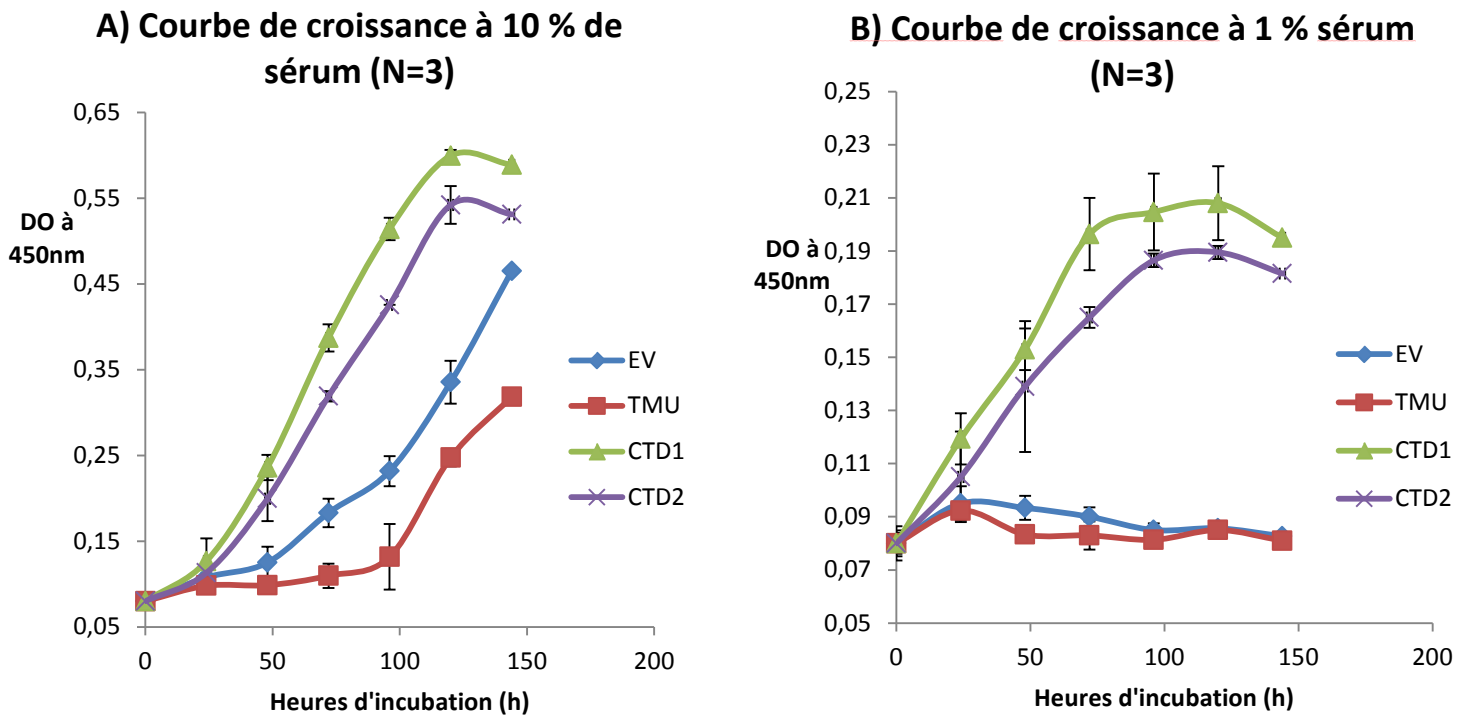
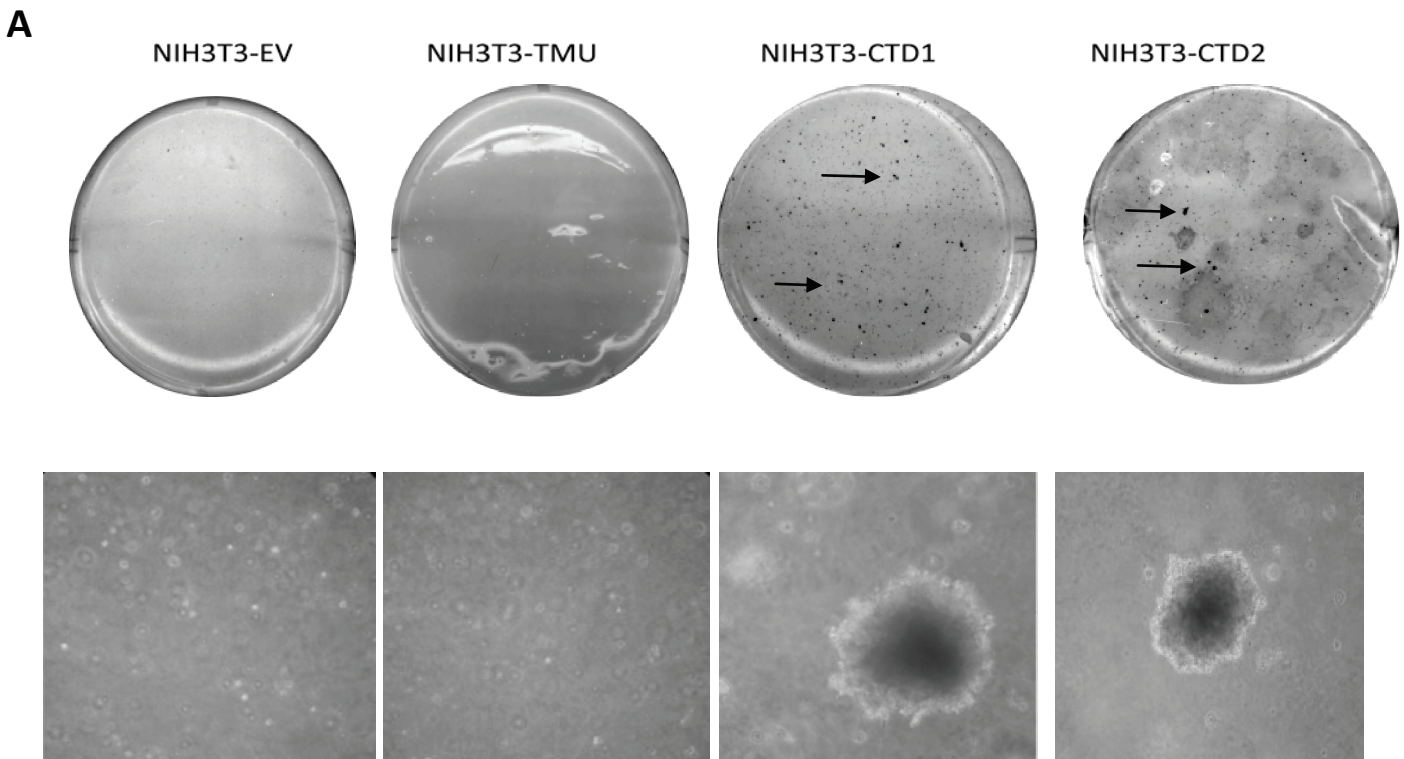


Figure 16: Courbe de croissance

(A) 1000 cellules par puits ont étéensemencées dans une plaque 96 puits et incubées en présence de FBS 10 %. Les plaques ont été analysées aux 24 h pendant 6 jours. Après avoir traité 1 h avec la solution XTT, les plaques ont été lues à 450 nm. (N=3) (P=0.01 pour 72 h-96 h). (B) 1000 cellules par puits ont étéensemencées, NIH3T3-EV (EV), NIH3T3-TMU (TMU), NIH3T3-CTD1 (CTD1) et NIH3T3-CTD2 (CTD2), dans une plaque 96 puits et incubées en présence de FBS 1 %. Les plaques ont été lues à 450 nm. Les plaques ont été analysées aux 24 h pendant 6 jours.

23.4 Croissance en absence d'ancrage

Une autre expérience typiquement utilisée pour évaluer la transformation des cellules est une expérience en Agar mou. Cette expérience consiste à ensemencées les cellules dans du milieu complet et 0.33 % d'Agar afin d'évaluer la capacité à croître en absence d'ancrage. Les résultats présentés à la figure 17 A, démontre que les clones indépendants exprimant MUC16-CTD ont formé plusieurs colonies, alors que les populations contrôles en ont formés que très peu. Si l'on se réfère au graphique en B, on peut constater que les deux clones NIH3T3-CTD1 et CTD2 ont formé significativement plus de colonies, comparativement aux populations qui expriment le vecteur vide (NIH3T3-EV) et la partie TMU de MUC16 (NIH3T3-TMU). Cette croissance en ancrage limité suggère que MUC16-CTD favorise la croissance en absence d'ancrage.



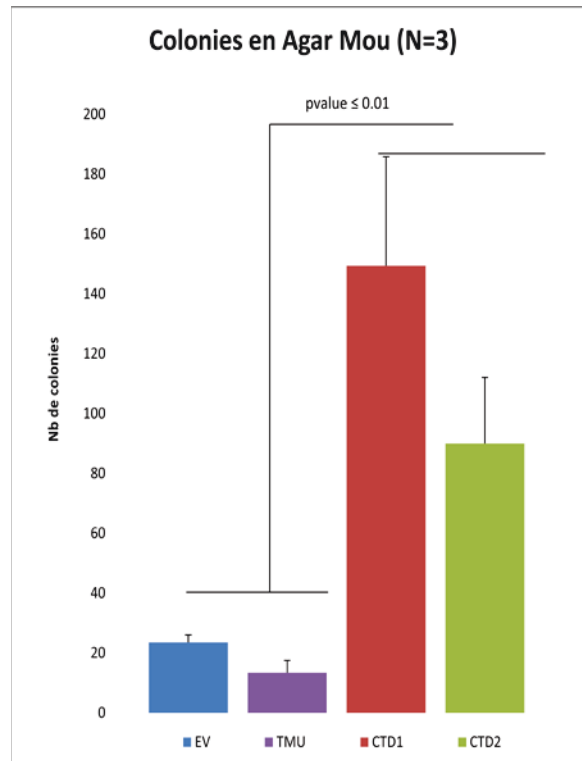
B

Figure 17: Formation de colonies en absence d'ancrage

(A) Photos de colonies formées en agar mou à 100X des différentes populations après un mois d'incubation. Les cellules ont été incubées dans une matrice d'agar 0,33 % et de milieu de culture. 10^5 cellules par puits ont étéensemencées. Les flèches désignent les colonies formées visibles. (B) Graphique moyen des colonies formées chez les différentes populations NIH3T3-EV (EV), NIH3T3-TMU (TMU), NIH3T3-CTD1 (CTD1) et NIH3T3-CTD2 (CTD2). Seules les colonies de plus de 10 cellules ont été comptées. Les cellules ont été incubées durant 1 mois (N=3).

24. Évaluation des différentes caractéristiques associées à la tumorigénèse

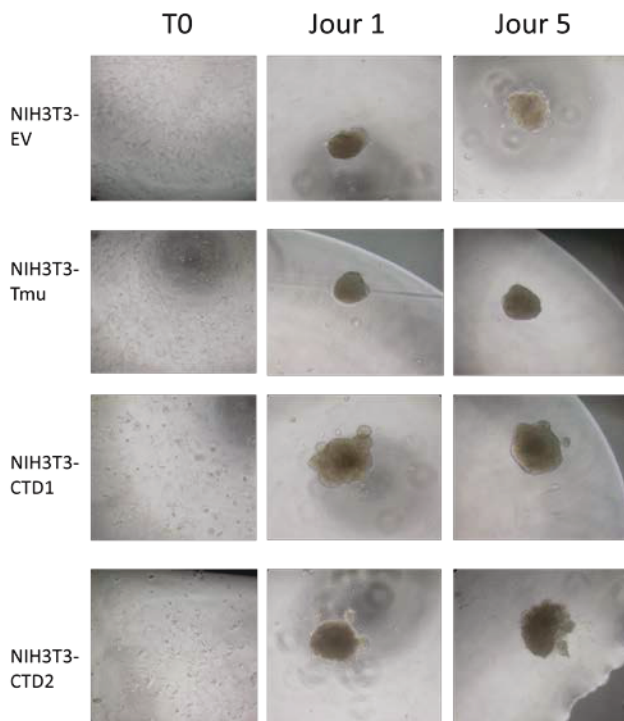
Suite aux expériences de transformation, nous avons voulu vérifier les effets du CTD de MUC16 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité.

24.1 Formation de sphéroïdes

Nous avons tout d'abord évalué la capacité des populations à former des sphéroïdes. Les cellules cancéreuses de l'ovaire sous forme de sphéroïdes sont souvent retrouvées au niveau de l'ascite retirée aux patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. Nous avons donc mis des cellules en suspension dans une goutte de milieu et évalué leur taille et leur densité. On a observé à la figure 18 A que toutes les populations formaient des sphéroïdes, leur densité semble être la même, cependant ceux qui expriment MUC16-CTD semblent être plus gros. Nous avons donc mesuré l'air des

sphéroïdes et on peut constater à la figure 18 B que la grosseur des clones indépendants augmente durant le temps alors que les populations contrôles restent stables. Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de MUC16 favorise la formation de plus gros sphéroïde.

A



B

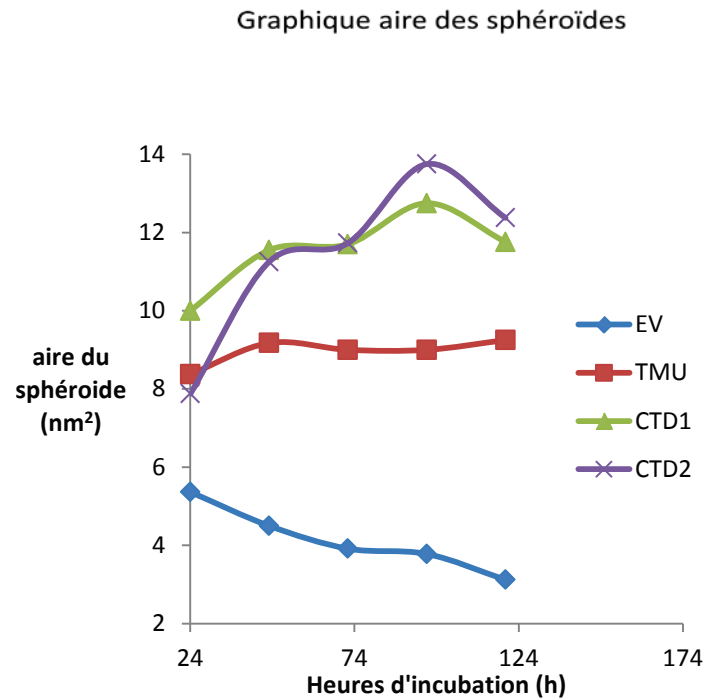


Figure 18: Formation de sphéroïdes

(A) 5×10^3 cellules par ml sont suspendus dans des gouttes de 15 μ l. Plusieurs gouttes ont été suspendues dans le couvercle d'un pétri de culture pour chaque populations. Des photos ont été prises à temps zéro et chaque jour durant 5 jours à 20X. Les photos illustrées sont représentatives des résultats observées. N=2 (B) L'aire des sphéroïdes ont été mesurés de chaque populations NIH3T3-EV (EV), NIH3T3-TMU (TMU), NIH3T3-CTD1 (CTD1) et NIH3T3-CTD2 (CTD2) à l'aide des photos présenté en A.

24.2 Croissance chez les souris NUDE

Les populations ont été injectées de façon sous-cutanée dans des souris NUDE avec 5 millions de cellules à quatre endroits sur le dos des souris. La croissance des tumeurs formées a été suivie jusqu'à ce les tumeurs atteignent environ 1 cm³. Les souris ont alors été euthanasiées, les tumeurs disséquées et pesées. On peut constater à la figure 19 que les tumeurs formées par le clone NIH3T3-CTD1 sont plus grosses que celles formées par le contrôle NIH3T3-TMU (A et B). De plus, on peut constater que le poids des tumeurs formées est également plus élevé chez les souris qui ont été injectées avec le clone CTD1 que ceux injectés avec le contrôle TMU (C). Le volume moyen des tumeurs formées par les NIH3T3-CTD1 dans les souris injectées a excédé 0,25 g à 23 jours alors que les tumeurs formées par les NIH3T3-TMU étaient de 0,067 g à 23 jours. Nous avons validé l'expression de MUC16-CTD et de MUC16-TMU à l'aide d'un RT-PCR fait à partir de biopsie des tumeurs (D), on peut constater que les tumeurs expriment bien les protéines.

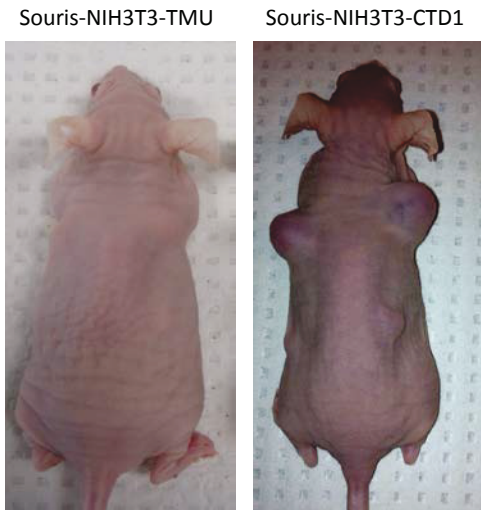
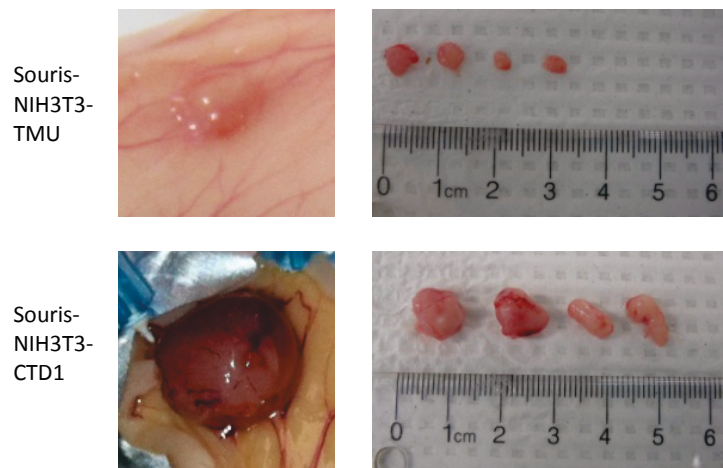
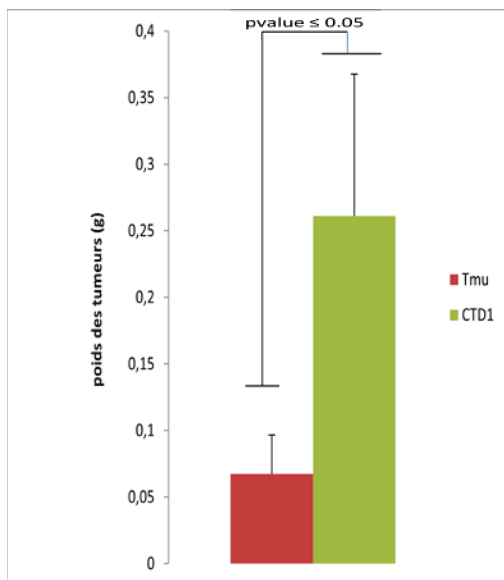
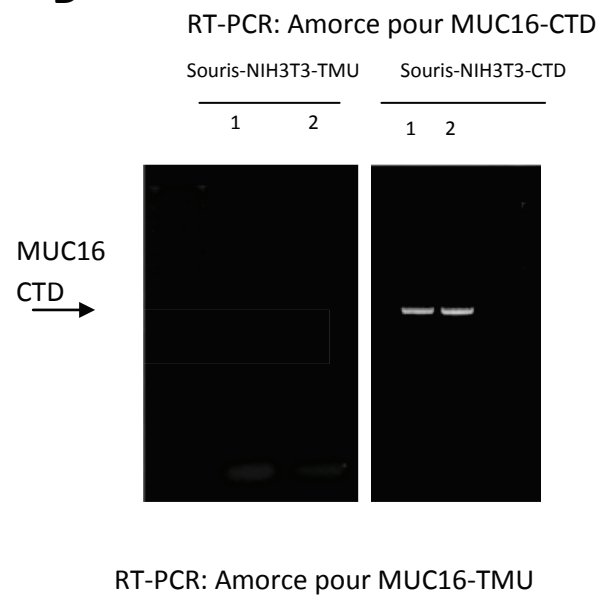
A**B****C****D**

Figure 19: . Croissance chez les souris NUDE

Les populations NIH3T3-TMU (TMU) et NIH3T3-CTD1 (CTD1) ont été injectées de façon sous-cutanée dans des souris NUDE, soit avec 5 millions de cellules à quatre endroits sur le dos des souris. (A) La croissance des tumeurs formées a été suivie jusqu'à ce les tumeurs formées atteignent environ 1 cm³. L'image illustre l'apparence des tumeurs lorsqu'elle ont atteint 1 cm³ suite à l'injection de la population NIH3T3-CTD1. (B) Les souris ont été euthanasiées, les tumeurs disséquées et mesurés. L'image illustre l'apparence des tumeurs obtenus chez les souris NUDE. (C) Les tumeurs ont été pesées. La figure illustre la masse moyenne des tumeurs sous-cutanées extraites des souris NUDE suite à leur euthanasie soit 23 jours suite à l'injection. Les données proviennent d'une seule expérience et comprennent 8 tumeurs prélevées à 2 souris NIH3T3-TMU et 8 tumeurs prélevées à deux souris NIH3T3-CTD1 (D) Vérification par RT-PCR l'expression de MUC16TMU et MUC16CTD dans les tumeurs des souris, avec des amorces spécifiques. Les produits RT-PCR ont été séparés sur un gel de 1,5 % d'agarose. Les bandes sont aux alentours de 1000 pb, qui est la taille attendue pour la construction MUC16-CTD, ainsi que la construction MUC16-TMU qui ont seulement 31 a.a de différence.

24.2.1 Analyse de l'expression de différentes protéines dans les tumeurs

Des coupes histologiques ont été faites sur les tumeurs afin de déterminer l'expression de différentes protéines au niveau du tissu. La protéine α SMA a été tout d'abord évaluée, cette protéine est exprimée par les myofibroblastes, elle devrait donc être présente dans toutes les tumeurs formées. Les résultats à la figure 20 démontrent que la protéine est exprimée dans toutes les coupes de tissu. On a également évalué l'expression de moc31 qui est une glycoprotéine exprimée par les cellules épithéliales et retrouvées seulement chez l'humain. Les tumeurs ainsi ne devraient pas exprimer cette protéine étant donné que les NIH3T3 injectées dans les souris sont des fibroblastes de souris. On peut observer à la figure 20, toutes les coupes sont négatives pour Moc31. Ces résultats suggèrent que les tumeurs représentent le type histologique attendu.

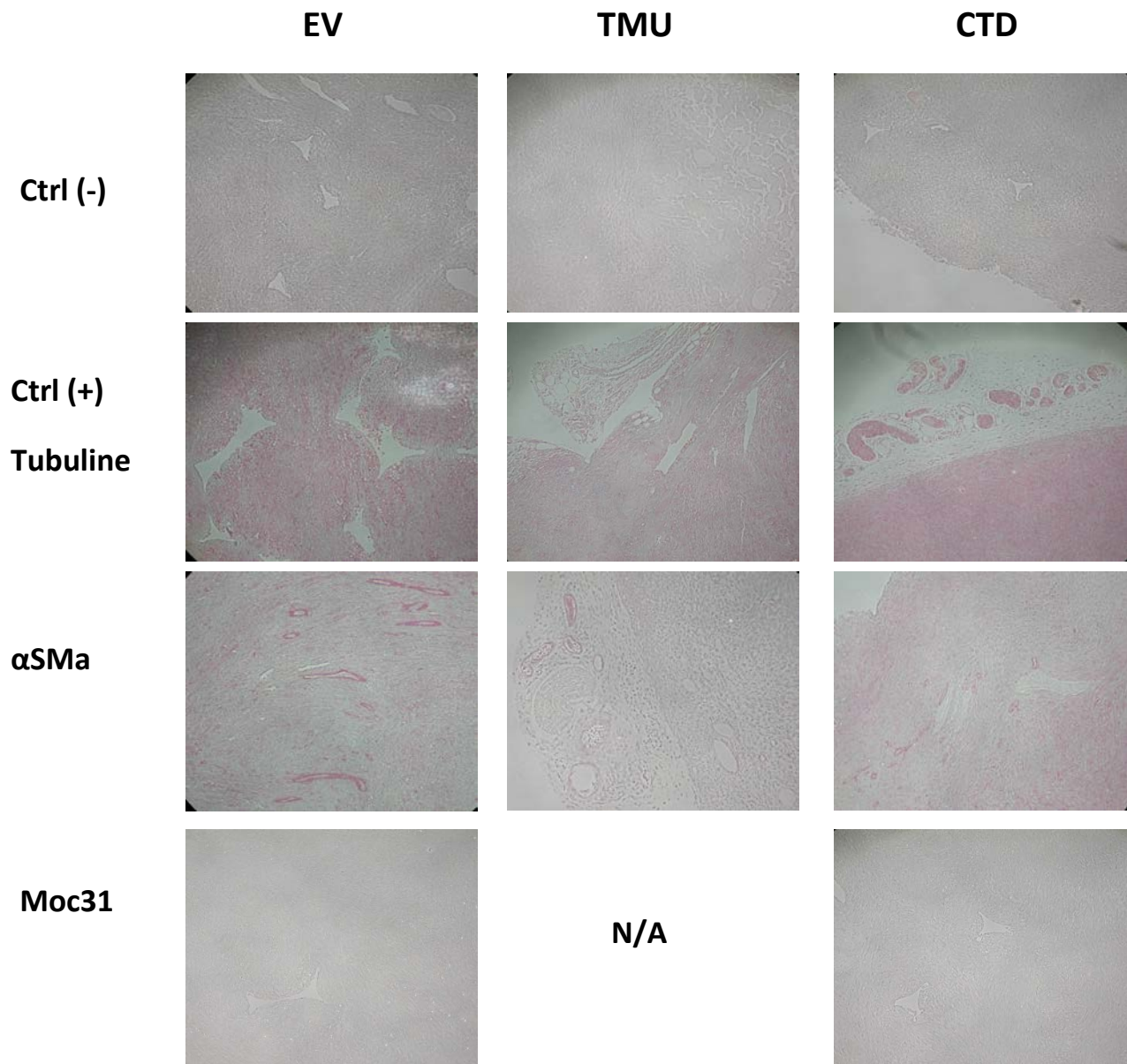


Figure 20: Coupe histologiques des tumeurs

Des coupes histologiques ont été faites sur les tumeurs des souris NIH3T3-EV, NIH3T3-TMU et NIH3T3-CTD1. La coloration des coupes des différentes tumeurs obtenues ont été fait selon le protocole de Dako LSAB + System AP à l'aide de divers anticorps. Des photos représentative des sections de tissu coloriés obtenues ont été prises à 20X. La tubuline a été utilisée comme contrôle positif et la coloration rouge représente la présence de la protéine dans le tissu.

25. Analyse de l'expression protéique de différentes protéines

Pour comprendre par quels mécanismes moléculaires MUC16-CTD transforme les cellules NIH3T3. Nous avons tout d'abord évalué les niveaux protéiques de plusieurs protéines, dont les cyclines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et qui entraînent également l'activation de plusieurs gènes importants dans la prolifération, la survie et la migration.

À la figure 21 A, on peut tout d'abord observer une diminution de l'expression de la cycline A1. Cette cycline est impliquée dans la régulation de la progression de la phase S du cycle cellulaire. Elle phosphoryle des substrats qui déclenchent et entretiennent la réplication de l'ADN et aussi va entraîner l'inactivation de la phase G1.

On observe également (Figure 21 A), une augmentation de l'expression de la forme cycline D2 qui est nécessaire à la phase G1. Elle a aussi comme fonction de réguler les CDK4 et 6 qui sont requis pour la transition G1/S du cycle cellulaire. Des études ont également démontré que cette forme de cycline est surexprimée dans les tumeurs ovariennes.

De plus, on observe une augmentation de la cycline E2 qui elle aussi joue un rôle dans la progression de la phase G1. Elle a comme fonction de lier CDk2 et entraîner également la transition G1/S du cycle cellulaire. On peut aussi constater l'expression de l'isoforme plus courte de la cycline E2 dans les deux clones indépendants alors qu'elle est absente dans les populations contrôles.

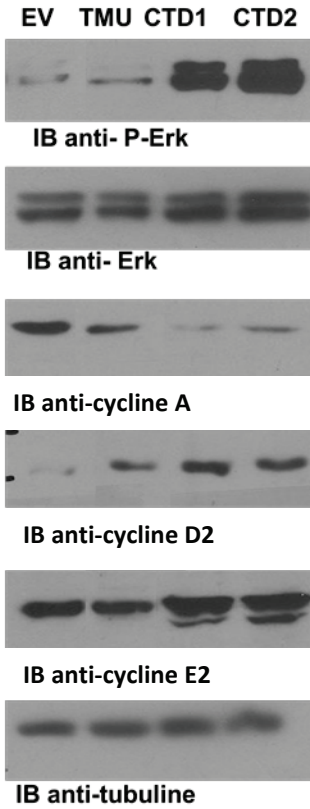
Pour les autres cyclines représentées en B dans un tableau synthèse, nous n'avons pas observé de différences d'expression entre les populations contrôles et les clones expriment MUC16-CTD. Ces résultats suggèrent que MUC16-CTD augmentait la prolifération par l'initiation de la

prolifération via la phase G1 (Figure 21 C), par une augmentation accrue des cyclines D2 et E2 et une diminution de la cycline A2.

Nous avons également noté qu'il y avait une augmentation de la forme phosphorylée de ERK dans les clones qui expriment MUC16-CTD (Figure 21 A). ERK fait partie des MAP kinase qui joue un rôle important dans la prolifération et la croissance cellulaire. ERK activée peut phosphoryler plusieurs substrats cytoplasmiques et nucléaires nécessaires à la transcription de nombreux gènes afin de passer de la phase G1 à la phase S dans le processus de division cellulaire. Ces résultats sont compatibles avec les résultats obtenus avec les cyclines.

Il ne semble pas avoir de changement d'expression des formes d'Akt totale et phosphorylée (Figure 25 B). Pour ce qui est des protéines en aval de ERK comme Elk et mcl-1 (qui sont impliqués dans la survie cellulaire et la prolifération), nous n'avons pas observé d'augmentation dans les clones exprimant CTD (Figure 21 B). C'est également le cas pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x1 (Figure 21 B).

A



B

	Expression protéique
Cycline A1	↘
Cycline B1	—
Cycline D1	—
Cycline D2	↗
Cycline D3	—
Cycline E2	↗
Cycline H	—
P-ERK	↗
ERK	—
P-AKT	—
AKT	—
Bcl-2	—
Bcl-xl	—
mcl-1	—

C

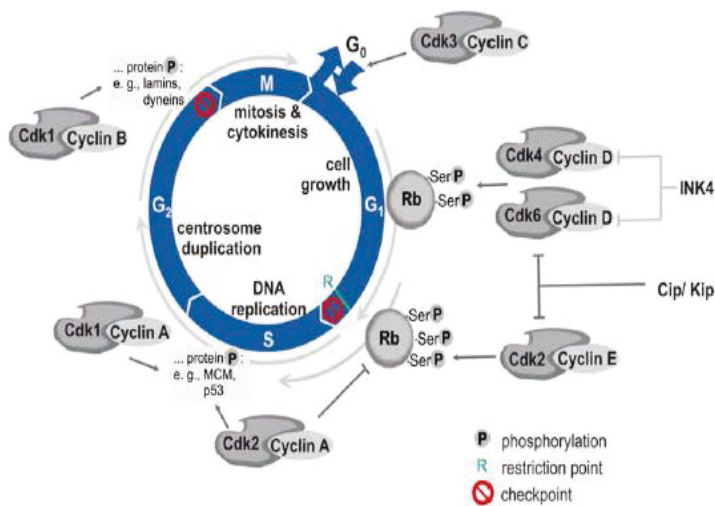


Figure 21: L'expression protéique de différentes protéines

A) Les lysats cellulaires obtenus ont été analysés par immunobuvardage par différents anticorps. (B) Tableau synthèse de l'expression protéique obtenue par immunobuvardage avec différents anticorps. (C) Vue d'ensemble de l'activation et de la régulation du cycle cellulaire. Image tirée Cancero dig, 2010.

En résumé, les NIH3T3 exprimant MUC16-CTD ont formé significativement plus de foyers en conditions adhérees et non-adhérees. On a aussi observé une augmentation de la prolifération dans les cellules exprimant MUC16-CTD en conditions normales et appauvries de sérum. Nous avons observé la formation de sphéroïdes qui grossissaient dans le temps chez les NIH3T3 exprimant MUC16-CTD. Nous avons également observé l'augmentation de l'expression de certaines cyclines et de la forme phosphorylée de ERK chez les clones NIH3T3-CTD. Finalement, nous avons observé la formation de tumeurs sous-cutanées dans les souris NUDE. Ces résultats suggèrent que MUC16-CTD joue un rôle dans la transformation.

26. Infection et validation de la lignée cellulaire OVN non-immortalisées non-transformée

26.1 Infection des OSE

Suite aux résultats obtenus avec la lignée NIH3T3, il a été décidé d'infecter les cellules OSE afin de déterminer si MUC16-CTD pourrait entraîner une immortalisation et/ou une transformation des cellules. Les cellules OSE sont les cellules de la surface épithéliale de l'ovaire, elles ont été obtenues par *Banque d'échantillons biologiques (seins/ovaires) et de données de Sherbrooke*, ce sont des cellules non transformées, non immortalisées, non tumorigéniques et qui n'expriment pas normalement la protéine MUC16. Les OSE utilisés dans ce projet sont les OVNT221, OVNT321 et OVNT225, ce sont des cellules issues d'ovaires sains de différentes patientes qui ont subi une intervention au Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke. Elles ont été infectées avec les lentivirus plenti6V5-EV, plenti6V5-GFP, plenti6V5-MUC16-TMU et plenti6V5-MUC16-CTD.

Une évaluation de l'efficacité des infections a été effectuée en premier lieu par l'observation de l'expression de la GFP chez les populations contrôles OSE-GFP. Selon cette vérification, présentée à la figure 22, l'infection semble avoir été efficace. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est aux alentours de 80 % et l'exprimait de façon forte.

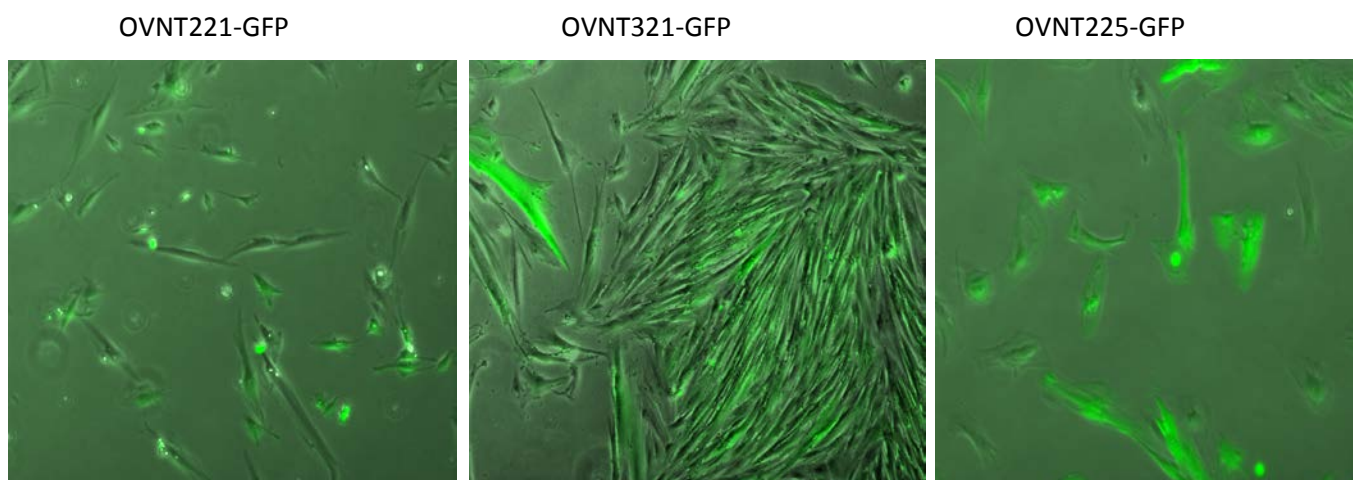


Figure 22: Efficacité d'infection des OSE

Les OSE OVNT221, OVNT321 et OVNT225 ont été infectées avec le plenti6V5-GFP. Des photos des OSE-GFP ont été prises trois jours après l'infection des OSE à 20X pour évaluer l'efficacité d'infection par l'observation de la fluorescence verte des OSE. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP est aux alentours de 80 %.

26.2 Validation

26.2.1 RT-PCR

Une première validation a été faite visant à confirmer la présence de la construction MUC16-CTD dans les populations OSE-CTD et l'absence de cette construction dans les populations contrôle OSE-EV et OSE-TMU. Cette validation a été faite par RT-PCR, les résultats sont présentés à la figure 23. La population OVNT-225 est entrée en sénescence environ une semaine après l'infection, donc aucune validation et expérience n'a été faite pour cette population. On constate que les 4 populations OSE-CTD (OVNT221-CTD et OVNT321-CTD) infectées par le plenti6V5-MUC16-CTD expriment la construction MUC16-CTD alors que les populations contrôles OSE-EV et OSE-TMU ne l'exprime pas.

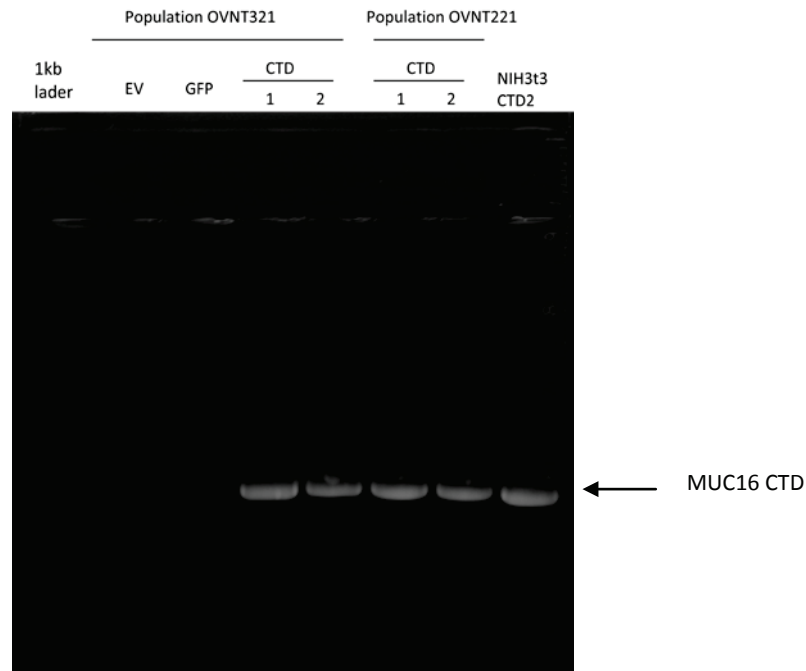


Figure 23: Validation des populations des populations OSE-CTD par RT-PCR

Les produits du RT PCR ont été placés sur un gel d'agarose 1,5 % / TAE. L'expression de l'ARN de la construction de MUC16-CTD a été validée dans les quatre populations OVNT321-CTD et OVNT221. La population contrôle était les NIH3T3-CTD. Les bandes sont aux alentours de 1000 pb, qui est la taille attendue pour la construction MUC16-CTD.

26.2.2 Immunofluorescence

L'expression de MUC16-CTD a été validée dans la population OVNT221-CTD par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-c-myc. On peut voir les résultats à la figure 24, on détecte l'expression de MUC16-CTD dans les populations OVNT221-CTD1 et OVNT221-CTD2, ainsi que l'expression de MUC16-TMU dans la population OVNT221-TMU.

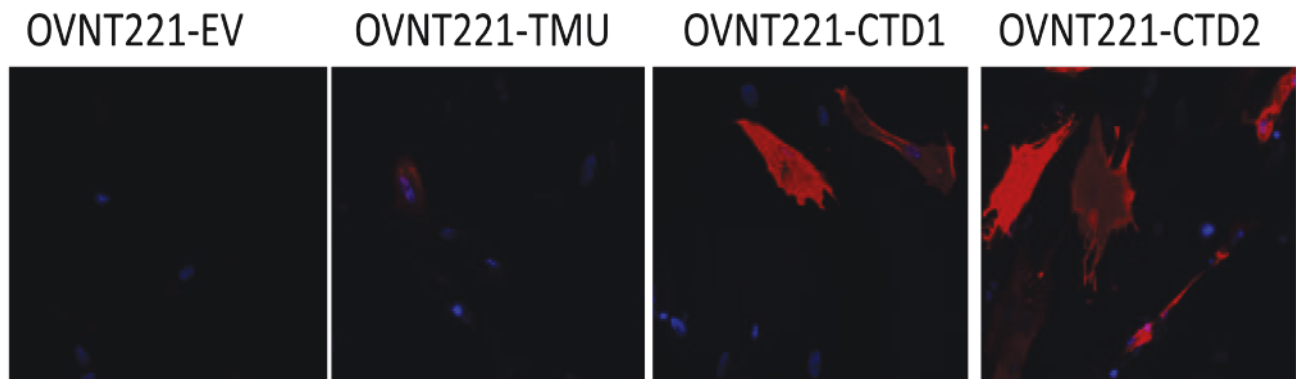


Figure 24: Validation des populations OSE-CTD

Détection de l'expression de MUC16-CTD dans les populations OVNT221-CTD et de l'expression de MUC16-TMU dans la population OVNT221-TMU par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-c-myc. Les deux constructions (MUC16-TMU et MUC16-CTD) possèdent l'étiquette c-myc. La coloration bleue représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de la protéine c-myc.

27. Expériences d'évaluation de la transformation

La morphologie et la croissance des cellules ont été suivies après l'infection des cellules avec les différents lentivirus. La morphologie des différentes populations OVNT221 et OVNT321 a été comparée et photographiée. Aucune différence de morphologie n'a été observée entre les différentes populations OVNT221 (Figure 25 A) ni entre les différentes populations OVNT321 (Figure 25 B). Au niveau de la vitesse de croissance des cellules, aucune différence n'a été observée entre les différentes populations. La présence de MUC16-CTD n'a pas affecté l'inhibition de contact des cellules. Les populations OVNT225 sont entrées en sénescence une semaine après leur infection. Les populations OVNT321 sont entrées en sénescence vers les passages 6-7 alors que les populations OVNT221 vers les passages 15-16. La partie C-terminale de MUC16 ne semble pas entraîner une transformation ou une immortalisation des cellules OSE.

A



B



Figure 25: . Morphologie des OSE

La morphologie des différentes populations OVNT221 et OVNT321 a été comparée et photographiée. Des photos des OVNT221 (A) et des OVNT321 ont été prises à 10x. Aucune différence de morphologie n'a été observée entre les différentes populations.

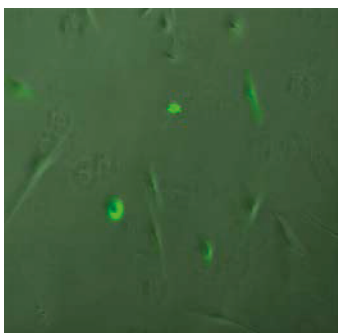
28. Infection et validation de la lignée cellulaire immortalisée non-transformée OVNT-95-hTERT

28.1 Infection

Suite aux résultats obtenus, il a été décidé d'étudier l'effet de MUC16-CTD sur des OSE immortalisés avec la télomérase. Cette lignée cellulaire a été réalisée par Sylvain Lespérance la lignée cellulaire de l'ovaire (OSE) a été immortalisée par l'expression de la télomérase reverse transcriptase (hTERT). Ces cellules possèdent un potentiel de prolifération illimité et elles sont non tumorigéniques. La lignée OVNT95 hTERT a été infectée avec les même lentivirus utilisés pour les NIH3T3 et les OSE.

Comme lors des expériences précédentes, l'efficacité d'infection a été évaluée à travers l'observation de la fluorescence de la population GFP. Selon les résultats obtenus, à la figure 26 A, l'efficacité d'infection semble avoir été au alentour de 50 %. Une première validation a été faite visant à confirmer la présence de la construction MUC16-CTD dans les populations OVNT95 hTERT-CTD. Cette validation a été faite par RT-PCR, les résultats sont présentés à la figure 26 B, les 2 populations OVNT95 hTERT-CTD infectées par le plenti6V5-MUC16-CTD expriment bien la construction MUC16-CTD. À partir de la deuxième population OVNT95 hTERT, choisis arbitrairement, nous avons formé des clones indépendants à l'aide de la méthode des cylindres de clonage.

A



B

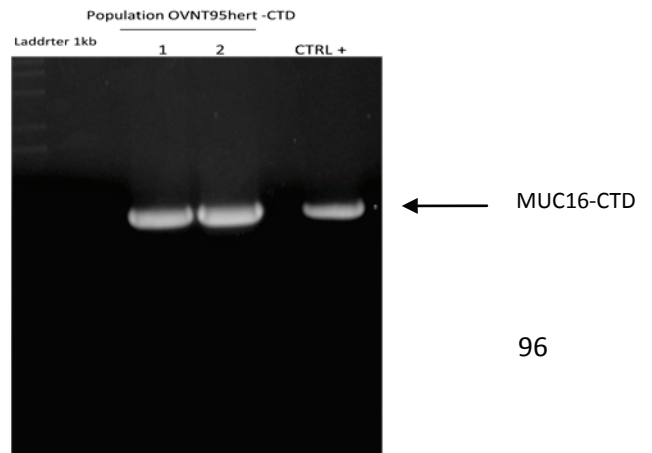


Figure 26: Efficacité d'infection des OVNT95 hTERT

(A) Des photos des OVNT95 hTERT-GFP ont été prises trois jours après l'infection des OVNT95 hTERT à 20X. Par l'observation de la fluorescence verte on peut évaluer que l'efficacité d'infection est de 50%. (B) Les produits du RT-PCR ont été placés sur un gel d'agarose 1,5 % / TAE. L'expression de l'ARN de la construction de MUC16-CTD a été validée dans les deux populations OVNT95 hTERT-CTD. La population contrôle était les NIH3T3-CTD2. Les bandes sont aux alentours de 1000 pb, qui est la taille attendue pour la construction MUC16-CTD.

28.2 Validation

28.2.1 RT-PCR

Tout d'abord, les différents clones ont été vérifiés au niveau de la transcription à partir d'un RT-PCR. Les résultats sont présentés à la figure 27. On peut observer l'expression de la construction MUC16-CTD dans tous les clones indépendants obtenus. Nous avons décidé de conserver seulement de façon arbitraire les clones indépendants #7 et #9 pour la suite des expériences et nous les avons nommés OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2 respectivement.

Cette validation a été refaite par RT-PCR, mais avec les populations contrôles OVNT95 hTERT EV et TMU, les résultats sont présentés à la figure 27 B. Les 2 clones OVNT95 hTERT-CTD expriment bien la construction MUC16-CTD alors que les populations contrôle OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT ne l'expriment pas.

De plus, une validation a été faite par RT-PCR mais avec l'amorce spécifique pour MUC16-TMU. Les résultats sont présentés à la figure 27 C, les 2 clones OVNT95 hTERT-CTD et la population OVNT95 hTERT expriment MUC16-TMU alors que la population contrôle OVNT95 hTERT-EV ne l'exprime pas.

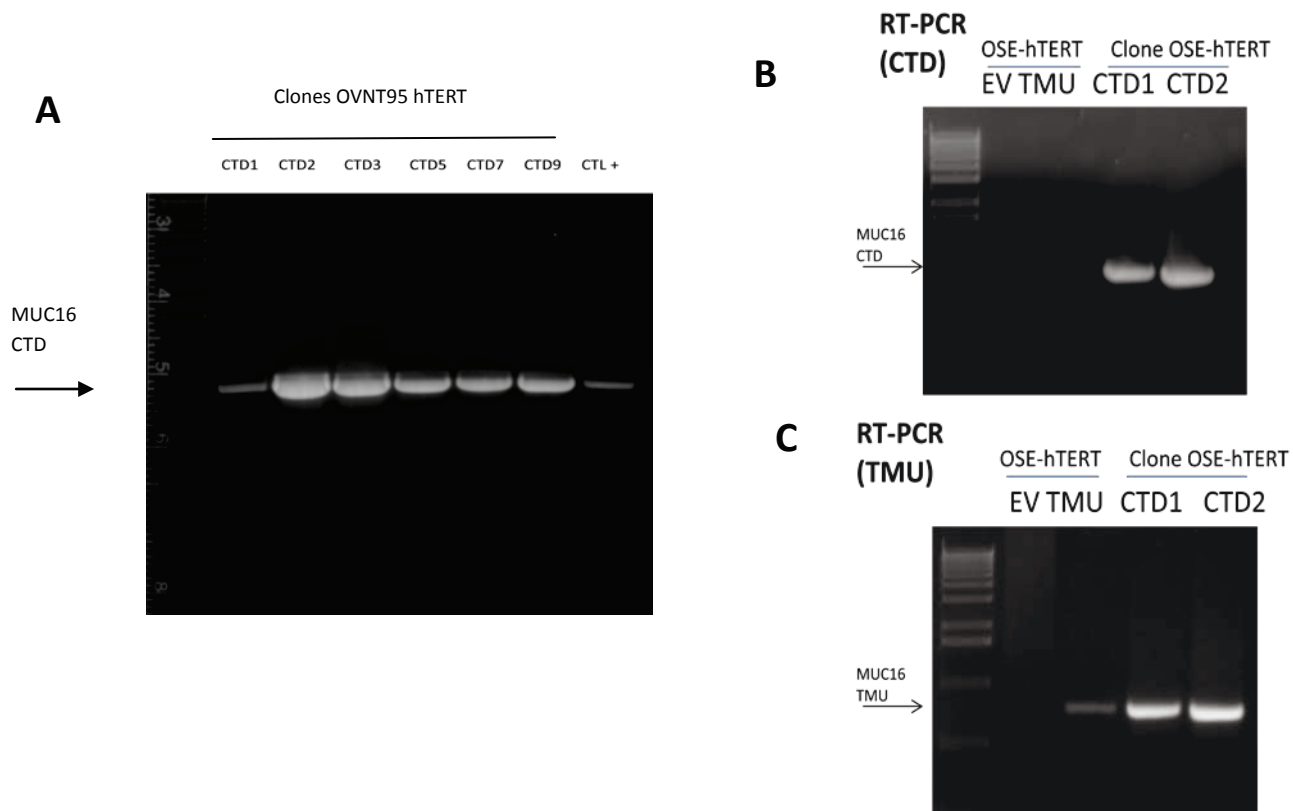


Figure 27: Validation des clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD par RT-PCR

(A) Les produits du RT PCR ont été placés sur un gel d'agarose 1,5 % / TAE. L'expression de l'ARN de la construction de MUC16-CTD a été validée dans tous les clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD. (B) L'expression de l'ARN de la construction de MUC16-CTD a été validée dans tous deux clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD avec les amorces spécifiques pour MUC16-CTD. Les bandes sont aux alentours de 1000 pb, qui est la taille attendue pour la construction MUC16-CTD. (C) L'expression de l'ARN de la construction de MUC16-TMU a été validée dans la population OVNT95 hTERT-TMU et dans les deux clones indépendants OVNT95hTERT-CTD avec les amorces spécifiques pour MUC16-TMU. Les bandes sont aux alentours de 1000 pb, qui est la taille attendue pour la construction MUC16-TMU.

28.2.2 Immunobuvardage

L'expression de MUC16-CTD dans les clones OVNT95 hTERT a ensuite été validée au niveau protéique par immunobuvardage de type Western. L'expression de MUC16 CTD et MUC16 TMU a été détectée en utilisant l'anticorps anti-c-myc qui est spécifique aux étiquettes dans les deux constructions. On peut observer à la figure 28 A qu'il y a expression de MUC16-CTD dans nos deux clones indépendants et en B l'expression de MUC16-TMU dans la population OVNT95 hTERT-TMU. On observe des bandes aux alentours de 70 kDa ce qui est attendu.

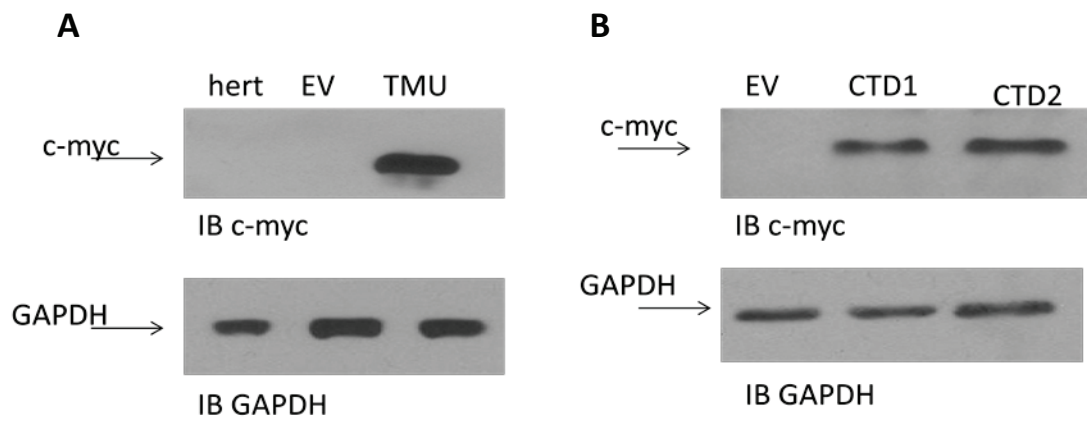


Figure 28: Validation par Immunobuvardage

L'expression de MUC16-CTD et de MUC16-TMU a été détectée en utilisant un anticorps anti-c-myc. GAPDH a été utilisé pour s'assurer que les niveaux protéiques étaient équivalents.

28.2.3 Immunofluorescence

Finalement, nous avons validé l'expression de MUC16-CTD dans les clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-c-myc. On peut voir les résultats à la figure 29. On détecte l'expression de MUC16-CTD dans les deux clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2, ainsi que l'expression de MUC16-TMU dans la population OVNT95 hTERT-TMU. Cette expérience n'a pas été faite de façon co-focale, donc on ne peut pas confirmer la localisation exacte de la protéine, cependant l'expression semble être au niveau membranaire.

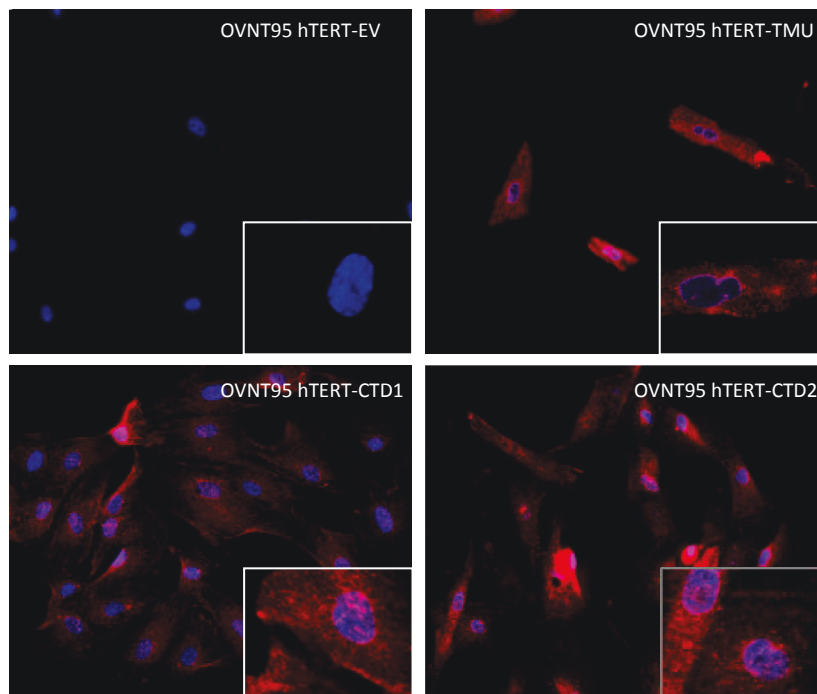


Figure 29: Validation des clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD

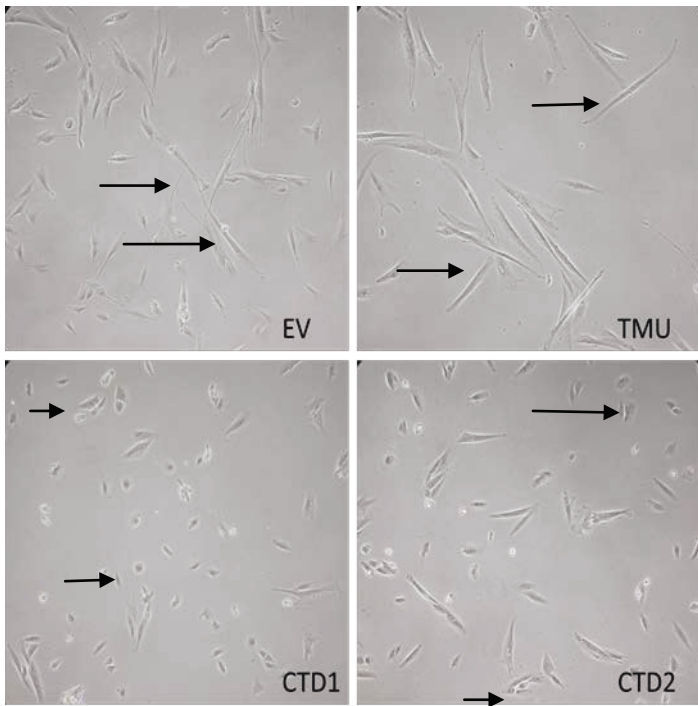
Détection de l'expression de MUC16 CTD dans les clones OVNT95 hTERT-CTD et de l'expression de MUC16-TMU dans la population OVNT95 hTERT-TMU par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-c-myc. Les deux constructions (MUC16-TMU et MUC16-CTD) possèdent l'étiquette c-myc. La coloration bleue représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de la protéine c-myc.

29. Expériences d'évaluation de la transformation

29.1 Changement de morphologie

La morphologie des différentes populations OVNT95 hTERT a été photographiée et comparée. Lorsque les cellules sont à 40 % et à 100 % de confluence (Figure 30 A) on peut observer que les clones OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2 vont présenter une morphologie beaucoup plus épithéliale, les cellules sont plus étroitement juxtaposées et sont plus petite en forme d'étoile, alors que les populations OVNT95 hTERT-EV et OVNT hTERT-TMU vont présenter une morphologie plus mésenchymateuse, elles sont beaucoup plus allongées et sous forme d'une fibre.

A



B

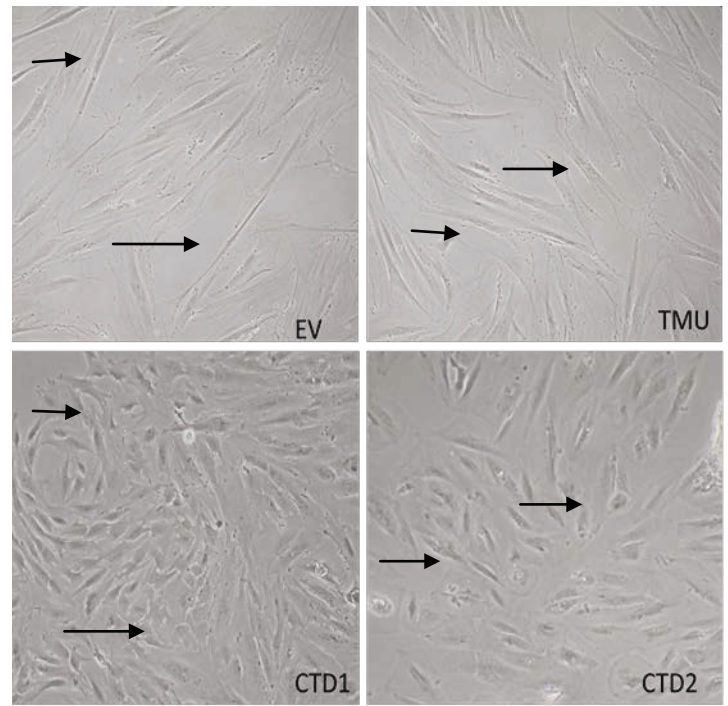


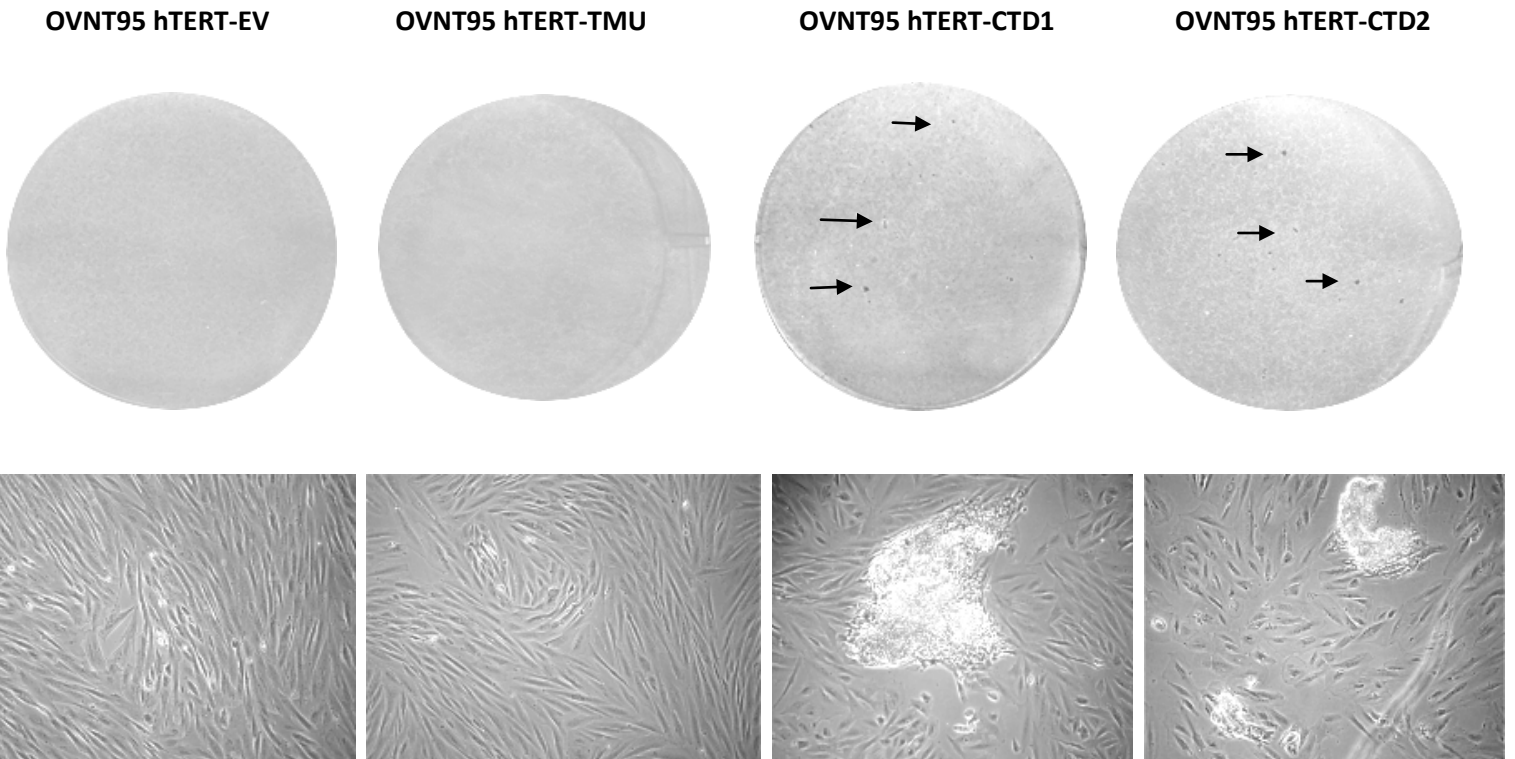
Figure 30: Morphologie des différentes populations OVNT95hTERT

Des photos des OVNT95 hTERT ont été prises à 10X en A) à 40 % de confluence et en B) à 100 % de confluence. Les flèches illustrent la morphologie beaucoup plus épithéliales chez les populations OVNT95 hTERT- CTD (CTD1 et CTD2), alors que chez les populations OVNT95 hTERT-EV (EV) et OVNT hTERT-TMU (TMU) illustre une morphologie plus mésenchymateuse et plus allongées.

29.2 Formation de foyers post-confluence

Comme les NIH3T3 nous avons vérifié si à post confluence les cellules étaient à mesure de former des foyers de transformation. On peut constater à la figure 31 A que plusieurs foyers ont été formés chez les deux clones indépendants exprimant la partie C-terminale de MUC16 et que très peu ont été formées pour les populations qui expriment le vecteur vide et la partie TMU de MUC16. Si on se réfère au graphique à la figure 31 B, on peut constater que les deux clones OVNT95 hTERT-CTD1 et CTD2 ont formé significativement plus de foyers de transformation, comparativement aux populations contrôles OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU. Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de MUC16 favorise la formation de foyer en condition adhéree et ainsi la perte d'inhibition de contact.

A



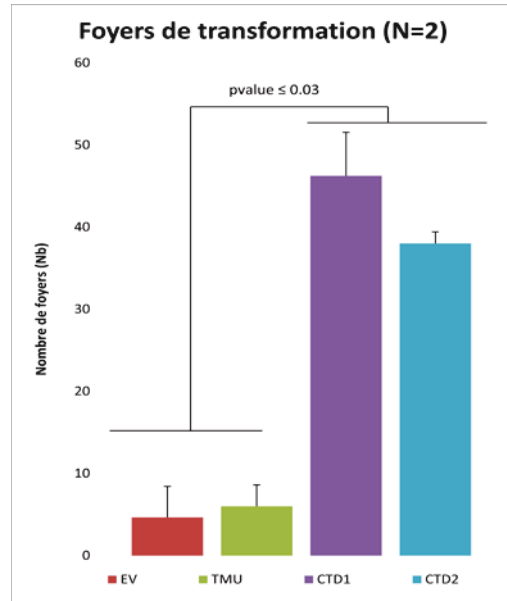
B

Figure 31: Formation de foyers de transformation

(A) Les cellules ont étéensemencées dans des pétris et incubées dans leurs conditions habituelles. Les photos à 100 X ont été prises à 14 jours. Les cellules ont été fixées avec la formaline et colorées au crystal violet, 14 jours après l'atteinte de leur confluence. Les flèches illustrent plusieurs foyers visibles qui ont été formés. (B) Graphique moyen des foyers de transformation formés dans chaque population OVNT95 hTERT-EV (EV), OVNT hTERT-TMU (TMU) OVNT95 hTERT-CTD1 (CTD1) et OVNT95 hTERT-CTD2 (CTD2), pour deux essais indépendants.

29.3 Prolifération

Nous avons par la suite évalué la prolifération des différentes populations à l'aide d'un essai XTT sur 6 jours. Tout d'abord à la figure 32 A, on observe une augmentation de la prolifération en condition normale de sérum soit 10 %, et ce, significativement pour les deux clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2 comparativement aux populations contrôles OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU. Nous avons également vérifié si MUC16-CTD pourrait promouvoir la prolifération en condition faible de sérum. Nous avons donc effectué la même expérience, mais avec du milieu contenant seulement 1 % de sérum. Les résultats présentés à la figure 32 B démontrent une augmentation significative de la prolifération des deux clones

indépendants. Alors que les populations contrôles semblent avoir de la difficulté à proliférer en présence de 1 % de sérum.

Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de MUC16 est suffisante pour stimuler la prolifération en condition normale et en condition privée de sérum, ainsi la partie C-terminale de MUC16 pourrait conférer aux cellules une certaine indépendance à différents signaux de croissance.

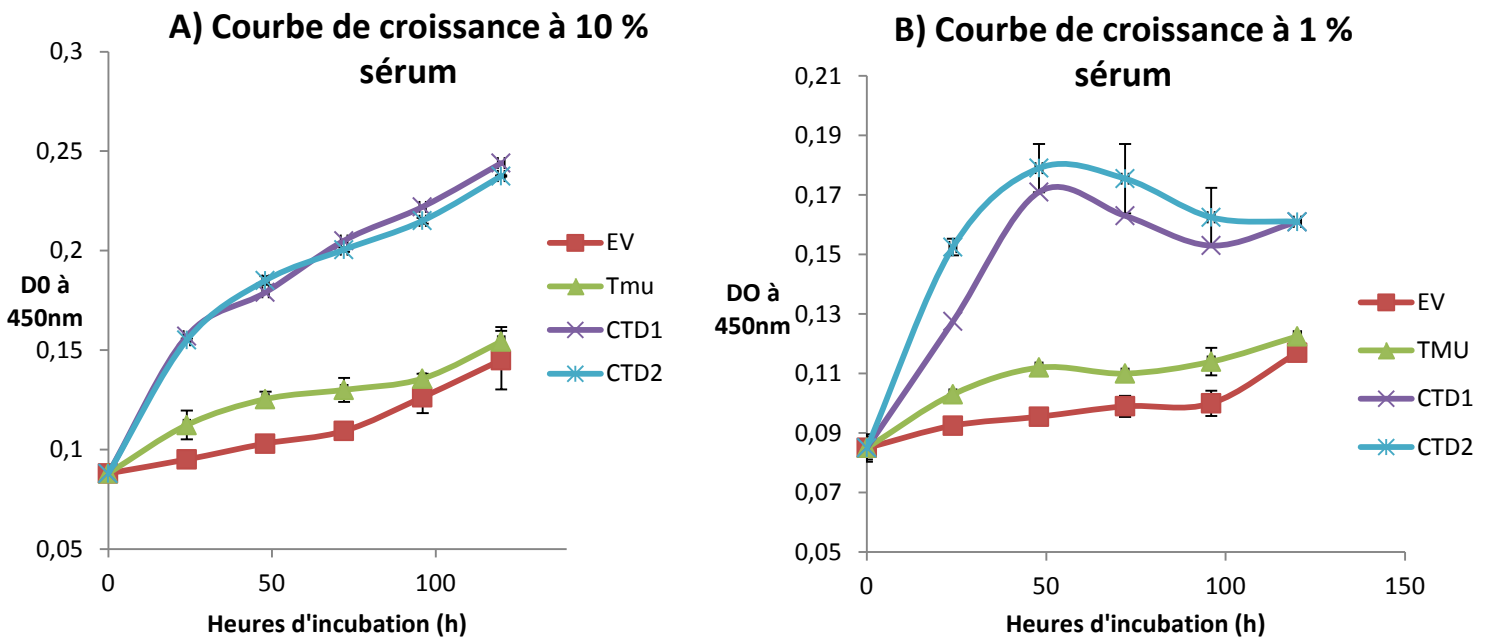


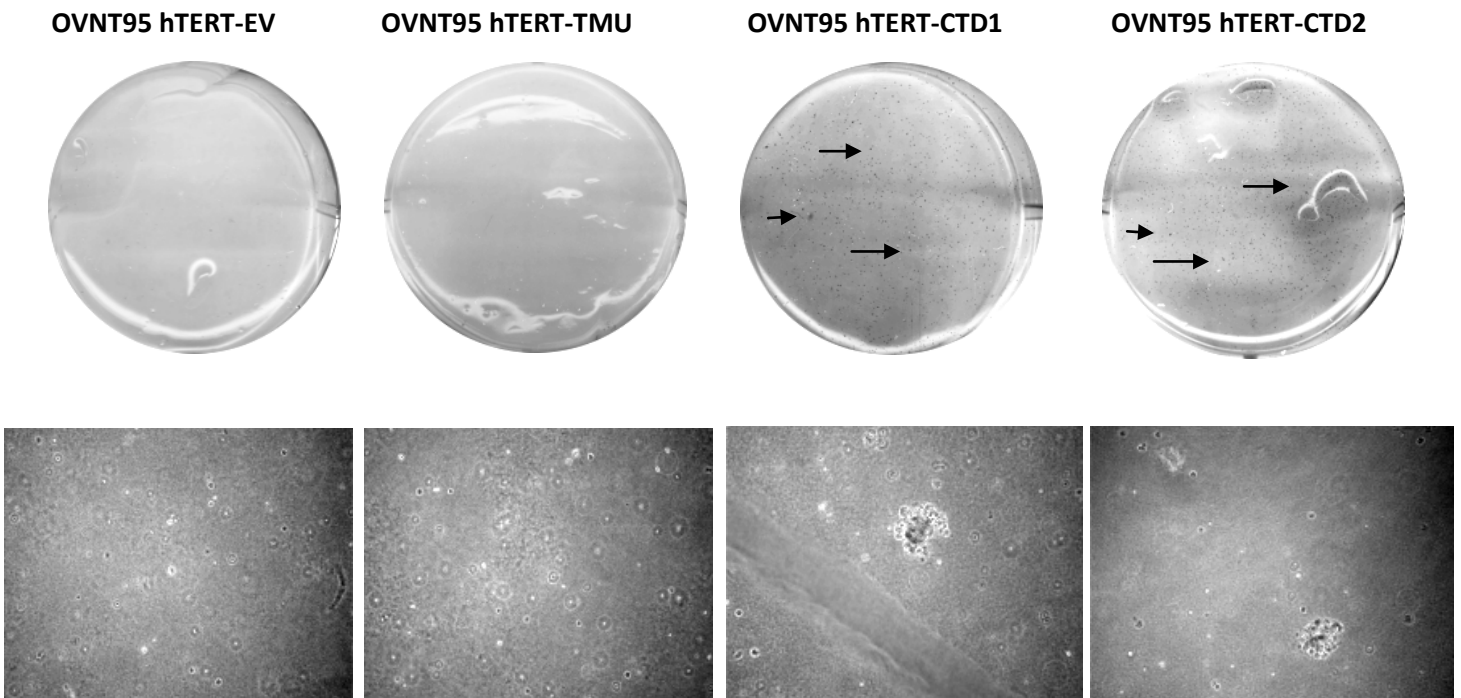
Figure 32: Courbe de croissance

(A) 1000 cellules par puits ont étéensemencées dans une plaque 96 puits et incubées en présence de FBS 10 %. Les plaques ont été analysées aux 24 h pendant 6 jours. Après avoir traité 1h avec la solution XTT, les plaques ont été lues à 450 nm. (N=2) (B) 1000 cellules par puits de chaque population OVNT95 hTERT-EV (EV), OVNT hTERT-TMU (TMU) OVNT95 hTERT-CTD1 (CTD1) et OVNT95 hTERT-CTD2 (CTD2) ont étéensemencées dans une plaque 96 puits et incubées en présence de FBS 1 %. Les plaques ont été lues à 450 nm. Les plaques ont été analysées aux 24 h pendant 6 jours.

29.4 Croissance en absence d'ancrage

Nous avons ensuite évalué la capacité des cellules à croître en absence d'ancrage. Les résultats présentés à la figure 33 A, démontre que les clones indépendants exprimant MUC16-CTD ont formé plusieurs colonies, alors que les populations contrôles en ont formés aucun. Si on se réfère au graphique en B, on peut constater que les deux clones OVNT95 hTERT-CTD1 et CTD2 ont formés significativement plus de colonies, comparativement aux populations qui contrôle OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU. Cette croissance en ancrage limité suggère que MUC16-CTD favorise la croissance en absence d'ancrage.

A



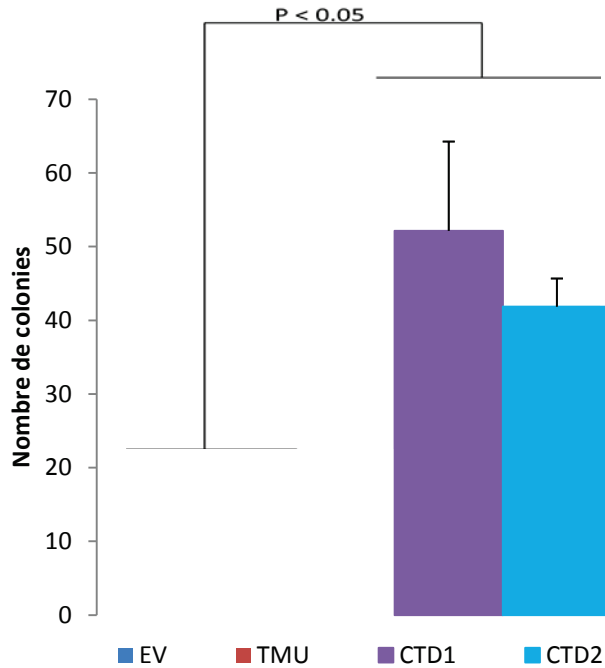
B

Figure 33: Formation de colonies en absence d'ancrage

(A) Photos de colonies formées en agar mou à 100 X des différentes populations après un mois d'incubation. Les cellules ont été incubées dans une matrice d'agar 0,33 % et de milieu de culture. 10^5 cellules par puits ont étéensemencées. Les flèches illustre les colonies visibles qui ont été formées. (B) Graphique moyen des colonies formées chez les différentes populations OVNT95 hTERT-EV (EV), OVNT hTERT-TMU (TMU) OVNT95 hTERT-CTD1 (CTD1) et OVNT95 hTERT-CTD2 (CTD2). Seules les colonies de plus de 10 cellules ont été comptées. Les cellules ont été incubées durant 1 mois. (N=3)

30. Évaluations des différentes caractéristiques associées à la tumorigénèse

Suite aux expériences de transformation, nous avons voulu vérifier les effets du CTD de MUC16 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité. La capacité de former des sphéroïdes et la capacité de migration des cellules ont été évaluées.

30.1 Formation de sphéroïde

Nous avons tout d'abord évalué la capacité des populations à former des sphéroïdes. Nous avons donc mis les cellules en suspension déposée sur de l'Agar 1,2 % et évaluer leur taille et leur densité pendant 48 h. On observe à la figure 34, la formation de sphéroïdes plus gros et beaucoup plus denses pour les deux clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2 comparativement aux populations contrôles OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU. Ces résultats suggèrent que MUC16-CTD favorise la formation de sphéroïdes plus gros et plus denses.

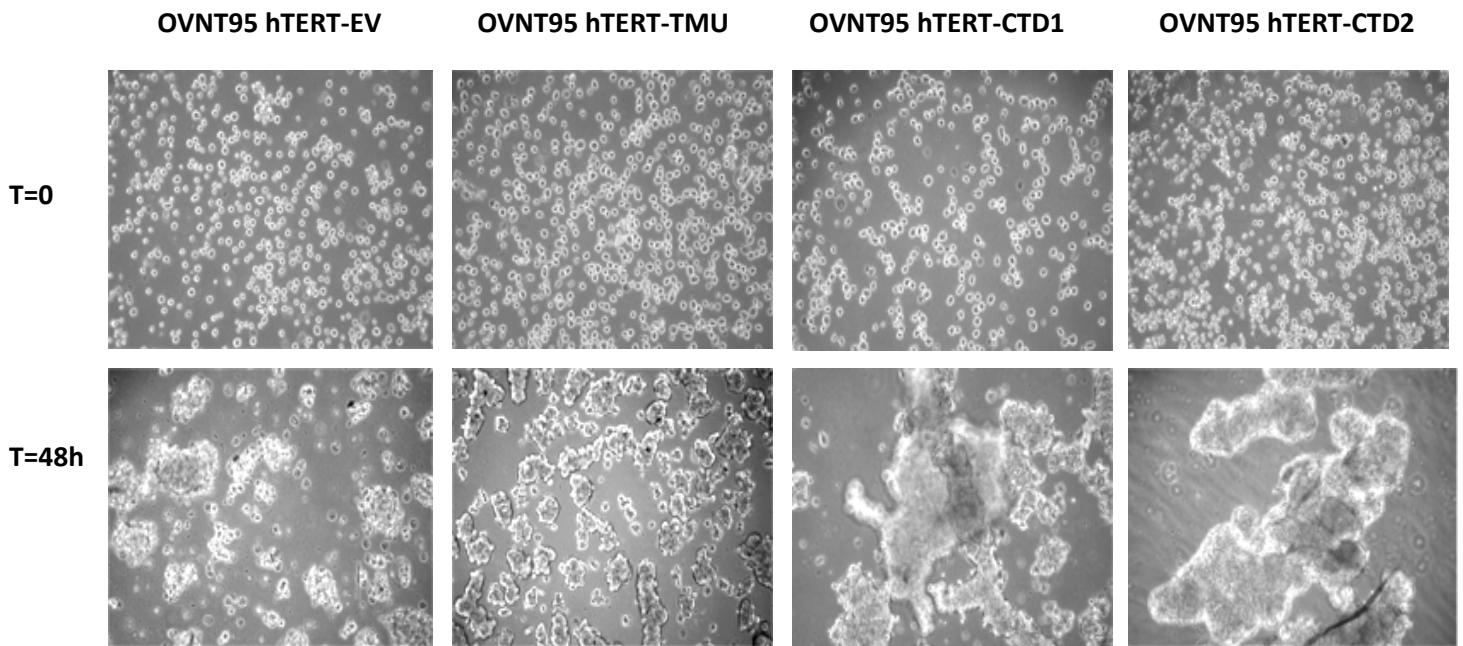


Figure 34: Formation de sphéroïdes

Photos de sphéroïdes formés en suspension sur 1,2 % d'agar de chaque population OVNT95 hTERT-EV (EV), OVNT hTERT-TMU (TMU) OVNT95 hTERT-CTD1 (CTD1) et OVNT95 hTERT-CTD2 (CTD2). 270 000 cellules par ml ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Après 48 h d' incubation la formation de sphéroïdes plus gros et beaucoup plus denses ont été formées chez les deux clones indépendants CTD1 et CTD2 comparativement aux populations contrôles EV et TMU. Les photos ont été prises à 10X.

31. Expérience de migration

Afin de vérifier si MUC16-CTD pourrait entraîner une augmentation de la capacité de migration des cellules, une expérience de migration par blessure de monocouche a été réalisée. La migration des cellules a été suivie au niveau de la croix tracée dans la monocouche cellulaire pendant 48 h. On peut observer à la figure 35 que les deux contrôles OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU on un peu migré vers 48 h, mais n'ont pas été en mesure de refermer la blessure. Alors que les deux clones indépendants ont migrés dès 24 h et à 48 h ont presque refermé la blessure sur monocouche.

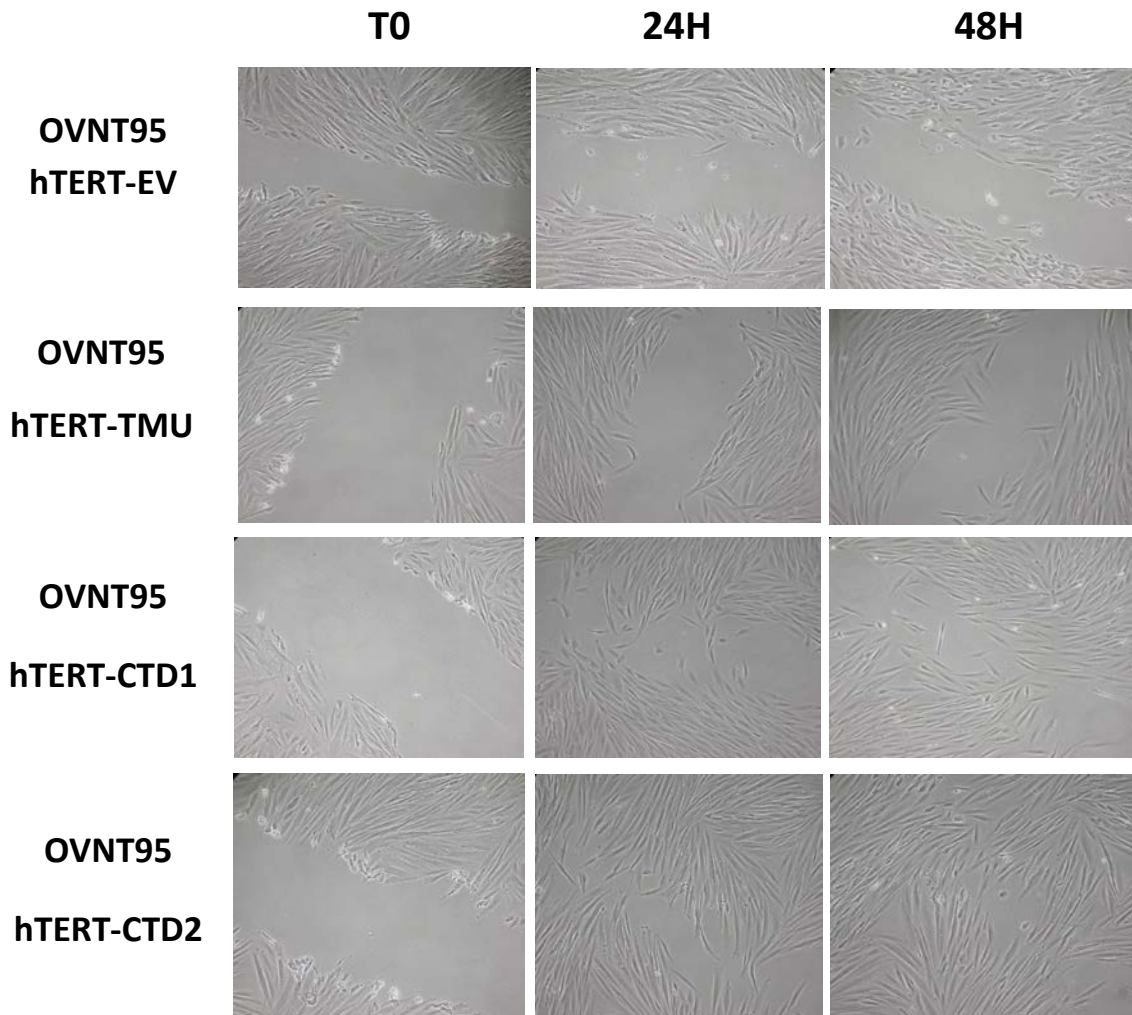


Figure 35: Blessure sur monocouche

Une croix a été faite sur la monocouche et les cellules ont été incubées pendant 48 h. Des photos ont été prises à 10X du milieu de la croix et du côté de la croix, le jour du traçage et les jours subséquents. Les deux contrôles OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU ont un peu migré vers 48 h, mais n'ont pas été en mesure de refermer la blessure. Alors que les deux clones indépendants ont migrés dès 24 h et à 48 h ont presque refermé la blessure sur monocouche.

32. Analyse patron d'expression des protéines d'adhésion

Les cadhérines sont des protéines d'adhésion et sont impliquées au niveau des jonctions cellulaires.

Lors de la transformation des cellules OSE en cellules cancéreuses, le patron d'expression des cadhérines est souvent affecté. Comme mentionné dans l'introduction de ce mémoire, les OSE expriment normalement la N-cadhérine et n'expriment pas la E-cadhérine. Des études ont démontré que lors de la transformation des OSE dans le cancer de l'ovaire, l'expression de la N-cadhérine diminue, alors une apparition de la E-cadhérine est souvent observée (Auersperg *et al.*, 2001).

32.1 IF et Western pour la N-cadhérine

Un IF et un western ont été effectués afin d'évaluer le patron d'expression et la concentration de la N-cadhérine chez les différentes populations.

Selon les résultats obtenus, la N-cadhérine serait exprimée chez toutes les populations OVNT95 hTERT. Le patron d'expression de la protéine et la localisation de celle-ci ne semble pas varier en fonction de la population cellulaire (Figure 36) mise à part peut-être une petite diminution dans le clone OVNT95 hTERT-CTD2. Pour le patron d'expression observé en Western, on observe une augmentation de la N-cadhérine dans les populations OVNT95 hTERT-TMU et CTD1 alors qu'elle est inchangée dans les autres populations OVNT95 hTERT-EV et CTD2 (Figure 37).

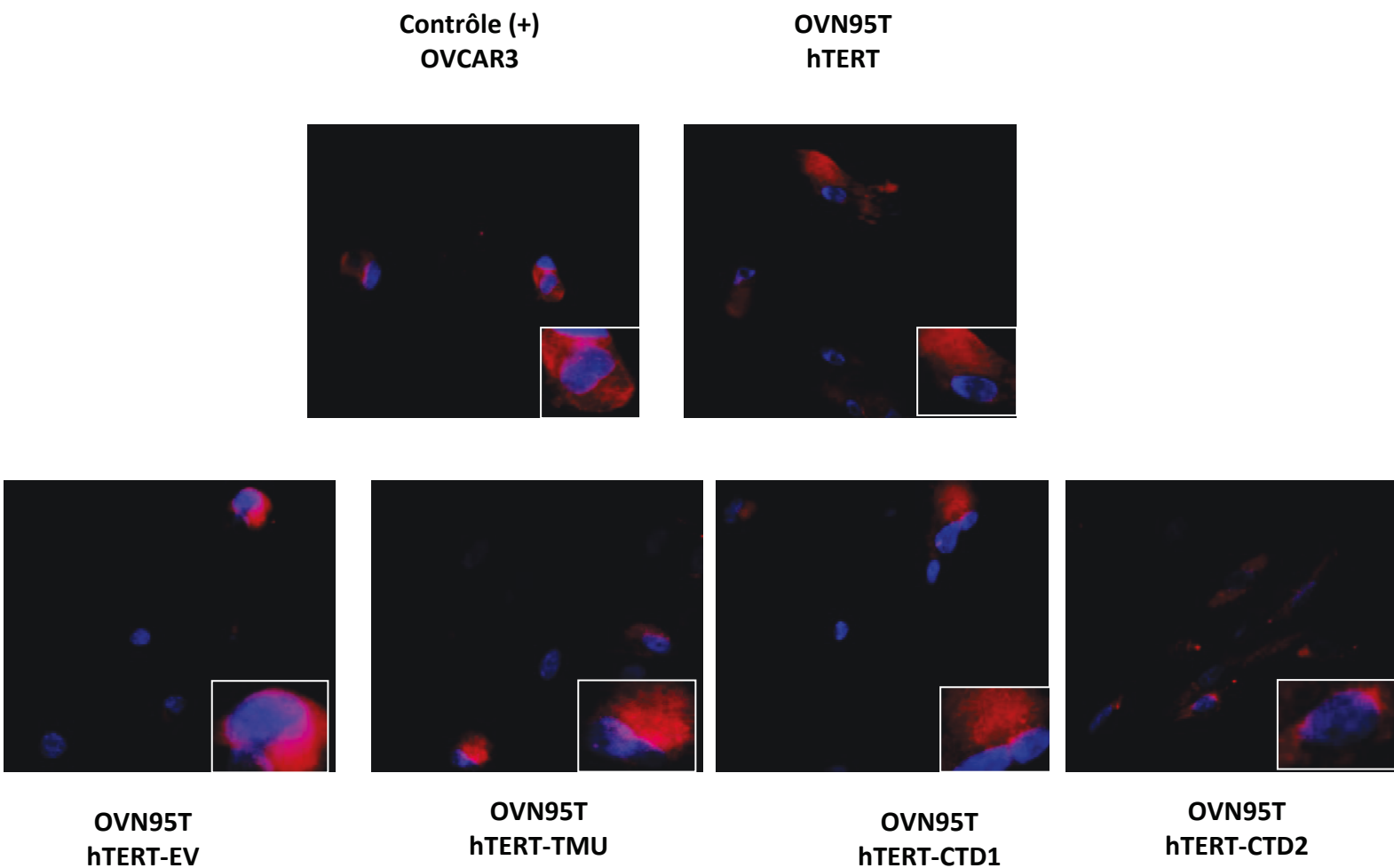


Figure 36: IF pour la N-cadhérine

Les photos des populations ont été prises à 40X. Le clone stable OVCAR3 4:5 #12, dérivé d'une lignée épithéliale cancéreuse de l'ovaire, a été utilisé en tant que contrôle positif. La coloration bleue représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de la protéine N-cadhérine.

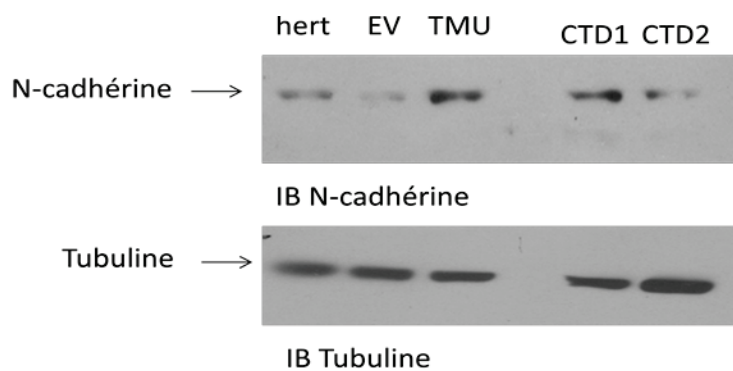


Figure 37: Western de la N-cadhérine

Les lysats provenant des cellules OVNT95 hTERT ont été analysés par immunobuvardage afin de détecter l'expression de la N-cadhérine. La tubuline a été utilisée pour s'assurer que les niveaux protéiques étaient équivalents. Un gel 10 % d'acrylamide a été utilisé.

31.2 IF et Western pour la E-cadhérine

Afin de déterminer si l'expression de la E-cadhérine était présente chez les différentes populations OVNT95 hTERT, un IF et un Western ont été effectués. Une apparition d'expression est observée en IF (Figure 38) chez les deux clones indépendants, mais également dans la population OVNT95 hTERT-TMU. Cependant en Western aucune expression n'a été observée chez les différentes populations de la E-cadhérine (Figure 39).

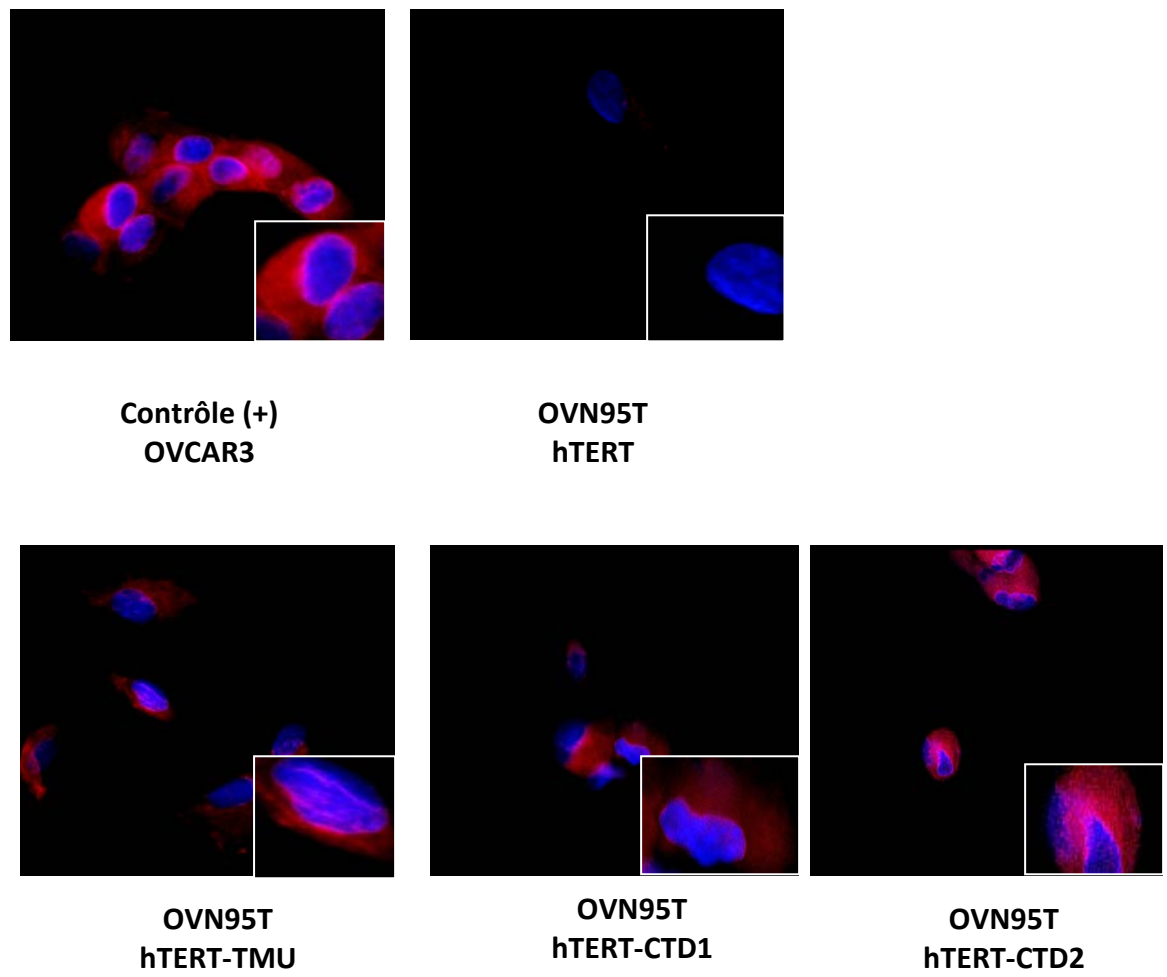


Figure 38: IF de la E-cadhérine

Les photos des populations ont été prises à 40X. Le clone stable OVCAR3 4 :5 #12, dérivé d'une lignée épithéliale cancéreuse de l'ovaire, a été utilisé en tant que contrôle positif. La coloration bleue représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de la protéine E-cadhérine.

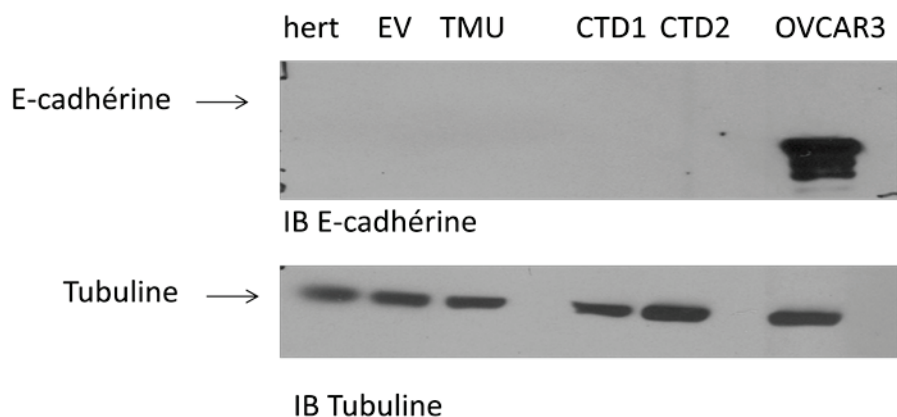


Figure 39: Western de la E-cadhérine

Les lysats provenant des cellules OVNT95 hTERT ont été analysés par immunobuvardage afin de détecter l'expression de la E-cadhérine. Le clone stable OVCAR3 4 :5 #12 a été utilisé en tant que contrôle positif. Tubuline a été utilisé pour s'assurer que les niveaux protéiques étaient équivalents.

31.3 IF et Western pour la β -caténine

La β -caténine est une protéine qui a deux fonctions différentes. Lorsqu'elle est présente à la membrane, elle joue un rôle au niveau des jonctions adhérentes. Lorsqu'elle se retrouve au niveau du cytoplasme, elle peut transloquer au noyau pour activer le facteur de transcription TCF/LEF et entraîner l'activation de plusieurs gènes cibles de la voie Wnt. Le patron d'expression de la β -caténine peut donc indiquer les fonctions que tient la protéine chez la cellule étudiée (Dietrich *et al.*, 2012).

Afin d'évaluer le patron d'expression de la β -caténine et la concentration de cette protéine chez les différentes populations, un IF et un western ont été effectués. Les résultats obtenus indiquent que les OVNT95 hTERT et les OVNT95 hTERT-EV n'expriment pas fortement la β -caténine, alors qu'on observe une petite augmentation chez les OVNT hTERT-TMU et une plus grosse augmentation chez les deux clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD1 et CTD2 (Figure 40). Cependant en Western on n'observe pas cette augmentation, les populations semblent exprimer la β -caténine au même niveau (Figure 41).

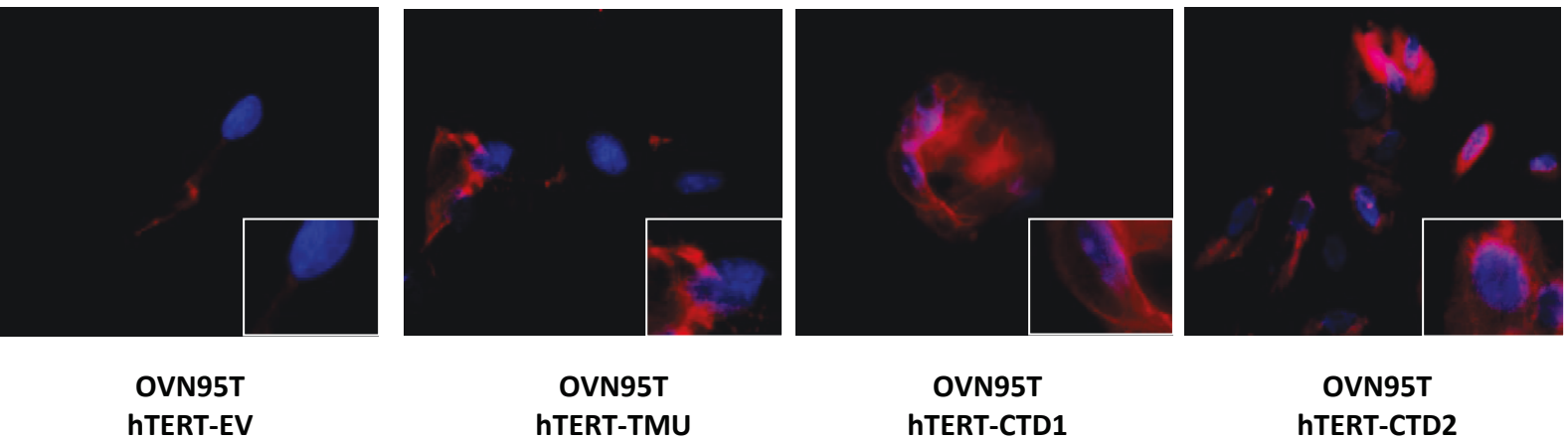
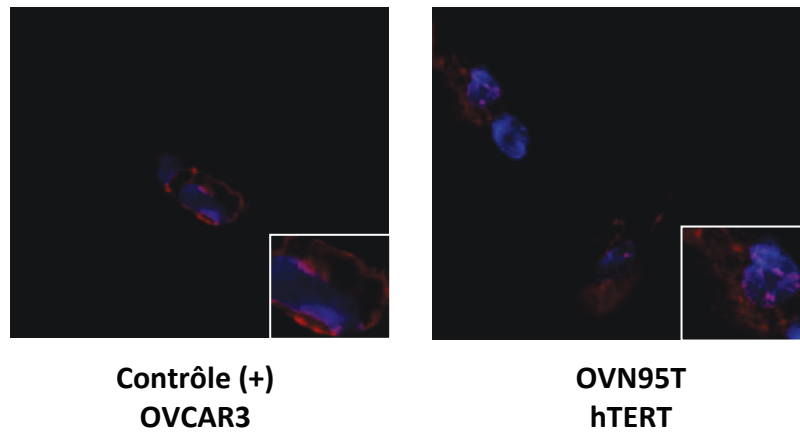


Figure 40: IF de la β -cadhérine

Les photos des populations ont été prises à 40X. Le clone stable OVCAR3 4 :5 #12, dérivé d'une lignée épithéliale cancéreuse de l'ovaire, a été utilisé en tant que contrôle positif. La coloration bleue représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de la protéine β -caténine.

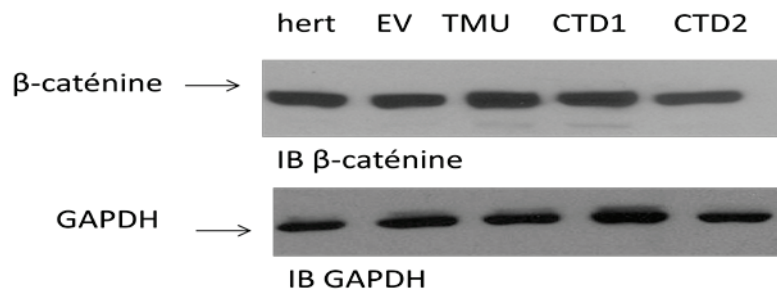


Figure 41: Western de la β -cadhérine

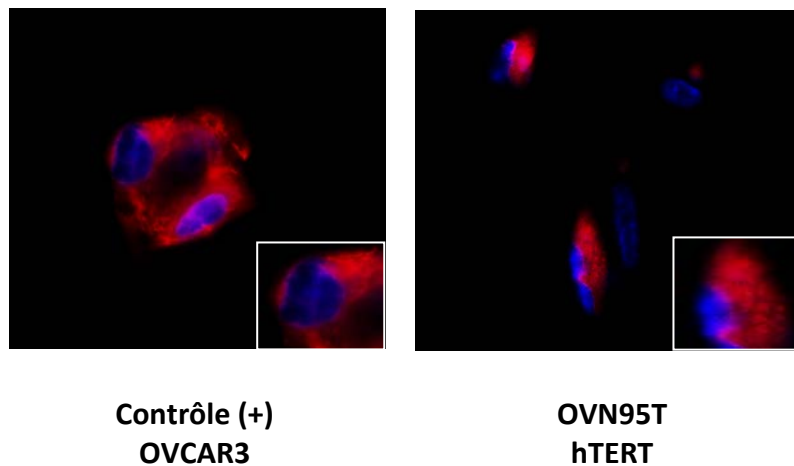
Les lysats provenant des cellules OVNT95 hTERT ont été analysés par immunobuvardage afin de détecter l'expression de la β -caténine. GAPDH a été utilisé pour s'assurer que les niveaux protéiques étaient équivalents.

32. Analyse de différentes composantes du cytosquelette

Après avoir analysé les effets de MUC16-CTD sur les jonctions cellulaires, on a évalué si MUC16-CTD pouvait entraîner des changements au niveau des composantes du cytosquelette.

32.1 IF pour les cytokératines 8 et 18

L'expression des cytokératines 8 et 18 chez les OSE permet d'évaluer le caractère épithélial ou mésenchymateux des cellules. Afin d'évaluer le patron d'expression, un IF a été effectué. Les résultats obtenus indiquent qu'il semble y avoir une perte d'expression des cytokératines pour les deux clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2 (Figure 42) comparativement aux populations contrôles OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU.



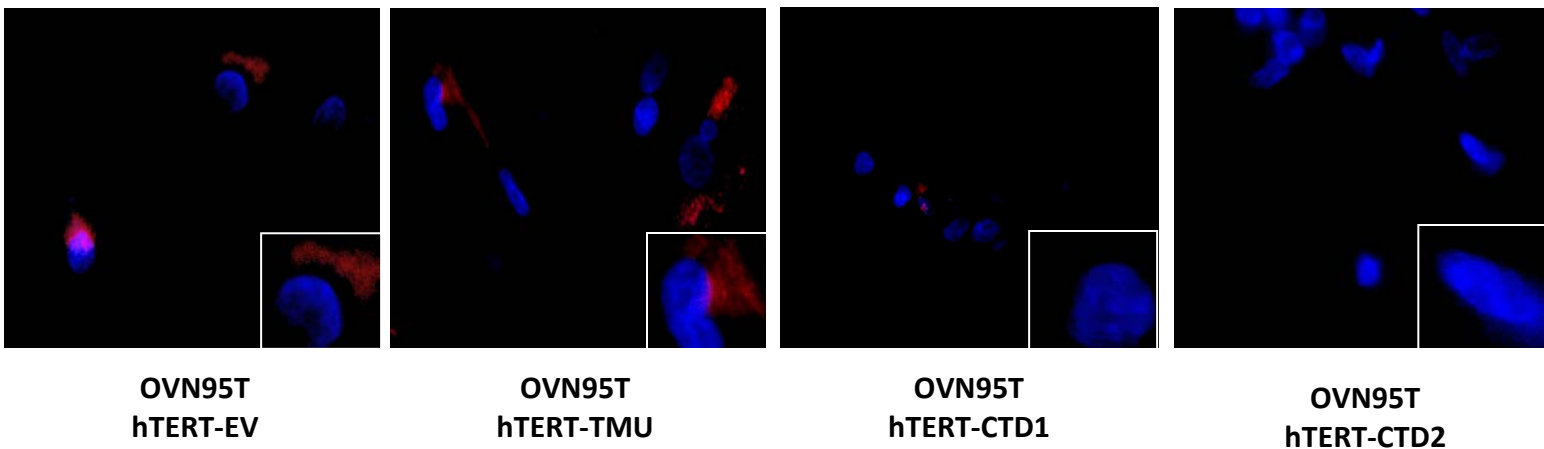
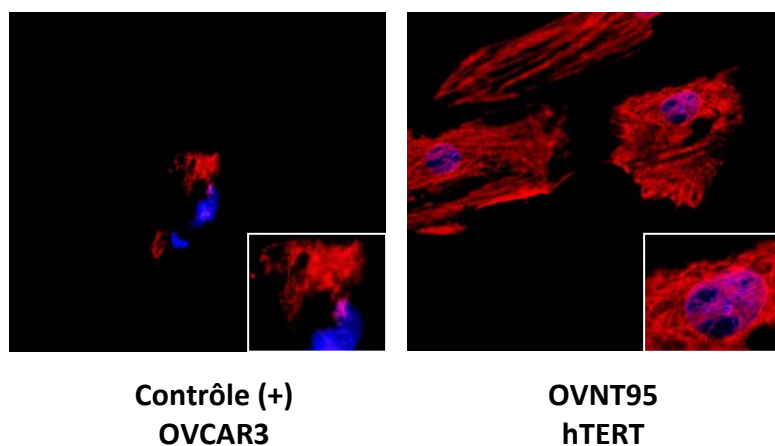


Figure 42: IF des cytokératines 8 et 18

Les photos des populations ont été prises à 40X. Le clone stable OVCAR3 4 :5 #12, dérivé d'une lignée épithéliale cancéreuse de l'ovaire, a été utilisé en tant que contrôle positif. La coloration bleue représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de les cytokératines 8 et 18.

32.2 IF pour la vimentine

Le patron d'expression de la vimentine été évalué chez les différentes populations OVNT95 hTERT. Cette protéine est une composante du cytosquelette généralement associée aux cellules mésenchymateuses qui influence la morphologie des cellules. Les résultats obtenus n'indiquent aucun changement apparent de l'expression de la vimentine dans les différentes populations (figure 43).



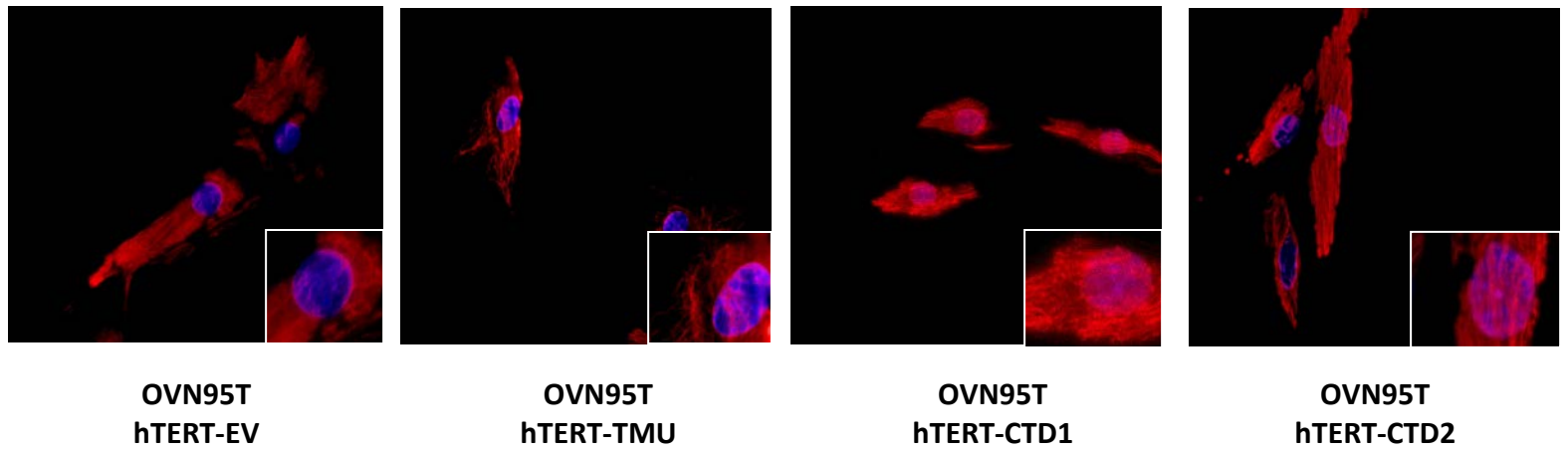
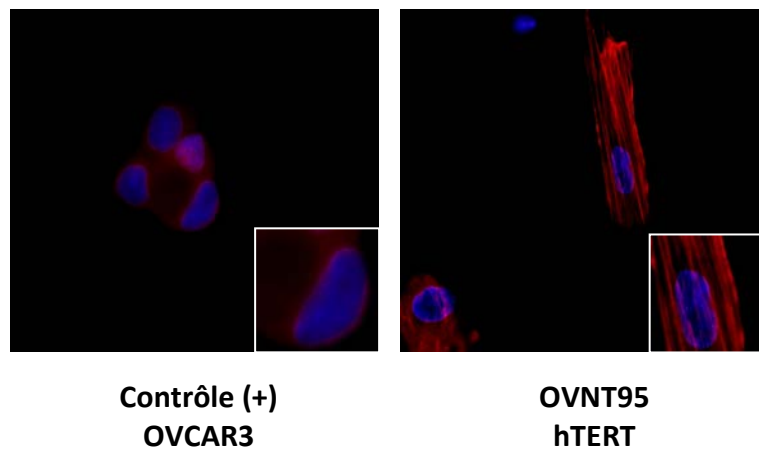


Figure 43: IF de la vimentine

Les photos des populations ont été prises à 40X. Le clone stable OVCAR3 4:5 #12, dérivé d'une lignée épithéliale cancéreuse de l'ovaire, a été utilisé en tant que contrôle positif. La coloration bleu représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de la protéine vimentine.

32.3 IF pour l'actine

Il est souvent observé lors de la transformation cellulaire des modifications dans le patron d'expression de l'actine. On a donc évalué le patron d'expression de la protéine F-actine par IF. On n'observe aucune différence dans le patron d'expression ni dans la concentration dans les différentes populations (Figure 44) exceptée une légère désorganisation des fibres de stress dans le clone indépendant OVNT95 hTERT-CTD1.



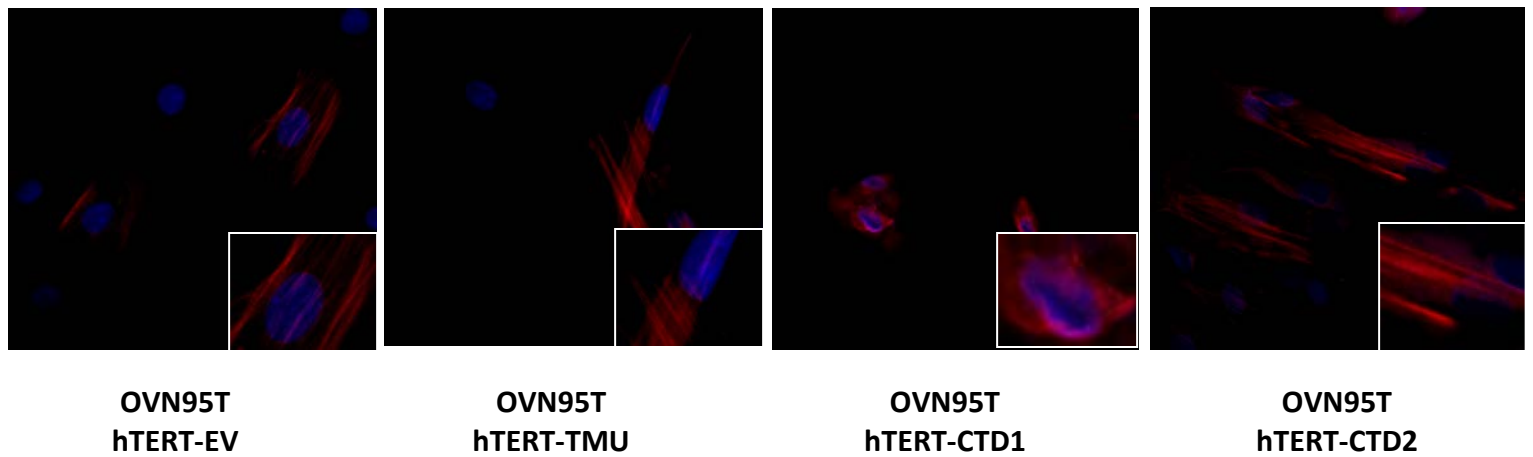


Figure 44: IF de l'actine

Les photos des populations ont été prises à 20X. Le clone stable OVCAR3 4:5 #12, dérivé d'une lignée épithéliale cancéreuse de l'ovaire, a été utilisé en tant que contrôle positif. La coloration bleue représente le noyau et la coloration rouge représente l'expression de la protéine actine.

33. Gènes identifiés par la Micropuce

La micropuce effectuée sur les clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2 et la population OVNT95 hTERT-TMU nous a permis d'identifier les gènes et les voies de signalisations augmentées ou diminuées dans les différents clones qui expriment la partie C-terminale de MUC16. Les profils d'expression ont été comparés en utilisant la puce à ADN du Génome Humain entier (Agilent) contenant plus de 44 000 gènes.

D'abord, nous avons produit les listes des gènes significativement augmentés et diminués qui sont exprimés dans les clones indépendants versus le contrôle OVNT95hTERT-TMU. Parmi les gènes qui seront exprimés de manière différentielle ($> 1,5$ fois la différence), nous avons constaté que 222 gènes étaient augmentés alors que 392 gènes étaient diminués.

Pour l'analyse dans ce mémoire nous avons mis l'accent sur les gènes associés au cancer et nous avons limité la liste des gènes potentiels en sélectionnant ceux du cycle cellulaire, la croissance et

la prolifération cellulaire, le mouvement cellulaire, la transformation et l'oncogenèse. Cette sélection a généré une petite liste de 10 à 15 gènes qui sont des gènes précédemment associés avec le développement et la progression du OC. Les gènes les plus significativement augmentés sont présentés dans le tableau 9 et ceux diminués sont présentés dans le tableau 10. On y retrouve les gènes TGF β 1 et LTBP1 les plus surexprimés et les gènes ADRA1B et S100A4 les plus diminués.

Le sentier et l'analyse des voies de signalisation basées sur les gènes régulés ont été produits à l'aide d'Ingenuity Pathways Analysis (IPA). L'IPA a montré que les gènes régulés positivement sont surtout associés à la motilité cellulaire, la survie cellulaire et la prolifération (Figure 45). Alors que les gènes impliqués dans l'apoptose et la prolifération (des régulateurs surtout négatifs) étaient parmi les gènes diminués (Figure 45 B). De plus, nous avons constaté que les voies canoniques activées dans les clones MUC16-CTD étaient surtout celles impliquées dans le remodelage des jonctions cellulaires et la signalisation IGF-1 (Figure 45 C). Les réseaux liés avec le cancer, l'assemblage et l'organisation cellulaire, la signalisation cellule-cellule, le cycle cellulaire ont également été diminués ou augmentés (Figure 45).

L'analyse a suggéré de nombreux partenaires impliqués dans la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire comme TGF β 1, LTBP1, NRG1 et COL1A1 (Figure 46). Alors que d'autres sont impliqués dans la migration et l'invasion telle que CTCF, EDN1, IL11 et MET (Figure 46). Plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose sont également augmentés et diminués (Figure 47), par exemple les gènes ANGTL4, TGF β 1 (augmentés), ADRA1 et FOXO1 (diminués).

Tableau 9: Gènes augmentés dans les clones OVNT95 hTERT-CTD

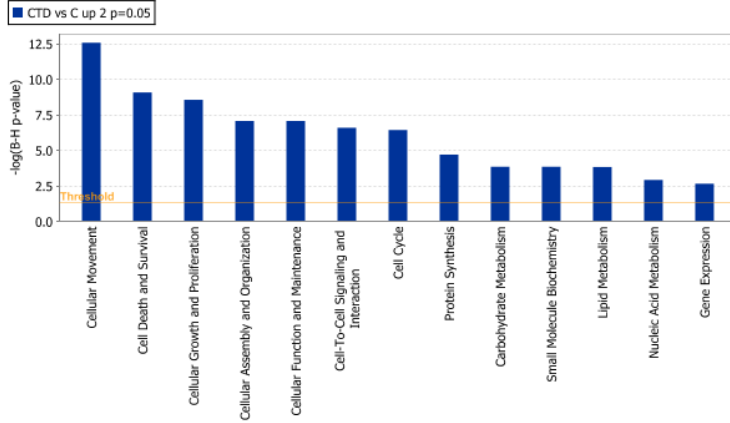
Unigene	symbole	Description	Fonction	Fold change	surexprimé dans le cancer ovarien
NM_000358	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced	Prolifération	16,1	Higashi T <i>et al.</i> ,2001
NM_206943	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	Prolifération	16,09	Higashi T <i>et al.</i> ,2001
NM_001901	CTGF	connective tissue growth factor complement factor H, transcript variant 1	migration et invasion	8,39	Junnikkala <i>et al.</i> , 2002
NM_000186	CFH	neuregulin 1, transcript variant ndf43	migration et invasion	7,59	Junnikkala <i>et al.</i> , 2002
NM_013960	NRG1	NADPH oxidase 4 , transcript variant 1	Prolifération	7,29	Gilmour LM <i>et al.</i> ,2002
NM_016931	NOX4		Prolifération, différenciation et mouvement cellulaire	6,98	Graham <i>et al.</i> ,2010
NM_000641	IL11	interleukin 11	Migration et prolifération	5,64	Campbell CL <i>et al.</i> ,2001
NM_001955	EDN1	endothelin 1	Migration, invasion et prolifération	4,36	Bufalo <i>et al.</i> ,2002; Nelson <i>et al.</i> ,2003; Jeng-Wei lu <i>et al.</i> ,2014
Z74615	COL1A1	prepro-alpha1(I) collagen	Prolifération	4,08	Santala <i>et al.</i> ,1993
NM_001299	CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle SRY (sex determining region Y)-box 4	Prolifération	3,66	Sigl Gery <i>et al.</i> ,2005
NM_003107	SOX4	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	Prolifération, différenciation et apoptose	3,51	Lai <i>et al.</i> ,2011
NM_003392	WNT5A		Prolifération, différenciation et apoptose	3,51	Peng C <i>et al.</i> ,2011
NM_002006	FGF2	fibroblast growth factor 2 met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	Prolifération et invasion	2,98	Criccard <i>et al.</i> ,1994; Fujimoto <i>et al.</i> , 1997
NM_000245	MET		Prolifération, migration, invasion et angiogénese	2,33	E lengyel, 2010; Mhaweck <i>et al.</i> ,2012;

Tableau 10: Gènes diminués dans les clones OVNT95 hTERT-CTD

Unigene	symbole	Description	Fonction	Fold change	diminué dans le cancer
NM_175861	ADRA1B	adrenergic, alpha-1B-, receptor	Apoptose	-16,8	
NM_002961	S100A4	S100 calcium binding protein A4 (S100A4), transcript variant 1	Apoptose	-9,65	
NM_0010015	GRB10	growth factor receptor-bound protein 10	Inhibition de PI3K	-6,98	Yu Yonghao <i>et al.</i> ,2011
NM_000210	ITGA6	integrin, alpha 6	Apoptose	-6,94	
NM_000076	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	Inhibiteur cycle cellulaire	-4,88	
NM_0010015	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	Apoptose	-4,66	
NM_002015	FOXO1	forkhead box O1	Apoptose	-4,12	
NM_021963	NAP1L2	nucleosome assembly protein 1-like 2	Apoptose	-4,04	
NM_001323	CST6	cystatin E/M	Cystatin inhibiteur	-3,99	Menendez <i>et al.</i> ,2007
NM_001323	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	Apoptose	-3,88	
NM_006988	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	Apoptose	-3,5	
NM_144497	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	Apoptose	-3,49	

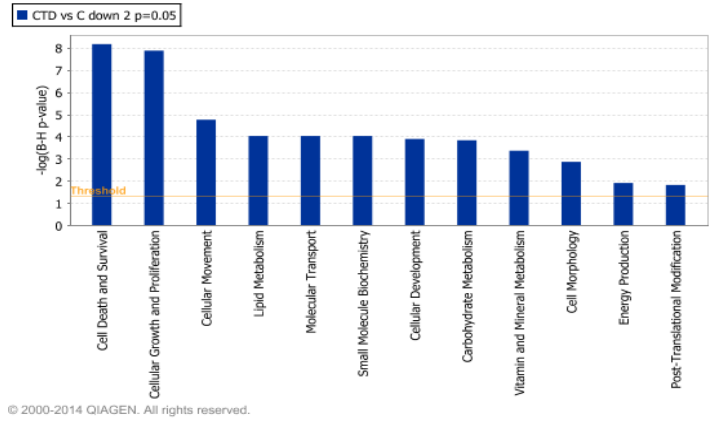
A

Analysis: CTD vs C up 2 p=0.05



B

Analysis: CTD vs C down 2 p=0.05



C

Analysis: CTD vs C up 2 p=0.05

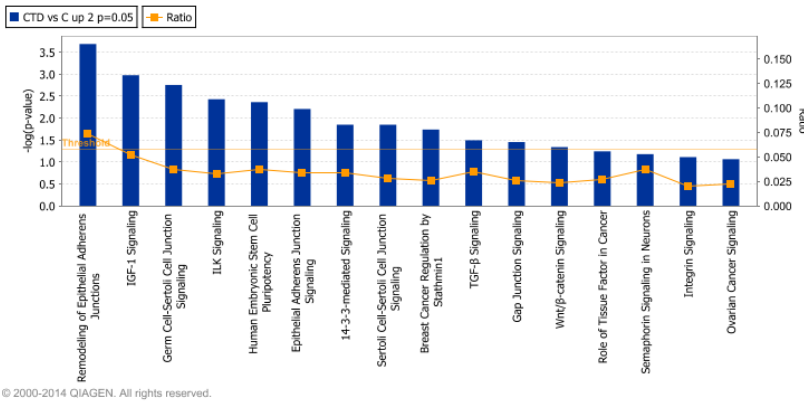


Figure 45: Analyse fonctionnelle des gènes régulées

Analyse fonctionnelle de l'ensemble de données de gènes exprimés de manière différentielle ($\geq 1,5$ fois) dans les clones indépendants exprimant MUC16-CTD. Les fonctions qui ont un Pvalue de plus 0,05 sont affichés. La ligne orange représente la coupure pour la valeur de signification. (A) Les gènes qui ont été régulés à la hausse et (B) gènes régulés à la baisse C) Différentes voies canoniques impliquées dans le processus cellulaire comme par exemple le remodelage des jonctions cellulaire et la signalisation IGF-1.

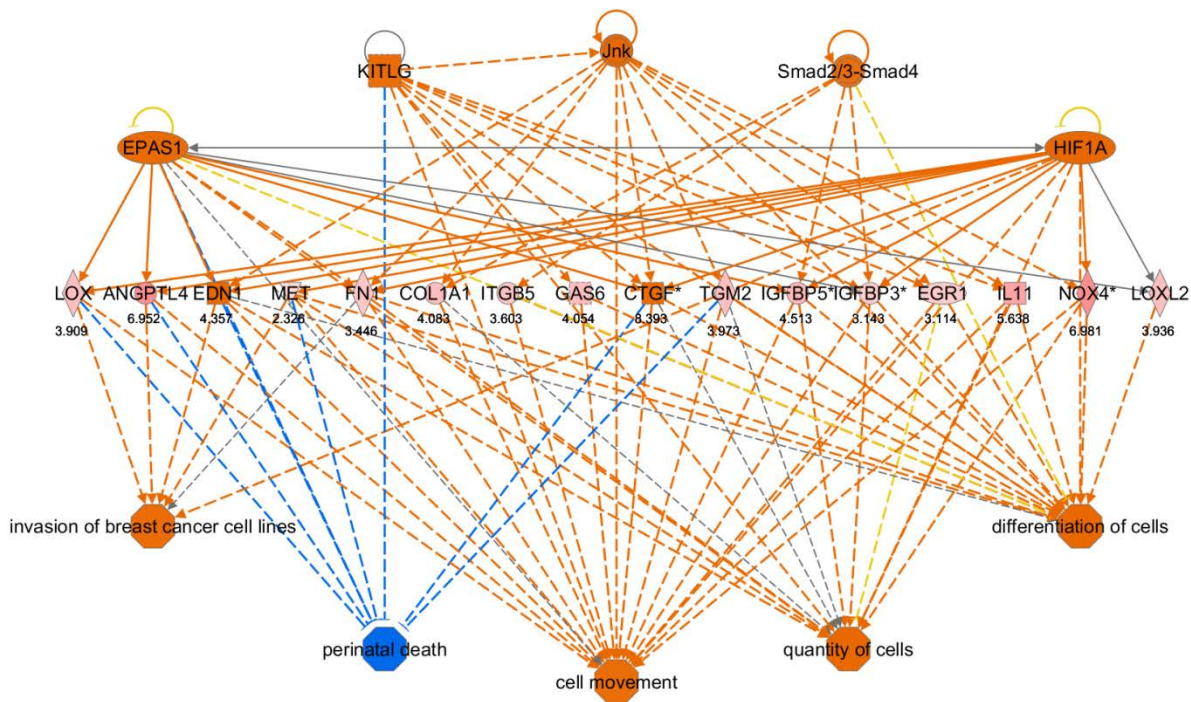
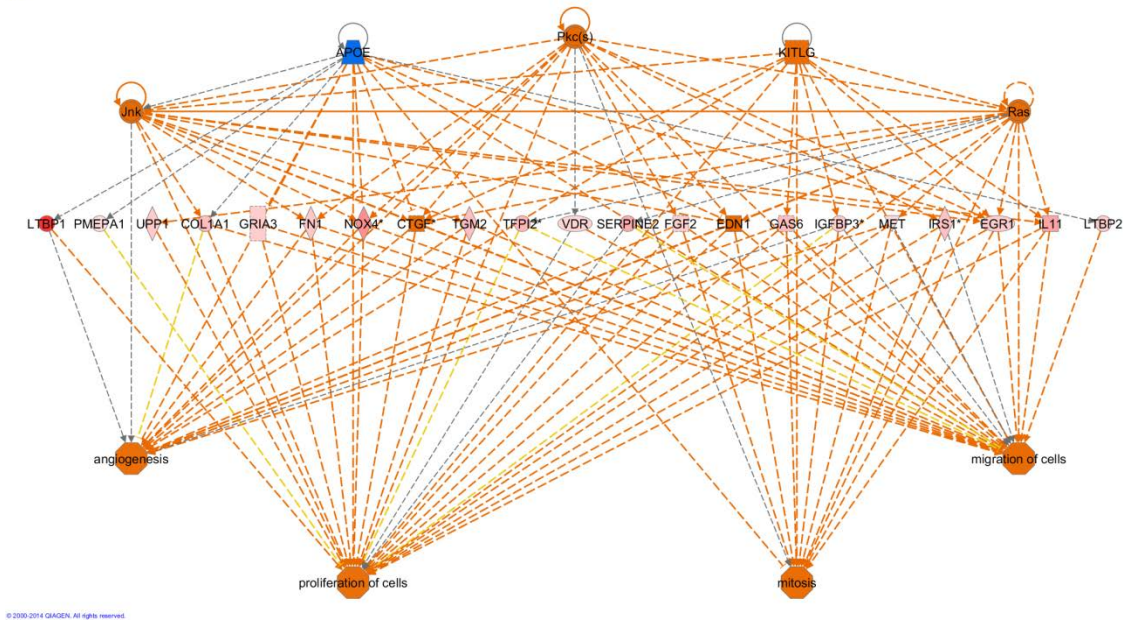
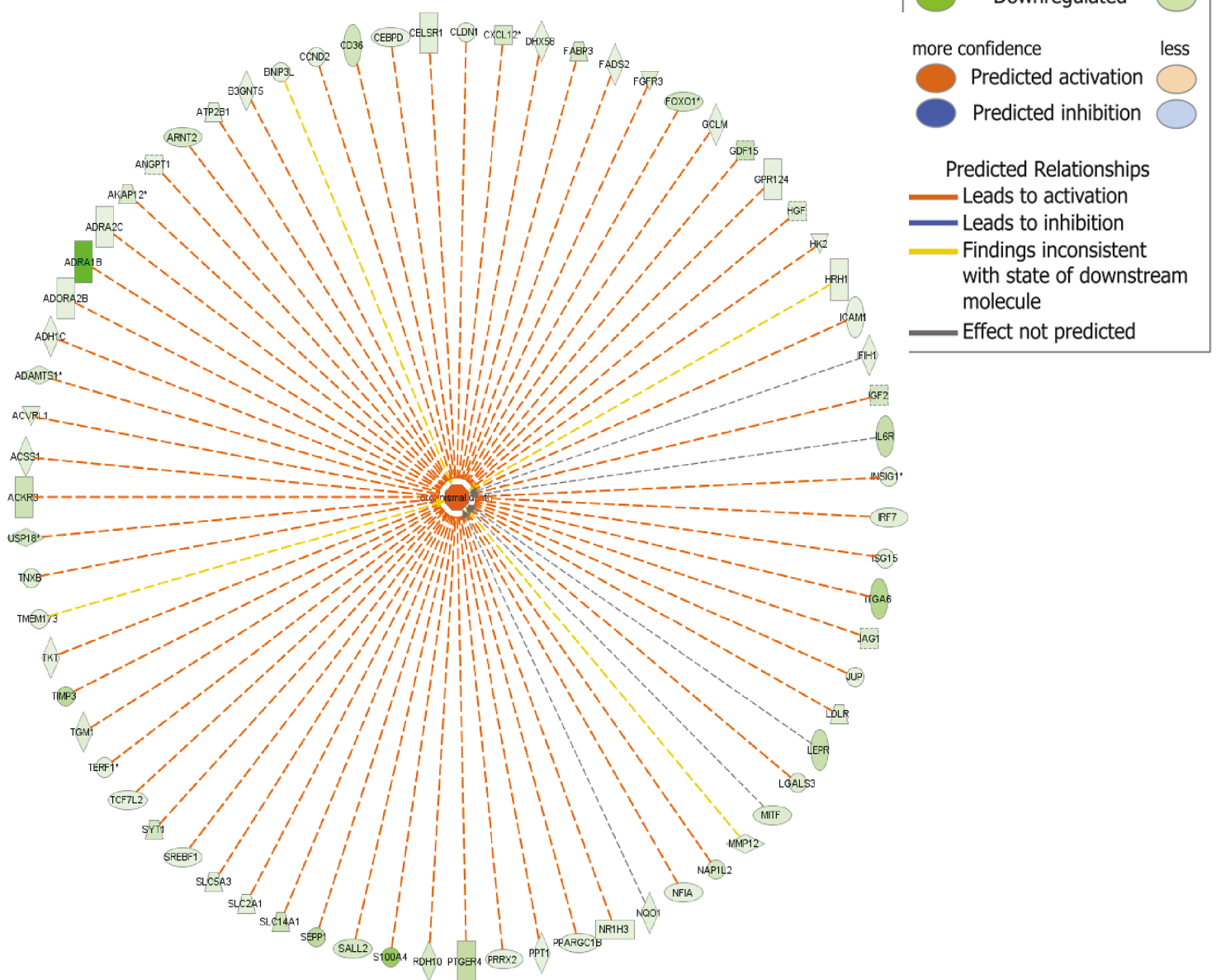


Figure 46: Gènes activés dans les clones OVNT95 hTERT-CTD

L'analyse des voies de signalisation basées sur les gènes régulés positivement dans les clones indépendants exprimant MUC16-CTD (A) Gènes impliqués dans l'invasion, le mouvement cellulaire et la différenciation des cellules (B) Gènes impliqués dans l'angiogénèse, la prolifération cellulaire, la mitose et la migration cellulaire. Les réseaux haut pointage ont été fusionnés et affichés graphiquement comme nœud (produit génique / génique) et des lignes (les relations biologiques entre les nœuds). Les nœuds sont affichés en utilisant diverses formes qui représentent la classe fonctionnelle du produit du gène (carré, cytokine; ovale vertical, récepteur transmembranaire; rectangle, récepteur nucléaire; diamant, enzymes; losange, transporteur; hexagone, facteur de traduction; ovale horizontal, facteur de transcription; cercle, autre). Les lignes sont affichées avec différentes étiquettes décrivant la nature de la relation entre les nœuds: - liaison uniquement; → agit sur. Les lignes en pointillé représentent une interaction indirecte.

B**Figure 47: Gènes impliqué dans la mort cellulaire**

L'analyse des gènes régulés (A) positivement (B) négativement dans l'apoptose. Les gènes sont affichés en utilisant diverses formes qui représentent la classe fonctionnelle du gène (carré, cytokine; ovale vertical, récepteur transmembranaire; rectangle, récepteur nucléaire; diamant, enzymes; losange, transporteur; hexagone, facteur de traduction; ovale horizontal, facteur de transcription; cercle, autre). Les lignes sont affichés avec différentes couleurs illustrés dans la légende.

Discussion

Rappel

Le cancer de l'ovaire est la cinquième cause de mortalité par cancer chez les femmes et le cancer gynécologique le plus mortel. Cette forte mortalité est en grande partie due au diagnostic tardif de la maladie. L'absence de symptômes aux stades précoces et de biomarqueur diagnostic rendent la détection du cancer de l'ovaire difficile. La protéine MUC16 est surexprimée dans 80 % des cancers épithéliaux de l'ovaire et est un marqueur utilisé pour le suivi des patientes. MUC16 est plus spécifiquement une glycoprotéine de type mucine qui est exprimée par les cellules de la surface de l'ovaire transformées.

Lors de la transformation des cellules de la surface de l'ovaire (OSE) en cellules cancéreuses, plusieurs changements seront entraînés; les caractéristiques épithéliales des cellules seront favorisées, l'expression de la E-cadhérine sera favorisée et le profil d'expression de plusieurs protéines sera influencé. Notamment l'expression des mucines, dont l'apparition de l'expression de la mucine MUC16 qui normalement n'est pas exprimée à la surface des cellules de l'ovaire.

Cette surexpression de MUC16 est associée à un phénotype plus agressif. Il a été démontré que la partie C-terminale de MUC16 est suffisante pour promouvoir la croissance en agar mou, la tumorigénèse et les métastases tout en conférant de nombreux avantages aux cellules. Ces observations semblent indiquer que MUC16 pourrait être un oncogène et que son domaine CTD serait suffisant à l'octroi de plusieurs caractéristiques associées à la transformation et à la tumorigénicité. Mon projet est donc de déterminer si MUC16 contribue à la transformation des cellules et si la partie C-terminale est suffisante pour induire ces effets.

Les effets de certains oncogènes peuvent varier d'un type cellulaire à un autre (Felsher, 2008). Afin de mieux définir les caractéristiques que la partie C-terminale de MUC16 confère aux cellules, des expériences de transformation des cellules immortalisées ou non-immortalisées ont été effectuées. De plus, des expériences sur la tumorigénicité ont été aussi effectuées chez ces deux types cellulaires.

34. La lignée cellulaire immortalisée non-transformée NIH3T3

Nous avons tout d'abord vérifié la capacité de la partie C-terminale de MUC16 à transformer les cellules NIH3T3, des fibroblastes de souris immortalisées couramment utilisées lors d'expériences de transformation par des protéines potentiellement oncogéniques (RUBIN et XU, 1989).

34.1 MUC16-CTD induit un léger changement de morphologie

Suite à l'obtention de plusieurs clones indépendants NIH3T3-CTD l'expression de MUC16-CTD dans ces derniers ont été validée par RT-PCR (Figure 11). Tous les clones exprimaient la construction, nous avons donc poursuivi les expériences avec seulement deux clones. L'expression a par la suite été validée au niveau protéique. Nous avons observé une expression dans les deux clones indépendants grâce à la détection des deux étiquettes c-myc et Flag (Figure 12). Une bande était présente aux alentours de 70 kDa pour les deux anticorps utilisés. Finalement, l'expression a été validée par Immunofluorescence (Figure 13). On observe une expression qui semble être membranaire, ce qui est attendu. La présence possible de la protéine au niveau du cytoplasme des cellules pourrait représenter la voie de sécrétion empruntée par la protéine pour rejoindre la membrane cellulaire. Il aurait été intéressant d'effectuer une immunofluorescence cofocale pour déterminer la localisation exacte de la protéine et déterminer si elle est également présente au niveau nucléaire, puisque MUC16 possède un signal potentiel de localisation nucléaire RRK (HUANG *et al.*, 2003).

Les cellules ont été observées au microscope afin de détecter des changements morphologiques. On observe un léger changement au niveau des deux clones indépendants NIH3T3-CTD1 et NIH3T3-CTD2 (Figure 14). Les cellules semblent être un peu plus épithéliales que fibroblastiques, ce qui serait prévu, puisque la mucine MUC16 est associée comme un marqueur épithélial (Jacob et Bast, 1989; Wong et Auersperg, 2003).

Après cette validation des clones indépendants, plusieurs expériences afin d'évaluer la transformation des NIH3T3 ont été effectuées.

34.2 MUC16-CTD favorise la perte d'inhibition de contact

Une expérience de formation de foyer à post-confluence a été effectuée afin d'évaluer les effets de MUC16-CTD sur l'inhibition de contact. Les résultats ont démontré que la présence de MUC16-CTD dans les NIH3T3 favorisait la formation de plusieurs foyers. Un nombre significativement plus élevé a été formé par les deux clones indépendants, comparativement aux populations contrôle NIH3T3-EV et NIH3T3-TMU (Figure 15). La perte d'inhibition de contact observée chez les clones indépendants pourrait indiquer que MUC16-CTD augmente l'insensibilité des cellules à différents signaux inhibiteurs de croissance.

34.3 MUC16-CTD stimule la prolifération

Lors de la transformation maligne des cellules, ces dernières développent souvent une autosuffisance par rapport aux différents signaux de croissance. Les résultats ont démontré que l'expression de la partie C-terminale de MUC16 dans les NIH3T3 a entraîné une croissance cellulaire significativement plus élevée, autant en condition normale de sérum (10 %) qu'en condition appauvrie de sérum (1 %) et ce, comparativement aux populations contrôles NIH3T3-EV et NIH3T3-TMU (Figure 16). Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de MUC16 est suffisante pour stimuler la prolifération et pourrait conférer aux cellules une certaine indépendance

à différents signaux de croissance. Il est également possible que MUC16-CTD rende les cellules insensibles aux différents signaux qui normalement contrôlent et inhibent leur croissance. En effet, les queues cytoplasmiques de certaines mucines sont connues pour entraîner l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire, qui favorisent la croissance et la prolifération cellulaire. Comme par exemple, il a été démontré que MUC1 interagit avec ErbB1 qui entraîne l'activation de la voie ERK (Jepson *et al.*, 2002). Alors qu'il a été démontré que MUC4 interagit avec ErbB2 qui conduit à l'activation des voies ERK et Akt pour promouvoir la croissance cellulaire (Carraway *et al.*, 2007). Il est donc possible que MUC16-CTD interagisse avec des récepteurs tyrosine kinase ou d'autres partenaires moléculaires pour entraîner également l'activation des voies ERK et Akt pour moduler la croissance cellulaire.

Également, il a été démontré que dans le cancer du sein MUC16 interagit avec la protéine JAK2 qui régule la phosphorylation de STAT3 qui par la suite activerait le facteur de transcription *c-jun*, qui a pour rôle d'induire l'expression de la cycline D1 et ainsi promouvoir la prolifération cellulaire. (Lakshmanan *et al.*, 2012). Il serait donc également possible que MUC16 via différentes voies de signalisation altère l'expression de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire.

34.4 MUC16-CTD favorise la capacité de croissance en absence d'ancrage

Afin de continuer à évaluer les effets de MUC16-CTD sur la transformation des NIH3T3, une expérience en agar mou a été effectuée pour évaluer la capacité des cellules à croître en absence d'ancrage. L'expression de MUC16-CTD dans les NIH3T3 a favorisé la formation de plusieurs colonies en agar mou. Un nombre significativement plus élevé de colonies a été formé par les deux clones indépendants comparativement aux populations contrôles NIH3T3-EV et NIH3T3-TMU (Figure 17). De plus, les colonies formées par les clones indépendants étaient d'une taille supérieure aux colonies formées par les populations contrôles. Ainsi, la présence de la partie C-

terminale de MUC16 favorise la croissance en absence d'ancrage. Ceci pourrait indiquer que MUC16-CTD favorise ou confère une certaine indépendance à différents signaux de croissance. Les cellules obtiennent des signaux de croissance de plusieurs sources. Du aux restrictions imposées aux cellules par la matrice d'agar, il se peut que MUC16-CTD augmente l'indépendance des cellules à différents signaux de croissance, ce qui permet aux cellules de croître en absence d'ancrage. Effectivement, lors de cette expérience, les cellules sontensemencées de façon isolée l'une aux autres dans la matrice d'agar et ainsi, les signaux de croissance fournis par la matrice extracellulaire et les signaux de croissance provenant des contacts intracellulaires sont grandement diminués. L'inactivation ou la perte d'une protéine ainsi que des modifications de certaines molécules d'adhésions présente à la surface des cellules peut entraîner des effets incontournables au niveau de la réponse aux facteurs inhibiteurs de croissance. Une étude récente suggère que la queue cytoplasmique de MUC16 interagit avec les kinases de la famille src et induit la relocalisation de la E-cadhérine et de la β -caténine (Akita et al., 2013). Ce qui réduirait l'adhérence des cellules et pourrait expliquer les résultats obtenus.

De plus, les résultats obtenus pourraient suggérer que MUC16-CTD entraîne une résistance à l'anoïkose. L'anoïkose est une forme spécifique d'apoptose, qui est entraînée lorsque les cellules perdent leur ancrage à leur matrice extracellulaire. Cependant, cette hypothèse reste à confirmer. Il serait intéressant de vérifier l'efficacité d'adhésion des NIH3T3-CTD par une expérience de clonogenicité sur plastique ainsi que de déterminer si MUC16-CTD est suffisant pour promouvoir la diffusion des cellules tumorales dans toute la cavité péritonéale des souris SCID par une expérience *in vivo*.

L'acquisition d'une résistante face à l'anoïkose constitue non seulement une étape critique dans la progression tumorale, mais aussi une étape limitante dans l'émergence de métastases. Il est donc possible que MUC16-CTD favorise indirectement la formation des métastases.

34.5 MUC16 -CTD favorise la formation de sphéroïdes

Une particularité chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire est souvent la présence d'ascite. L'ascite est un fluide qui est fréquemment accumulé dans la cavité péritonéale au cours de la progression des cancers de l'ovaire. Ce « microenvironnement tumoral » particulier contribue à la dissémination des cellules cancéreuses et à leurs implantations péritonéales. Elles contiennent des agrégats de cellules cancéreuses qui se sont détachés de la tumeur primaire et qui peuvent entraîner la formation de métastases. De plus, l'organisation des cellules et leur réarrangement en agrégats multicellulaires, ou sphéroïdes permettraient aux cellules cancéreuses de survivre en absence d'ancrage à une matrice extracellulaire, avant de former un foyer secondaire à distance.

Une expérience pour vérifier l'habilité des différentes populations à former des sphéroïdes a été effectuée. Les résultats obtenus (Figure 18) suggèrent que l'expression de MUC16-CTD favoriserait la formation de plus gros sphéroïde et par conséquent, pourraient favoriser la survie, la prolifération ou la force des interactions cellules-cellules. Les interactions cellule-cellule retrouvées à même les sphéroïdes pourraient en effet remplacer temporairement les signaux de survie; habituellement fournis par la matrice extracellulaire. Les sphéroïdes expriment d'ailleurs des patrons de protéines différents de ceux retrouvés chez les cellules normales (Shield et al., 2007). Ils seraient donc possibles que MUC16-CTD entraîne la relocalisation de certaines protéines. Il a été démontré que MUC16 agissait comme un régulateur important du processus EMT dans les cellules cancéreuses de l'ovaire (Comamala *et al.*, 2011). Il est possible que la queue cytoplasmique de MUC16 interagisse avec la E-cadhérine et la β -caténine et induit leur

relocalisation. Ce qui pourrait entraîner l'activation de certaines voies de signalisation, dont la voie de Wnt qui entraînerait l'augmentation de la motilité cellulaire, la migration et le caractère invasif des cellules (Suyama *et al.*, 2002).

De plus, il serait possible que MUC16-CTD joue un rôle dans la dissémination du cancer de l'ovaire et du processus métastatique. Le mécanisme par lequel MUC16 affecte, le processus métastatique est inconnu, il serait donc intéressant d'évaluer la capacité d'invasion des NIH3T3, soit avec une expérience en chambre de Boyden avec des couches de matrigels ou par une expérience *in vivo*; injection des souris SCID de façon péritonéale.

34.6 MUC16-CTD semble favoriser la formation de tumeurs

Les cellules doivent acquérir de nombreux avantages pour être capables de former une tumeur chez un animal. Bien que les souris NUDE possèdent un système immunitaire déficient, l'utilisation de ce modèle permet la comparaison de la tumorigénicité de différentes populations. L'expérience effectuée chez les souris NUDE a permis d'observer que l'expression de la partie C-terminale de MUC16 augmente la tumorigénicité des cellules (Figure 19). Les tumeurs sous-cutanées formées par le clone NIH3T3-CTD1 étaient plus grosses que celles formées par la population contrôle NIH3T3-TMU. Cette observation semble en accord avec les différents résultats obtenus chez les NIH3T3. Il est possible que les avantages que semble conférer MUC16-CTD aient favorisé la croissance des cellules chez les souris NUDE, telles que la diminution de l'inhibition de contact, l'indépendance des signaux de croissance et l'indépendance des signaux inhibiteurs de croissance. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'ajout de MUC16-CTD dans les SKOV3 ainsi que l'ajout de MUC1 et MUC4 dans les NIH3T3 (Bafna Sangeeta *et al.*, 2008)

Suite aux résultats obtenus avec les NIH3T3, la partie C-terminale de MUC16 semble jouer un rôle important dans la transformation et dans la tumorigénèse, ce qui suggère que MUC16 posséderait des propriétés oncogéniques. Les rôles oncogéniques de MUC1 et MUC4 semblent être attribuables à la partie cytoplasmique de la protéine, or la structure de la partie C-terminale de MUC16 diffère de ces mucines. Il est donc possible que les mécanismes entraînant la transformation des cellules différeraient des mucines MUC1 et MUC4.

34.7 MUC16-CTD semble stimuler la prolifération via la phase G1.

Pour comprendre par quel mécanisme moléculaire MUC16-CTD augmente la prolifération des cellules NIH3T3 *in vitro* et *in vivo*, nous avons tout d'abord évalué le niveau protéique de plusieurs protéines par Immunobuvardage (Figure 21). Nous avons évalué les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, y compris ERK1/2, Akt, cycline D1, cycline D2, cycline E et cycline A.

Les résultats obtenus suggèrent que la partie C-terminale de MUC16 augmente la prolifération des NIH3T3. Ceci pourrait être via la phase G1 puisque nous avons observé une augmentation de la phosphorylation ERK1/2, des niveaux de la cycline D2 et E2. Ces trois protéines ont pour rôle de favoriser la prolifération cellulaire, et ce, via la phase G1 du cycle cellulaire. La partie C-terminale de MUC16 pourrait également favoriser la prolifération via l'inhibition des gènes régulant la phase S puisque nous avons observé une diminution de la cycline A responsable pour la rentrée en phase S des cellules.

De plus, nous avons constaté l'apparition de la forme plus courte de la cycline E2 dans les deux clones indépendants, alors qu'elle est absente dans les populations contrôles. Dans la littérature, il a été démontré que la forme plus courte de la cycline E2 est surexprimée dans le cancer ovarien et absente chez les cellules normales (Bedrosian I *et al.*, 2004).

35. La lignée cellulaire non-immortalisée et non-transformée OSE

Suite aux résultats obtenus avec la lignée NIH3T3, il a été décidé d'infecter des OSE, des cellules de la surface épithéliales de l'ovaire afin de déterminer si MUC16-CTD est en mesure d'entraîner la transformation et l'immortalisation de ces cellules. Une très bonne efficacité d'infection a été observée chez les différentes cellules OSE à partir des populations GFP (Figure 22). Des expériences de validation pour les populations OVNT221 et OVNT321 ont ensuite été effectuées. La validation des cellules OVNT225 s'est avérée impossible à cause de l'entrée rapide des cellules en sénescence. Chez les OVNT321, une entrée plus tardive a permis d'évaluer en RT-PCR la construction de MUC16-CTD (Figure 23) et pour les OVNT221, on a pu évaluer en RT-PCR, ainsi qu'en immunofluorescence, les constructions MUC16-CTD et MUC16-TMU (Figure 23-24).

35.1 La partie C-terminale de MUC16 n'est pas suffisante pour immortaliser et transformer les OSE

En culture, les cellules ayant atteint un plateau de sénescence présentent de nombreuses caractéristiques phénotypiques spécifiques permettant de les reconnaître aisément. Les cellules OSE ont présenté une augmentation de leurs tailles, un étalement sur leur support et une augmentation de la taille de leurs noyaux, accompagnée d'une polynucléation. Ainsi, l'entrée en sénescence des différentes populations d'OSE a empêché une analyse des cellules à travers les différentes expériences de transformation. Cependant, des observations ont été effectuées lors de la culture des populations. Aucune modification de morphologie n'a été notée (Figure 24). Aussi, aucune différence de vitesse de croissance et d'inhibition de contact des cellules n'a pas été observée.

Les résultats obtenus avec les OSE indiquent que la partie C-terminale n'est pas suffisante pour induire la transformation et l'immortalisation de ces cellules. Il est possible que d'autres modifications cellulaires soient nécessaires pour que la partie C-terminale puisse transformer les

cellules non-immortalisées. Il est connu dans la littérature que l'immortalisation des cellules peut être entraînée par la combinaison de plusieurs oncogènes. En effet, il a été démontré que le facteur de transcription Kruppel (KLF-8) serait un oncogène faible et coopérerait avec c-myc pour transformer et immortaliser (par SV40 et hTERT) les cellules OSE (Lu et *al.*, 2014). Il serait donc intéressant de déterminer si MUC16-CTD pourrait transformer et immortaliser les OSE en combinaison avec d'autres oncogènes comme c-myc.

36. La lignée cellulaire immortalisée non-transformée OVNT-95-hTERT

L'immortalité des OVNT95 hTERT a permis d'effectuer des expériences de transformation et d'évaluer le rôle que pourrait jouer la partie C-terminale de MUC16 dans la transformation des cellules, sur les différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité et l'expression des protéines membranaires et du cytosquelette.

36.1 MUC16-CTD induit un changement de morphologie

Suite à la validation de l'expression de MUC16-CTD dans les clones, les cellules ont été régulièrement observées au microscope afin de détecter des changements morphologiques. On observe un changement au niveau des deux clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2 (Figure 30). Les cellules semblent présenter une morphologie plus épithéliale alors que les populations contrôles présente plutôt une morphologie mésenchymateuse. Ce qui serait prévu, puisque MUC16 est décrit comme un marqueur épithélial (Jacob et Bast, 1989; Wong et Auersperg, 2003) et lorsque les OSE se transforment en cellules cancéreuses, les caractéristiques épithéliales sont favorisées. De façon surprenante cependant il n'y a pas de différence d'expression avec les marqueurs épithéliaux.

Plusieurs expériences afin d'évaluer la transformation des OVNT95 hTERT ont été effectuées après validation des clones indépendants.

36.2 MUC16-CTD favorise la perte d'inhibition de contact

Afin d'évaluer les effets de MUC16-CTD sur l'inhibition de contact, une expérience de formation de foyer post-confluence a été effectuée. Les résultats ont démontré que la présence de MUC16-CTD dans les OSE immortalisées favorisait la formation de foyer. Un nombre significativement plus élevé a été formé par les deux clones indépendants OVNT95 hTERT-CTD1 et OVNT95 hTERT-CTD2, comparativement aux populations contrôle OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU (Figure 31). La diminution de l'inhibition de contact observée chez les clones indépendants pourrait indiquer que MUC16-CTD augmente l'insensibilité des cellules à différents signaux inhibiteurs de croissance.

36.3 MUC16-CTD stimule la prolifération

Une des expériences afin d'évaluer la capacité des cellules à être autosuffisantes face aux signaux de croissance est de déterminer si les cellules peuvent proliférer dans un milieu appauvri en sérum. Les résultats suggèrent que la partie C-terminale de MUC16 est suffisante pour stimuler la prolifération et pourrait conférer aux cellules une certaine indépendance à différents signaux de croissance. Il est également possible que MUC16-CTD rende les cellules insensibles aux différents signaux qui cherchent normalement à contrôler et à inhiber leur croissance. Par exemple, il est possible que MUC16-CTD interagisse avec des récepteurs tyrosine kinase ou d'autres partenaires moléculaires pour entraîner également l'activation de différentes voies pour moduler la croissance cellulaire. Tel que discuté avec les résultats obtenus avec les NIH3T3, il est possible que MUC16-CTD interagisse avec des récepteurs tyrosine kinase ou d'autres partenaires moléculaires pour entraîner l'activation des voies ERK et Akt pour moduler la croissance cellulaire. Cependant, puisque MUC16 est dépourvue d'un motif de liaison aux RTK, il n'est pas clair si la signalisation induite par MUC16 est affectée par les RTK. En effet, l'expression stable du domaine C-terminal MUC16 dans les cellules SKOV3 n'a pas modifié

l'expression ou la phosphorylation de l'EGFR (Thériault *et al.*, 2011). Bien que ces observations n'excluent pas l'implication des récepteurs à activité tyrosine kinase, d'autres partenaires sont probablement nécessaires pour moduler la croissance des cellules.

36.4 MUC16-CTD favorise la capacité de croissance en absence d'ancrage

Une expérience en agar mou a été effectuée afin d'évaluer la capacité des cellules à croître sans ancrage. Les résultats ont démontré que la présence de MUC16-CTD dans les OVNT95 hTERT favorisait la formation de colonies en Agar mou. Un nombre significativement plus élevé de colonies a été formé par les deux clones indépendants comparativement aux populations contrôles OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU (Figure 33) qui n'en ont formé aucun. Ainsi, la présence de la partie C-terminale de MUC16 favorise la croissance en absence d'ancrage. Ceci pourrait indiquer encore une fois que MUC16-CTD favorise ou confère une certaine indépendance à différents signaux de croissance.

Plusieurs facteurs de croissance induisent la phosphorylation des résidus tyrosine sur la queue cytoplasmique de la mucine MUC1 qui entraîne l'activation de certaines voies de signalisation (Ren *et al.*, 2006). Cette phosphorylation augmente en outre la liaison de MUC1 à la β -caténine et induit la co-translocation de la partie C-terminale de MUC1 et la β -caténine dans le noyau (Ren *et al.*, 2006). Lorsque la β -caténine se retrouve dans le noyau elle s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF, modulant ainsi leur activité et activant (ou inactivant) l'expression d'un grand nombre de gènes cibles qui promouvoit la tumorigénicité. Il est donc possible que MUC16-CTD interagissent avec la β -caténine et active la voie de Wnt. Or, les structures entre MUC1 et MUC16 diffèrent et la queue cytoplasmique de MUC16 ne possède pas les sites de liaison spécifique à la β -caténine comme MUC1 il n'est donc pas certain que MUC16 pourrait jouer un rôle similaire à MUC1.

Ainsi, les résultats obtenus pourraient suggérer que MUC16-CTD entraîne une résistance à l'anoïkose et par conséquent pourrait favoriser indirectement la formation de métastases. Or, cette hypothèse reste à confirmer.

36.5 MUC16-CTD favorise la formation de sphéroïdes

Une expérience visant à vérifier l'habilité des différentes populations à former des sphéroïdes a été effectuée. Toutes les populations ont été en mesure de former des sphéroïdes après 48 h, mais ceux obtenus avec les clones indépendants étaient beaucoup plus gros et plus denses (Figure 34). En effet, les sphéroïdes obtenus avec les populations contrôles se dissociaient facilement avec une simple agitation alors que ceux des clones restaient très compacts, ce qui correspond aux caractéristiques des sphéroïdes formés par des lignées cancéreuses de l'ovaire. Les sphéroïdes formés par ces lignées vont être capables de proliférer pendant environ 10 jours, vont être caractérisés par une augmentation graduelle de leur taille et vont être difficiles à se défaire (SHIELD *et al.*, 2007), ce que nous avons observé avec les clones indépendants. Ces résultats suggèrent donc que l'expression de MUC16-CTD favoriserait possiblement la survie, la prolifération ou la force des interactions cellules-cellules. De plus, il serait possible que MUC16-CTD joue un rôle dans la dissémination du cancer de l'ovaire et du processus métastatique, puisque les sphéroïdes sont impliqués dans ce processus.

Dans les cellules épithéliales, le recrutement de la E-cadhérine et de l'actine du cytosquelette dans les régions de contacts intracellulaire est essentiel pour la stabilisation des jonctions adhérentes (Yonemura *et al.*, 1995) Les cadhérines mènent à l'adhésion mécanique cellule-cellule et régulent la morphologie cellulaire, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (Gumbiner *et al.*, 2000).

On observe souvent une diminution de l'expression de la N-cadhérine et l'apparition d'une expression de la E-cadhérine chez les cancers épithéliaux de l'ovaire et chez les cellules métaplasiques (Wong *et al.*, 1999). La destruction des contacts cellule-cellule résultant de la diminution de l'expression de la E-cadhérine joue un rôle important dans la transition EMT. Il est possible que la queue cytoplasmique de MUC16 interagisse avec la E-cadhérine, la β -caténine ou autres composantes du cytosquelette et induit leur relocalisation.

36.6 Analyse de l'expression des protéines adhésion

Afin de faire suite au changement de morphologie observé chez les clones indépendants NIH3T3 et OVNT95 hTERT, nous avons décidé d'étudier le patron d'expression de différentes protéines d'adhésion ainsi que le patron d'expression de différentes protéines du cytosquelette. Des IF et des Immunobuvardage de type Western ont été effectués pour visualiser leur localisation et leur niveau d'expression. Chez les OSE, l'expression et la concentration de ces protéines permettant également de détecter une évolution des cellules vers un état métaplasique (Auersperg *et al.*, 2011).

36.6.1 L'expression de la N-cadhérine et de la E-cadhérine n'est pas influencée par MUC16-CTD

Tel que décrit dans la littérature, on observe souvent une diminution de l'expression de la N-cadhérine et l'apparition d'une expression de la E-cadhérine chez les cancers épithéliaux de l'ovaire et chez les cellules métaplasiques (Wong *et al.*, 1999).

On a observé par IF que la N-cadhérine était exprimée chez les différentes populations OVNT95 hTERT (Figure 36). On a également observé une légère diminution de l'intensité de marquage de la protéine chez le clone OVNT95 hTERT-CTD2. Cependant, cette différence était peu notable par Western. On a plutôt observé une augmentation de la N-cadhérine en Western dans la population OVNT95 hTERT-TMU et le clone OVNT95 hTERT-CTD1, ce qui ne concorde pas avec les

résultats obtenus en IF. Ainsi, il ne semble pas avoir une différence importante des niveaux de N-cadhérine dans les différentes populations. Il est probable que la plus faible expression de N-cadhérine observée chez les clones CTD2 par IF ait en fait été reliée à la morphologie plus épithéliale du clone, alors que l'expression augmentée de la population TMU pourrait être attribuée à sa morphologie plus mésenchymateuse.

Parallèlement, nous avons évalué l'expression de la E-cadhérine dans les différentes populations. Nous avons observé une apparition de l'expression de la protéine en IF dans les OVNT95 hTERT-TMU et dans les deux clones. Cependant en Western nous n'avons détecté aucune expression de la protéine. Il est possible que MUC16 influence l'expression de la E-cadhérine, mais ne serait pas seulement attribuable à la partie cytoplasmique de MUC16. Il serait intéressant de refaire l'expérience et d'observer par microscopie électronique les jonctions cellulaires pour évaluer s'il y a des changements parmi les différentes populations.

L'apparition de la E-cadhérine dans les deux clones indépendants appuie les observations faites plus tôt que la partie C-terminale de MUC16 induit la transformation des OSE immortalisées et favorise une morphologie épithéliale. Cependant, l'expression de la E-cadhérine dans la population OVNT95 hTERT-TMU ainsi que l'absence de modification de l'expression de la N-cadhérine ne nous permet pas de conclure dans ce sens.

36.6.2 L'expression de la β -caténine n'est pas influencée par MUC16-CTD

L'expression de la β -caténine a par la suite été évaluée. Lorsque la protéine est exprimée à la membrane, la β -caténine est impliquée dans le maintien des jonctions adhérentes. Lorsque la β -caténine est exprimée selon un patron cytoplasmique et/ou nucléaire indique généralement que la voie de signalisation de Wnt/wingless est activée (DIETRICH, 2002). L'activation de la voie de Wnt permet indirectement d'activer la transcription de certaines protéines impliquées dans la

prolifération cellulaire telle, que c-myc et la cycline D1 (RASK *et al.*, 2003). Des dérèglements du patron d'expression de la β -caténine impliquent souvent l'activation ou la dérégulation de la voie Wnt. La voie Wnt est fréquemment dérégulée dans les cancers de l'ovaire (RASK *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a une augmentation de l'expression de la β -caténine dans la population OVNT95 hTERT-TMU et une augmentation plus élevée dans les deux clones indépendants. L'expression dans la population OVNT95 hTERT semble être exclusive à la membrane qui correspond à l'expression dans la littérature de la β -caténine dans les OSE (RASK *et al.*, 2003). Le patron d'expression observé est également similaire à celui de la E-cadhérine. Il a été démontré que MUC16 interagit avec la β -caténine et avec la E-cadhérine (Comamala *et al.*, 2011) et il est connu dans la littérature que la β -caténine et la E-cadhérine interagissent ensemble au niveau des jonctions cellulaires.

De plus, dans les deux clones indépendants, la localisation de β -caténine semble également être cytoplasmique et même nucléaire, ce qui est souvent le cas dans le cancer de l'ovaire. Ceci laisse supposer que la partie C-terminale de MUC16 puisse jouer un rôle important dans la relocalisation de la protéine. Il a été démontré que la queue cytoplasmique de MUC1 lie spécifiquement la β -caténine et co-localise au noyau; ce qui entraîne l'activation de plusieurs gènes régulés par la voie Wnt. Jusqu'à présent, il n'y a aucune preuve que la queue cytoplasmique de MUC16 lie et co-localise avec la β -caténine dans le cytoplasme ou vers le noyau.

Cependant, comme avec l'expression de la E-cadhérine, on ne retrouva pas le même patron qu'observé en IF, en Western. Il serait intéressant d'effectuer un IF de façon cofocale pour bien déterminer la localisation de β -caténine.

36.7 Analyse de l'expression des protéines adhésions

On observe souvent des changements au niveau du patron d'expression de protéines du cytosquelette lors de transformation cellulaire ou lors d'une EMT. Donc, le patron d'expression de différentes protéines du cytosquelette a été analysé par IF.

36.7.1 MUC16-CTD favorise une EMT chez les populations OVNT95 hTERT

La littérature indique que les OSE expriment généralement les cytokératines 8 et 18, qui sont des marqueurs épithéliaux (AUESPERG *et al.*, 2001). Cependant lors qu'une EMT se produit, leur expression tend à diminuer. Les cytokératines 8 et 18 ont été détectées chez les différentes populations. Cependant, on observe une diminution de cette expression dans les deux clones indépendants CTD1 et CTD2, suggérant que les clones aient subi une EMT.

L'expression de la vimentine chez toutes les populations OVNT95 hTERT semble également confirmer l'état mésenchymateux des cellules et la EMT chez les clones indépendants. La vimentine est un marqueur mésenchymateux et normalement exprimée chez les OSE. Or la présence de vimentine et l'absence des cytokératines chez les clones semblent indiquer une EMT plus complète que celle des OSE normalement retrouvées à la surface des ovaires puisque les OSE expriment, généralement, à la fois les cytokératines et la vimentine. Une expression exclusive de la vimentine chez les clones OVNT95 hTERT-CTD pourrait donc indiquer que les cellules sont devenues plus mésenchymateuses (AUESPERG *et al.*, 2001).

Le patron d'expression des différentes protéines du cytosquelette étudiées ne semble pas appuyer la morphologie observée chez les clones qui présentaient une morphologie beaucoup plus épithéliale. Or, cela semble appuyer l'effet possible de MUC16-CTD sur la migration. Puisqu'avec l'expérience de blessure sur monocouche, MUC16-CTD semblait favoriser la migration chez les

cellules OVNT95 hTERT (Figure 35), il est possible que la partie C-terminale de MUC16 favorise l'EMT chez les cellules OSE immortalisées.

36.7.2 Le patron d'expression de la F-actine

L'actine est une protéine qui influence grandement la morphologie cellulaire, la façon dont l'actine est organisée dans une cellule va influencer les fonctions et le phénotype de celle-ci. En effet, la forme de la cellule résulte de l'organisation de trois types de filaments formant son cytosquelette: les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Le réseau de microfilaments d'actine est directement responsable des mouvements cellulaires grâce à ses propriétés de polymérisation. La F-actine forme un réseau dense sous la membrane plasmique, mais elle est aussi présente sous la forme de câbles très structurés appelés câbles de stress, qui traversent le cytoplasme et s'ancrent à la membrane plasmique (ROVERTS *et al.*, 2005). L'actine va être impliquée au niveau de plusieurs différentes fonctions, dont la migration, l'adhésion et la signalisation (CHAUHAU *et al.*, 2009).

Excepté une légère différence pour le clone OVNT95 hTERT-CTD1, la détection de la F-actine chez les cellules n'a démontré aucune différence entre les différentes populations OVNT95 hTERT. Chez les cellules, l'actine semblait organisée en fibre de stress (Figure 44). Les fibres de stress apparaissent sous forme de filaments qui parcourent le cytoplasme de la cellule, sauf pour le clone OVNT95 hTERT-CTD1 où les fibres de stress semblent être concentrée au niveau de la membrane. Chez les OSE, une organisation de la F-actine en fibre de stress est associée à un état cellulaire normal. Lors d'une transformation graduelle des OSE, les fibres de stress deviennent plus concentrées aux sites d'interaction avec d'autres cellules (ROVERTS *et al.*, 2005; CHAUHAU *et al.*, 2009). Ainsi, les résultats indiquent que les populations OVNT95 hTERT-EV et OVNT95 hTERT-TMU ont gardé des caractéristiques relativement normales malgré leur

immortalisation par la télomérase. Le patron d'expression du clone OVNT95 hTERT-CTD1 semble illustrer une transition vers un état métaplasique, ce qui irait avec les résultats obtenus précédemment, qui suggère que MUC16-CTD favorise la transformation des OSE immortalisées. Cependant, on se serait attendu d'obtenir le même patron d'expression chez le clone OVNT95 hTERT-CTD2, ce qui n'a pas été le cas.

37. Micropuce

Parmi les gènes qui seront exprimés de manière différentielle (> 1,5 fois la différence), nous avons sélectionné ceux impliqués dans le cycle cellulaire, la croissance, la prolifération cellulaire, le mouvement cellulaire et la transformation, ainsi que des gènes qui ont déjà été associés au développement et à la progression du cancer ovarien.

Parmi ceux-là, on retrouve le gène TGF β 1 comme étant le plus surexprimé dans les clones indépendants, comparativement à la population contrôle OVNT95 hTERT-TMU. TGF β 1 est un facteur de croissance de transformation (TGF de l'anglais *transforming growth factor*). C'est une cytokine polypeptidique qui joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Gold LI, 1999). Dans le cancer, TGF β joue un rôle de régulateur positif ou négatif. Au début, dans les stades précoces, il peut jouer le rôle de suppresseur de tumeur, mais dans la progression maligne, TGF β va plutôt promouvoir la croissance tumorale et le processus métastatique (Gold LI, 1999). Il est connu dans la littérature que TGF β est surexprimé dans le cancer de l'ovaire (Gordinier *et al.*, 1999; Higashi *et al.*, 2001) et augmente l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes (Rodriguez GC *et al.*, 2001).

On constate également l'augmentation de l'expression de Wnt5a, qui est un membre non canonique Wnt. Dans plusieurs tissus, son expression est altérée et associée à différents cancers, notamment le cancer du sein, le mélanome, le cancer du côlon, et le glioblastome (Ford CE *et al.*, 2009). Des

niveaux plus élevés d'ARN messager de Wnt5a (ARNm) ont également été détectés chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (Matei D *et al.*, 2002). En accord avec la détection de l'ARNm de Wnt5a, l'expression protéique dans le cancer épithélial de l'ovaire est significativement plus élevée que celles trouvées dans les tumeurs épithéliales bénignes et des ovaires normaux. Wnt5a est également un facteur prédictif de mauvais pronostic du cancer de l'ovaire (Badiglian Filho L *et al.*, 2009). Une autre étude a également montré que l'expression accrue du gène Wnt5a entraînait un phénotype plus résistant à la chimiothérapie chez les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (Varma RR *et al.*, 2005). Or, une enquête plus approfondie est nécessaire pour élucider les mécanismes précis de l'activation Wnt5a dans le cancer ovarien (Peng C *et al.*, 2011).

Nous avons également observé l'augmentation de CFH qui est une glycoprotéine soluble circulant dans le plasma humain, ses principales fonctions sont de réguler la voie alternative du système du complément ainsi que veiller à ce que le système du complément soit dirigé vers les agents pathogènes ou d'autres matériaux dangereux afin de ne pas endommager les tissus de l'hôte. Des études montrent deux mécanismes de résistance du complément dans les cellules tumorales de l'ovaire : (i) la production du facteur H et la protéine analogue facteur H et (ii) la sécrétion de la protéine soluble de cofacteur membranaire. Ainsi, la résistance au complément pourrait entraîner la protection des cellules tumorales ovariennes contre une attaque immunitaire tumorale et, par exemple, constituer un obstacle pour la thérapie avec des anticorps monoclonaux. (Junnikkala *et al.*, 2002)

De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène MET. Une forte expression de la protéine MET indique une plus grande susceptibilité à la transformation (ZHOU *et al.*, 2008). La voie de signalisation HGF/MET est impliquée dans de nombreux cancers. Au niveau du cancer

de l'ovaire, cette voie augmente la prolifération, la migration et favorise l'apparition de métastases (ZHOU *et al.*, 2008).

Il y a plusieurs gènes diminués, dont ADRA1B et S100A4, qui sont des protéines qui activent l'apoptose et entraîne la mort cellulaire. Il est possible que les clones indépendants soient plus résistants à l'apoptose. Il serait intéressant de déterminer si MUC16-CTD peut entraîner la résistance à l'apoptose chez les OSE immortalisées.

Également, on retrouve une diminution de GRB10, qui est un inhibiteur de la voie PI3K et qui peut également réguler négativement la voie de signalisation de l'insuline (Yonghao *et al.*, 2011).

Finalement, on a également observé la diminution de CDKN1C qui est un inhibiteur du cycle cellulaire. Il est possible que MUC16-CTD entraîne une activation accrue du cycle cellulaire, puisque les résultats préliminaires obtenus avec les NIH3T3 où MUC16-CTD semblait promouvoir la prolifération via la phase G1 du cycle cellulaire.

Beaucoup d'autres gènes augmentés et diminués doivent être validés par qPCR et devront être sélectionnés pour une analyse plus complète. Néanmoins, ces résultats préliminaires sont prometteurs et sont une bonne piste afin de déterminer quelques voies de signalisation potentiellement influencées par MUC16 qui pourraient contribuer à la progression tumorale du cancer ovarien.

Conclusion

En conclusion, pour évaluer le potentiel oncogénique de MUC16, des clones stables de NIH3T3 et d'OSE-immortalisées qui expriment la partie C-terminale de MUC16 ont été obtenus. Des clones indépendants ont été sélectionnés (CTD1 et CTD2) et l'expression de MUC16-CTD a été validée par immunobuvardage, PCR et immunofluorescence. Les NIH3T3 et OSE-hTERT exprimant MUC16-CTD ont induit la perte d'inhibition de contact des cellules par la formation de foyers de transformations en conditions adhérees. La diminution de l'inhibition de contact pourrait indiquer que le domaine C-terminale de MUC16 augmente l'insensibilité des cellules à différents signaux inhibiteurs de croissance. On a aussi observé une augmentation de la prolifération chez les NIH3T3 et OSE-hTERT exprimant MUC16-CTD, ceci en condition normale de sérum (10 %) et à faible concentration de sérum (1 %). Ce phénotype acquis a été associé à des protéines de régulation du cycle cellulaire d'expression altérée dans les NIH3T3, soit une augmentation de la phase G1 et l'augmentation de la forme phosphorylée de ERK.

Également, nous avons observé que MUC16-CTD induit la formation de colonies en agar mou. Ces résultats suggèrent que la portion CTD favorise ou confère une certaine indépendance des cellules à différents signaux de croissance. Finalement, nous avons observé la formation de tumeurs sous-cutanées dans les souris NUDE, ce qui confirme que MUC16-CTD contribue à la tumorigénicité. Les résultats obtenus suggèrent que MUC16-CTD induit la transformation des cellules et est capable d'agir comme un oncogène.

Fait intéressant, les phénotypes acquis de transformation induits par la partie C-terminale de MUC16 sont assez similaires à ceux rapportés avec l'expression du domaine C-terminale des mucines MUC1 et MUC4 (Li Y et al., 2003; Bafna S *et al.*, 2008). Il a été bien démontré que

MUC1 et MUC4 favorisent la croissance cellulaire (Sato S *et al.*, 2000; Komatsu M *et al.*, 2001) et possèdent des propriétés oncogéniques (Li Y *et al.*, 2003). Bien que la fonction oncogénique de MUC16, MUC1 et MUC4 semble être localisée dans la partie C-terminale (CT), MUC16 CT n'a aucune homologie avec MUC1 CT et MUC4 CT, ce qui suggère que les mécanismes de transformation diffèrent entre MUC16 et MUC1 et MUC4. Il est possible que MUC16 via sa queue cytoplasmique puisse recruter des protéines intracellulaires différentes des autres mucines et entraîner l'activation de différentes voies signalisations, qui par la suite entraîneraient la transformation des cellules.

Finalement, nous avons également observé que MUC16-CTD n'était pas capable à lui seul d'entraîner la transformation et l'immortalisation des OSE. Il est possible que les effets de la partie C-terminale de MUC16 passent par une co-expression avec d'autres oncogènes. En effet, la majorité des oncogènes n'est pas en mesure de transformer et immortaliser les cellules humaines seules.

En résumé, nos données fournissent pour la première fois une preuve d'un rôle potentiel de MUC16 dans la transformation cellulaire et cette influence serait attribuable en partie à la portion cytoplasmique de MUC16. Nous avons montré que MUC16-CTD entraînait la transformation des NIH3T3 et des OSE immortalisées.

Plusieurs validations supplémentaires seront nécessaires afin de confirmer que MUC16 possède des propriétés oncogéniques et également afin de déterminer par quel mécanisme moléculaire elle induit ces effets. Nous croyons qu'il est important d'en connaître davantage, car MUC16 pourrait représenter une cible potentielle très intéressante pour prévenir le développement du cancer de l'ovaire.

Perspectives

Les résultats obtenus dans ce mémoire suggèrent fortement que MUC16 pourrait fonctionner comme un oncogène et peut contribuer à la transformation des cellules OSE.

Il serait intéressant d'identifier les protéines qui pourraient interagir avec la partie C-terminale de MUC16 et qui contribueraient à sa fonction oncogénique. Nous croyons que la spécificité fonctionnelle de MUC16 en ce qui concerne le potentiel oncogène se produirait à travers le recrutement de protéines intracellulaires via sa queue cytoplasmique. Cette hypothèse est donnée par l'observation que MUC16-CTD est suffisante pour induire la transformation des cellules NIH3T3 et des OSE immortalisées mais pas la construction MUC16-TMU qui elle, est dépourvue que de la queue cytoplasmique de MUC16. Des résultats préliminaires au laboratoire ont identifié quelques protéines potentielles dont Ras-associated protein 1 (liaison Rab1), RNF5, FAK (données non publiées), la E-cadhérine et la β -caténine (Comamala *et al.*, 2011). Il serait donc intéressant de valider l'interaction entre MUC16-CTD et définir la localisation de l'interaction sur MUC16 de ces protéines et par conséquent, déterminer si le rôle de MUC16-CTD dans la tumorigenèse est modifié par la modulation de l'expression de ces protéines.

Dans la littérature, peu de choses sont connues sur les voies de signalisation activées par MUC16. Il serait essentiel de mieux comprendre au niveau moléculaire comment MUC16 induit les effets sur la pathogenèse du cancer ovarien et la transformation possible des cellules. Les voies de signalisation pourraient être des biomarqueurs potentiels ou des nouvelles cibles thérapeutiques. Le profil d'expression génétique obtenu dans ce mémoire est une bonne approche pour évaluer les capacités de signalisation de la partie C-terminale de MUC16.

Basée sur l'analyse des données de puces à ADN, il serait intéressant de sélectionner un nombre limité de gènes MUC16-CTD induits ou réprimés pour l'analyse primaire en raison de leur rôle potentiel dans le développement et la progression de CO. On pourrait tout d'abord par qRT-PCR et par immunobuvardage valider les changements d'expression des gènes. La signification biologique des changements dans l'expression de protéines pourrait être également validée par le microréseau de tissus (TMA).

Les gènes candidats régulés à la hausse dans les OSE MUC16-CTD pourraient être clonés dans des vecteurs lentiviraux et exprimés de manière stable dans les cellules OSE. À l'inverse, les gènes qui sont régulés à la baisse pourraient être avec des knockdowns siRNA dans les cellules OSE. L'impact de l'expression ectopique des gènes ou des gènes knockdowns sur la prolifération cellulaire, sur la croissance en absence d'ancrage ou avec ancrage et la tumorigénèse pourraient par la suite être déterminés. Bien au-delà de ce projet, une fois que les changements moléculaires ont été identifiés et validés pour leur implication dans la tumorigénèse du cancer ovarien, les prochaines étapes seraient d'évaluer leur expression dans un panneau de cellules tumorales et de corréler leur expression avec le pronostic afin de déterminer s'ils représentent des marqueurs potentiels pour la survie. L'analyse des puces à ADN saura fournir des indices pour déterminer les gènes potentiellement impliqués dans l'initiation et le développement des tumeurs.

Finalement, nous avons observé que MUC16-CTD n'entraînait pas seule la transformation des OSE. Il est possible que MUC16-CTD ait besoin de coopérer avec d'autres oncogènes pour transformer et immortaliser ces cellules. Il serait intéressant de combiner MUC16-CTD avec c-myc ou Akt et d'évaluer les effets. Les protéines c-myc et Akt, sont souvent modifiées dans le

cancer épithélial de type séreux et contribue à la transformation des cellules OSE. De plus, leur régulation à la hausse favorise la tumorigénicité du cancer ovarien.

La migration est également une caractéristique importante de la tumorigénicité. Au niveau du cancer, la migration des cellules est souvent centrale à la formation de métastases. Elle permet aux cellules cancéreuses de quitter la tumeur primaire et s'implanter dans un nouvel endroit. Il aurait été intéressant de vérifier si MUC16-CTD pourrait entraîner une augmentation de la capacité de migration des cellules, une expérience de migration par blessure de monocouche et l'utilisation de Chambre de Boyden pourrait permettre de vérifier la migration cellulaire. Également, il aurait été intéressant de déterminer si MUC16-CTD augmente l'invasion.

Remerciements

Je souhaiterais remercier tout ceux et celles qui m'ont aidé lors de ma maîtrise à l'Université de Sherbrooke.

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Dr. Alain Piché, pour m'avoir offert la possibilité de joindre son laboratoire et pour m'avoir offert un projet si stimulant. Merci à Isabelle Matte pour son aide dans toutes les expériences de ce mémoire et de m'avoir encouragé à persister dans mes objectifs. J'ai développé de nouveaux outils intellectuels, une rigueur scientifique et un esprit critique en grande partie grâce à elle. Merci à Denis Lane pour son aide et pour répondre à mes millions de questions. Merci aux autres membres du laboratoire, aux anciens membres et aux stagiaires qui m'ont également aidée soit Benoît Pouliot, Dre. Claudine Rancourt, Catherine Thériault, Martine Migneault, Julie Beaudin, Marianne Boivin et Sylvain L'espérance. Merci aux membres du Département de biologie cellulaire et d'anatomie qui m'ont aidée pour les

expériences *in vivo* soit Dre. Nathalie Perrault, Stéphanie St-Jean, ainsi qu'à Jean-Philippe Babeu et Etienne Lemieux pour leur aide dans un projet connexe.

Merci à mes amis Rémy Lecours, Sarah Tremblay, Vincent Robert, Martin Prince, Carolyne Forgues, Valéry Bouchard, Adamy Roberge Desbiens et Olivier Lasnier pour m'avoir toujours encouragé.

Merci également à l'Université de Sherbrooke qui a en partie financé ma maîtrise et qui a rendu celle-ci possible ainsi que la Société de Recherche sur le Cancer et de l'Institut de recherche en santé du Canada pour le financement partiel de ma maîtrise. Je tiens aussi à remercier Dr. Benoît Paquette et Dre Nathalie Perreault d'avoir accepté le travail d'évaluer ce mémoire.

Finalement, un gros merci à ma famille pour leur soutien, mon père, mon petit frère, mon beau père et surtout un gros merci à ma mère Cécile Gaudreault qui a été ma plus grande fan.

J'ai passé des années inoubliables, Sherbrooke tu as été parfaite !

Annexes

P Giannakouros, I Matte , C Rancourt, A Piché (2014) Transformation of NIH3T3 mouse fibroblast cells by MUC16 mucin (CA125) is driven by its cytoplasmic tail, International journal of oncology, DOI: 10.3892/ijo.2014.2707.

P Giannakouros, M Comamala, I Matte, C Rancourt, A Piché (2015) MUC16 mucin (CA125) regulates the formation of multicellular aggregates by altering β -catenin signaling, American journal of cancer research, 5(1):219-30.

Références

Adams CL, Nelson WJ, Smith SJ (1996) Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. J Cell Biol 135:1899-1911.

Argueso P, Spurr-Michaud S, Russo CL, Tisdale A, Gipson IK (2003) MUC16 mucin is expressed by the human ocular surface epithelia and carries the H185 carbohydrate epitope. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:2487–2495.

Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. Endocr Rev: 22:255-288.

Akita K, Tanaka M, Tanida S, Mori Y, Toda M, Nakada H (2013) CA125/MUC16 interacts with Src family kinases, and over-expression of its C-terminal fragment in human epithelial cancer cells reduces cell-cell adhesion. Eur J Cell Biol: 92(8-9):257-63.

Badgwell D, Bast RC Jr (2007) Early detection of ovarian cancer. Dis Markers: 23:397–410.

Badiglian Filho L, Oshima CT, De Oliveira Lima F, *et al.* (2009) Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. Oncol Rep: 21:313-320.

Bafna S, Kaur S, Batra SK (2010) Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. Oncogene: 29(20):2893-904.

Bafna Sangeeta , Singh Ajay P , Moniaux Nicolas , D Eudy James , Meza L Jane , and Batra K (2008) MUC4, a multifunctional transmembrane glycoprotein, induces oncogenic transformation of NIH3T3 mouse fibroblast cells. Cancer Res: 68(22):9231–9238.

Barbolina MV, Burkhalter RJ, Stack MS (2011) Diverse mechanisms for activation of Wnt signalling in the ovarian tumour microenvironment. Biochem J: 437(1):1-12.

- Bast RC Jr, Hennessey B, Mills GB (2009) The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*: 9:415-428.
- Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC (1981) Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest*: 68:1331-1337.
- Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC (1983) A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Eng J Med*: 309:883-887.
- Belisle JA, Gubbels JA, Raphael CA, Migneault M, Rancourt C, Connor JP, Patankar MS (2007) Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). *Immunology*: 122:418-429.
- Belisle JA, Horibata S, Jennifer GA, Petrie S, Kapur A, André S, Gabius HJ, Rancourt C, Connor J, Paulson JC, Patankar MS (2010) Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Mol Cancer*: 9:118.
- Berns EM, Bowtell DD (2012) The changing view of high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res*: 72(11):2701-4.
- Blalock TD, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Heimer SR, Gilmore MS, Ramesh V, Gipson IK (2007) Functions of MUC16 in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*: 48:4509-18.
- Boivin M, Lane D, Piché A, Rancourt C (2009) CA125 (MUC16) tumor antigen selectively modulates the sensitivity of ovarian cancer cells to genotoxic drug-induced apoptosis. *Gynecol Oncol*: 115:407-413.
- Carraway KL 3rd, Funes M, Workman HC, Sweeney C (2007) Contribution of membrane mucins to tumor progression through modulation of cellular growth signaling pathways. *Curr Top Dev Biol*: 78:1-22.
- Chang K, Pastan I (1996) Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*: 93:136-140.
- Chen V W, Ruiz B, Killeen JL, Côté TR, Wu XC, Correa CN (2003) Pathology and classification of ovarian Tumors. *Cancer*: 97(10 Suppl)p.2631-42, doi:10.1002/chor.11345.
- Choi R, Kathleen and Ie-Ming Shih (2009) Ovarian Cancer. *Annu. Rev Pathol Mech Dis*: 4:287–313.
- Colombo N, Van Gorp T, Parma G, Amant F, Gatta G, Sessa C, Vergote I (2006) Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*: 60:159-179.

Comamala M, Pinard M, Thériault C, Matte I, Albert A, Boivin M, Beaudin J, Piché A, Rancourt C (2011) Downregulation of cell surface CA125/MUC16 induces epithelial-to-mesenchymal transition and restores EGFR signaling in NIH:OVCAR3 ovarian carcinoma cells. *Br J Cancer*: 104:989-999.

Davis HM, Zurawski VR Jr, Bast RC Jr, Klug TL (1986) Characterization of the CA 125 antigen associated with human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res*: 46:6143-6148.

Davies JR, Kirkham S, Svitacheva N, Thornton DJ, Carlstedt I (2007) MUC16 is produced in tracheal surface epithelium and submucosal glands and is present in secretions from normal human airway and cultured bronchial epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*: 39:1943-1954.

de la Cuesta R, Maestro ML, Solana J, Vidart JA, Escudero M, Iglesias E, Valor R (1999) Tissue quantification of CA 125 in epithelial ovarian cancer. *Int J Biol Markers*: 14:106–114.

De Vita, Hellman & Rosenberg's (2000) *Cancer Principles and practice of Oncology*. pg:1568-1594. ISBN-13:987-0-7817-7207-5.

Dharma Rao T, Park KJ, Smith-Jones P, Iasonos A, Linkov I, Soslow RA, Spriggs DR (2010) Novel Monoclonal Antibodies Against the Proximal (Carboxy-Terminal) Portions of MUC16. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*: 18:462-472

Dodier P, Piché A (2006) Bcl-X(L) is functionally non-equivalent for the regulation of growth and survival in human ovarian cancer cells. *Gynecol Onco*: 100:254-263.

Fendrick JL, Konishi I, Geary SM, Parmley TH, Quirk JG Jr, O'Brien TJ (1997) CA125 phosphorylation is associated with its secretion from the WISH human amnion cell line. *Tumour Biol*: 18:278-289.

Ford CE, Ekstrom EJ, Andersson T (2009) Wnt-5a signaling restores tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*: 106:3919-3924.

Gatcliffe TA, Monk BJ, Planutis K, Holcombe RF (2008) Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *Int J Gynecol Cancer*: 18(5):954-62.

Gold LI (1999) The role for transforming growth factor-beta (TGF-Beta) in human cancer. *Crit Rev Oncoq.*: 10(4):303-60.

Gordinier ME, Zhang HZ, Patenia R, Nash MA, Atkinson EN, Katz RL, Levy LB, Platsoucas CD, Freedman RS (1999) Quantitative analysis of transforming growth factor β 1 and 2 in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*: 5:2498-505.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsihchlis PN, Larue L (2003) The protein kinase Akt induces epithelial-mesenchymal transition and

promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*: 63:2172-2178.

Gronowitz E, Pitkanen S, Kjellmer I, Heikinheimo M, Strandvik B (2003) Association between serum oncofetal antigens CA 19-9 and CA 125 and clinical status in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr*: 92:1267-1271.

Gubbels JA, Belisle J, Onda M, Rancourt C, Migneault M, Ho M, Bera TK, Connor J, Sathyanarayana BK, Lee B, Pastan I, Patankar MS (2006) Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer*: 5:50.

Gubbels JA, Felder M, Horibata S, Belisle JA, Kapur A, Holden H, Petrie S, Migneault M, Rancourt C, Connor JP, Patankar MS (2010) MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Mol Cancer*: 9:11.

Hall PA, McCluggage WG (2006) Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. *J Pathol*: 208(1):1-6.

Hattrup CL, Gendler SJ (2008) Structure and function of cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol*: 70:431-457.

Higashi T, Sasagawa T, Inoue M, Oka R, Shuangying L, Saijoh K (2000) Overexpression of latent transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) binding protein 1 (LTBP-1) in association with TGF-beta 1 in ovarian carcinoma. *Jpn J Cancer Res*: 92(5):506-15.

Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Kjaerbye-Thygesen A, Gayther S, Jacobs IJ, Hogdall CK (2007) CA125 expression pattern, prognosis and correlation with serum CA125 in ovarian tumor patients from the danish "MALOVA" ovarian cancer study. *Gynecol Oncol*: 104:508-515.

Hollingsworth MA, Swanson BJ (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface, *Nat Rev Cancer*: 4(1):45-60.

Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994) β -catenin mediates the interaction of the cadherincatenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*: 127:1375-1380.

Huang L, Chen D, Liu D, Yin L, Kharbanda S, Kufe D (2005) MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3 β mediated phosphorylation and degradation of β -catenin. *Cancer Res*: 65:10413-10422.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW (2007) Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*: 213:374-383.

Jäger K, Wu G, Sel S, Garreis F, Bräuer L, Paulsen FP (2007) MUC16 in the lacrimal apparatus. *Histochem Cell Biol*: 127:433–438.

Jepson S, Komatsu M, Haq B, Arango ME, Huang D, Carraway CA, Carraway KL (2002) MUC4/sialomucin complex, the intramembrane erbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27(kip), but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinaseB/Akt pathways. *Oncogene*: 21:7524-7532.

Jin P, Hardy S, Morgan DO (1998) Nuclear localization of cyclin B1 controls mitotic entry after DNA damage. *J Cell Biol*:141:875–885.

Jonckheere N, Skrypek N, Frénois F, Van Seuningen I (2013) Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function. *Biochimie*: 95(6):1077-86.

Junnikkala S, Hakulinen J, Jarva H (2002) Secretion of soluble complement inhibitors factor H and factor H-like protein (FHL-1) by ovarian tumour cells. *Br J Cancer*: 87:1119–1127.

Kabawat SE, Bast RC Jr, Bhan AK, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB (1983) Tissue distribution of a coelomic epithelium-related antigen recognized by the monoclonal antibody OC125. *Int J Gynecol Pathol*: 2:275–285.

Kaneko O, Gong L, Zhang J, Hansen JK, Hassan R, Lee B, Ho M (2009) A binding domain on mesothelin for CA125/MUC16. *J Biol Chem*: 284:3739-3749.

Kipps E, Tan DS, Kaye SB (2013) Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research, *Nat Rev Cancer*: 13(4):273-82.

Komatsu M, Jepson S, Arango ME, *et al.* (2001) MUC4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene*: 20: 461-470.

Kondo Keiichi, Kohno Nobuoki, Yokoyama Akihito, Hiwada Kunio (1998) Decreased MUC1 Expression Induces E-Cadherin-mediated Cell Adhesion of Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Res*: 58:2014-2019

Konishi I, Fendrick JL, Parmley TH, Quirk JG Jr, O'Brien TJ (1994) Epidermal growth factor enhances secretion of the ovarian tumor-associated cancer antigen CA125 from the human amnion WISH cell line. *J Soc Gynecol Invest*: 1:89-96.

Kufe W. Donald (2009) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature Reviews Cancer*: 874-885.

Kurman RJ, Shih IM (2010) The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*: 34:433-443.

Kui WN, Easton RL, Panico M, Sutton-Smith M, Morrison JC, Lattanzio FA, Morris HR, Clark GF, Dell A, Patankar MS (2003) Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *J Biol Chem*: 278:28619-28634.

Krivak TC, Tian C, Rose GS, Armstrong DK, Maxwell GL (2009) A Gynecologic Oncology Group Study of serum CA-125 levels in patients with stage III optimally debulked ovarian cancer treated with intraperitoneal compared to intravenous chemotherapy: an analysis of patients enrolled in GOG 172. *Gynecol Oncol*: 115:81–85.

Kwabi-Addo Bernard, Giri Dipak, Schmidt Karen, Podsypanina Katrina, Parsons Ramon, Greenberg Norman, Ittmann Michael (2001) Haploinsufficiency of the *Pten* tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression, *Proc Natl Acad Sci USA*: 98(20): 11563–11568

Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Das S, Chakraborty S, Haridas D, Mukhopadhyay P, Lele SM, Batra SK (2012) MUC16 induced rapid G2/M transition via interactions with JAK2 for increased proliferation and anti-apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*: 16;31(7):805-17.

Leung P, Adashi E (2003) *The Ovary*. Academic Press: ISBN: 978-0-12-444562-8

Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L Carraway KL 3rd, Kufe D (2001) The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *J Biol Chem*: 276:35239-35242.

Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D (2003) Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene. *Oncogene*: 22, 6107–6110.

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

Lloyd KO, Yin BW (2001) Synthesis and secretion of the ovarian cancer antigen CA 125 by the human cancer cell line NIH:OVCAR-3. *Tumour Biol*: 22:77-82.

Lu H, Wang X, Urvalek AM, Li T, Xie H, Yu L, Zhao J (2014) Transformation of human ovarian surface epithelial cells by Krüppel-like factor 8. *Oncogene*: 33(1):10-8

Matei D, Graeber TG, Baldwin RL, *et al.* (2002) Gene expression in epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene*: 21:6289-6298

Matte I, Lane D, Bachvarov D, Rancourt C, Piché A (2014) Role of malignant ascites on human mesothelial cells and their gene expression profiles. *BMC Cancer*: 14:288

Matte I, Lane D, Boivin M, Rancourt C, Piché A (2014) MUC16 mucin (CA125) attenuates TRAIL-induced apoptosis by decreasing TRAIL receptor R2 expression and increasing c-FLIP expression. *BMC Cancer*: 14:234

Maehama T, Dixon JE (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*: 273(22):13375-8.

Ménard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E (2003) Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene*: 22(42):6570-8

Montes Fernandez Ana, Gomez Garcia Jesus *et al.* (2012) Epidemiology and Etiology of ovarian cancer, Ovarian Cancer basic science perspective. 1-16, ISBN 978-953-307-812-0.

Moritani S, Ichihara S, Hasegawa M, Endo T, Oiwa M, Yoshikawa K, *et al.* (2008) Serous papillary adenocarcinoma of the female genital organs and invasive micropapillary carcinoma of the breast. Are WT1, CA125, and GCDFP-15 useful in differential diagnosis. *Hum Pathol*: 39:666–671.

Muller A, Patricia J, Vousden Karen H (2013) p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*: 15, 2–8.

Murdoch W, Mc Donnell A (2002) Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction*: 123:743-50

Naora H, Montell DJ (2005) Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer*: 5:355-366.

Nap M. Immunohistochemistry of CA125 (1998) Unusual expression in normal tissues, distribution in the human fetus and questions around its application in diagnostic pathology. *Int J Biol Markers*: 13:210–215.

Nemoto S, Finkel T (2002) Redox Regulation of Forkhead Proteins Through a *p66shc*-Dependent Signaling Pathway. *Science*: 295:2450-2452.

Nustad K, Lebedin Y, Lloyd KO, Shigemasa K, de Bruijn HW, Jansson B, Nilsson O, Olsen KH, O'Brien TJ (2002) Epitopes on CA125 from cervical mucus and ascites fluid and characterization of six new antibodies. Third report from the ISOBM TD-1 workshop. *Tumour Biol*: 23:303–314.

O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L (2001) The Ca125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumour Biol*: 22:348-466.

O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Shigemasa K (2002) The CA 125 gene: a new discovered extension of the glycosylated N-terminal domain doubles the size of this extracellular superstructure. *Tumour Bio*: 23:154-169.

Ouchi M, Fujiuchi N, Sasai K, Katayama H, Minamishima YA, Ongusaha PP, *et al.* (2004) BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition. *J Biol Chem*: 279:19643–19648.

Ozawa M, Ringwald M, Kemler R (1990) Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*: 87:4246-4250.

Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, Daly MB, Godwin AK, Schilder RJ, Xu X, Hamilton TC (2004) Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell*: 5:19-24.

Patankar MS, Jing Y, Morrison JC, Belisle JA, Lattanzio FA, Deng Y, Wong NK, Morris HR, Dell A, Clark GF (2005) Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol*: 99:704-713.

Partridge E. Edward, Barres N. Mark (1999) Epithelial Ovarian Cancer: Prevention, Diagnosis, and treatment. *CA CANCER J CLIN*: 49:297-320

Peng C, Zhang X, Yu H, Wu D, Zheng J (2011) Wnt5a as a predictor in poor clinical outcome of patients and a mediator in chemoresistance of ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*: 21(2):280-8.

Piché Alain, Rancourt Claudine, Matte Isabelle and Lane Denis (2002) The Role of MUC16 Mucin (CA125) in the Pathogenesis of Ovarian Cancer, *Ovarian Cancer - Basic Science Perspective*. ISBN 978-953-307-812-0

Pochampalli MR, el Bejjani RM, Schroeder JA (2007) MUC1 is novel regulator of ErbB1 receptor trafficking. *Oncogene*: 26:1693-1701.

Prat Jaime (2014) for the FIGO committee on gynecologic oncology, FIGO guidelines, Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*: 124:1–5.

Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu WH, Huang L, Raina D, Chen W, Kharbanda S, Kufe D (2004) Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell*: 5(2):163-75.

Ren J, Raina D, Chen W, Li G, Huang L, Kufe D (2006) MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling. *Mol Cancer Res*: 4:873-883.

Rodriguez GC, Haisley C, Hurteau J, Moser TL, Whitaker R, Bast RC Jr, Stack MS (2001) Regulation of invasion of epithelial ovarian cancer by transforming growth factor- β . *Gynecol Oncol*: 80:245-53.

Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, Miyajima A (2004) Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *JBiol Chem*: 279:9190-9198.

Rustin GJ, Nelstrop AE, Tuxen MK, Lambert HE (1996) Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125: a North Thames Ovary Group Study. *Ann Oncol*: 7:361–364.

Sasaki R, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, Tashiro H, Katabuchi H, Kiyono T (2009) Oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells with defined cellular oncogenes, *Carcinogenesis*: 30(3):423-31.

Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ (2001) Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem*: 276:13057-13064.

Seelenmeyer C, Wegehingel S, Lechner J, Nickel W (2003) The cancer antigen CA125 represents a novel counter receptor for galectin-1. *J Cell Sci*: 116:1305-1318.

Silverberg SG (2000) Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal., *Int J Gynecol Pathol*: 19(1):7-15.

Satoh S, Hinoda Y, Hayashi T, *et al.* (2000) Enhancement of metastatic properties of pancreatic cancer cells by MUC1 gene encoding an anti-adhesion molecule. *Int J Cancer*: 88: 507-518.

Staddon JM, Smales C, Schulze C, Esch FS, Rubin LL (1995) p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol*: 130:369-381.

Statistique Canadiennes sur le cancer 2014, Société canadienne du cancer, Statistique Canada, Agence de la santé publique du Canada, Registres provinciaux et territoriaux du cancer cancer.ca/statistiques

Suzuki A, de la Pompa J L, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, *et al.* (1998) High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr. Biol*: 8:1169-1178.

Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB (2002) A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell*: 2:301-314

The Cancer Genome Atlas Research Network (2010) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*: 474(7353):609-615.

Thériault C, Pinar M, Comamala M, Migneault M, Beaudin J, Matte I, Boivin M, Piché A, Rancourt C (2011) MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis. *Gynecol Oncol*: 121:434-443.

Vakiani E, Solit B D (2011) KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*: 223:219–229

Van Altena AM, Kolwijck E, Spanjer MJ, Hendriks JC, Massuger LF, de Hullu JA (2010) CA125 nadir concentration is an independent predictor of tumor recurrence in patients with ovarian cancer: a population-based study. *Gynecol Oncol*: 119:265–269.

Varma RR, Hector SM, Clark K, *et al.* (2005) Gene expression profiling of a clonal isolate of oxaliplatin-resistant ovarian carcinoma cell line A2780/C10. *Oncol Rep*: 14:925-932.

Vaughan S, Coward JI, Bast RC Jr, Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, Coukos G, Crum CC, Drapkin R, Etemadmoghadam D, Friedlander M, Gabra H, Kaye SB, Lord CJ, Lengyel E, Levine DA, McNeish IA, Menon U, Mills GB, Nephew KP, Oza AM, Sood AK, Stronach EA, Walczak H, Bowtell DD, Balkwill FR (2011) Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nature reviews. cancer* volume 11: 719-725

Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, Salzet M (2010) Epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett*: 291:59-66.

Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 8(4):275-83.

Wang SI, Parsons R, Ittmann M (1998) Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*: 4:811–815.

Wen Y, Caffrey TC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hollingsworth MA. Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and β -catenin (2003) *J Biol Chem*: 278:38029-38039.

Wu YM, Nowack DD, Omenn GS, Haab BB (2009) Mucin glycosylation is altered by pro-inflammatory signaling in pancreatic- cancer cells. *J Proteome Res*: 8:1876–1886.

Xiaofang Y, Yue Z, Xialian X, Zhibin Y (2007) Serum tumour markers in patients with chronic kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest*: 67:661–667.

Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D (1997) Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma associated antigen and β -catenin in cell adhesion. *J Biol Chem*: 272:12492-12494.

Yan W, Fu Y, Tian D, Liao J, Liu M, Wang B, Xia L, Zhu Q, Luo M (2009) PI3 kinase/Akt signaling mediates epithelial-mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*: 382:631-636.

Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO (2002) Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer*: 98:737-740.

Yin BW, Lloyd KO (2001) Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem*: 276:27371-27375.

Yu Y, Yoon SO, Poulgiannis G, Yang Q, Xiaoju M M, Villén J, Kubica N, Hoffman G R., Cantley C L, Gygi S P, Blenis J (2011) Quantitative Phosphoproteomic Analysis Identifies the Adaptor Protein Grb10 as an mTORC1 Substrate that Negatively Regulates Insulin Signaling *Science*: 332(6035): 1322–1326.

Zheng J, Mercado-Uribe I, Rosen DG, Chang B, Liu P, Yang G, *et al.* (2010) Induction of papillary carcinoma in human ovarian surface epithelial cells using combined genetic elements and peritoneal microenvironment. *Cell Cycle*: 9:140–6.