



Influence du stroma et des cellules souches mésenchymateuses sur la dissémination et la résistance au traitement des carcinomes ovariens épithéliaux

Cyril Touboul

► To cite this version:

Cyril Touboul. Influence du stroma et des cellules souches mésenchymateuses sur la dissémination et la résistance au traitement des carcinomes ovariens épithéliaux. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. <NNT : 2012PA11T072>. <tel-00907889>

HAL Id: tel-00907889

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00907889>

Submitted on 22 Nov 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champs disciplinaires : Biologie cellulaire et Moléculaire
Ecole Doctorale de rattachement : Cancérologie

**Influence du stroma et des cellules souches
mésenchymateuses sur la dissémination et la résistance au
traitement des carcinomes ovariens épithéliaux**

Sous la direction du
Dr Massoud MIRSHAHI

Présentée et soutenue publiquement
par
Cyril TOUBOUL
Le 21 Novembre 2012

JURY

Président de Jury :	Professeur Denis QUERLEU
Rapporteur :	Professeur Roman ROUZIER
Rapporteur :	Professeur Charles COUTANT
Examineur :	Professeur Philippe MORICE
Examineur :	Docteur Arash RAFII TABRIZI
Directeur de thèse :	Docteur Massoud MIRSHAHI

Sommaire

Résumé :	8
Introduction :	9
I-Aspects cliniques du cancer de l'ovaire :	10
a) Epidémiologie :	10
b) Carcinogénèse :	14
c) Diagnostic.....	16
d) Traitement :	19
- Traitement standard :	19
- La chimio-hyperthermie intrapéritonéale (CHIP) :	21
e) De la clinique à la recherche fondamentale et translationnelle :	22
II- Un environnement permissif est nécessaire pour le développement tumoral :	23
a) La théorie du « seed » and « soil » :	24
b) Application à la métastase ovarienne :	25
c) Théories actuelles des mécanismes de la dissémination métastatique:	27
- L'invasion locale :	28
- La formation de la métastase tumorale :	31
III- Le développement tumoral ovarien au sein du microenvironnement péritonéal:	34
a) La barrière mésothéliale :	34
b) Le paradoxe des cellules souches mésenchymateuses (MSC) :	36
- Une graine multipotente :	36
- Un sol pour les autres types cellulaires :	42
c) Les cytokines permettent un dialogue entre les cellules tumorales et stromales :	43
- CXCL12 (SDF1) :	44
- IL6 et IL8 :	46
- Les autres cytokines :	48
d) La théorie des cellules souches de cancer (CSC) :	49
e) Signature génomique de la métastase ovarienne :	51
IV- Mécanismes de chimiorésistance :	55
a) Les résistances intrinsèques:	55
b) Résistances aux sels de platines :	57
- Généralités.	57
- Augmentation de la réparation de l'ADN :	57

- Modification de la cible:.....	58
- Effet des pompes d'efflux :	59
- La signalisation pro-apoptotique induite par le cisplatine :.....	60
c) Résistances aux taxanes :	62
- Généralités :.....	62
- Action des pompes d'efflux:.....	63
- Mutations de la tubuline :.....	64
- Perspectives thérapeutiques:	65
- Les résistances liées au microenvironnement :	65
V- Intérêt des modèles en 3 dimensions :.....	68
a) Pourquoi un modèle en 3 dimensions ?.....	68
b) Les différents types de modèle 3D :	69
c) Les modèles 3D utilisés dans le cancer de l'ovaire :	71
d) La membrane amniotique :	73
Matériel et méthodes :	77
I- Culture cellulaire :.....	77
a) Monocultures :.....	77
b) Co-cultures :.....	78
c) Culture des sphéroïdes tumoraux ovariens avec la membrane amniotique :	78
d) Chimiothérapie et traitement hyperthermique :.....	79
II- Tests fonctionnels :	80
a) Test d'adhérence :	80
b) Test de migration/invasion :.....	80
c) Tests de blessure :	81
d) Tests d'inhibition :	81
III- Cytométrie en flux :	82
a) Test de viabilité par cytométrie en flux : Calcein-AM / Live Dead :	82
b) Analyse et tri des MSC de membrane chorioaniotique :	83
IV- Microscopie confocale :	84
V- Analyses génomiques et protéiques :.....	85
a) Analyse du sécrétome :	85
b) Analyse du transcriptome :	86
c) Analyse des voies de transcription, Ingenuity Pathway Analysis :	87
Résultats:.....	88

I- Article 1: Les cellules souches mésenchymateuses induisent un profil pro-métastatique des cellules tumorales ovariennes par des modifications transcriptomiques.....	88
- Résumé long :.....	88
II. Article 2 : les cellules souches mésenchymateuses augmentent la dissémination tumorale ovarienne par la sécrétion d'IL6 dans un modèle 3D à base de membrane chorioamniotique :	101
- Résumé long :.....	101
III. Article 3 : les cellules souches mésenchymateuses protègent les cellules tumorales ovariennes de la mort induite par l'hyperthermie grâce à la sécrétion de la cytokine CXCL12 :	131
- Résumé long.....	131
Discussion et perspectives :.....	145
I- l'influence des MSC sur la dissémination métastatique :	146
a) La présence des MSC dans les tumeurs :.....	146
a) Effet du recrutement des MSC sur le développement tumoral :.....	147
b) Perspectives:	149
II- L'impact des MSC sur la résistance aux traitements :.....	151
Références :.....	157
Annexes	186

Liste des abréviations:

ADN	Acide Desoxyribo-Nucleique
ARN	Acide Ribo-Nucleique
ALDH	ALdehyde DesHydrogenase
ABC	ATP Binding Cassette
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide 7
BMDC	Bone Marrow Derived Cells
BMP2	Bone Morphogenetic Protein 2
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BMP6	Bone Morphogenetic Protein 6
BDNF1	Brain-Derived Neurotrophic Factor 1
BRCA	BReast CAncer
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
CA125	Carbohydrate Antigen 125
CA-MSC	Carcinoma Associated Mesenchymal Stem Cells
CSL	<u>C</u> BF1/ <u>R</u> BP- <u>J</u> κ/ <u>S</u> uppressor of Hairless/ <u>L</u> AG-1
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CHIP	Chimiothérapie Hyperthermique IntraPeritoneale
CSPG4	Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4
CD	Cluster of Differentiation
CFU-F	Colony-Formating Unit - Fibroblastic
DLL4	Delta-like 4
DLL1	Delta-like-1
DLL3	Delta-like-3
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementation group 1
FIGO	Fédération Internationale des Gynécologues Obstétriciens
FOXO	forkhead box O
FPRL1	Formyl peptide receptor-like 1

GGR	Global Genomic Repair
GST	Gluthation-S-Transferase
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HAS	Haute Autorite de Sante
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2
ICAM1	InterCellular Adhesion Molecule 1
IL10	Interleukin 10
ISSCR	International Society for Stem Cell Research
LPA	LysoPhosphatidic Acid
LPAR	LysoPhosphatidic Acid Receptor
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MT	MetalloThionein
miARN	micro Acide Ribo-Nucleique
MCM2	mini-chromosome maintenance protein 2
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
MUC16	Mucin 16, cell surface associated
MDR	Multi Drug Resistance
MRP	Multi Resistance Protein
NO	Nitric Oxyde
NICD	Notch Intracellular Cytoplasmic Domain
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
NER	Nucleotide Excision Repair
OMS	Organisation Mondiale de la Sante
OCP	Ovarian Cancer Prognostic Profile
PBM	PDZ Binding Motif
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinases
PEDF	pigment-epithelium derived factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor

PSD95	Post synaptic density protein
PDZ	Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor 1, Zonula Occludens-1
PEC	Primary Endothelial Cell
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RhoA	Ras Homolog Family Gene, member A
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
SMAD3	S-mothers against decapentaplegic homolog 3
SOX11	SRY-related HMG-box 11
SLP1	Synaptotagmin-like protein 1
CNS	Systeme Nerveux Central
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGFbeta1	Transforming Growth Factor beta 1
TGFbetaR1	Transforming Growth Factor beta Receptor 1
TNM	Tumor Node Metastase
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF-C	Vascular Endothelial Growth Factor C
VPF	Vascular Permeability Factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XPA	Xeroderma Pigmentosum, complémentation group A
ZO-1	Zonula Occludens-1

Résumé :

Le cancer épithélial de l'ovaire (EOC) a la particularité d'être diagnostiqué à un stade avancé chez 75% des patientes et de récidiver dans un grand nombre de cas malgré une bonne réponse initiale à la chimiothérapie, expliquant ainsi son pronostic sombre.

Le rôle du microenvironnement tumoral semble être de premier plan dans le développement et la survie des cellules cancéreuses mais il existe encore peu de données concernant les cellules mésenchymateuses souches (MSC). Dans ce travail nous avons donc cherché à déterminer les mécanismes moléculaires entre les MSC et les cellules tumorales ovariennes.

Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence l'émergence d'un profil pro-métastatique des cellules tumorales ovariennes après contact avec les MSC. Nous avons ensuite développé un modèle d'infiltration tumorale 3D révélant que les MSC augmentaient la dissémination tumorale ovarienne par la sécrétion d'IL6. Enfin nous avons démontré que les MSC étaient capables d'induire chez les cellules tumorales ovariennes un phénotype thermotolérant lié à la sécrétion CXCL12.

Ces données vont donc toutes dans le même sens en démontrant les propriétés pro-tumorales des MSC et ouvrent de nouvelles perspectives de thérapies ciblant les interactions entre le stroma et la tumeur.

Mots clés : Cancer de l'ovaire, Carcinose péritonéale, Chimiorésistance, Microenvironnement tumoral, Cellules souches mésenchymateuses.

Introduction :

L'incidence des tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire est en France de 7,3 à 10,9 pour 100 000 femmes et elles sont responsables de plus de 3000 décès par an, soit 5,8% des décès par cancer [1-3]. La survie globale est également faible, d'environ 39% à cinq ans et 20% à 10 ans. Le mauvais pronostic des tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire est lié à leur découverte tardive. Le traitement de choix repose sur la chirurgie de cytoréduction complète mais 75% de ces cancers est diagnostiqué au stade III ou IV, empêchant la plupart du temps de réaliser une exérèse chirurgicale complète première (1, 2). Dans ces cas-là, le traitement de ces formes inopérables d'emblée de cancer de l'ovaire repose sur la chimiothérapie néoadjuvante, avec un taux de réponse initial entre 65 et 80% après la première ligne de traitement. Malgré cette réponse initiale, de nombreuses récurrences sont observées en raison du développement d'une chimiorésistance dans de nombreux cas. Il existe une fraction de cellules tumorales ovariennes qui vont survivre malgré les traitements et vont constituer la maladie résiduelle. C'est cette maladie résiduelle qui va ensuite être à l'origine des récurrences qui grèvent le pronostic des patientes atteintes de cancer de l'ovaire.

L'enjeu est donc de mieux comprendre dans un premier temps comment se développe et se dissémine cette maladie carcinomateuse ovarienne, de comprendre le rôle des cellules et facteurs environnants composant le microenvironnement tumoral. Enfin il est également fondamental d'élucider les mécanismes permettant la survie de certaines cellules tumorales ovariennes au cours du traitement.

I-Aspects cliniques du cancer de l’ovaire :

a) Epidémiologie :

Avec une estimation de 4 375 nouveaux cas diagnostiqués en France en 2005, le cancer de l’ovaire représente 3,2% de l’ensemble des nouveaux cancers féminins et se place au 7ème rang des cancers féminins. Son mauvais pronostic explique qu’il soit au 5ème rang des décès par cancer chez la femme avec 3 180 décès par an, et au 13ème rang de l’ensemble des décès par cancer (Figure 1 & 2). Le taux de mortalité standardisé est de 4,6 (http://www.invs.sante.fr/surveillance/cancers/estimations_cancers/donnees_localisation/ovaire/comment_ovaire.pdf).

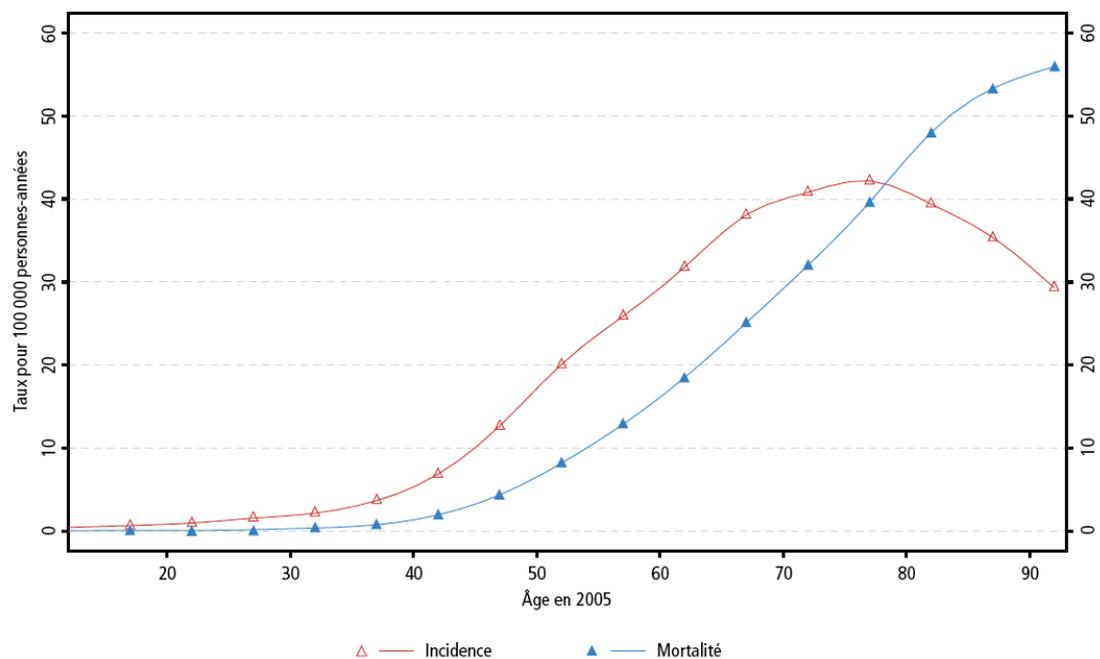


Figure 1 : Incidence et mortalité du cancer de l’ovaire en 2005 en fonction de l’âge (source : Institut de veille sanitaire — Estimation nationale de l’incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005)

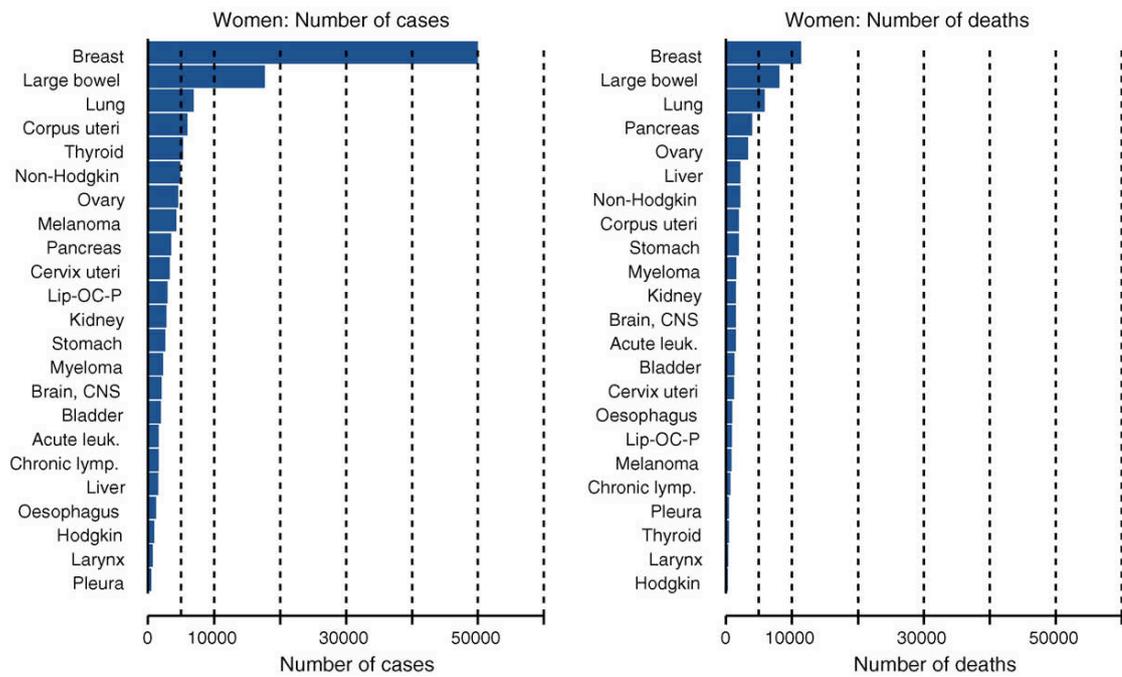


Figure 2 : Incidence et mortalité par cancer en France en 2005 selon Belot et al. [4]

Depuis 1990 son incidence ne cesse d'augmenter alors que sa mortalité devrait diminuer légèrement après une augmentation (Figure 3).

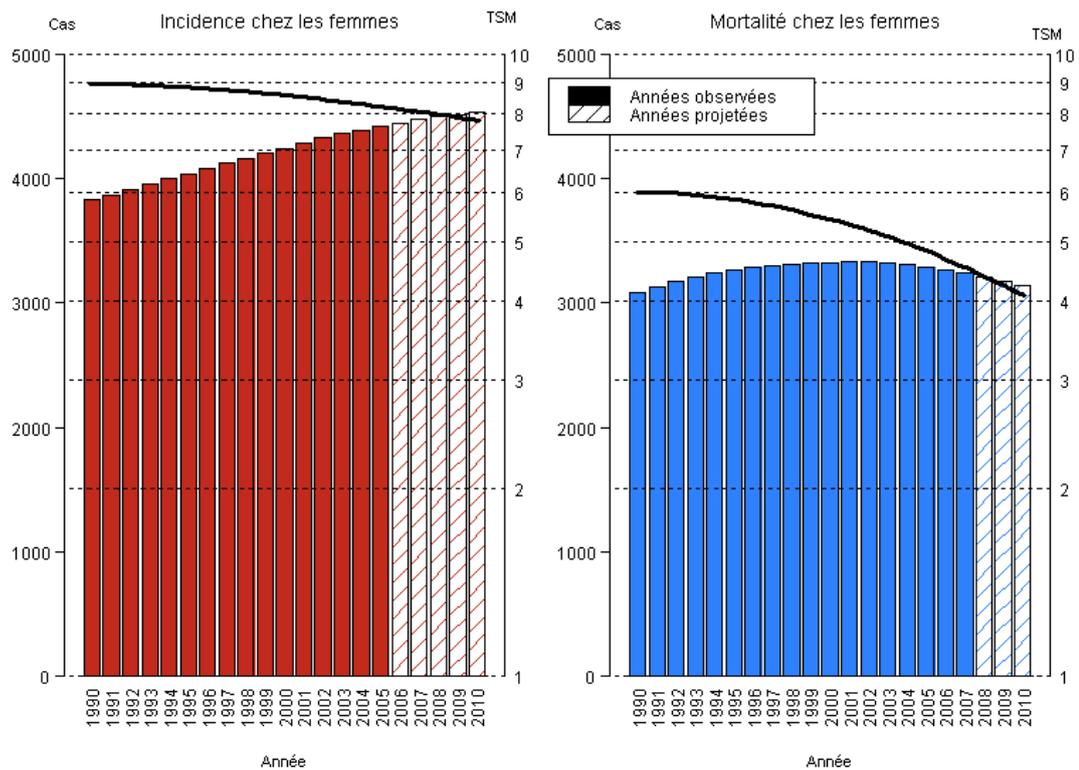


Figure 3 : Evolution du nombre de cas et de décès chez la femme de 1990 à 2010 en France
 (source: http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/donnees_localisation/ovaire.pdf)

La mortalité par cancer de l’ovaire a beaucoup augmenté jusqu’en 1987, elle diminue depuis de 1,2 % par an. Cette diminution est due en grande partie à la diminution de l’incidence de ce cancer. Cette localisation est responsable de 3 357 décès en 2006, ce qui représente 5,5 décès sur 100 décès par cancer chez la femme (Figure 4).

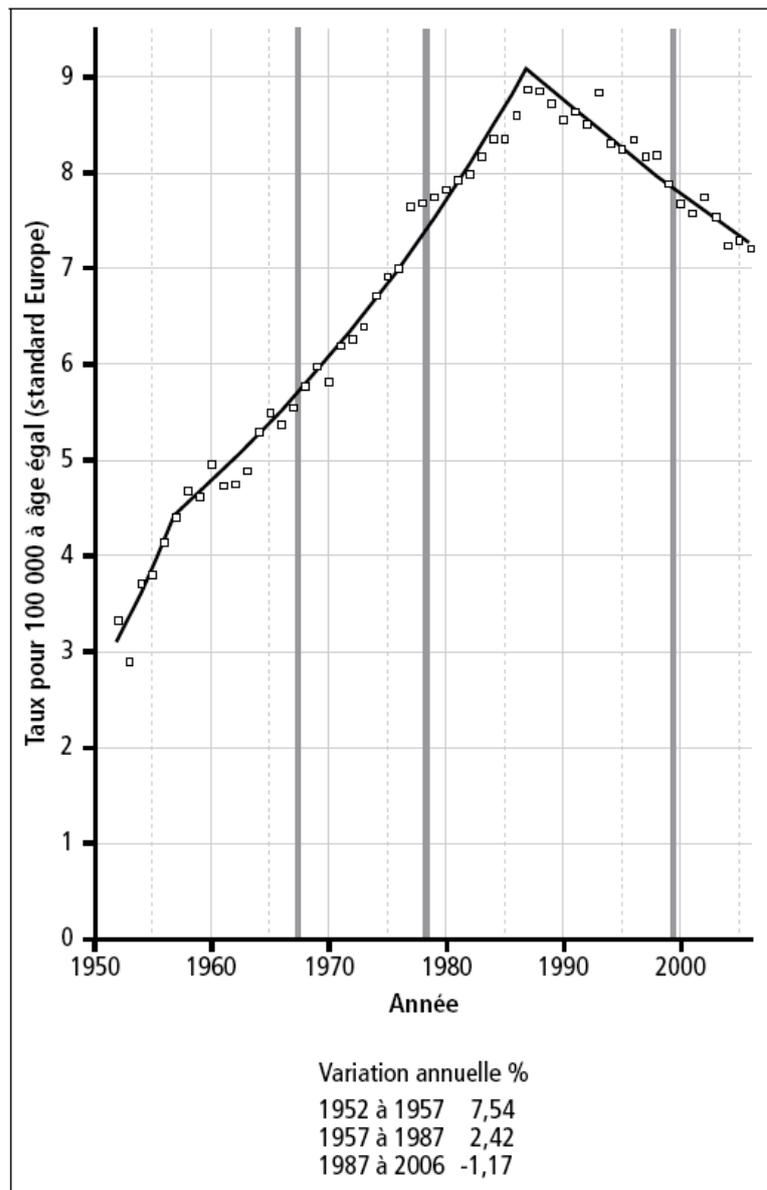


Figure 4 : Evolution de la mortalité par cancer de l’ovaire en France de 1950 à 2006 (source : <http://www.invs.sante.fr/applications/cancers>)

La principale explication de cette importante mortalité est la découverte tardive de ce cancer, soit environ 75% au stade III. Or la survie à 5 ans du cancer de l’ovaire varie dans la littérature entre 5 et 75% selon la période et le geste chirurgical (Tableau 1). Il ressort que la qualité de l’exérèse chirurgical

est le principal facteur prédictif de survie globale dans le cancer de l'ovaire de stade avancé [5].

Author/Year	Primary focus of series	Number of patients	Stages	Residual macroscopic disease (number, %)	Median survival (months) ^a	Estimated 5-year survival (%)	P value
Omura, ⁹ Hoskins ²⁶ (1989, 1994)	GOG 52 and 97 IV CDDP/Cytosin/Adriamycin vs. IV CDDP/Cytosin	349	IIIa,b,c	None: 99 (28.4%) ≤0.1 cm: 250 (71.6%)	>48 NA	NA ^b NA	<0.001
Eisenkop ³² (1992)	Surgical with multiple adjuvant regimens (87% Pt-based)	250	IIIC,IV	None: 28 (11.2%) ≤1 cm: 109 (43.6%) >1 cm: 113 (45.2%)	>60 32 16	~ 59% ~ 36% ~ 9%	0.001
Makar ¹¹ (1995)	Surgical with multiple adjuvant regimens (78% Pt-based)	455	IIIa,b,c	None: 45 (9.9%) <2 cm: 78 (17.1%) >2 cm: 332 (73.0%)	~75 ~45 ~18	~ 58% ~ 40% ~ 18%	<0.001
Alberts ¹² (1996)	GOG 104 IP CDDP/IV Cytosin vs. IV CDDP/IV Cytosin	546	IIIa,b,c	None: 139 (25.4%) <0.5 cm: 254 (46.5%) 0.5–2 cm: 153 (28.0%)	76 42 32	~ 52% ~ 31% ~ 23%	<0.001
Le ¹³ (1997)	Surgical with adjuvant Pt-based chemotherapy	330	IIIa,b,c	None: 51 (15.4%) <2 cm: 89 (27.0%) >2 cm: 190 (57.5%)	~54 ~21 ~16	~ 45% ~ 15% ~ 12%	<0.0001
Michel ¹⁵ (1997)	Surgical with adjuvant Pt-based chemotherapy	152	IIIa,b,c IV	None: 46 (30.3%) <2 cm: 92 (60.5%) >2 cm: 14 (9.2%)	>36 ~24 ~14	NA NA NA	<0.0001
Ozols ¹⁷ (2003)	GOG 158 IV Carbo/Taxol vs. IV CDDP/Taxol	792	IIIa,b,c	None: 281 (35.5%) ≤1 cm: 511 (64.5%)	>60 ~46	~ 60% ~ 38%	NA
Eisenkop ¹⁹ (2003)	Surgical with adjuvant Pt-based chemotherapy	408	IIIc	None: 351 (86.0%) ≤1 cm: 41 (10.0%) >1 cm: 16 (4.0%)	76 32 19	~ 56% ~ 34% 0%	<0.0001
Von Georgi ¹⁸ (2003)	Surgical with adjuvant Pt-based chemotherapy ± radiotherapy	119	IIIa,b,c IV	None: 22 (18.4%) <100 cm ³ : 25 (21.0%) 101–500 cm ³ : 26 (21.8%) 501–1000 cm ³ : 31 (26.1%) >1000 cm ³ : 15 (12.6%)	~54 ~46 ~26 ~18 ~22	~ 48% ~ 30% ~ 9% ~ 10% 0%	<0.001
Aletti ²¹ (2006)	Surgical with adjuvant Pt-based chemotherapy	194	IIIc	None: 46 (23.7%) <1 cm: 85 (43.8%) 1–2 cm: 22 (11.3%) >2 cm: 41 (21.1%)	>80 ~38 ~22 ~16	~ 70% ~ 30% ~ 18% ~ 5%	<0.001
Chi ²³ (2006)	Surgical with adjuvant Pt-based chemotherapy	465	IIIc	None: 67 (14.7%) ≤0.5 cm: 70 (15.1%) 0.6–1.0 cm: 99 (21.3%) 1.0–2.0 cm: 53 (11.4%) >2 cm: 176 (37.8%)	106 66 48 33 34	~ 75% ~ 55% ~ 42% ~ 25% ~ 25%	<0.001

^a ~ Extrapolated from inspection of survival curve.

^b Not available.

Tableau 1 : Survie médiane et à 5 ans des patientes après chirurgie initiale pour cancer de l'ovaire selon Eisenkop et al.[5].

b) Carcinogénèse :

La cancérogenèse ovarienne et ses premiers événements restent débattus car le cancer de l'ovaire est presque toujours diagnostiqué à un stade tardif. Plusieurs théories ont été proposées en ciblant initialement l'ovaire et les anomalies de l'épithélium ovarien de surface, puis plus

récemment la trompe de Fallope. En effet, en 1971, Fathalla remarque que le cancer de l'ovaire était plus fréquent chez les nullipares. Ainsi, dans la théorie de la cicatrisation, chaque ovulation crée un traumatisme mineur sous forme d'une rupture au niveau de la surface épithéliale. Au cours du processus de cicatrisation, des kystes d'inclusion d'épithélium ovarien peuvent se former dans le stroma et ainsi, soumis à des facteurs de croissance cellulaires ou hormonaux, être à l'origine d'une prolifération puis de la transformation néoplasique [6]. Pour d'autres, ce n'est pas l'épithélium ovarien qui est à l'origine du processus de cancérogénèse mais les « résidus Müllériens » situés anatomiquement près du hile de l'ovaire ou dans les régions paratubaires et para-ovariennes. Cet épithélium müllérien contient les précurseurs de l'épithélium tubaire, de l'endomètre, et de l'endocol et permet ainsi d'expliquer les similitudes existant entre les différents types de cancers de l'ovaire et les tumeurs épithéliales müllériennes : tumeurs séreuses papillaires (similitudes avec l'épithélium tubaire), tumeurs mucineuses (similitudes avec l'épithélium endocervical), tumeurs endométrioïdes (similitudes avec l'épithélium endométrial) [7]. Cette idée est venue d'une observation d'un groupe d'investigateurs Hollandais qui retrouvaient des carcinomes tubaires de l'ovaire débutant sur des pièces d'annexectomie chez les patientes mutées BRCA, ressemblant aux carcinomes séreux ovariens [8].

Des modèles visant à intégrer les deux précédents se sont finalement développés permettant d'expliquer la présence de cellules d'origine tubaire au sein des kystes d'inclusion ovariens après chaque ovulation [9]. C'est ensuite

par les cytokines et différents types cellulaires présents liés à l'inflammation que pourrait se faire la transformation maligne [10].

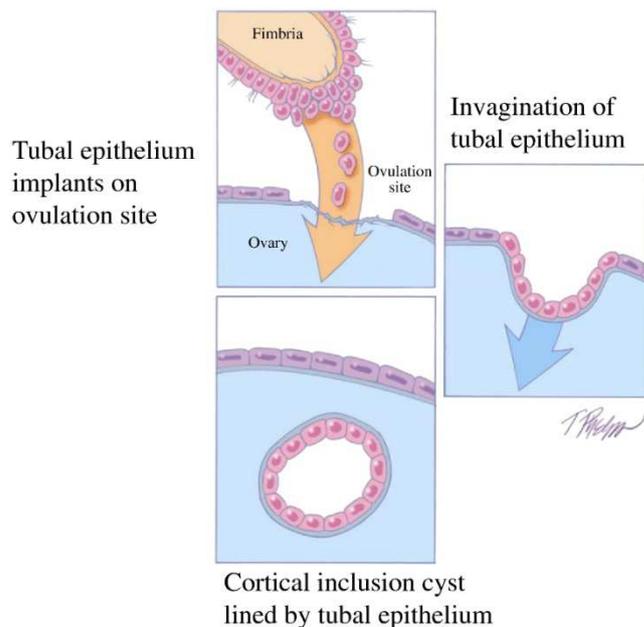


Figure 5 : développement d'un kyste d'inclusion cortical à partir de l'épithélium tubaire selon Kurman et al. [9, 11]

c) Diagnostic

Le diagnostic du cancer de l'ovaire se fait dans 75% des cas à un stade tardif en raison de l'absence de signe clinique au stade précoce. Dans ce cas les signes cliniques sont aspécifiques : pesanteur ou douleur abdominale, compression des organes de voisinage ou encore infection. Dans 25% des cas le diagnostic est fortuit et est découvert sur pièce de kystectomie ou annexectomie, ou à l'occasion d'une échographie pelvienne. Voilà pourquoi des travaux ont évalué la possibilité d'un dépistage basé sur l'échographie vaginale et le dosage du CA125, montrant l'absence de bénéfice en terme de survie globale concernant ces stratégies [12].

Lors d'une suspicion de cancer de l'ovaire, c'est la chirurgie, soit la coelioscopie dès qu'elle est réalisable, qui va permettre le diagnostic histologique soit sur une biopsie en cas de stade avancé, soit après annexectomie ou kystectomie.

La classification histologique des tumeurs malignes ovariennes est complexe et hétérogène (Tableau 2). Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux tumeurs épithéliales de l'ovaire (EOC) qui représentent 80% des carcinomes ovariens (carcinomes séreux, mucineux, endométrioïdes et à cellules claires) et plus particulièrement aux carcinomes séreux qui sont les plus fréquents.

C'est lors de la chirurgie de stadification qui commence par la réalisation d'une coelioscopie qu'est connue l'extension de la maladie selon la classification FIGO (Tableau 3).

Tumeurs épithéliales

Séreuses
Mucineuses
Endométrioïdes
À cellules claires
À cellules transitionnelles
Épithéliales mixtes
Indifférenciées

Tumeurs germinales

Tératomes
Pluritissulaires
- matures
- immatures
Monotissulaires
Struma ovarii (goitre ovarien)
Tumeurs carcinoïdes
Tumeurs neuroectodermiques
Tumeurs germinales primitives
Dysgerminome
Tumeur vitelline
Carcinome embryonnaire
Choriocarcinome non gestationnel
Polyembryome
Tumeurs germinales mixtes

Tumeurs du stroma gonadique et des cordons sexuels et tumeurs stéroïdes

Fibrome
Thécome
Fibrosarcome
Tumeur stromale avec composante mineure des cordons sexuels
Tumeur stromale sclérosante
Tumeur stromale à cellules en bague à chaton
Tumeurs des cordons sexuels
Tumeur à cellules de la granulosa

Type adulte
Type juvénile
Tumeur à cellules de Sertoli–Leydig
Tumeur à cellules de Sertoli
Tumeur du stroma gonadique et des cordons sexuels de type mixte et formes indifférenciées
Gynandroblastome
Tumeur à cellules de Sertoli avec tubes annelés
Tumeur des cordons sexuels indifférenciée
Tumeurs à cellules stéroïdes
Lutéome stromal
Tumeurs à cellules de Leydig
Tumeurs à cellules stéroïdes

Tumeurs mixtes des cordons sexuels et germinales

Gonadoblastome
Tumeur mixte des cordons sexuels et des cellules germinales

Tumeurs du rete ovarii

Adénome
Adénocarcinome

Autres

Carcinome à petites cellules
Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
Carcinome hépatoïde
Carcinome adénoïde kystique
FATWO (tumeur Wolffienne)
Paragangliome
Myxome
Lymphomes
Tumeurs conjonctives

Tableau 2 : classification OMS 2003 des tumeurs de l'ovaire

Stades FI G O	Classification TNM		Survie à 5 a ns ⁵
I	T1	Tumeur limitée aux ovaires	84 %
IA	T1a	Tumeur limitée à un seul ovaire avec capsule intacte	
IB	T1b	Tumeurs des deux ovaires, capsules intactes	
IC	T1c	Rupture capsulaire ou tumeur à la surface ovarienne ou cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal	
II	T2	Tumeur ovarienne étendue au pelvis	59 %
IIA	T2a	Extension à l'utérus et/ou aux trompes	
IIB	T2b	Extension aux autres organes pelviens	
IIC	T2c	Extension pelvienne avec cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal	
III	T3 et/ou N1	Métastases péritonéales au-delà du pelvis et/ou adénopathies métastatiques régionales	35 %
IIIA	T3a	Métastases péritonéales microscopiques	
IIIB	T3b	Métastases péritonéales macroscopiques < 2 cm	
IIIC	T3c et/ou N1	Métastases péritonéales > 2 cm et/ou adénopathies métastatiques régionales	
IV	M1	Métastases à distance (autres que les métastases péritonéales)	22 %

Tableau 3 : classification FIGO et TNM du cancer de l'ovaire(2002)

d) Traitement :

- *Traitement standard :*

La prise en charge du cancer de l'ovaire repose sur la chirurgie et la chimiothérapie. Seule la résection complète de la maladie peut permettre la guérison [13, 14]. La chirurgie peut être initiale ou peut survenir après une

chimiothérapie néo-adjuvante, dans ce cas elle est dite « d'intervalle » et est réalisée après 3 à 6 cycles de chimiothérapie [15]. Dans les deux cas, cette chirurgie doit être complète, c'est à dire avec un résidu tumoral nul.

La chimiothérapie néo-adjuvante doit être préférée lorsque la maladie n'est pas résécable d'emblée en fonction de l'état général de la patiente. Lorsque la maladie est accessible à une résection complète d'emblée et que l'état général de la patiente le permet, le traitement chirurgical doit être préféré [13, 14, 16]. L'avantage de la chimiothérapie néo-adjuvante est de rendre accessible à la chirurgie et d'en diminuer la morbidité, l'important restant le caractère complet de la chirurgie [14, 15, 17, 18].

Les sels de platines et les taxanes restent les molécules de référence dans le traitement en première ligne des cancers de l'ovaire, avec un taux de réponse initial entre 65 et 80%. Malgré cette réponse initiale, de nombreuses récurrences sont observées. Une chimiorésistance se développe dans de nombreux cas et explique l'échec des traitements ultérieurs. La maladie résiduelle est donc le problème majeur dans cette pathologie et pourrait expliquer les récurrences et les échecs thérapeutiques. Cette maladie résiduelle se développe à partir de très peu de cellules dans certains cas et le plus souvent au niveau du péritoine abdomino-pelvien. Afin d'améliorer le contrôle local ou de prendre en charge les récurrences, le développement de nouvelles stratégies est nécessaire. La pathologie cancéreuse ovarienne ayant une diffusion péritonéale, il semble logique dans cette pathologie de développer des traitements à diffusion intra-péritonéale. Ainsi ont été développées des traitements tels que la chimiothérapie intra-veineuse et la chimio-hyperthermie intrapéritonéale (CHIP) [19, 20].

- *La chimio-hyperthermie intrapéritonéale (CHIP) :*

La CHIP a été décrite chez l'animal puis l'homme par Spratt et coll. [21] dans les années 70 puis a été développée dans les cancers digestifs entre autres par Sugarbaker aux Etats Unis et Elias en France [22, 23]. Le rationnel de ce traitement repose d'une part sur l'effet cytotoxique propre de l'hyperthermie, jouant sur une thermosensibilité des tissus tumoraux supérieure à celle des tissus sains du fait de l'association d'une hypoxie avec une acidose, d'une micro-circulation tumorale anarchique et d'un déficit en thermorégulation [24]. Il existe d'autre part un effet synergique avec la chimiothérapie par plusieurs mécanismes [20] : (i) augmentation des adduits de l'ADN par le cisplatine, (ii) augmentation des liaisons croisées de l'ADN par le cisplatine, (iii) meilleure pénétration des agents cytotoxiques par perméabilisation des membranes cellulaires. Mais en réalité les mécanismes moléculaires en jeu sont encore mal connus.

Le concept est séduisant dans le cancer de l'ovaire ou les récurrences péritonéales sont à l'origine du pronostic encore sombre. Cependant, seules des études de faible niveau de preuve sont actuellement disponibles et permettent pour l'instant simplement de prouver la faisabilité de la technique mais soulevant des questions non élucidées [25, 26]. On ne sait pas actuellement quel est le moment pour réaliser une CHIP : au moment de la chirurgie initiale, après chimiothérapie néoadjuvante ou encore au moment de la récurrence. Il existe des arguments pour chacun de ces différents temps de la prise en charge mais après la chimiothérapie néoadjuvante permet de diminuer l'étendue de la maladie et ainsi la morbidité de la chirurgie de cytoréduction qui précède la CHIP, et de sélectionner les patientes

chimiosensibles pouvant être éligible à un traitement par CHIP [26]. La seconde question importante est le choix de la drogue et les modalités de délivrance : un essai français utilisant de l'oxaliplatine en consolidation (CHIPOVAC) avait dû être arrêté en raison de la toxicité trop importante (hémopéritoine) [27]. D'autres sels de platine tel que le cisplatine ont été utilisés, les taxanes et en association d'autres drogues comme la mitomycine C et la doxorubicine [24].

Dans tous les cas la limite de la prise en charge chirurgicale de l'ovaire, à fortiori lorsqu'elle est suivie d'une CHIP, est sa morbidité. En effet, la question qui se pose est comment augmenter l'effet du traitement cytotoxique sans en augmenter la toxicité. Certains types cellulaires sont moins sensibles que d'autres à l'effet de l'hyperthermie mais on ne sait pas si cette protection passe par des contacts cellulaires ou par l'effet de certaines molécules. En outre, l'effet du microenvironnement tumoral ovarien comme le stroma cellulaire n'est pas connu. A l'instar de la chimiorésistance [28], il semble légitime de supposer que le stroma pourrait être impliqué dans la sensibilité des cellules tumorales à l'hyperthermie. Résoudre cette équation pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies afin d'améliorer l'efficacité de la CHIP.

e) De la clinique à la recherche fondamentale et translationnelle :

Le cancer de l'ovaire pose donc plusieurs problèmes cliniques qu'il nous faudra résoudre afin d'améliorer le pronostic malheureusement encore sombre de ces patientes parfois jeunes. La première problématique concerne sa découverte tardive, au stade de carcinose péritonéale, sans outil diagnostique actuellement efficace. Cette problématique clinique de dépistage

et de diagnostic va de pair avec la compréhension des mécanismes de dissémination métastatique péritonéale qui peut parfois être très rapide. Cette voie de recherche implique en réalité aussi bien le développement d'une carcinose péritonéale que la compréhension des mécanismes de développement de la maladie résiduelle péritonéale après traitement par chirurgie et/ou chimiothérapie.

Le second problème majeur dans le cancer de l'ovaire est la survenue de récurrences souvent chimiorésistantes après chimiothérapie malgré une bonne réponse initiale. Cette résistance au traitement est donc également un axe important de la recherche fondamentale et translationnelle dans le cancer de l'ovaire. Les mécanismes moléculaires permettant la survie des cellules tumorales sous traitement constitue donc un enjeu majeur dont dépendent le développement des futures thérapeutiques dans le cancer de l'ovaire.

II- Un environnement permissif est nécessaire pour le développement tumoral :

Le développement tumoral est-il lié au hasard ? Pourquoi une tumeur va s'implanter dans un organe plutôt qu'un autre, puis par la suite métastaser dans un organe plutôt qu'un autre ? Ces questions simples sont en réalité majeures dans la compréhension de la biologie tumorale. Elles ont d'ailleurs été posées il y a plus d'un siècle par Stephen Paget qui nous donne les premiers éléments de réponse dans ses travaux.

a) La théorie du « seed » and « soil » :

Alors que la théorie dominante à cette époque est celle développée par Virchow selon laquelle les métastases s'expliquent par l'embolie des cellules tumorales au niveau des arbres vasculaires capillaires [29], Stephen Paget, chirurgien anglais formule sa théorie du « seed » and « soil ». En 1889, il publie une étude dans le Lancet, basée sur l'autopsie de 735 patientes atteintes de cancer du sein et montre une absence de corrélation entre le degré de perfusion des organes et leur susceptibilité aux métastases. Il constate une haute incidence des métastases au niveau du foie, des ovaires, des os, et au contraire peu, voire pas, de métastases au niveau de la rate [30]. Il constate donc la nécessité pour le développement tumoral (la graine) d'un environnement permissif (le sol) qui est la base de sa théorie de la graine et du sol. Cette théorie, un temps contestée, a finalement été validée à partir des années 70 par les travaux de Fidler et al. [31], ainsi que de Hart et al. [32]. En effet, si les cellules tumorales circulent au travers de l'ensemble du réseau vasculaire, le développement métastatique reste contraint à certains organes spécifiques [31, 32].

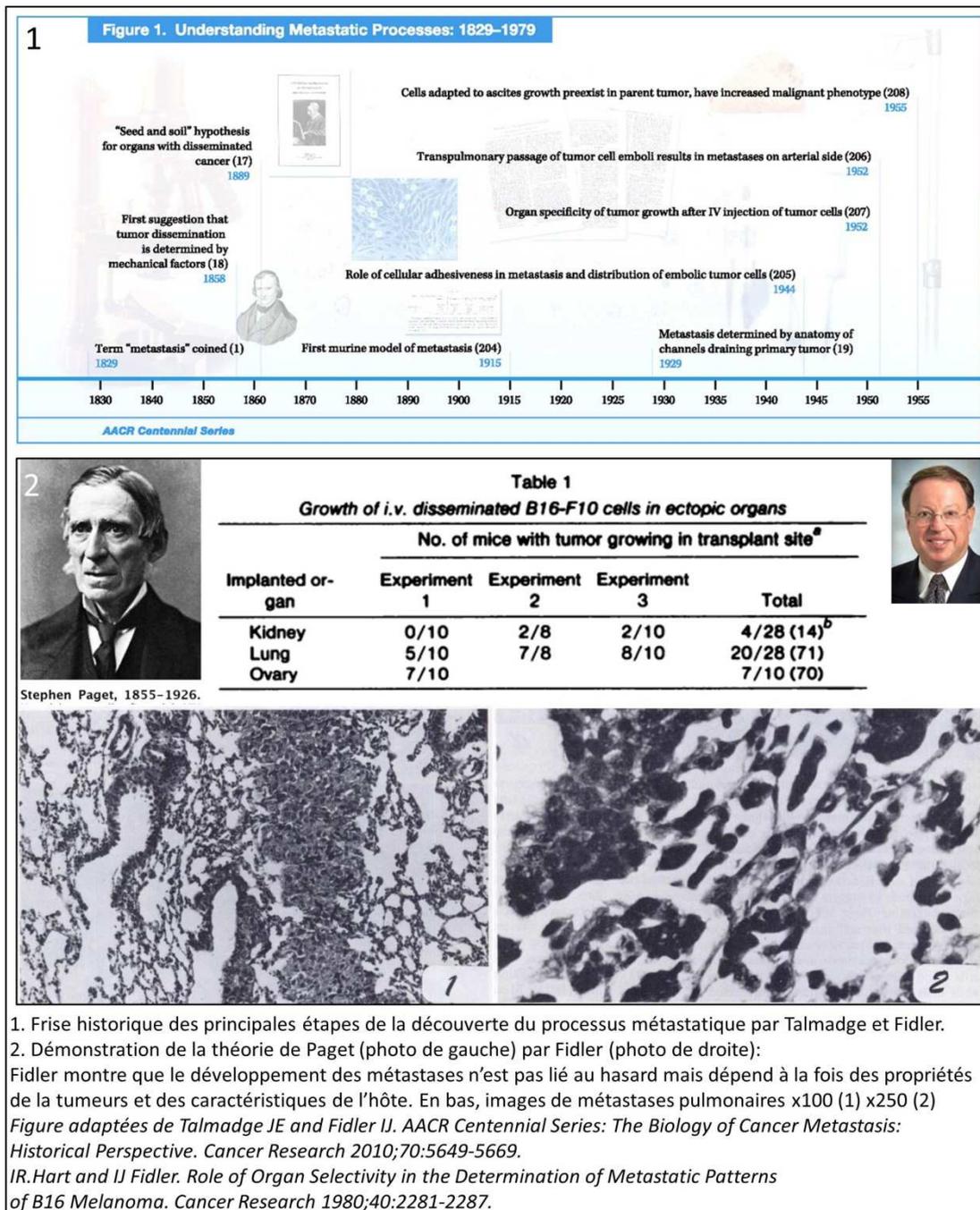


Figure 6 : Travaux ayant permis la compréhension du processus métastatique et de confirmer la théorie du « seed and soil »

b) Application à la métastase ovarienne :

Près d'un siècle après les travaux de Paget, l'étude de Tarin de 1984 est une parfaite illustration de la théorie du « seed and soil » dans le cancer

de l'ovaire. A cette époque, l'introduction du shunt péritonéo-veineux pour les patients atteints de cancer pelvien avec ascite réfractaire a permis une observation chez l'homme du processus métastatique. Les shunts mis en place étaient nécessairement unidirectionnels avec une valve à sens unique et sans aucun filtre qui serait à l'origine d'une obstruction rapide de l'anastomose (Figure 7) [33]. Parmi les 27 patients de sa série, 15 ont été autopsiés après leur décès, dont 9 patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Tarin n'observe alors pas plus de métastases chez ces patients et ceux malgré les millions de cellules tumorales déversées dans leur circulation générale [33]. Il observe même plus de la moitié de ces patients sans métastase malgré parfois une survie longue jusqu'à 27 mois avec shunt en place (dont 6 patientes avec cancer de l'ovaire). Chez certains patients, il observe quelques cellules tumorales dans les tissus sans métastase développée. Chez d'autres, les métastases se sont développées dans d'autres organes que ceux contenant les premiers capillaires traversés par les cellules tumorales. Tarin a même quantifié le contenu de chaque ascite en cellules tumorales et vérifié la viabilité de ces cellules : il retrouve entre 1 et 60 millions de cellules tumorales viables pour 100mL d'ascite. Enfin, il a testé la capacité de formation de colonies dans de l'agarose et retrouve une clonogénicité de 1/1000 à 1/10000 [33]. Cette étude est donc majeure dans la compréhension des mécanismes de formation de la métastase chez l'homme et confirme bien que ce processus n'est pas lié au hasard mais est le résultat d'un mécanisme impliquant à la fois les cellules tumorales et son hôte.

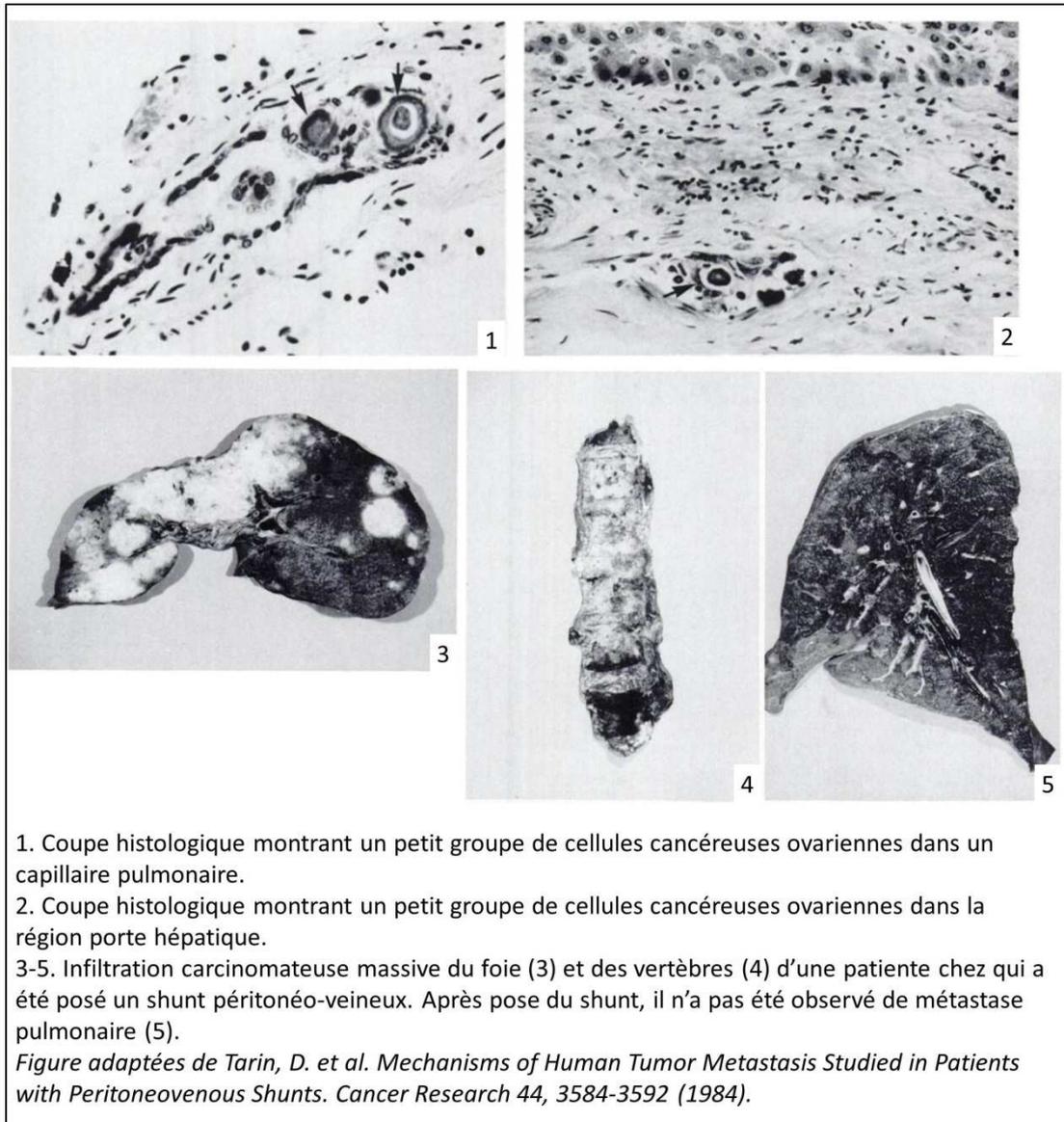


Figure 7 : Etude anatomique et histologique chez des patients traités par shunt péritonéoveineux pour ascite réfractaire [33]

c) Théories actuelles des mécanismes de la dissémination métastatique :

Il est actuellement communément admis que la métastase n'est pas liée au hasard mais bien déterminée par les caractéristiques de la tumeur et de son hôte au cours d'une cascade « invasion-métastase » [34]. Ce sont les transformations génétiques et épigénétiques de la tumeur et des cellules stromales environnantes non tumorales qui sont à l'origine de la progression

tumorale. Valastian et Weinberg décrivent les étapes de cette cascade (Figure 9) dont je vais détailler les quelques étapes clés permettant d'introduire la problématique de la dissémination tumorale dans le cancer de l'ovaire [34].

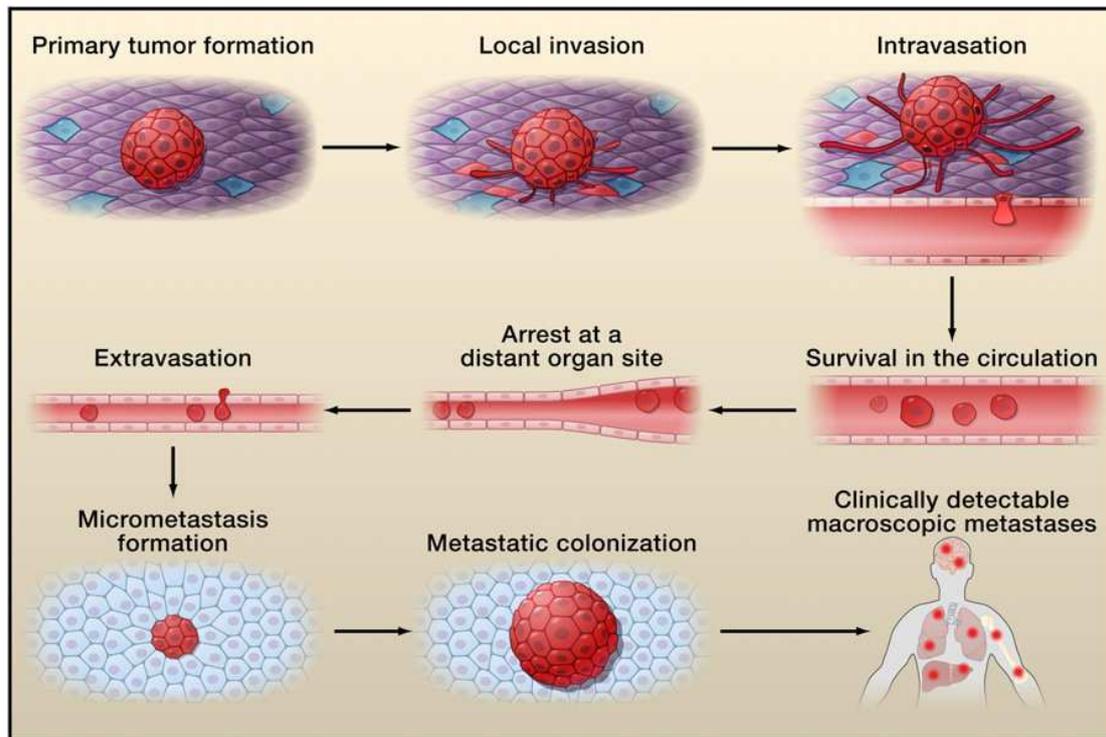


Figure 8 : Les étapes de la cascade « invasion-métastase » selon Valastian et Weinberg [34]

- L'invasion locale :

Les cellules tumorales sont tout d'abord confinées à leur tumeur primaire au sein d'un stroma associé à la tumeur puis du parenchyme tissulaire normal. L'invasion locale débute nécessairement par la rupture de la membrane basale (MB) permettant l'accès au stroma. Cette membrane extra-cellulaire qui définit la limite entre le compartiment épithélial et stromal,

contient de nombreuses cytokines et facteurs de croissance qui peuvent être libérées par les protéases sécrétées par la tumeur. De plus, elle joue également un rôle crucial dans la transmission de signaux tumoraux au sein des cellules tumorales via des voies d'activation initiées par l'adhésion médiée par les intégrines, des cellules à la matrice. Ces interactions sont à l'origine de modifications de la polarité cellulaire, de prolifération, invasion et survie des cellules tumorales [35]. L'organisation épithéliale joue d'ailleurs un rôle de protection tumorale comme nous le verrons plus bas avec la barrière mésothéliale au sein du péritoine [36].

J.P. Thiery a décrit le processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT) aboutissant à la dissolution des jonctions étroites médiées par les Cadhérines existantes entre les cellules épithéliales, avec une perte de la polarité cellulaire et l'acquisition de caractéristiques mésenchymales sont un fort potentiel invasif [37]. On remarque cependant une contradiction dans le cancer de l'ovaire où les cellules tumorales ont au contraire une expression renforcée du phénotype épithélial par rapport à l'épithélium normal. En effet dans le programme d'EMT, les cellules suppriment l'expression des marqueurs épithéliaux pour les remplacer par des marqueurs mésenchymateux [37]. C'est ensuite la perte de la barrière que constitue la membrane basale qui permet l'invasion stromale par les cellules tumorales. Cette destruction est médiée par les métalloprotéases (MMPs), permet par la suite la libération de facteurs de croissance.

Une fois l'accès possible au stroma, les cellules tumorales sont confrontées à une variété importante de cellules mésenchymateuses. Au départ, le stroma réagit de la même manière que lors d'une blessure ou d'une

inflammation chronique [38]. Dans ce stroma réactionnel, les cellules tumorales rencontrent des fibroblastes, cellules endothéliales, adypocytes, de nombreuses cellules dérivées de la MO comme les cellules souches mésenchymateuses, des macrophages et autres cellules immunitaires (Figure 9) [39]. Il s'engage alors un véritable dialogue entre les cellules tumorales et les cellules stromales, médié par cytokines et autres facteurs de croissance. Par exemple dans le cancer du sein qui est un des exemples de carcinome dont la physiopathologie est la mieux connue, les adipocytes augmentent l'invasion des cellules carcinomateuses mammaires par la sécrétion d'IL6 [40]. Les macrophages associés à la tumeur (TAMs) permettent également une activation du récepteur à l'EGF (EGFR) des cellules carcinomateuses [41]. En réponse ces dernières activent l'activité protéasique de la cathépsine des TAMCs par la sécrétion d'IL4 [42]. Ces exemples démontrent le caractère bidirectionnel des interactions entre les cellules tumorales et le stroma environnant : les cellules tumorales favorisent la formation d'un stroma inflammatoire et ce dernier augmente l'agressivité tumorale, établissant ainsi une boucle d'activation auto-entretenu. D'ailleurs une modification profonde au niveau du génome des cellules stromales a été rapportée. Finak a montré un profile pro-métastatique du stroma associé à la tumeur dans le cancer du sein [43].

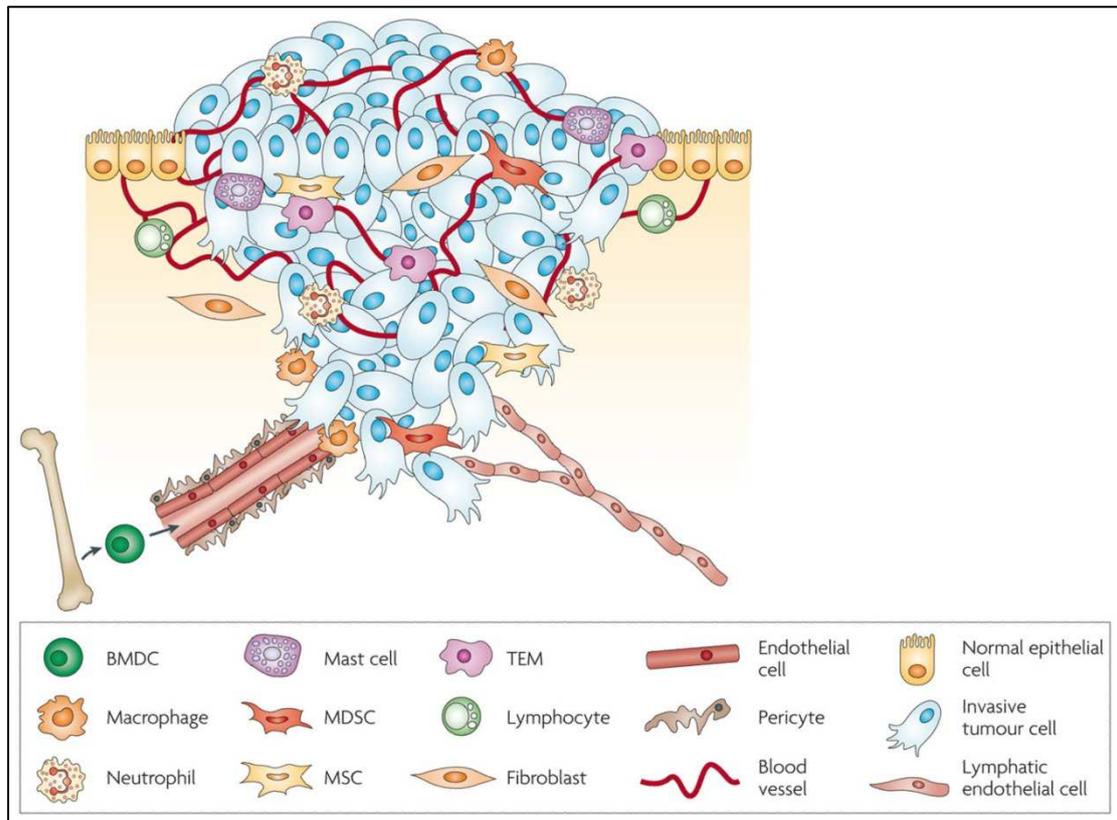


Figure 9 : Microenvironnement de la tumeur primaire selon Joyce and Pollard [39]

Une fois la tumeur primaire développée au sein d'un environnement permissif et favorable, la dissémination va se faire de différentes façons mais l'exemple de la formation métastatique illustre bien la modification par la tumeur de son environnement.

- **La formation de la métastase tumorale :**

La formation de la métastase a pour caractéristique l'envahissement par la tumeur d'un tissu différent de l'organe primitif. Dans le cas du cancer de l'ovaire, l'ovaire et le péritoine ont la même origine embryologique mais ces deux tissus n'ont pas le même environnement, la même architecture et

n'abritent pas les mêmes types cellulaires. Dans le but de former des micrométastases, les cellules tumorales doivent donc survivre dans cet environnement différent.

Lyden décrit la formation première d'une niche pré-métastatique avant même la colonisation tumorale [44]. Des signaux libérés par les cellules tumorales permettent une augmentation de la production de fibronectine localement par les fibroblastes résidents dans le tissu [45]. Les progéniteurs de la MO, par une sécrétion de MMP9, permettraient une libération du stromal cell-derived factor 1 (SDF1), chimioattractant pour les cellules tumorales [44]. Tout ce processus se déroulant avant l'arrivée des cellules tumorales métastatiques, permettant de préparer un environnement plus « accueillant » pour les cellules carcinomateuses. C'est ce qui explique que le processus métastatique ne se fasse pas par hasard mais dans des sites prédéfinis par l'établissement d'une niche pré-métastatique. Cette préparation est en fait la condition *sine qua none* de la formation et de la survie de la micrométastase. C'est ensuite la cellule tumorale qui va devoir adapter son programme cellulaire aux demandes du nouvel environnement. Un exemple est la métastase osseuse dans le cancer du sein ou l'activation de la voie d'activation de la tyrosine kinase Src en réponse au SDF-1 va rendre possible la survie cellulaire. L'inhibition de Src a pour effet d'empêcher la métastase osseuse dans le cancer du sein mais son activation ne permet pas pour autant le développement d'autre localisation métastatique comme le poumon [46].

Une fois la micrométastase établie, ce n'est pas pour autant que la métastase va se développer et croître. C'est même une stabilisation qui est le

plus souvent observée. En effet, le contingent de cellules métastatiques a une survie limitée. Chambers décrit la persistance de petites colonies micrométastatiques latentes ou en dormance [47]. Dans le cancer du sein c'est même l'incapacité à activer certaines voies d'activation au sein du tissu distant qui explique cette quiescence [48]. C'est encore une fois la nécessité d'établir autour de la tumeur une niche hospitalière qui va permettre aux cellules carcinomateuses d'échapper à la quiescence et permettre leur prolifération. Une autre explication de la non augmentation tumorale même en cas de prolifération des cellules tumorale est le défaut de vascularisation aboutissant à un taux important de mort cellulaire. Les cellules stromales peuvent par ce biais empêcher le développement tumoral comme décrit dans le cancer de prostate par une sécrétion de thrombospondin-1 qui a un rôle anti-angiogénique [49]. Inversement, dans le cancer du sein, c'est la sécrétion d'Angiopoïétine 2 par les cellules stromales dérivées de la MO qui va permettre la croissance tumorale en favorisant la vascularisation des nodules métastatiques [50].

La dissémination métastatique est donc régie par des modifications à la fois du tissu hôte et des cellules carcinomateuses et n'est absolument pas liée au hasard. Comme l'avait observé Stephen Paget il y a 120 ans, la dissémination métastatique n'est pas déterminée par la disposition anatomique vasculaire ou l'agencement des différents tissus ou organes les uns par rapport aux autres. Ces notions, mises en évidence dans les différents types de tumeurs épithéliales, sont également la base des travaux menés dans le champ de la recherche sur le cancer de l'ovaire.

III- Le développement tumoral ovarien au sein du microenvironnement péritonéal:

Le péritoine est une structure faisant intégralement partie du microenvironnement tumoral de l'ovaire. Le péritoine est constitué d'une couche de cellules mésothéliales et recouvre les organes abdominaux (péritoine viscéral) ainsi que les parois pelviennes et abdominales (péritoine pariétal). Il est attaché à une membrane basale recouvrant un stroma d'une épaisseur variable contenant du collagène, des vaisseaux, des lymphatiques et fibres nerveuses (6,7). Le péritoine permet une mobilisation rapide des mécanismes inflammatoires permettant de circonscrire une plaie ou une infection. Plusieurs cytokines et chemokines ont été identifiées dans l'ascite des patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Parmi elles on retrouve : TGF β , IL10, IL6, TNF α , CSF1 et IL1 [51-54] ainsi que l'IL8 (CXCL8), Rantes (CCL5) et SDF1 (CXCL12).

a) La barrière mésothéliale :

La couche mésothéliale du péritoine a pour fonction la protection contre les agresseurs que sont les cellules tumorales. Kenny montre pourtant leur disparition en cas d'envahissement péritonéal (Figure 10) [55]. En effet, il remarque une disparition des cellules mésothéliales au niveau des nodules tumoraux alors qu'elles sont présentes autour, là où il n'existe pas de cellule tumorale.

A Normal intra-abdominal peritoneum



B Human ovarian cancer metastasis

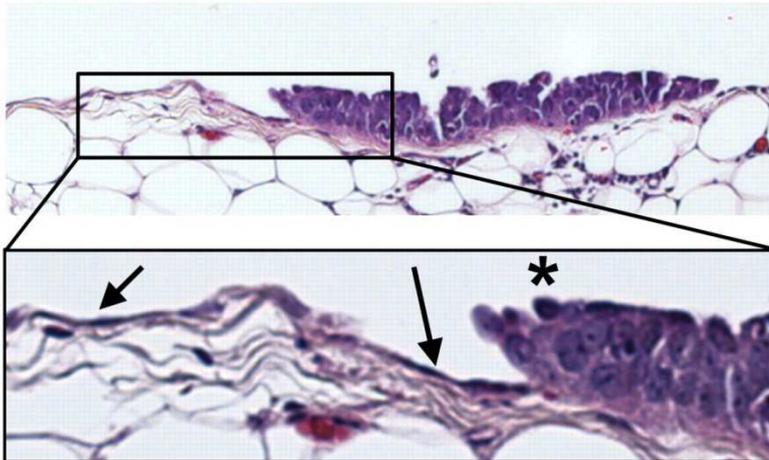


Figure 10 : disparition de la couche cellulaire mésothéliale lors de l'envahissement péritonéal selon Kenny et al. [55]

Iwanicki a récemment démontré comment les cellules tumorales organisées en agrégats, utilisent la force générée par la myosine pour créer une brèche au sein de la couche mésothéliale et accéder à la membrane basale. Les auteurs montrent en fait la nécessité pour les cellules tumorales en agrégats d'exprimer la myosine et les intégrines pour permettre ce nettoyage cellulaire [36]. Dans un autre modèle d'envahissement péritonéal, d'autres auteurs ont proposé un mécanisme de clivage des protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC) comme la vitronectine et la fibronectine par les métalloprotéases (MMP-2) [56]. Ces mécanismes permettant la destruction de la barrière mésothéliale sont nécessaires aux cellules tumorales pour accéder à la matrice extra-cellulaire et débiter l'infiltration tissulaire.

b) Le paradoxe des cellules souches mésenchymateuses (MSC) :

- *Une graine multipotente :*

Une fois la couche mésothéliale passée, les cellules tumorales accèdent à la matrice extra-cellulaire (MEC) composée d'un microenvironnement riche en cytokines et cellules. Ces cellules comprennent les cellules immunitaires avec notamment les monocytes, macrophages et cellules dendritiques, les cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes et les cellules souches mésenchymateuses (MSC), les cellules endothéliales constituant les vaisseaux et capillaires sanguins.

Les MSC ont la particularité d'être utilisées dans le champ de la régénération tissulaire et sont nommées ainsi pour la première fois par Caplan en 1991 [57]. On peut tracer le concept de MSC aux classiques expériences de transplantation de moelle osseuse (MO) en dehors de l'os mettant en évidence la régénération d'os et de moelle. Si ces expériences ont débuté en 1869, ce sont les travaux de Tavassoli et Crosby près d'un siècle plus tard en 1968 [58], qui apportèrent la preuve d'un potentiel ostéogénique associé à la MO, sans encore pouvoir les identifier les MSC puisque ils étaient réalisés avec des fragments entiers de MO en dehors de l'os. Ce sont ensuite les travaux de Friedenstein dans les années 60 et 70 [59, 60] qui permirent d'isoler une sous-population minoritaire de cellules au sein de la MO avec un potentiel ostéogénique. Ces cellules se distinguaient de la majorité des autres cellules hématopoïétiques par leur rapide adhérence en culture et leur aspect « fibroblast-like » de leurs cellules filles en culture,

trahissant ainsi leur appartenance au compartiment stromal de la MO. La seconde avancée de Friedenstein a été de montrer le caractère clonale des colonies formées par ces cellules, en ensemençant des suspensions cellulaires de MO à des densités différentes. Il obtenait alors des petites colonies initiées par des cellules uniques (CFU-F : colony-forming unit fibroblastic) dont il put démontrer le caractère clonal par la relation linéaire entre la formation de colonie et le nombre de cellules explantées ainsi que l'utilisation de marqueurs chromosomiques comme la thymidine tritiée [60]. Enfin, les transplantations in vivo ont permis la mise en évidence de la régénération possible de multiples tissus tels que l'os, le cartilage, le tissu adipeux et le tissu fibreux par la culture d'une seule cellule stromale de MO [60], que Friedenstein et Owen ont appelé cellule souche ostéogénique ou cellule souche stromale de MO [60]. Ces cellules souches non hématopoïétiques, plus largement connues par la suite sous le nom de cellules souches mésenchymateuses (MSC), suscitèrent un grand engouement à travers le monde en devenant une des cellules souches post-natales humaines, au même titre que les cellules souches hématopoïétiques (HSC). En général, les MSC représentent une fraction minoritaire des cellules de la MO et des autres tissus [61]. La proportion exacte est difficile à calculer en raison des différentes méthodes d'isolation et de séparation, mais elle est estimée dans la MO à 1/10000 cellules nucléées chez un nouveau-né contre 1/1000000 chez une personne âgée de 80 ans [62]. La multipotence est une caractéristique définissant la MSC, c'est-à-dire sa capacité à se différencier en plusieurs lignées mésenchymateuses que sont l'os, le cartilage, le tendon, le muscle, le stroma médullaire et le tissu adipeux (Figure 11) [62-64].

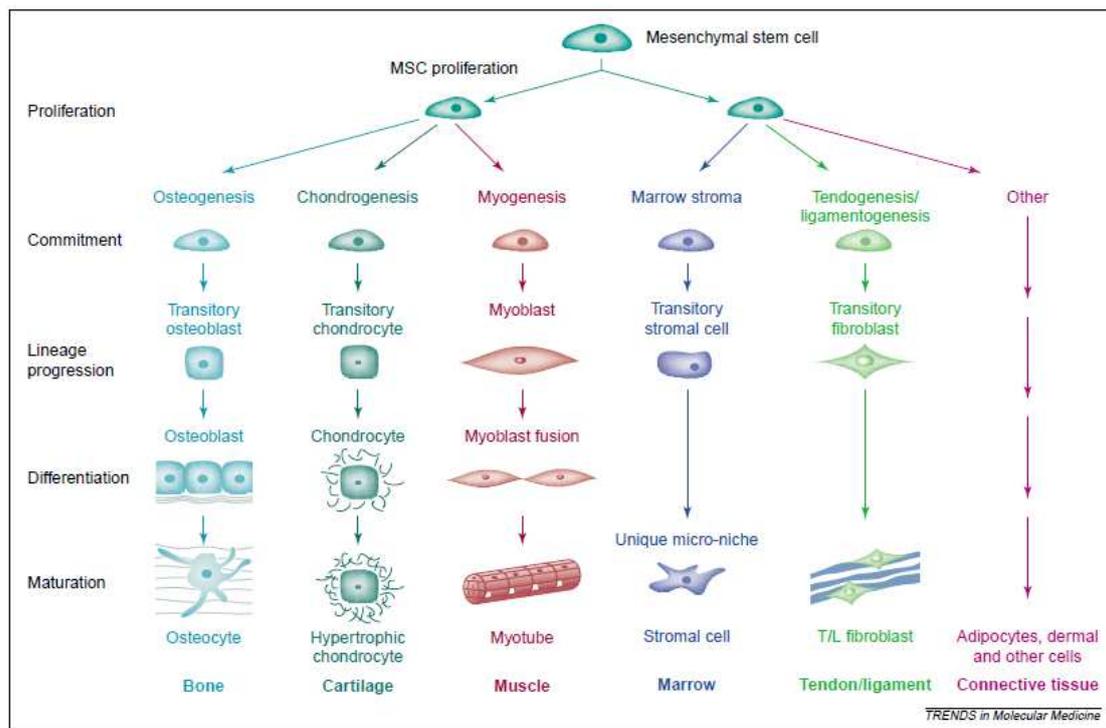


Figure 11 : Les étapes de différenciation des MSC, du mieux connu (à gauche) au moins étudié (à droite)[65]

Chaque lignée peut être induite par des conditions de culture particulières. Par exemple, la différenciation osseuse peut être induite par la présence de dexamétasone, d'acide ascorbique, et de β -glycérophosphate [66]. La différenciation adipeuse peut être induite par la présence de dexamétasone, d'insuline, d'indométhacine, et 1-méthyl-3-isobutylxantine [66]. Enfin, la différenciation chondrocytaire est, elle, obtenue après culture des MSC en culots en l'absence de sérum et en présence de transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) and bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) [67, 68]. Classiquement, par définition les MSCs doit avoir les mêmes propriétés que les HSCs :

- Caractère souche testé par expériences de transplantation in vivo ;
- Multipotence testée obligatoirement au niveau d'une cellule unique ;
- Autorenewement qui implique la reconstitution d'une population de cellules souches identiques par leur phénotype et leur fonction que la cellule initialement transplantée.

Cette définition qui peut être aisément vérifiée dans le cas des HSCs en raison de leur facile isolation, d'un renouvellement extrêmement rapide et continu du pool des cellules sanguines, et d'une distribution systémique et non tissu spécifique [69], est beaucoup plus difficile dans le cas des MSCs. En effet, l'autorenewement de certaines cellules souches peut être très long, et cela en rapport avec le renouvellement du tissu dont elle est issue comme pour le squelette qui n'est renouvelé que 3 à 5 fois dans la vie d'un homme contre tous les 30 jours pour la peau.

Cependant récemment, la plasticité de ces cellules a permis d'aller au-delà des concepts admis jusqu'alors, permettant d'obtenir des tissus en dehors du lignage mésodermique mais également du lignage endodermique et neurodermique. En effet, différents travaux ont permis d'obtenir des neurones [70], des hépatocytes [71, 72] et de l'endothélium [65], remettant en cause le nom et concept de MSC comme cellules progénitrices stromales pures. De nouvelles entités telles que « multipotent adult progenitor cells » (MAPCs),[73] « human BM-derived multipotent stem cells » (hBMSCs),[74] « marrow-isolated adult multilineage inducible » (MIAMI) cells,[75] « very small embryonic-like stem (VSEL) cells » [76] ou encore « unrestricted somatic stem cells » (USSCs) [77]. La question de l'existence d'une

population cellulaire souche stromale homogène présente dans de multiples tissus mésenchymateux reste donc ouverte.

Pour unifier ces différents modèles, Bianco [69] présente la théorie des péricytes où les progéniteurs post-nataux sont recrutés dans les tissus par le même mécanisme que le recrutement des péricytes autour des microvaisseaux naissants (Figure 12). Dans cette théorie, le caractère souche des cellules recrutées s'explique par un mécanisme développemental où est satisfait le besoin local en cellules tissu spécifique comme les cellules musculaires dans le muscle, etc... [78]. Ces cellules seraient donc bloquées dans leur croissance jusqu'à un signal de prolifération et différenciation lors d'un besoin local de régénération ou réparation en fonction des besoins physiologiques, ou expérimentalement lorsque qu'elles sont explantées in vitro et forment les CFU-F. Alternativement, lorsqu'elles ne se différencient pas, ces cellules souches tissu-spécifique pourraient supporter la régénération d'autres types cellulaires locaux, comme observé dans la MO. Bianco propose donc la dénomination de « skeletal stem cell » de manière cohérente avec la nomenclature utilisée par les hématologistes. Les expériences in vitro permettant d'obtenir des colonies clonales devraient faire référence à une « CFU-F », en ajoutant la provenance tissulaire de la cellule initiale, comme BM-CFU-F pour la MO ou AT-CFU-F pour le tissu adipeux [69].

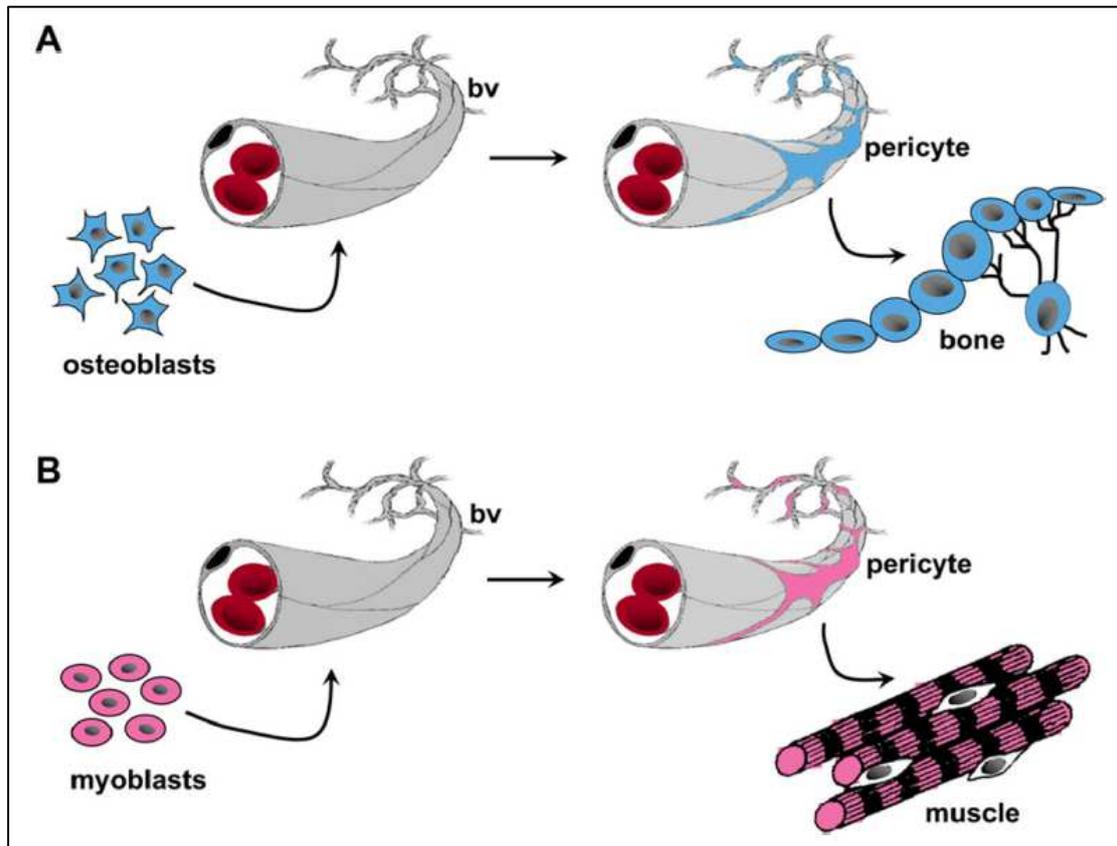


Figure 12 : Modèle proposant les péricytes comme réservoir de progéniteurs tissus spécifiques [69]

Les marqueurs présents à la surface de ces cellules ont été définis pour la plupart des études in vitro sur des cellules en culture, avec des cellules isolées principalement sur la base de leurs propriétés d'adhérence et leur potentiel de différenciation [61]. Les MSC en expansion ex vivo ont été caractérisées phénotypiquement sur la base de l'expression de marqueurs non spécifiques, dont CD105, CD73, CD90, CD166, CD44, et CD29 [62, 64] (Tableau 4).

Antigen	Expanded/ primary MSCs	Human/murine MSCs
CD105 (endoglin, SH2) ¹⁸⁻²⁰	Expanded	Human, murine
CD73 (ecto-5' nucleotidase, SH3, SH4) ¹⁸⁻²⁰	Expanded	Human
CD166 (ALCAM) ¹³	Expanded	Human
CD29 (β 1-integrin) ^{13,18-20}	Expanded	Human, murine
CD44 (H-CAM) ¹⁸⁻²⁰	Expanded	Human, murine
CD90 (Thy-1) ^{13,18-20}	Expanded	Human
TRA-1-81	Expanded	Human (placenta)
Sca-1	Expanded	Murine
STRO-1 ⁶⁶	Primary	Human (BM)
CD349 (frizzled-9) ⁶⁸	Primary	Human (BM, placenta)
SSEA-4 ⁶⁵	Primary	Human \pm (BM, placenta)
Oct-4 ³⁰	Primary	Human \pm (BM, placenta, fetal tissues)
Nanog-3	Primary	Human \pm (BM, placenta)
SSEA-1 ^{30,64}	Primary	Murine (BM)
CD271 (low-affinity nerve growth receptor) ^{67,69}	Primary	Human
MSCA-1 ⁶⁹	Primary	Human (BM)
CD140b (PDGF-RB) ⁶⁸	Primary	Human

Tableau 4 : Antigènes exprimés à la surface des MSC primaires et en culture

- Un sol pour les autres types cellulaires :

A côté de leurs propriétés de différenciation et de génération tissulaire, les BMSCs (Bone Marrow Stromal Cells ou MSC de la MO) sont connues pour être partie intégrante de la niche de la MO. Cette niche est en effet très importante dans l'homéostasie de la MO et régule les HSCs par des signaux spécifiques. Ainsi, il a été montré une augmentation du pool de HSCs par la production de kit-ligand soluble (sKitL), de thrombopoïétin, Flk-2, et angiopoïétin-like factors [79-82]. En plus de ces signaux, il semblerait également qu'un contact direct entre les HSCs et les cellules de la niche soit nécessaire pour assurer une survie à plus long terme des HSCs [82]. Ainsi, la niche ostéogénique composée des ostéoblastes et ostéoclastes a été décrite comme permettant le maintien des HSCs dans un état quiescent [83-86].

Enfin, les BMSCs sont également nécessaires au maintien du réseau de sinusoides de la MO [87]. C'est en effet à ce niveau qu'ont été localisées les BMSCs. Cette fonction est en réalité indissociable de la fonction de maintien de l'hématopoïèse qui est impossible sans le réseau de sinusoides de la MO, ou sont également situés les HSCs. On retrouve les BMSCs au niveau de la paroi des sinusoides et dans un modèle in vivo, ils précèdent l'établissement de l'hématopoïèse [87]. Ils régulent également la niche ostéoblastique par leur fonction de progéniteurs ostéogéniques, et sont donc impliqués dans cette voie de régulation décrite plus haut. Ces fonctions de maintenance et de véritable « nursing » cellulaire sont des fonctions clés qui expliquent de nombreuses observations impliquant ces cellules même en dehors de la MO, avec des effets bénéfiques aux tissus ou organes dans lesquelles elles sont transplantées [69].

c) Les cytokines permettent un dialogue entre les cellules tumorales et stromales :

La relation entre chimiokines et cellules cancéreuses semble être d'une importance de premier plan. Les chimiokines sont impliquées dans la croissance tumorale [88], dans l'angiogénèse [89], dans la réponse de l'hôte contre les cellules cancéreuses [90] et peuvent favoriser l'évolution des métastases en agissant directement sur la migration et l'invasion des cellules cancéreuses [91, 92]. Les chimiokines sont de petits peptides sécrétés qui contrôlent l'adhésion et la migration transendothéliale des leucocytes, particulièrement durant la réponse inflammatoire [93]. Elles sont composées

de 4 groupes : CC, CXC, C et CX3C, selon la position de leur résidu cystéine NH2-terminal et sont liées à un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Il existe de forts arguments pour penser que l'infiltration et la croissance des cellules cancéreuses est régulée par les chimiokines dérivées des tumeurs [94, 95].

En plus des effets des cytokines sur les cellules tumorales classiquement décrits, de nombreux auteurs se focalisent maintenant sur le rôle de premier plan de ces cytokines permettant un véritable dialogue entre les cellules tumorales épithéliales et les cellules stromales. Ces dernières sont en effet modifiées par l'environnement pro-inflammatoire ou « nuage cytokinique » mis en place par les cellules tumorales [96]. Le but de ce paragraphe n'est pas de citer de manière exhaustive toutes les cytokines connues mais de mettre en lumière les principales cytokines étudiées dans ce travail de thèse.

- **CXCL12 (SDF1) :**

Les cellules épithéliales tumorales des tumeurs ovariennes expriment fortement CXCL12 (SDF1). Contrairement à l'effet anti-tumoral de certaines chimiokines, SDF-1 permet dans les tumeurs solides d'augmenter le recrutement de cellules dendritiques plasmacytoïdes qui inhibent l'activité anti-tumorale des lymphocytes T (production d'IL10 et inhibition de la production d'IFN) [97]. Par ailleurs, SDF-1 joue un rôle important dans la tumorigénèse ovarienne. In vitro, il a été montré que SDF-1 stimulait la multiplication des cellules tumorales ovariennes, la production d'ARN messagers du TNF α et la migration des cellules tumorales [98]. Kryczek *et al.* ont montré que l'hypoxie dans un modèle tumoral d'adénocarcinome

ovarien induisait une production importante de CXCL12 (SDF-1) et de VEGF. Ces deux facteurs forment un axe angiogénique synergique pouvant induire une angiogénèse in vivo [99].

Dans un modèle de cancer de prostate, il a été montré que SDF-1 augmentait l'expression de CXCR4 par le biais d'une activation de NF- κ B ainsi que de la voie de signalisation des MAPK kinases MEK et ERK. Cette augmentation d'expression de CXCR4 est à l'origine d'une augmentation de l'adhésion à des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine et à une migration transendothéliale des cellules cancéreuses [100]. En outre, il semblerait que dans les carcinomes épithéliaux, la migration des cellules carcinomateuses induite par SDF-1 passe par l'activation d'Akt [101]. Cette activation de la voie Akt se ferait en fait par l'intermédiaire de la phosphorylation du récepteur de l'EGF dont la partie intra-cellulaire est liée à ces kinases [102]. Orimo et Weinberg montrent dans le cancer du sein que la sécrétion de SDF-1 par les fibroblastes associés à la tumeur augmentent la croissance et l'angiogénèse des tumeurs mammaires [103].

Des travaux récents mettent également en évidence le rôle de la prostaglandine E2 (PGE2) et de SDF1 dans le recrutement des cellules suppressives dérivées de la moelle osseuse (MSDCs) dans l'ascite par les tumeurs ovariennes [104]. Ils montrent en effet que l'inhibition de COX2 (qui permet la production de la PGE2) bloquait la production de SDF-1 dans les cancers ovariens et empêchait le recrutement des MSDCs connues pour faciliter la progression tumorale [104].

En résumé, SDF-1 facilite la progression tumorale par différents mécanismes complémentaires [105]: (i) en favorisant la survie et l'invasion cellulaire; (ii) en recrutant des cellules stromales facilitant ainsi indirectement la croissance tumorale et la métastase (comme les BMDCs); et (iii) en stimulant l'angiogenèse directement ou par effet paracrine.

- *IL6 et IL8 :*

L'IL6 et IL8 ont également déjà été étudiées dans le cancer du sein ou Ginestier montre leur implication dans le développement des cellules souches de cancer (CSC) [96, 106]. En effet, il existe un dialogue entre la cellule cancéreuse et sa niche dont des types cellulaires comme les fibroblastes ou les cellules souches mésenchymateuses (MSC) [96]. Ces dernières sont recrutées dans la moelle par l'intermédiaire d'un chimiotactisme médié par l'IL6 et permettent un renouvellement des CSC [96, 107]. Liu montre le dialogue médié par les cytokines existent entre les MSC et les cellules tumorales. L'IL6 et l'IL8 tiennent un rôle prépondérant dans ce dialogue en permettant l'autorenouveaulement des CSC (Figure 13). Il est intéressant de noter que pour dans ce travail, c'est l'IL6 qui permet le recrutement des MSC au sein des tumeurs mammaires et empêché par l'inhibition du récepteur de l'IL6 dans les MSC. Enfin, Ginestier montre que l'inhibition du récepteur de l'IL8 permet de depleter la populaon des CSC et d'induire une mort cellulaire des autres cellules [106].

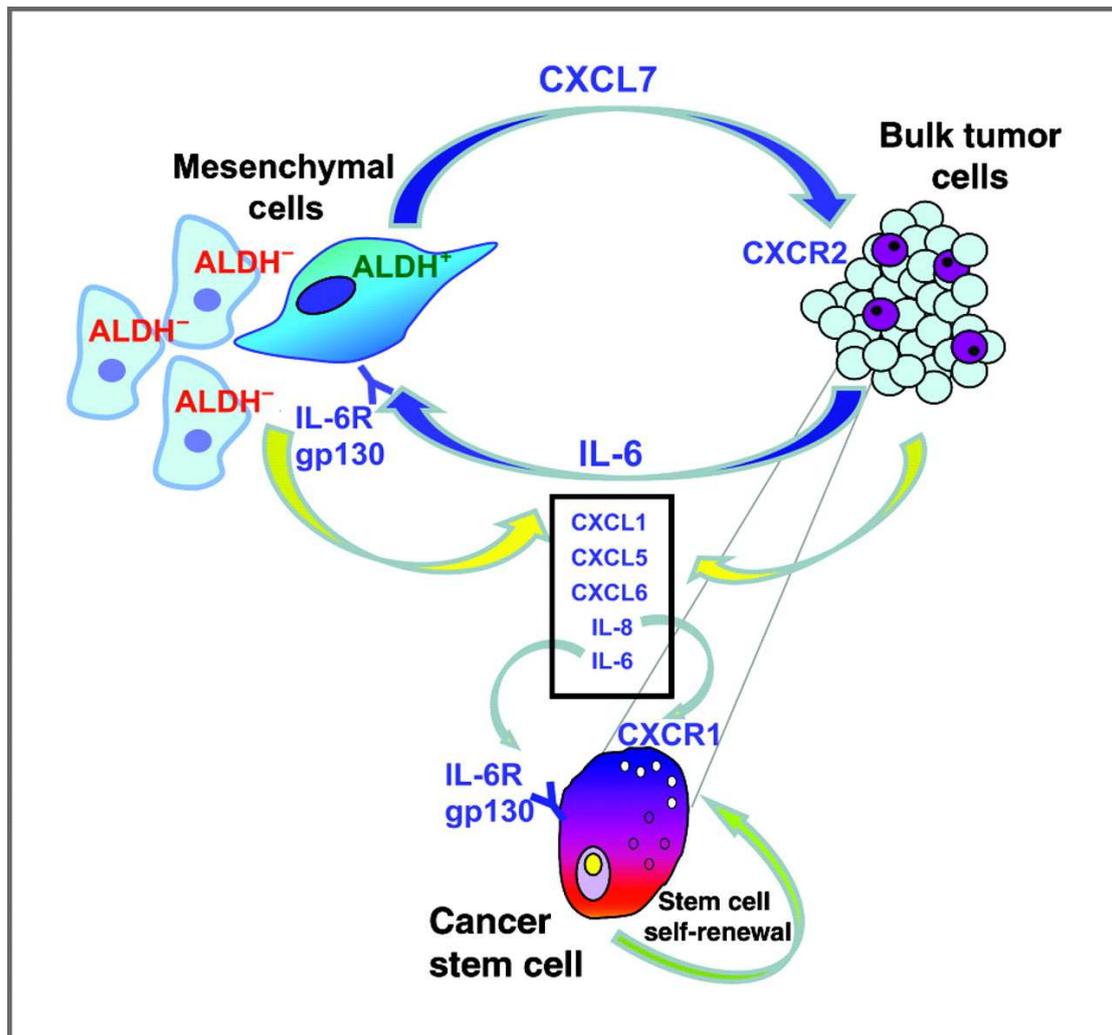


Figure 13 : Relations entre les cellules du stroma et les cellules tumorales selon Liu et al. [107]

Dans le cancer de l'ovaire il a été montré que la transformation des MSCs en fibroblastes associés à la tumeur était induit par l'acide lysophosphatidique (LPA) présent dans le microenvironnement tumoral ovarien [108]. C'est ce même LPA qui va induire une sécrétion d'IL6 et IL8 dans l'environnement tumoral qui vont entraîner à leur tour une augmentation de la mobilité des cellules tumorales ovariennes [109]. Cette observation va dans le même sens que celle de Spaeth et coll. qui montrent une augmentation de la croissance tumorale ovarienne sous l'effet de l'IL6 sécrété

après transformation des MSCs en fibroblastes associés à la tumeur [110]. Enfin, une équipe française a elle décrit l'influence des adipocytes transformés par les cytokines inflammatoires secrétées au contact des tumeurs mammaires, avec en particulier le rôle central de l'IL6 permettant d'augmenter les capacités pro-invasives des cellules tumorales mammaires [40].

Ces données vont donc toutes dans le même sens et mettent en évidence d'une part le rôle de médiateur central de l'IL6 et de l'IL8 entre les cellules tumorales ovariennes et les MSC. D'autre part, il ressort de l'IL6 une influence pro-tumorale claire en augmentant le recrutement des MSC, la croissance et la mobilité tumorale. Ces données font de l'IL6 et IL8 de bons candidats dans l'étude des interactions OCC – MSC.

- *Les autres cytokines :*

Nous avons vu précédemment que le recrutement des MSC dans le cancer du sein était médié par l'IL6. Dans le cancer de l'ovaire, ce recrutement semble lié à une sécrétion de LL37 (leucine, leucine-37) dans le microenvironnement tumoral ovarien [111]. Une fois recrutées, l'influence des MSC sur les cellules cancéreuses passe par la sécrétion de nombreuses cytokines. Dans le cancer du sein, Karnoub et coll. avaient montré l'importance de CXCL5 (Rantes) secrété par les MSC dans la dissémination métastatique des cellules tumorales mammaires [112]. Dans le cancer de l'ovaire, c'est l'équipe de Buckanovich qui a montré l'importance des MSC dans le maintien du compartiment souche des tumeurs ovariennes [113].

Dans leur modèle, ils montrent que les MSC associées au cancer (CA-MSC) diffèrent des MSC classique par leur comportement et les facteurs secrétés. En effet ces CA-MSC acquièrent des propriétés pro-tumorales. Ainsi, ils montrent que c'est la sécrétion de BMP2, 4 et 6 par les CA-MSC qui augmente le compartiment souche des cellules tumorales ovariennes [113]. Enfin, Charles et coll. montrent le rôle de chef d'orchestre du TNFa qui permet le recrutement de cellules myéloïdes dans les tumeurs ovariennes et une augmentation de la croissance tumorale, réversible par l'inhibition spécifique du TNFa [114].

Ces données montrent l'importance du réseau cytokinique dans l'action pro-tumorale des MSC. C'est notamment par la sécrétion de cytokines spécifiques que les MSC permettent de maintenir le compartiment souche des tumeurs ovariennes.

d) La théorie des cellules souches de cancer (CSC) :

La théorie de la cellule souche de cancer (CSC) dans le carcinome de l'ovaire s'est développée à l'instar des travaux réalisés dans le cancer du sein [106, 107, 115]. En 2003, les cellules tumorales CD24- CD44+ isolées à partir de carcinomes mammaires pouvaient en effet être transplantées en série in vivo et reconstituer la tumeur dont elles provenaient [115]. Les CSC ont ensuite été identifiées dans de nombreux cancers épithéliaux comme le mélanome, le colon, etc... [116-118]. Les CSC doivent répondre à 5 critères [119, 120]:

- Autorenouvellement

- Etre restreint à une minorité de la population cellulaire totale
- Capacité à reproduire le phénotype tumoral
- La différenciation en cellules non tumorigène
- Expression de marqueurs cellulaires distinctifs permettant leur isolation

Dans le cancer de l'ovaire, les travaux de Bapath et al. [121] ont permis l'isolation de 2 clones à partir d'ascites de patientes, capables de former des sphéroïdes en culture, similaires à ceux retrouvés dans les ascites de cancer de l'ovaire [121] +20. Ces clones cellulaires étaient capables de former des xénogreffes dans des souris nude transplantation après transplantation, et de reconstituer les caractéristiques histologiques des tumeurs mères [121]. Zhang identifie en 2008 CD117 (c-kit) et CD44 comme marqueurs permettant l'isolation des CSC dans l'ovaire [122]. Puis Kusumbe et Bapath se servent du PKH (PKH67/PKH26), un marqueur de la membrane cellulaire qui se lie à sa double couche lipidique, pour identifier une population de cellules répondant aux caractéristiques des CSC [123]. Enfin en 2011, Silva et al. affirment isoler les CSC ovariennes en se servant des marqueurs ALDH et CD133, comme précédemment dans le cancer du sein [107, 124, 125].

Plusieurs limitations à ce modèle peuvent être avancées dans le cancer de l'ovaire. La première concerne la méconnaissance de l'organisation hiérarchique du tissu ovarien. A l'inverse du sein où les travaux sur la physiologie du tissu normal ont précédé les recherches sur les cellules souches de cancer, les travaux dans l'ovaire n'ont pas permis d'élucider de manière claire cette organisation. La carcinogénèse ovarienne étant toujours actuellement débattue, l'origine de ce cancer est encore inconnue et ce ne

sont que des hypothèses mettant en avant une origine tubaire (cf infra). Le tissu ovarien est un organe complexe abritant de nombreux systèmes et types cellulaires différents. Il a en effet la particularité d'abriter les cellules de la lignée germinale, côtoyant les cellules de la granulosa, les cellules théquales, les cellules épithéliales, cellules de reliquats embryonnaires, etc... c'est donc un environnement complexes ou de nombreux types de cellules souches et progéniteurs sont impliquées dans différentes fonctions biologiques : de reproduction, endocrines, de soutien. Nous ne savons donc pas desquelles de ces cellules pourrait provenir la fameuse CSC dans le cadre du cancer de l'ovaire, contrairement à la CSC dans le cancer du sein qui est parfaitement identifiée dans l'organisation hiérarchique du sein.

D'ailleurs cette confusion se traduit par une multiplication des marqueurs proposés pour identifier une CSC ovarienne. Il n'existe actuellement par de consensus concernant les marqueurs à utiliser. La théorie de la CSC dans le cancer de l'ovaire est séduisante puisqu'elle permettrait d'expliquer le concept de maladie résiduelle microscopique et de récurrence sous la forme d'une maladie résistante au traitement à partir de quelques cellules seulement. Malheureusement, cette théorie n'est actuellement qu'une hypothèse qui devra être confirmée par d'autres travaux, en particulier une meilleure compréhension de l'organisation hiérarchique du tissu ovarien.

e) Signature génomique de la métastase ovarienne :

A l'instar des études moléculaires réalisés dans le cancer du sein permettant de mettre en place une classification moléculaire pronostique des cancers du sein [126, 127], plusieurs études ont recherché les profils

d'expression génomique associés à la survie globale, la survie sans récurrence ou à la réponse au traitement dans le cancer de l'ovaire.

Trois de ces études ont recherché des marqueurs associés à la survie globale ou à la survie sans récurrence. Spentzos et al. [128] ont identifié 115 gènes à partir de l'analyse d'un premier set de 34 échantillons tumoraux. Ces profils d'expression génomique leur ont permis de distinguer et ainsi définir deux groupes pronostiques sur 34 nouveaux prélèvements. Il est important de noter que le profil d'expression génomique associée à un bon pronostic dans cette étude n'était pas significativement lié à une plus grande chimiosensibilité. Le même groupe a réalisé une étude afin de rechercher le profil génomique relié à une chimiorésistance. Utilisant un premier set de 24 patients avec analyse de la tumeur initiale, ils ont mis en évidence un panel de 93 gènes permettant de faire la différence entre une population chimiosensible et une autre chimiorésistante (la chimiorésistance était définie par la présence d'une maladie résiduelle lors du second look).

Hartmann et al. [129] ont étudié le profil génomique associé à une récurrence précoces (>21 mois) et celui associé à une récurrence tardive (>21 mois) après chimiothérapie. L'analyse de 79 tumeurs de haut grade à un stade avancé leur a ainsi permis d'identifier 14 gènes prédictifs d'une récurrence précoce le taux de prédilection estimé dans cette étude était de 86%. Cependant il existe un important biais méthodologique dans cette étude rendant les résultats plus que discutables. En effet le set de patientes ayant servi à la détermination du groupe de 14 gènes et le set de patientes ayant servi à la validation des données n'étaient pas strictement indépendants, ce qui a probablement surestimé la capacité de prédiction du set de 14 gènes.

Les profils d'expression génomiques associés à la chimiorésistance ont été recherchés dans cinq autres études.

Certaines ont étudié cette chimiorésistance sur des lignées d'adénocarcinome ovarien. Crinjns et al. [130] ont pu ainsi identifier 315 gènes associés à la chimiorésistance à partir de quatre lignées différentes par leur degré de résistance au cisplatine. D'autres études se sont servies de prélèvements tumoraux de patientes dont le pronostic et la réponse à la chimiothérapie étaient connus pour identifier des profils d'expression génomique associés à la chimiorésistance. Ces profils d'expression étaient ensuite testés sur des groupes de patients dont le pronostic n'était pas connu pour évaluer leur précision. Helleman et al. [131] ont pu identifier un profil de 9 gènes à partir des tumeurs de 24 patients en fonction de leur réponse à la chimiothérapie. Ils ont ensuite validé cette batterie de gènes sur un groupe indépendant de 72 patientes par RT-PCR.

Dressman et al. [132] ont eux d'abord identifié 1727 gènes de prédiction de la réponse à la chimiothérapie à partir de 83 échantillons de cancer de l'ovaire à un stade avancé. Ce profil d'expression génomique a ensuite été appliqué à 36 échantillons tests avec une précision de 78%. Ils ont étudié en parallèle les voies potentiellement à l'origine la chimiorésistance. Ils ont ainsi pu identifier une activation des voies Src et Rb/E2F. Le profil d'expression génique prédictif d'une chimiorésistance a donc également servi à identifier les voies moléculaires impliquées dans cette chimiorésistance, ouvrant ainsi la voie à une prise en charge individualisée et adaptée à chaque patiente.

Dans toutes ces études, aucune signature génique commune n'a pu émerger, probablement à cause du caractère hétérogène du cancer de l'ovaire, du faible nombre de patientes par rapport aux études réalisées dans le cancer du sein et une hétérogénéité des techniques utilisées allant de la pureté de l'échantillon tumoral à l'utilisation de plateformes génomiques et d'algorithmes différents entre les études.

Plus récemment le Cancer Genome Atlas (The Cancer Genome Atlas, TCGA) a réalisé une étude de grande ampleur multicentrique de 489 adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade avec une analyse de la variation du nombre de copies des gènes, du transcriptome, du statut de méthylation des promoteurs ainsi que de l'expression des micro-ARN (miRNA) [133].

Les données de cette vaste étude confirme la prédominance de mutations sur le gène TP53 présentes dans 96% des échantillons testés et l'existence de mutations sur les gènes BRCA1 et BRCA2 dans 22% des tumeurs [133]. En outre, quatre sous-types d'adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade ressortent de l'analyse du profil d'expression des ARN messagers : 1) différencié, caractérisé par l'expression de MUC1, MUC16 et SLP1 ; 2) immunoréactif, caractérisé entre autre par l'expression de CXCL10, CXCL11 et CXCR3 ; 3) mésenchymateux, expression élevée des gènes de la famille HOX, ANGTL1 et 2 ; 4) prolifératif, avec une expression importante d'HMGA2, SOX11, MCM2, PCNA.

Cependant, Ces sous-types établis sur la base de l'étude transcriptomique ne parviennent pas à résumer des groupes pronostiques de

patientes [133]. Le TCGA sur la base des études transcriptomiques définit néanmoins une signature de 193 gènes capable de discriminer des groupes de patientes de bon et de mauvais pronostic [133]. La détection de ces signatures, au sein même de la tumeur primaire pourrait être en accord avec l'hypothèse de l'évolution clonale ; selon laquelle la malignité d'une tumeur est due à l'émergence de nouveaux clones issus d'une pression de sélection (modèle darwinien de l'évolution tumorale) [134-136]. Cependant, ces résultats peuvent aussi être interprétés selon un modèle prédéterminé, où le caractère métastatique serait un reflet de la malignité de la tumeur primaire [137]. Selon ce modèle, la malignité serait principalement conditionnée par l'action combinée des mutations qui participent à l'agressivité locale des tumeurs. Ainsi, selon le modèle prédéterminé, l'acquisition additionnelle de mutations n'aurait qu'un rôle complémentaire [136-138].

IV- Mécanismes de chimiorésistance :

a) Les résistances intrinsèques:

Comme rappelé au début de l'introduction, le traitement des cancers de l'ovaire est basé sur l'utilisation d'une chimiothérapie par carboplatine et taxol avant ou après la chirurgie [139-141]. Malgré une bonne réponse initiale, des résistances vont apparaître notamment à l'occasion de récurrences de la maladie et peuvent être acquises ou *de novo*. Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer les résistances acquises : 1) altérations de la membrane lipidique entraînant une diminution de la pénétration de la drogue dans la cellule; 2) augmentation de la capacité de réparation de l'ADN, entraînant une diminution ou une inhibition du phénomène d'apoptose; 3)

modifications de la cible de la drogue; 4) modifications de la drogue par des mécanismes dépendant de la métallothionéine et du glutathion; 5) Perte des récepteurs ou transporteurs de surface empêchant la drogue d'entrer dans la cellule; 6) efflux de la drogue à l'aide de pompes d'efflux (Figure 15).

Nous allons donc détailler ces mécanismes de chimiorésistance dans ce paragraphe.

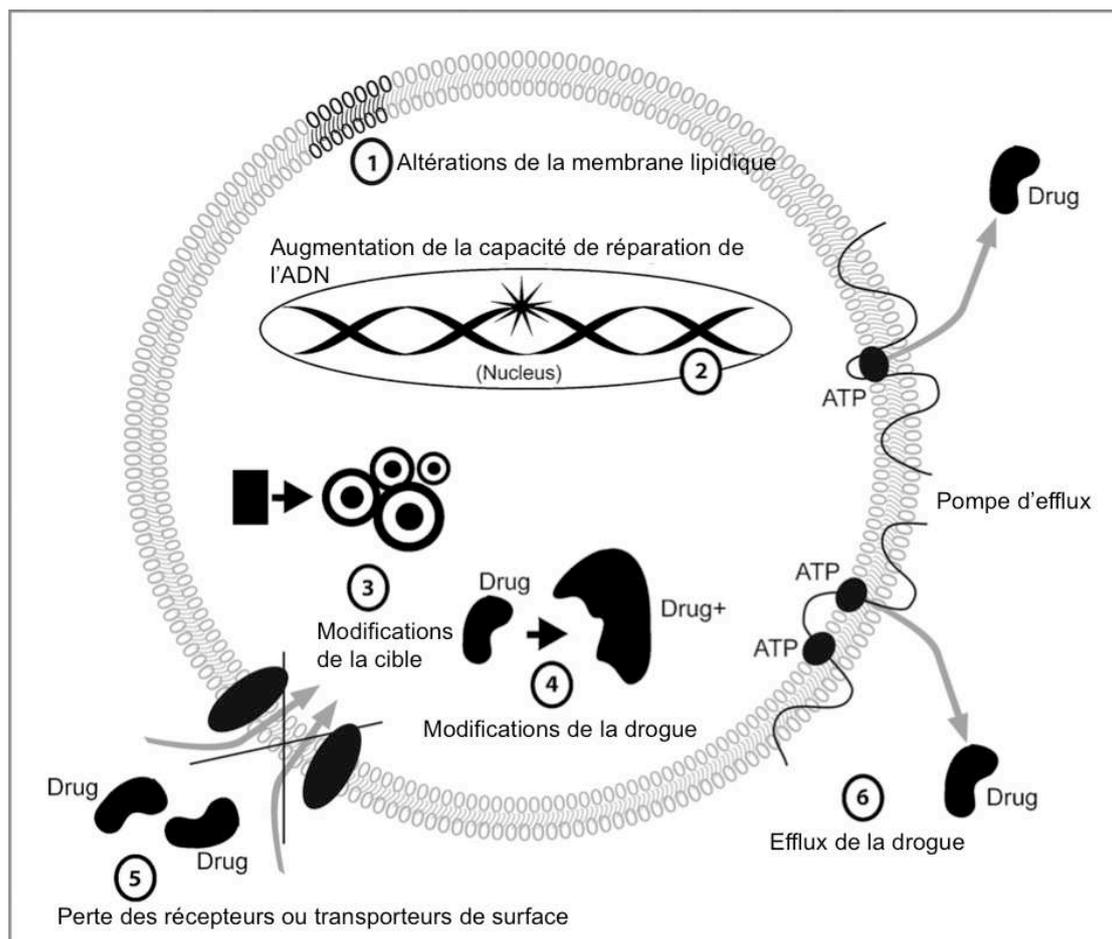


Figure 15 : Principaux mécanismes de chimiorésistance. Adapté de : Allen KE, Weiss GJ. *Mol Cancer Ther* 2010;9:3126-3136.

b) Résistances aux sels de platines :

- *Généralités.*

La découverte des propriétés antitumorales du platine a été fortuite. En 1965, Rosenberg a observé une inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* lorsque le milieu de culture contenait du chlorure d'ammonium et qu'il était soumis à un courant électrique établi entre deux électrodes de platine. Il montra que l'effet inhibiteur n'était pas dû au courant parcourant le milieu de culture mais à la formation d'un complexe entre le platine libéré par les électrodes et les molécules d'ammoniac et de chlorure du bain, c'est-à-dire par formation de dichlorodiamine-platine, produit connu depuis 1845.

Cette observation conduisit Rosenberg à étudier le cis-platine ainsi que d'autres complexes du platine et à mettre en évidence leur effet antinéoplasique chez l'animal puis chez l'homme. [142]. La formation d'adduits au niveau des bases puriques de l'ADN, adénine ou guanine, entraîne une inhibition de la réplication de l'ADN lors de la phase S et de la transcription de l'ADN en ARN [143]. La majorité des patientes atteintes de cancer de l'ovaire sont initialement bonnes répondeuses au cisplatine, cependant les récurrences sont fréquentes et souvent sous une forme chimiorésistante dont les principales causes sont résumées dans la Figure 15.

- *Augmentation de la réparation de l'ADN :*

Le mécanisme principal de réparation de l'ADN sollicité lors d'un traitement par cisplatine dans le cancer de l'ovaire est l'excision de nucléotide ou « Nucleotide Excision Repair » (NER). C'est donc ce mécanisme qui peut

être sollicité dans les cellules résistantes au traitement. L'enzyme la plus étudiée permettant l'augmentation des NER est la protéine d'ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation group 1), dont l'activité est augmentée chez les patientes résistantes au cisplatine [144]. Chez ces patientes il existe en effet une augmentation de ERCC1 mais également des autres enzymes comme XPA (Xeroderma Pigmentosum, complémentation group A) nécessaires au phénomène de NER [144-146].

- *Modification de la cible:*

C'est la formation d'adduits sur les macromolécules d'ADN qui va entraîner l'inactivation des complexes de platines, en particulier sous leur forme ionique (Pt^{2+}) [147].

La métallothionéine (MT) est une protéine de bas poids moléculaire, présentant de multiples résidus cystéine et qui permettent la chélation d'un ensemble d'ions métalliques. Le platine est en fait retenu comme d'autres espèces métalliques toxiques grâce à l'activité enzymatique de la MT qui permet de réguler les quantités de certaines molécules comme le zinc ou le cuivre au sein du cytoplasme et dans le noyaux [148]. La chélation du cisplatine par la MT est donc essentielle à sa régulation en permettant la transformation jusqu'à cinq molécules de cisplatine [149]. La relation entre l'expression de la MT et la sensibilité aux sels de platines a été démontrée sur des cellules en culture [150].

Cependant, cette corrélation entre MT et sensibilité aux platines n'est pas retrouvée de manière aussi nette dans les essais cliniques utilisant du

cisplatine chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire. Qualitativement il semblerait toutefois que c'est la situation nucléaire de la MT plus que son expression qui serait associée avec les patientes non répondeuses ou moins bonne répondeuses au platine, définissant ainsi un critère pronostic indépendant [151].

La conjugaison du Gluthation au cisplatine est réalisée par la Gluthation-S-Transferase (GST) et permet également l'élimination du cisplatine comme d'autres espèces électrophiles hautement réactives [152]. La GST, et plus particulièrement son iso-forme "π", est responsable de nombreux mécanismes de détoxification cellulaire, et il a été proposé que la π-GST puisse intervenir dans l'émergence d'une résistance au platine [153]. Certains auteurs ont rapporté une surexpression de l'iso-forme π de la GST dans les cancers ovariens de stade avancé [154]. Satoh et al. rapportent même une corrélation entre l'expression de la GST et la survie chez 137 patientes atteintes de cancer de l'ovaire même si les résultats de cette étude ont été discutés [153, 155].

- *Effet des pompes d'efflux :*

Les principales pompes d'efflux permettant d'éliminer les chimiothérapies sont les molécules ABC^{B1} ou MDR1, ABC^{C1} ou MRP1 et ABC^{G2} ou BCRP. La surexpression de ces pompes est classiquement associée à une résistance à de nombreuses molécules de chimiothérapie mais il n'a pas été démontré de manière claire dans le cancer de l'ovaire que ces pompes puissent réellement éliminer le cisplatine des cellules cancéreuses

[4]. En outre, les études cliniques ne retrouvent pas non plus de relation nette entre la survie globale et sans progression et leur expression en cas de traitement par cisplatine [153, 156]. Certains auteurs rapportent toutefois une implication de la pompe MRP2 dans la survenue d'une chimiorésistance sous cisplatine [157]. Cependant il n'a pas été montré d'intérêt pronostic associé à la mesure de son expression, qui est d'ailleurs inconstante dans les cellules primaires tumorales ovariennes [157].

D'autres pompes d'efflux ont été étudiées et certaines pourraient avoir une implication dans la chimiorésistance aux platines comme le transporteur de cuivre ATP7B. L'implication de ce transporteur a été rapportée dans des cellules carcinomateuses prostatiques résistantes aux sels de platine [158]. Dans les cellules tumorales ovariennes, il a été rapporté une diminution d'efficacité du cisplatine en cas d'augmentation du niveau d'expression d'ATP7B. En outre, les cellules n'exprimant pas ATP7B chez qui on transfecte le gène acquièrent une chimiorésistance aux sels de platine [159]. Ce transporteur induit une chimiorésistance par efflux du cisplatine. Il a été rapporté une augmentation des ARN de la molécule ATP7B dans plusieurs types de cancers épithéliaux (dont le cancer de l'ovaire) [160-162]. Les tumeurs ovariennes exprimant cette molécule semblaient être de plus mauvais pronostic [160].

- *La signalisation pro-apoptotique induite par le cisplatine :*

Pendant une exposition aux sels de platine, la liaison du platine à l'ADN va entraîner une activation des enzymes de réparation de l'ADN. C'est

ensuite le « gardien du génome » la protéine P53A qui va soit permettre à la cellule de poursuivre dans son cycle cellulaire après réparation des lésions de l'ADN, soit initier une apoptose de la cellule en cas d'échec de la réparation [163-165]. La mutation de cette protéine clé du génome est retrouvée dans au moins 50% des tumeurs malignes ovariennes [166]. Le traitement standard des cancers ovariens de stade avancé repose sur une association de carboplatine et de taxol [141]. Certains rapportent une efficacité plus importante de la chimiothérapie en cas de mutation P53 mais cette donnée reste encore discutée dans la littérature [166].

Il existe une grande hétérogénéité des tumeurs ovariennes concernant leur statut P53 et il est donc difficile de baser la probabilité de réponse aux sels de platine simplement sur ce paramètre. La chimiorésistance aux platine reste un phénomène complexe faisant intervenir un ensemble de mécanismes.

Parmi ces mécanismes, la réponse apoptotique au traitement par chimiothérapie constitue un facteur important. Cette apoptose est médiée par plusieurs protéines comme Bcl-2, AKT ou encore Fas-L dont l'expression et l'activité sont à l'origine d'une différence de réponse au traitement par inhibition du phénomène d'apoptose dans les cellules tumorales ovariennes [167-170]. La variation de facteurs comme XIAP ou l'inhibiteur « X-linked inhibitor » qui sont capable d'inhiber l'apoptose liée au chromosome X est par exemple une cause de chimiorésistance dans de nombreux cancers [167]. Evidemment une élucidation de ces processus complexes pourrait permettre une meilleure compréhension de l'impact en clinique de l'inhibition de l'apoptose dans la chimiorésistance des tumeurs ovariennes sous traitement

par sels de platine, et envisager de nouvelles thérapies ciblées pro-apoptotique en association avec la chimiothérapie.

c) Résistances aux taxanes :

- Généralités :

Les taxanes, dérivés de l'if européen, sont une classe de chimiothérapies appartenant à la catégorie des anti-mitotiques. Les taxanes inhibent la division cellulaire en bloquant la formation du fuseau mitotique de tubuline formé par la polymérisation d'hétéro-dimères d'alpha et beta tubuline [171, 172]. C'est pourquoi ils sont appelés « poisons du fuseau ». Les taxanes vont se lier à la sous-unité beta de la tubuline entraînant une stabilisation et une extension de polymère de microtubule [173-175]. Cette liaison va bloquer la dépolymérisation du fuseau mitotique provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en phase M, puis l'initiation de la mort cellulaire par apoptose.

Le paclitaxel et le docetaxel sont les deux taxanes les plus fréquemment utilisées en clinique, en particuliers dans le traitement de nombreuses tumeurs solides (tumeurs malignes de prostate, pulmonaires, voies aérodigestives supérieures, mélanomes, cancer des ovaires) [176].

Malgré l'efficacité clinique initiale des chimiothérapies à base de taxanes, le taux de rechute des patientes atteintes de cancer de l'ovaire est évalué à plus de 75%. L'hypothèse avancée est celle d'une chimiorésistance des cellules tumorales. La diminution de la concentration des taxanes au

niveau du cytoplasme, ainsi que l'altération de la tubuline sont les deux modes de résistance les plus décrits in vitro.

- *Action des pompes d'efflux:*

La diminution de la concentration cytoplasmique et nucléaire de la drogue a été rapportée in vitro à la fois pour le paclitaxel et le docetaxel. De manière plus claire que pour les sels de platine précédemment, cette diminution serait dépendante de l'activité de plusieurs protéines de la famille des transporteurs ABC (ABC^{B1} , ABC^{B11} et ABC^{C1}) dites « pompes d'efflux » qui rejetteraient les molécules de chimiothérapie [176-178]. Il a été décrit qu'une inhibition de ces pompes, en particulier ABCB1 par des molécules telles que la cyclosporine ou la verapamil permettait de rétablir la sensibilité de cellules tumorales cultivées in vitro en présence de taxanes [179, 180]. Par la suite, des études cliniques ont montré la capacité de restauration de la sensibilité des cellules tumorales au docetaxel en utilisant des bloqueurs de pompes de première et deuxième génération. Dans les essais précliniques, l'inhibition des pompes d'efflux ABC permettait l'augmentation de la cytotoxicité et une réduction de dose des chimiothérapies grâce à l'interaction pharmacocinétique. Cependant les essais cliniques utilisant les inhibiteurs de pompes les plus prometteurs, ceux de troisième génération (comme l'association tariquidar-docetaxel) n'ont pas montré de résultats significatifs en terme de survie globale. Dans le cadre du traitement des tumeurs malignes du système nerveux central (SNC), l'Eraclidar, un inhibiteur d'ABCB1, développé pour augmenter la diffusion du docetaxel dans le SNC s'est révélé

néfaste par l'augmentation de la concentration systémique et la diminution de l'élimination du docetaxel [181].

Ainsi le rôle des pompes d'efflux ABC, et plus particulièrement ABCB1 dans les résistances cliniques aux taxanes reste à préciser. Les échecs relatifs des essais cliniques mettent en doute l'intérêt thérapeutique des inhibiteurs des pompes ABC dans les cancers ayant développé une chimiorésistance aux taxanes.

- *Mutations de la tubuline :*

Une autre hypothèse pour expliquer l'émergence de résistance aux chimiothérapies est l'altération de l'expression ou de l'activité de la cible des agents chimiothérapeutiques. Concernant les résistances aux taxanes, les modifications concernent la mutation ou l'altération de l'expression de nombreux iso-types de la bêta-tubuline [182-184]. La cristallographie par rayon X a permis de mettre en évidence le site de mutation de la bêta-tubuline, au niveau du site de liaison entre le taxane et la sous-unité de la tubuline. L'altération de l'efficacité de cette liaison entraînerait une diminution de la stabilité des polymères de tubuline [184, 185]. Cependant le polymorphisme du gène de la bêta-tubuline est très peu fréquent dans la population générale [186]. De même, au sein des patients atteints de cancer différents (poumon, sein ou ovaire), les patients chimiorésistants, ne présentent pas au niveau du gène de la bêta-tubuline de polymorphisme et/ou de mutation. En raison du faible polymorphisme du gène de la bêta-tubuline, la modification d'expressivité de la cible de l'agent chimiothérapeutique ne permet pas d'expliquer, à lui seul, le mécanisme de résistance des taxanes.

- *Perspectives thérapeutiques:*

Les mécanismes de résistance aux taxanes restent encore aujourd'hui, non élucidés. Les mutations du gène de la tubuline sont très peu fréquents chez les patientes et même au sein du groupe groupes résistants aux taxanes. L'Inhibition de la pompe d'efflux ABC^{B1} constitue une perspective d'action pour lever la chimiorésistance mais peut être à l'origine d'une toxicité sévère des taxanes. Récemment a été développée une molécule dérivée de la famille des taxanes n'étant pas substrat d'ABC^{B1}, le DJ-927 (tesetaxel) et qui entraîne une toxicité sévère sur les cellules tumorales exprimant ABC^{B1} [187]. Le développement du tesetaxel a été interrompu suite à un échec dans le traitement des cancers colorectaux et gastriques [188]. Cette piste visant la mise au point de molécules indépendantes des transporteurs de la famille ABC reste néanmoins une alternative intéressante à leur inhibition chimique.

- *Les résistances liées au microenvironnement :*

Les transformations de la cellules tumorale à l'origine d'une résistance aux traitements chimiothérapeutiques précédemment décrits est un processus long et complexe [189]. Néanmoins, les patientes ayant un cancer de l'ovaire chimiorésistant récidiveront par définition dans l'année suivant le traitement [140]. Ainsi, ces transformations nécessitant plusieurs années ne peuvent expliquer la chimiorésistance de ces cancers et c'est donc possiblement une protection extérieure qui va permettre aux cellules tumorales de survivre. Cette protection pourrait être apportée même de manière transitoire par le microenvironnement tumoral, permettant la constitution d'une maladie minimale résiduelle (figure 15).

Ce concept de protection par le microenvironnement a été apporté par Teicher au début des années 90 [190]. En réalisant des allogreffes de cancer du sein chez la souris, il a pu créer un modèle in vivo de chimiorésistance en réalisant des traitements par des chimiothérapies diverses de ces tumeurs. Ces cellules devenues chimiorésistantes étaient ensuite extraites puis cultivées in vitro. Un phénotype sensible était observé in vitro, alors même que greffées à nouveau sur des souris, elles reconstituaient de nouvelles tumeurs chimiorésistantes [190]. Ces expériences remettent en cause les concepts ne prenant en compte que la cellule tumorale comme unique responsable de la réponse aux traitements et montrent l'importance de l'environnement tumoral dans cette réponse à la chimiothérapie [190].

Le stroma tumoral est complexe et contient de nombreux composants moléculaires et une variété importante de cellules diverses telles que les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, et les cellules stromales. Parmi cet ensemble de cellules, certaines ont été rapportées comme pouvant être modifiées par la tumeur et nous ont paru intéressantes dans le cancer de l'ovaire: les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Nous avons donc recherché quel pouvait être leur influence dans la constitution d'une maladie résiduelle tumorale, très souvent résistante aux traitements anticancéreux.

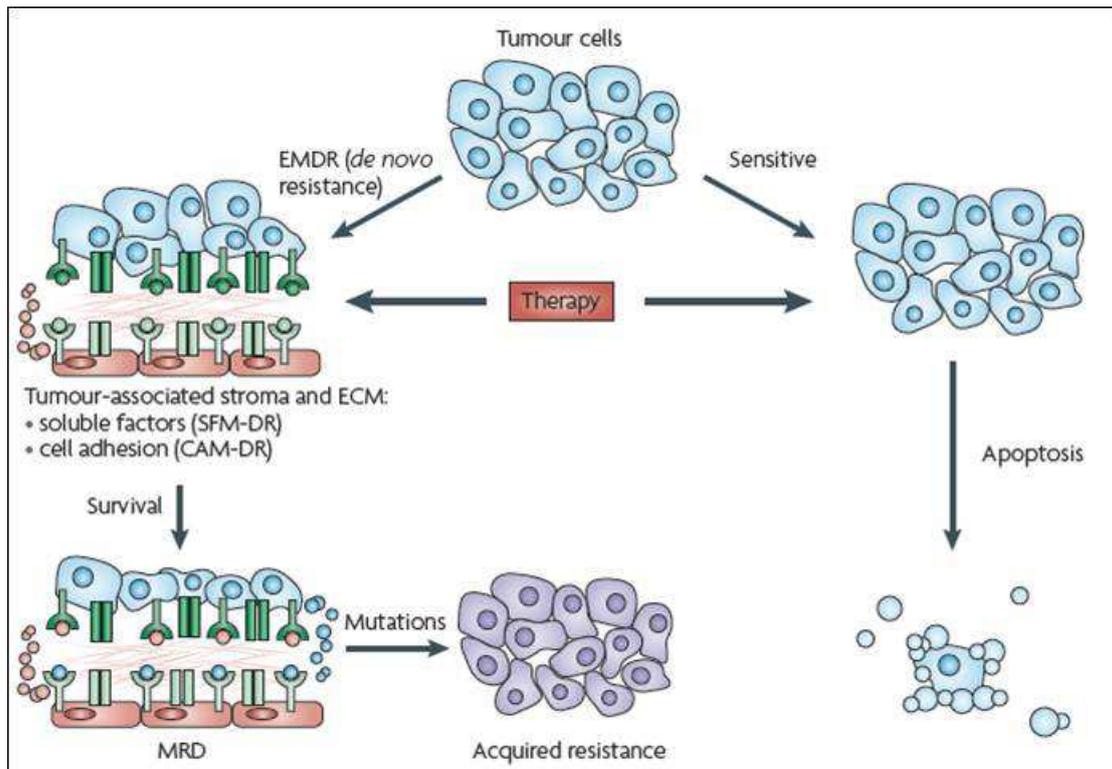


Figure 16 : résistances liées au stroma tumoral selon Meads [189].

V- Intérêt des modèles en 3 dimensions :

a) Pourquoi un modèle en 3 dimensions ?

Les modèles en 3 dimensions (3D) permettent de combler le fossé existant entre la culture cellulaire en 2 dimensions (2D) et l'animal. En mimant les caractéristiques d'un environnement in vivo tout en permettant l'utilisation des mêmes outils que dans la culture cellulaire traditionnelle, les modèles 3D offrent un regard unique sur le développement des tumeurs, de tissus ou organes, ainsi que sur le comportement des cellules souches. Ainsi, ces modèles permettent d'accélérer la recherche translationnelle sur la biologie du cancer [191].

Les tumeurs, tissus et organes sont des structures en 3D. Cependant, notre capacité à comprendre leur organisation et leurs fonctions est basée très souvent sur des études de culture cellulaire en 2D qui peuvent altérer leur morphologie ainsi que les interactions entre les cellules et avec la matrice par rapport à un environnement 3D plus physiologique [192-196]. Une propriété importante pour le comportement cellulaire est la polarité cellulaire, dépendant du type cellulaire et de l'environnement. Les cellules épithéliales sont souvent polarisées avec des surfaces apicales et basales important pour l'organisation tissulaire. Leur partie basale repose sur les membranes basales comprenant du collagène, laminine et autres composants de la matrice. Cette organisation, perdue lors d'une culture en 2D peut être restaurée en cultivant ces cellules en 3D. Un autre type cellulaire important dans de nombreux tissus est le fibroblaste. Contrairement à la cellule épithéliale, le fibroblaste n'est pas polarisé mais en les cultivant en 2D, ils acquièrent artificiellement

une surface ventrale (ou inférieure) et dorsale (ou supérieure) et n'ont donc de contact avec un éventuel substrat comme du collagène qu'avec leur surface ventrale. Ils perdent cette polarité artificielle quand ils sont remis dans une matrice mésenchymateuse en 3D, et retrouvent leur morphologie « in vivo » [194, 197, 198]. Cette différence de morphologie peut influencer leur prolifération et leur migration, à composition et matrice identique [194, 199, 200]. Une des explications est la différence de contact ici sur toute leur surface et non qu'une partie ventrale ou dorsale avec la matrice.

A l'autre extrémité de l'éventail expérimental, les modèles animaux permettent la mise en évidence finale de l'importance de molécules spécifiques mais peuvent également souffrir de discordances selon la technique utilisée pour interférer avec la fonction d'une protéine spécifique [201]. De plus, ils peuvent ne pas reproduire les caractéristiques d'une tumeur humaine ou d'une réponse thérapeutique ou différenciation d'une cellule souche. Les modèles 3D tissulaires in vitro offrent une troisième approche, intermédiaire entre la culture 2D et le modèle animal in vivo.

b) Les différents types de modèle 3D :

La première approche classique est l'utilisation de tissu prélevé in vivo, explanté et cultivé in vitro comme des morceaux de tissu ou organes microscopiques qui gardent alors leur architecture originale en 3D. Cette approche est particulièrement utile pour réaliser des cultures à relativement court terme afin d'étudier de nombreux tissus [202, 203]. Le tissu doit alors être assez fin pour permettre une oxygénation et une pénétration des nutriments à l'intérieur (soit environ 0,3 mm d'épaisseur) [191]. D'un autre côté les études portant sur la biologie des tumeurs ont pu bénéficier

de systèmes permettant de reproduire l'insuffisance de nutrition de leur partie centrale induisant une nécrose importante dans l'étude des interactions entre les cellules tumorales et l'hôte comme dans l'angiogenèse et la chimiorésistance [204].

D'autres modèles 3D ont été établis à partir de cellules isolées provenant de lignées cellulaires, tissu dissocié ou cellules souches. Une stratégie répandue est la d'implanter des cellules uniques ou agrégats pseudo-tissulaires sur un guide matriciel 3D. Les guides 3D sont constitués de molécules purifiées come du collagène, des biomatériaux synthétiques, ou même de matrices extracellulaires natives desquelles des cellules vivantes ont été préalablement extraites [191]. Enfin, il est également utilisé des combinaisons diverses de cellues isolées ou fragments tissulaires, mélangés à d'autres types cellulaires. Un exemple est le modèle 3D de tumeur mélanocytaire développé en déposant des cellules cancéreuses de mélanocyte humain sur de la peau humaine contenant des kératinocytes et des fibroblastes [205].

Enfin les modèles de sphéroïdes 3D ont été utilisés afin d'enrichir la composition cellulaire en cellules souches tumorales [206, 207]. Les sphéroïdes peuvent etre étudiés en suspension, dans un bioréacteur ou dans une matrice 3D, à partir d'une cellule unique ou d'un mix de cellules tumorales plus ou moins stromales. Ces agrégats peuvent mimer le comportement tumoral de manière plus réaliste grâce à l'hétérogénéité cellulaire permise par le sphéroïde : cellules proliférantes et non proliférantes, cellules oxygénées et hypoxiques sécrétant alors des cytokines [208]. Les sphéroïdes peuvent alors permettre l'étude des propriétés d'adhésion

tumorale, leurs interactions cellulaires, etc... [208, 209]. Ces modèles 3D ont permis de comprendre les relations entre les cellules tumorales et leur stroma en montrant par exemple l'influence de facteurs stromaux spécifiques pouvant promouvoir la croissance tumorale et l'angiogénèse [103, 210], ou encore le rôle du stroma dans l'établissement de la niche pré-métastatique [211].

Les modèles 3D sont donc un outil particulièrement intéressant pour l'étude des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, permettant une approche plus précise et réaliste que la culture 2D, et plus simple à mettre en place que les modèles animaux.

c) Les modèles 3D utilisés dans le cancer de l'ovaire :

Dans le cancer de l'ovaire, c'est surtout l'équipe de Chicago qui a travaillé sur des modèles spécifiques au cancer de l'ovaire [56]. Kenny et Lengyel ont en effet reproduit un modèle de carcinose péritonéale épiploïque. L'épiploon est en effet un site majeur de métastase de cancer de l'ovaire. Ils ont donc réalisé un modèle 3D des composants clés du microenvironnement épiploïque comprenant des cellules mésothéliales, des fibroblastes et une matrice extra-cellulaire. Ils ont extrait des fibroblastes et primaires d'épiploon humain qu'ils ont mixés avec une matrice composée de collagène I, fibronectine, vitronectine et laminine I, puis ont déposé une couche de cellules mésothéliales également extraites d'épiploon humain (Figure 14). Ils ont respecté les proportions présentes dans l'épiploon préalablement analysé avec un ratio de 1:5 et 1:8 de fibroblastes et cellules mésothéliales, respectivement. Ils ont ensuite déposé sur la couche mésothéliale les cellules tumorales ovariennes Skov3 (lignée cellulaire de carcinose péritonéale de cancer de l'ovaire). Ils ont observé une adhésion dans les quatre premières

heures puis une invasion dans les 24 premières heures de culture, reproduisant l'aspect d'une métastase épiploïque.

Dans un premier travail, ils montrent que les cellules tumorales adhèrent préférentiellement au collagène I parmi les constituants de la matrice. Les cellules mésothéliales inhibent l'adhésion et l'invasion des cellules tumorales ovariennes alors que les fibroblastes les favorisent par un contact cellulaire.

Dans deux autres articles (REF2008) [56], ils démontrent grâce à leur modèle l'implication de MMP-2 dans l'adhésion des cellules cancéreuses ovariennes à la surface du péritoine. MMP-2 permet en fait le clivage des protéines de la matrice fibronectine et vitronectine en petits fragments permettant une liaison plus importante des intégrines à la surface des cellules cancéreuses avec ces petits fragments. Ils proposent donc un modèle du rôle de MMP-2 dans la métastase épiploïque dans la figure 14.

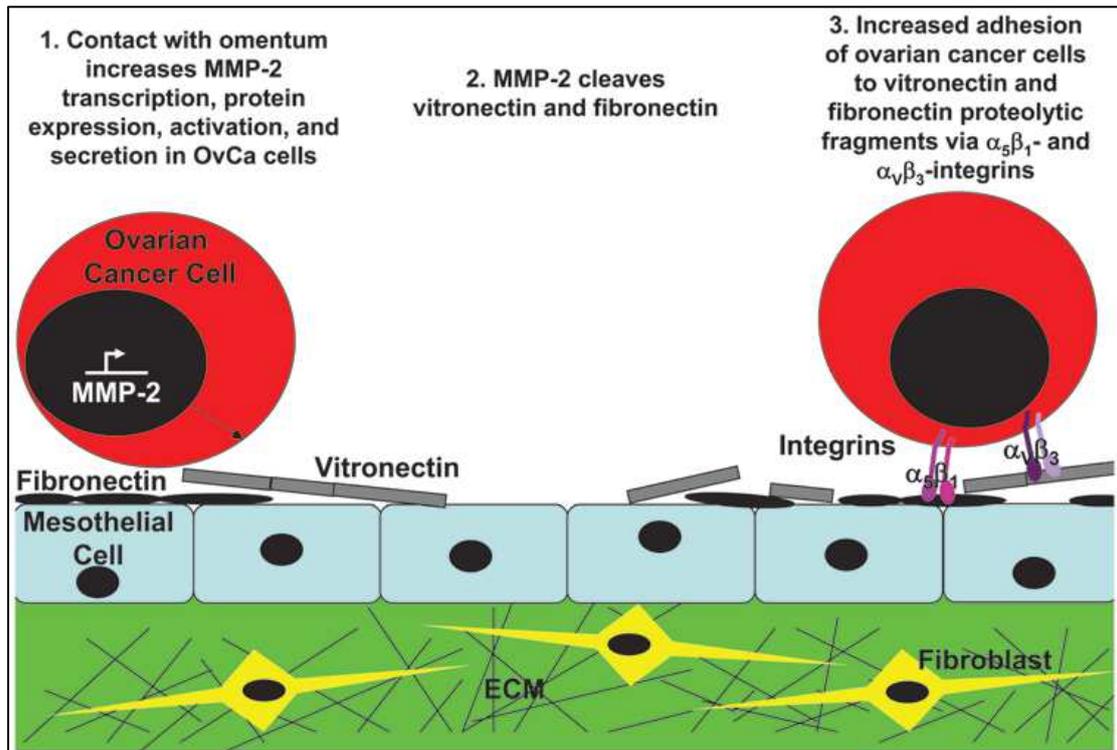


Figure 14 : Rôle de MMP-2 dans la formation de la métastase épiploïque proposé par Kenny et al.[56]

d) La membrane amniotique :

La membrane amniotique est une annexe embryonnaire ayant la particularité d'être une source importante de cellules souches, utilisée ainsi dans la régénération tissulaire [212]. La membrane amniotique est constituée par deux feuillets : l'amnion et le chorion (Figure 14). Ces deux feuillets sont fusionnés à partir de la 17^{ème} semaine de développement, aboutissant à une membrane amniochorionique unique. L'amnion est composée d'une couche unique épithéliale surplombant une fine membrane basale composée de collagène et d'une couche de fibroblastes en dessous (Figure 14). Le chorion est constitué de plusieurs couches de cellules trophoblastiques et stromales indifférenciées. Les couches stromales de l'amnion et du chorion proviennent

du mésoderme extra-embryonnaire. Les cellules « fibroblaste like » de la membrane amniochorionique ont les caractéristiques de véritables MSC.

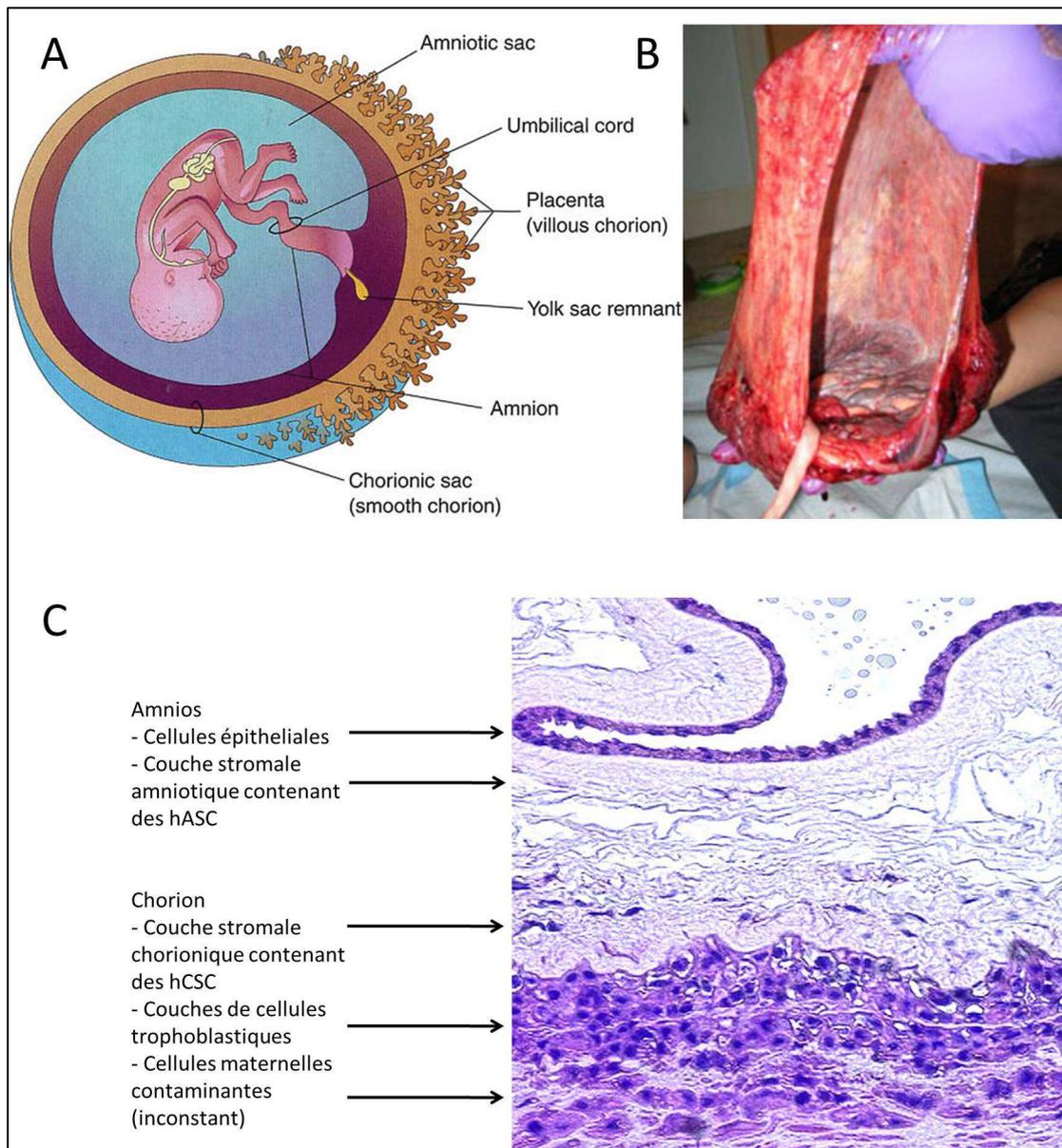


Figure 14 : Aspect macroscopique et microscopique de la membrane amniochorionique adapté de Ylancheran et al. [212]

Les deux membranes sont facilement séparées grâce à un tissu lâche composé d'élastine entre les deux feuillets. Les cellules stromales d'amnios humain (hASC) et de chorion humain (hCSC) sont extraites après avoir retiré la couche épithéliale amniotique par de la trypsine et la couche

trophoblastique par de la dispase. La décidue maternelle contaminante éventuellement présente peut être retirée mécaniquement digestion dans de la collagénase. Les cellules stromales sont alors obtenues en digérant les couches plus internes de la membrane dans de la collagénase [213-216]. Des cellules stromales positives pour la vimentine ont été obtenues à partir de la membrane amniotique à tous les termes de la grossesse [214, 215]. A terme, le feuillet amniotique contient $1-4 \times 10^6$ cellules stromales et le feuillet chorionique autant si ce n'est encore plus [217]. Ces cellules sont très prolifératives et peuvent être cultivées jusqu'à une quinzaine de passage avant la sénescence, ou plus si le terme est plus précoce [213, 215, 216]. Comme les BM-MSC (MSC de MO), les hASC et hCSC présentent un aspect de fibroblaste et sont adhérent au plastique en culture, formant des colonies clonales. Ils expriment les mêmes antigènes de surface que les BM-MSC (négatifs pour CD31, CD34, CD45 et positifs pour CD166, CD105, CD90, CD73, CD49e, CD44, CD29 and CD13) et leur différenciation en lignées matures peut être induite in vitro [215-218].

La structure des hASC et hCSC diffère en microscopie électronique mais peuvent se différencier dans les lignées ostéoblastiques, chondroblastiques, adypocytaires et myocytaires in vitro, quelque soit le terme [213, 216, 218]. A l'instar des autres MSC, il a également été rapporté une différenciation possible en cardiomyocyte, hépatocytes et endothélium [219-221]. Enfin, ces cellules expriment très peu voir pas du tout des antigènes d'histocompatibilité de classe I et II à leur surface, induisant de ce fait très peu de réaction immunitaire expliquant l'absence de rejet lorsque lors

de l'utilisation de la membrane amniotique pour le traitement des brûlures ou ulcérations cutanées [222, 223].

La membrane chorioamniotique est une source illimitée de MSC et constitue donc un outil idéal pour leur étude par sa disponibilité également illimitée à terme, le peu de barrière éthique et légale à son utilisation. Elle a donc constitué la base de notre modèle d'infiltration tumorale en 3D nous permettant d'étudier les relations entre les cellules tumorales et les MSC.

Matériel et méthodes :

Ce chapitre reprend la section « Materials and methods » des articles insérés ci-après. Une liste exhaustive de ces techniques, avec une brève explication est présentée ci-dessous. Une technique commune à plusieurs articles est détaillée une seule fois pour les différents travaux l'utilisant.

I- Culture cellulaire :

a) Monocultures :

Les lignées tumorales ovariennes SKOV3 (HTB-77), CaOV3 (HTB-75), et NIH : OVCAR3 (HTB-161) ont été obtenues par l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules tumorales ovariennes SKOV3 (HTB-77) ont été cultivées en utilisant un milieu contenant du DMEM high glucose [Hyclone, Thermo Scientific], 10% FBS [Hyclone, Thermo Scientific], 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B solution [Sigma], 1 Non Essential Amino-Acid [Hyclone, Thermo Scientific]. Les CaOV3 et les NIH : OVCAR3 ont elles aussi été cultivées en utilisant un milieu contenant du DMEM high glucose [Hyclone, Thermo Scientific], 20% FBS [Hyclone, Thermo Scientific], 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B solution [Sigma], 1 Non Essential Amino-Acid [Hyclone, Thermo Scientific], 2mM L-Glutamine.

Les cultures de sphéroïdes ou agrégats en 3D ont été réalisées

Les MSCs dérivées de moelle osseuse ont été obtenues chez la compagnie Stem Cell (Vancouver, CA). Ces MSCs ont été cultivées dans le milieu : MSC Basal Medium (Stem Cell [Vancouver, CA]) auquel on a ajouté

les Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Stem Cell [Vancouver, CA]), et ce conformément aux instructions du fournisseur.

Les MSCs dérivées de cellules souches embryonnaires humaines exprimant constitutivement la protéine fluorescente mOrange ont été cultivées dans un milieu ayant pour formulation : DMEM low glucose (Hyclone, Thermo Scientific), 20% FBS (Hyclone, Thermo Scientific), 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B solution (Sigma), 2mM L-Glutamine.

b) Co-cultures :

Les co-cultures de cellules tumorales ovariennes et MSCs sont réalisées 24h avant l'expérience. Brièvement, une suspension de cellules tumorales ovariennes est déposée sur un tapis de MSCs dans les puits d'une plaque de 24 puits ou 6 puits. Les deux types cellulaires sont ensuite cultivés dans un milieu DMEM, sans sérum bovin foetal, avec 10 000 UI/mL de Pénicilline, 10mg/mL de Streptomycine, et de 2 mM de glutamine pendant 24h, à 37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide.

c) Culture des sphéroïdes tumoraux ovariens avec la membrane amniotique :

Cinquante mille cellules étaient cultivées dans une plaque 48 puits à très faible adhérence (Corning) dans du milieu composé de DMEM/F12 (1:1) (Hyclone) basal media supplémenté avec 2mM L-Glutamine (Hyclone), 1x Non Essential Amino Acid (NEAA) (Hyclone), PenStrepAmpB (Sigma), 20 ng/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Peprotech), 20 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) (Peprotech), 5µg/ml Insulin (Sigma), 2% B27 supplements (Invitrogen) et 4% de basement matrigel (BD Biosciences) à

37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide. Le milieu était remplacé tous les 3 jours.

La membrane chorioamniotique provenait de placenta prélevé de donneurs de l'hôpital Hamad Medical Corporation et du Presbyterian Hospital immédiatement après césarienne programmée à terme en l'absence de rupture prématurée des membranes ou chorioamniotite, après avoir obtenu l'accord éthique Internal review Board (HMC- IRB protocol 9109/09, Weill Cornell Medical College in Qatar).

La membrane était lavée avec du PBS +/- du RBC lysis buffer (eBiosciences) puis dilacérée en petits morceaux (millimétriques) sous la hotte en conditions stériles. Les morceaux de membrane étaient ensuite cultivés avec les cellules tumorales ovariennes.

d) Chimiothérapie et traitement hyperthermique :

Les cellules étaient traitées par chimiothérapie dans un contexte d'absence de sérum et de cytokine et après les avoir sevrées de sérum pendant 12 heures. Les chimiothérapies utilisées étaient le cisplatine (Sigma) à la dose de 90 µM et paclitaxel (Sigma) à la dose de 6 µM pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide.

Les différents types cellulaires étaient été places dans une étuve à 42°C pendant 1 à 2 heures (5%CO₂, atmosphère humide). Les cellules étaient ensuite placées à 37°C pendant 2 heures avant de pratiquer une expérience.

II- Tests fonctionnels :

a) Test d'adhérence :

Pour étudier l'adhésion à la MEC, des plaques étaient coatées avec du Matrigel (BD Biosciences) selon les recommandations du fabricant. 2×10^4 cellules OVCAR-3 eGFP provenant de mono ou de co-culture avec des MSC séparées par FACS (Fluorescent activated cell sorting) étaient déposées dans chaque puits et incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 15, 30 minutes et 1 heure. Les plaques étaient lues avec un spectrophotomètre aux longueurs d'onde 488 nm pour l'excitation et 510 nm pour l'émission.

b) Test de migration/invasion :

Pour mettre en évidence l'invasion de la MEC, des supports perméables Transwell 8 µm de 24 puits étaient ou non coatés avec du Matrigel (BD Biosciences) à 4°C. La migration était évaluée à partir de Transwell seul et l'invasion à partir de Transwell coaté avec du Matrigel. Les cellules OVCAR-3 étaient cultivées sans sérum la veille de l'expérience. 5×10^4 cellules OVCAR-3 étaient déposées par puit et incubées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 12 et 24 heures. La chambre supérieure contient un milieu sans sérum tandis que la chambre inférieure du dispositif contient un milieu avec sérum.

Les tests de stimulations ont été réalisés en reprenant les tests de migration et invasion en ajoutant dans la chambre inférieure des cytokines mélangées au milieu selon les concentrations suivantes : 100ng/mL d'IL6, 100ng/mL d'IL8, 100ng/mL de CCL5, 100ng/mL de TNFa, milieu avec 20% de

sérum (contrôle positif), milieu sans sérum (contrôle négatif), Les expériences étaient réalisées en triplicat.

c) Tests de blessure :

Cinquante mille cellules Ovar3 par puits étaient déposés dans une plaque 24 puits en triplicat pour chaque condition. Les cellules étaient secrétées de sérum pendant 24 heures dans un contexte d'absence de sérum et de cytokine. La même blessure droite était réalisée dans tous les puits à l'aide d'un cône de pipette de 1 mL. Après avoir lavé les puits avec du PBS pour enlever les cellules détachées, un milieu frais contenant les molécules spécifiques à chaque condition était utilisé, avec un contrôle positif (milieu avec 20% de sérum) et négatif (milieu sans sérum). Les cytokines IL6 (100 ng/ml, #20006 PeproTech), IL8 (100 ng/ml, #20008 PeproTech), TNFa (100 ng/ml, #AF-30001A PeproTech) and CCL5 (100 ng/ml, #30006 PeproTech) étaient ajoutées comme précédemment décrit. Le taux de fermeture était déterminé à 6, 12, 24 et 48 heures et des photos étaient prises. Les expériences étaient réalisées en triplicat.

d) Tests d'inhibition :

L'inhibition du récepteur de l'IL6 était réalisé en incubant les cellules tumorales ovariennes avec les petits morceaux de membrane avec l'antagoniste spécifique du récepteur à l'IL6 (Abcam, #ab47215) dans un puit d'une plaque 48 puits à très faible adhérence (Corning) contenant le milieu 3D.

III- Cytométrie en flux :

Les cellules tumorales ovariennes ou souches mésenchymateuses étaient trypsinées, puis bloquées à l'aide d'une solution de PBS-5%FBS-1%BSA-10%FcR Blocking Reagent (Myltenyi Biotec) à 4 degrés celsius. La suspension cellulaire était ensuite marquée avec les anticorps nécessaires à l'expérience pour 15 minutes à température ambiante, puis filtrée à 40 µm. La suspension unicellulaire était ensuite analysée par cytométrie en flux à l'aide d'un SORP FACSAria2 (BD Biosciences). Les données étaient acquises et analysées sur FACSDiva 6.3 software (BD Biosciences). Brièvement, les doublets étaient exclus par une double fenêtre morphologique FSC-W × FSC-H and SSC-W × SSC-H, les canaux simple marquage sont utilisés pour régler les compensations, et les FMO (Fluorescence Minus One) étaient utilisés pour définir les populations cellulaire positive pour un marqueur d'intérêt. Généralement 100 000 évènements étaient acquis pour l'analyse, durant le tri cellulaire on appliquait un masque de pureté pour minimiser les contaminations entre les populations triées.

a) Test de viabilité par cytométrie en flux : Calcein-AM / Live Dead :

Les cellules tumorales ovariennes en mono- ou en coculture sur un lit de MSC depuis 24h étaient traitées par différentes doses de cisplatine et paclitaxel. 48h après, un quadruple marquage des cellules tumorales ovariennes ou MSC était réalisé avec des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes : EpCam (Molécule d'adhésion des cellules épithéliales, CD326) Alexia Fluor 647 nm pour sélectionner les cellules épithéliales tumorales, l'IgG Pacific Blue pour exclure la fluorescence aspécifique FcR dépendante, et le LiveDead Near IR (Invitrogen, Molecular probes) pour

quantifier les cellules mortes. La suspension cellulaire était analysée par un cytomètre en flux LSR II (BD Biosciences). Les doublets étaient exclus par les analyses FSC-W × FSC-H et SSC-W × SSC-H. La eGFP est excitée par un laser bleu à 488 nm et l'émission est lue à 510/50 nm. En monoculture, les cellules OVCAR-3 sont définies comme eGFP+LiveDead-, en co-culture, les cellules vivantes sont définies comme SSC-A+LiveDead- et les OVCAR-3 comme eGFP+EpCam+. 50 000 cellules par échantillon sont analysées. La préparation et l'acquisition des données des monocultures de cellules OVCAR-3 étaient réalisées de manière identique pour éviter tout changement d'expression génique, d'invasion cellulaire ou de migration dû à la procédure expérimentale.

b) Analyse et tri des MSC de membrane chorioanotique :

La membrane chorioamniotique était lavée au PBS et les globules rouges retirés par du RBC lysis buffer (eBiosciences). Elle était ensuite dilacérée et digérée par un cocktail d'enzymes pré-chauffées : Dispase 2 (1mg/ml, Stem Cells Inc) et Collagenase / Hyaluronidase (300 µg/ml and 100 µg/ml respectively, Stem Cells Inc) pendant 45 minutes à 37°C. Le tissu digéré était ensuite filtré dans des filtres de 100µm afin d'obtenir une suspension cellulaire. Cette suspension était ensuite marquée avec les anticorps suivants : l'anticorps souris anti-humain CD45 (BD Biosciences, #339192, clone 2D1) couplé à l'Amcyan, l'anticorps souris anti-humain CD34 (BD Biosciences, #555821, clone 581) couplé au FITC, l'anticorps souris anti-humain CD105 (biolegend, #323212, clone 43A3) couplé à l'AF647, l'anticorps souris anti-humain CD73 (BD Biosciences, #550257, clone AD2) couplé au PE, l'anticorps souris anti-humain CD29 (biolegend, #323212,

clone TS2/16) couplé à l'APC-Cy7, l'anticorps souris anti-humain CD90 (BD Biosciences, #550402, clone 5E10) couplé à l'AF700, l'anticorps souris anti-humain CD44 (BD Biosciences, #555479, clone G44-26) couplé au PE.

Brièvement, 1.10^6 cellules étaient prélevées et les liaisons non spécifiques étaient bloquées par du PBS- 5%FBS-1%BSA-10%FcR Blocking Reagent (Myltenyi Biotec) pendant 30 minutes dans de la glace. La suspension cellulaire était ensuite analysée par cytométrie sur FACSAria2 (BD Biosciences) et les données analysées par le logiciel FACSDiva 6.3 (BD Biosciences). Les doublets étaient exclus par l'analyse de FSC-W x FSC-H et SSC-W x SSC-H. 500000 évènements étaient acquis par échantillon.

IV- Microscopie confocale :

Les tumeurs (agrégats tumoraux sur les petits morceaux de membrane chorioamniotique) étaient lavées deux fois au PBS puis fixées au paraformaldehyde 3.7% (Sigma) avant marquage. Les anticorps utilisés étaient l'anticorps souris anti-humain CD73 (Biolegend, #344006, clone AD2) couplé à l'APC et l'anticorps souris anti-humain CD90 (Biolegend, #328118, clone 5E10) couplé au PerCP-Cy5.5. Les sites antigéniques non spécifiques étaient bloqués avec du PBS et 0,3% de sérum bovin et 0,5% HS pendant une heure. Les tumeurs étaient incubées avec les anticorps et du FcR bloking reagent (Miltenyi, #120-000-442) pendant la nuit et lavés trois fois au PBS. Les lames étaient montées à l'aide du kit Fluoromount contenant du 4-, 6-diamidino-2- phenylindole (DAPI, Invitrogen) pour contre colorer les noyaux. Les lames étaient lues au microscope confocal « Zeiss Laser Scanning

Microscope 710 (Carl Zeiss) ». Les images étaient analysées avec le logiciel Zen 2008 V5,0,0228 (Carl Zeiss).

V- Analyses génomiques et protéiques :

a) Analyse du sécrétome :

Les cellules mésenchymales associées aux tumeurs ou cellules souches mésenchymateuses ont été cultivées dans un milieu sans sérum pendant 24 heures. Les cellules mesenchymales associées aux tumeurs ou cellules souches mésenchymateuses ont ensuite été traitées par hyperthermie comme décrit ci-dessus. Le milieu conditionné est ensuite collecté, et les protéines qu'il contient quantifiées en mesurant l'absorbance du milieu à 280 nm sur un Nanodrop (Thermo Scientific, Dubai, Emirates). 200 µg de protéines sont déposés sur RayBioVR Human Cytokine Antibody Array G Series 1000 conformément aux instructions du fournisseur. Le milieu non conditionné a été utilisé comme contrôle négatif. Les membranes ont ensuite été révélées par une réaction chemiluminescence entre l'HRP (Horse Radish Peroxydase) et le SuperSignal West Pico Luminescent Substrates (Thermo Scientific, Dubai, Emirates). Les données sont acquises par caméra CCD (Geliance CCD camera, Perkin Elmer) puis traitées sur le logiciel ImageJ. Brièvement, les signaux acquis sur les membranes ont tout d'abord été inversés et l'intensité du bruit de fond soustraite. Nous avons ensuite défini des disques de 110-120 µm de diamètre pour capturer l'intensité d'une cytokine donnée. Afin de comparer les membranes entre elles, toutes les valeurs sont normalisées sur la base du contrôle positif interne à la membrane.

b) Analyse du transcriptome :

Les ARN messagers sont isolés en utilisant le kit Qiagen RNEasy en suivant les instructions du fournisseur. Deux contrôles qualités sont ensuite mis en œuvre afin de produire des données d'analyse transcriptomique satisfaisantes. (1) une analyse spectrophotométrique, (2) une analyse de la fragmentation de l'ARN sur puce Agilent. Un total de 200 ng d'ARN messenger est ensuite analysé sur Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Les données sont ensuite normalisées via le logiciel Partek: (1) par puce, en divisant les données brutes par le 50^{ème} percentile de toutes les mesures, (2) par gène, en divisant les données brutes par la médiane d'expression de tous les gènes contenu sur la puce. Les données sont ensuite traitées sur le logiciel Partek. Une comparaison de classe entre les différentes conditions (3 répliquats biologiques par condition) a été menée afin d'identifier les changements sur l'expression des transcrits avec une différence significative en suivant le « associated two-tailed Students t-test ($p < 0.05$) » et une diminution ou une augmentation d'un facteur 2 au minimum. Les images des puces scannées sont ensuite analysées par Microarray Suite version 5.0 (MAS 5.0) algorithm (Affymetrix) comme décrit dans [175, 224, 225]. Brièvement, les données sont corrigées par une correction de Benjamini-Hochberg pour limiter le taux de faux-positifs. Les comparaisons statistiques de données catégoriques sont menées en utilisant le test de χ^2 . Les corrélations sont effectuées en utilisant la corrélation de Pearson. Toutes autres comparaisons statistiques est calculée par le two-tailed (Welsh) t-test.

c) Analyse des voies de transcription, Ingenuity Pathway Analysis :

Afin d'identifier les voies de transcription modifiées sur la base de nos études transcriptomiques, nous avons utilisé le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Les réseaux de transduction ont été construits en superposant les gènes obtenus dans les listes de gènes significativement surexprimés ou sous-exprimés et les réseaux moléculaires contenus dans la base de données d'Ingenuity Pathways Knowledge. Les voies de transduction affectées par la co-culture avec les MSC ont été générées algorithmiquement sur la base de leur relevance statistique. Un réseau est la représentation graphique du lien entre les gènes. Les gènes sont représentés par des nœuds ; la relation, stimulatrice ou inhibitrice, entre les différents gènes est représentée par une ligne. La significativité statistique des réseaux générés est basée sur leur distribution hypergéométrique et est calculée par le right-tailed Fisher's exact t-test.

Résultats:

I- Article 1: Les cellules souches mésenchymateuses induisent un profil pro-métastatique des cellules tumorales ovariennes par des modifications transcriptomiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « Plos one » [226] et est référencé sous :

Lis R. & Touboul C. et al. (Co-premiers auteurs). Mesenchymal cells interaction with ovarian cancer cells triggers wide transcriptomic pro-metastatic profile. Plos One 2012; 7:e38340.

- Résumé long :

La plupart des patientes atteintes d'adénocarcinomes ovariens séreux de haut grade sont diagnostiquées à un stade avancé, avec une extension péritonéale de leur maladie [2]. Bien que beaucoup d'études s'intéressent à la dissémination métastatique à travers le flux sanguin, la biologie de l'atteinte péritonéale est encore peu connue. Certains auteurs ont suggéré, cependant, que l'initiation d'une métastase péritonéale pouvait répondre à une succession d'étapes critiques, telles que l'exfoliation du foyer primaire de la maladie, en l'occurrence l'ovaire, l'interaction et l'adhérence aux cellules mésothéliales péritonéales, ainsi que la colonisation des feuillets sub-mésothéliaux et la prolifération au sein de ceux-ci [227].

Il est maintenant admis qu'il doit exister un niche pré-métastatique, capable de procurer aux cellules tumorales un environnement permissif au développement tumoral [211, 228, 229]. Dans cette étude, notre but était de démontrer que les cellules souches mésenchymateuses constituent un

déterminant cellulaire critique pour l'établissement d'une métastase, en décrivant les profondes modifications transcriptomiques pro-métastatique induites chez les cellules tumorales ovariennes au contact des cellules souches mésenchymateuses et de vérifier leur traduction sur le comportement des cellules tumorales.

Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules pluripotentes, capables de générer une variété de tissus conjonctifs tels que l'os, le tissu adipeux, le cartilage ou encore les muscles [64]. Des travaux récents ont montré que les MSC sont recrutées en nombre important au niveau du stroma tumoral ovarien où elles participent aux phénomènes d'invasion, d'initiation de la métastase, de résistances aux chimiothérapies ou au traitement par hyperthermie [111, 133, 230, 231]. Bien que de nombreuses études s'attachent à décrire l'acquisition du caractère métastatique de façon uni-factorielle, peu d'études ont tenté d'identifier les changements globaux subis par les cellules tumorales lors de leur interaction avec le stroma adjacent [232].

Les travaux de Zhang et al. ont démontré que les cellules tumorales prostatiques subissaient de profondes modifications d'ordre transcriptomique lors de leur interaction avec les cellules souches mésenchymateuses. Ils définissent ainsi un nouveau profil métastatique basé sur approche globale d'étude du transcriptome [232]. Plus récemment, le groupe de Ronald J. Buckanovich a révélé que les cellules souches mésenchymateuses contribuaient à la tumorigenicité des adénocarcinomes ovariens grâce à la production des facteurs appartenant à la famille des Bone Morphogenetic Protein, et en particulier le BMP2. Ces travaux suggèrent que les MSC

stimulent la croissance tumorale en augmentant le pool de cellules souches tumorales ovariennes [113].

Décrire les modifications liées au microenvironnement et définir les voies de transduction modifiées par l'interaction entre une cellule tumorale et son microenvironnement nous permettraient d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans cette étude, nous avons démontré que la co-culture de cellules de lignées tumorales ovariennes (OVCAR3 et SKOV3) avec des cellules souches mésenchymateuses augmentait les propriétés métastatiques des cellules tumorales. En utilisant une approche transcriptomique corrélée à des tests fonctionnels, nous avons pu mettre en évidence que les MSC augmentaient les propriétés métastatiques des lignées tumorales ovariennes en régulant positivement certains groupes de gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire, l'invasion et la motilité, ou encore la chimiorésistance. Ces résultats suggèrent que la niche créée par les cellules souches mésenchymateuses pourrait augmenter l'initiation d'un foyer métastatique. Cibler l'interaction entre les cellules tumorales ovariennes et les MSC de l'hôte pourrait ainsi constituer une cible de choix dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mesenchymal Cell Interaction with Ovarian Cancer Cells Triggers Pro-Metastatic Properties

Raphael Lis^{1,2,5*}, Cyril Touboul^{1,2*}, Christophe M. Raynaud¹, Joel A. Malek³, Karsten Suhre⁴, Massoud Mirshahi², Arash Rafii^{1,5*}

1 Stem Cell and Microenvironment Laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar, Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar, **2** UMRS 872 INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Equipe 18, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France, **3** Genomic Core, Weill Cornell Medical College in Qatar, Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar, **4** Department of Physiology and Biophysics, Weill Cornell Medical College, New York, New York, United States of America, **5** Department Genetic Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, New York, United States of America

Abstract

Tumor microenvironment is an important actor of ovarian cancer progression but the relations between mesenchymal cells and ovarian cancer cells remain unclear. The objective of this study was to determine the ovarian cancer cells' biological modifications induced by mesenchymal cells. To address this issue, we used two different ovarian cancer cell lines (NIH:OVCAR3 and SKOV3) and co-cultured them with mesenchymal cells. Upon co-culture the different cell populations were sorted to study their transcriptome and biological properties. Transcriptomic analysis revealed three biological-function gene clusters were enriched upon contact with mesenchymal cells. These were related to the increase of metastatic abilities (adhesion, migration and invasion), proliferation and chemoresistance *in vitro*. Therefore, contact with the mesenchymal cell niche could increase metastatic initiation and expansion through modification of cancer cells. Taken together these findings suggest that pathways involved in hetero-cellular interaction may be targeted to disrupt the acquired pro-metastatic profile.

Citation: Lis R, Touboul C, Raynaud CM, Malek JA, Suhre K, et al. (2012) Mesenchymal Cell Interaction with Ovarian Cancer Cells Triggers Pro-Metastatic Properties. PLoS ONE 7(5): e38340. doi:10.1371/journal.pone.0038340

Editor: Eric Deutsch, Institut Gustave Roussy, France

Received: February 9, 2012; **Accepted:** May 4, 2012; **Published:** May 30, 2012

Copyright: © 2012 Lis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This publication was made possible by a grant from the Qatar National Research Fund under its National Priorities Research Program award number NPRP 09-1174-3-291 and NPRP 4-640-1-096. Its contents are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the Qatar National Research Fund. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jat2021@qatar-med.cornell.edu

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Most patients with ovarian cancer generally die from peritoneal disease [1]. Development of peritoneal carcinomatosis involves defined critical steps, including cell shedding, interaction and adhesion to mesothelial layer, and proliferation into the sub-mesothelium [2]. Several reports describe a pre-metastatic niche within the target organ, facilitating the initial survival of tumor cells [3,4,5].

Mesenchymal cells (MCs) are pluripotent cells that give rise to a variety of connective tissue cell types [6]. Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSC) are recruited in significant number to tumor sites where they contribute to invasion, metastasis, and resistance to chemotherapy of ovarian cancer cell lines [7,8,9,10,11]. MSC have been shown to contribute to ovarian cancer tumorigenicity through altered production of Bone Morphogenetic Protein (BMP2) leading to an increase of ovarian cancer cell (OCC) proliferation *in vitro* and *in vivo* [12]. While many studies focus on specific factors in the acquisition of metastatic profile, only few studies are assessing the global transcriptomic changes occurring in cancer cells upon their interaction with the mesenchymal stem cells (MSC) [13]. Zhang S et al.¹³ reported the modification of the prostate cancer cell transcriptome induced by interaction with MCs. The modifications defined a new pro-

metastatic state. Understanding the pathways impacted by the interaction of cancer cells and their microenvironment and the induced global modifications is mandatory in order to be able to target microenvironment specific pathways [13].

Here, we investigate co-culture of two different types of OCC lines with MCs. We demonstrate that this interaction enhances metastatic abilities of OCC. Using transcriptomic analysis and functional assays; we demonstrate that genes related to cellular adherence, invasion, migration, proliferation and chemoresistance are modified upon OCC/MC contact in a cell line specific manner. Our results suggest that specific pathways may be targeted to disrupt the acquired pro-metastatic profile.

Materials and Methods

Cell Culture

Ovarian cancer cell lines SKOV3 (HTB-77) and OVCAR3 (HTB-161) were purchased from ATCC and maintained in culture following ATCC recommendations (DMEM high glucose [Hyclone, Thermo Scientific], 10% FBS [Hyclone, Thermo Scientific], 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B solution [Sigma], 1X Non Essential Amino-Acid [Hyclone, Thermo Scientific]). The ovarian cancer cell lines were stably transduced by lentiviral vectors encoding eGFP (Genethon, Evry). Mesen-

chymal cells were purchased from Stem Cells, Inc (MSC-001F, Vancouver, CA) maintained and expanded in culture using MesenCult® MSC Basal Medium completed with Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Stem cell Inc, Vancouver, CA). Their ability to differentiate in adipocytes, osteoblasts and chondrocytes was verified as per the supplier instructions (data not shown).

Co-Cultures

We established co-cultures of eGFP-OCC with BM-MC at ratio of 1:2 for 24 hours. OCC were differentiated from BM-MC based on their eGFP and Ep-Cam. The different cell populations were sorted using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).

Fluorescent activated cell sorting

Cells were harvested and blocked in PBS-5%FBS-1%BSA-10%FcR Blocking Reagent (Myltenyi Biotec). Single-cell suspension was analyzed and sorted on SORP FACS Aria2 (BD Biosciences). Data were processed with FACSDiva 6.3 (BD Biosciences). Doublets were excluded by FSC-W × FSC-H and SSC-W × SSC-H analysis, single stained channels were used for compensation, and fluorophore minus one (FMO) controls were used for gating. eGFP fluorescence was acquired with 488 nm blue laser and 510/50 nm emission, 50 000 events were acquired per sample. Charts display the median of fluorescence intensity (mfi) relative to control. During cell-sorting purity-phase mask was applied. OCC monocultures were processed and sorted as controls.

Gene expression analysis

Upon cell sorting mRNA was isolated using Trizol reagent followed by purification using RNAeasy extraction kit from Qiagen. 200 ng of total RNA were analyzed on Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Data were analyzed using Partek software (St Louis, MO). Class comparison between different conditions (three biological replicates) was performed to identify gene expression changes with significant expression differences and two-fold increased or decreased expression [14,15,16]. Principal component analysis (PCA) were performed using Partek with the standard settings. Statistical comparisons for microarray data were calculated using two-tailed Students t-test. Benjamini-Hochberg correction was applied to limit positive false discovery rate to 5%. Statistical comparisons for categorical data were achieved using Chi-squared test. Correlations were performed using Pearson correlation. All other statistical comparisons were calculated using two-tailed t-test.

Ingenuity Pathway Analysis

We used Ingenuity Pathway Analysis software (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) for network analysis of genes that were differentially regulated upon co-culture. We defined global gene lists representing IPA keywords: “Metastasis”, “Proliferation of cell lines” and “Cell death of tumor cell line”. All edges are supported by at least one reference from the literature, textbook, or canonical information stored in the Ingenuity Pathways knowledge database. *P*-values for enrichment of biological functions were generated based on the hypergeometric distribution and calculated with the right-tailed Fisher’s exact for 2×2 contingency tables as implemented in Ingenuity.

Adherence assay

96 well-plates were coated with Matrigel (BD-Biosciences). 20 000 OCC-eGFP were seeded per well and incubated in 5%CO₂

incubator at 37°C for 15, 30 and 60 minutes. Non-adherent cells were washed away. Adherent cells were quantified using fluorescence plate reader (Wallac, Perkin Elmer) (488 nm excitation, 510 emission). All functional experiments were performed in biological triplicates.

Migration/Invasion assays

8 μm pores transwell permeable supports were coated with Matrigel. 50 000 viable OCC (sorted from co- and monoculture) were seeded per well and incubated in 5%CO₂ at 37°C for 12 and 24 hours. OCC migration and invasion was then assessed using a fluorescence plate reader (Wallac, Perkin Elmer).

Proliferation assay

5000 OCC were seeded in monoculture or on MSC-mOrange monolayer in a serum free/cytokine free media. OCC were counted every two days during 14 were coated with Matrigel. 50 000 days under a microscope using GFP fluorescence. Each day ten fields were quantified.

Chemoresistance

100000 OCC were seeded in monoculture or with BM-MSC in 1:2 ratio. Mono- and co-culture were treated with 90 μM Cisplatin and 6 μM Paclitaxel (Sigma) for 24 h. Cells were then stained with Calcein Red-Orange, LIVE/DEAD Aqua blue (Invitrogen, Molecular Probes), CD73-APC (Biolegend, clone: AD2) according to manufacturer’s instructions and analyzed by FACS. OCC were defined as cells GFP+CD73-, living OCC were defined as calcein Red-Orange+ LIVE/DEAD aqua-. 50 000 events were acquired per sample.

Statistical analysis

Student-t tests, Fisher exact tests and chi-square tests were performed as appropriate. All *p*-values are two-sided with statistical significance evaluated at the 0.05 alpha levels. Ninety-five percent confidence intervals (95% CI) were calculated to assess the precision of the obtained estimates. All statistical analysis was done using the data analysis plug-in of Microsoft Excel 2008.

Results

Modification of the OCC transcriptome upon interaction with MC

In order to investigate modifications of OCC transcriptome upon MC contact, we designed a coculture model in which OCC are cultivated alone (control condition) or in presence of MC (test condition) during 24 h in a serum free, cytokine free medium. OCC (control and test conditions) were then sorted by FACS based on their co-expression of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM, CD326) and the enhanced-Green Fluorescent Protein (eGFP) (Figure 1.A).

Upon MC contact, the transcriptome of the two cell lines we tested (NIH:OVCAR3-eGFP and SKOV3-eGFP) was dramatically modified (Figure 1.B). NIH:OVCAR3 significantly upregulated 26 genes and downregulated 10 genes (Table S1); SKOV3 significantly upregulated 18 genes and downregulated 3 genes (Table S2). Changes observed in the two ovarian cancer cell lines did not allow us to establish a common gene signature upon MC contact (Figure 1.B, Table S1, Table S2). However using Ingenuity Pathway Analysis software, we were able to identify three biological function clusters enriched upon contact with MC: “Metastasis” (NIH:OVCAR3, $p = 6.48 \times 10^{-6}$; SKOV3, $p = 5.42 \times 10^{-5}$), “Proliferation of cell lines” (NIH:OVCAR3,

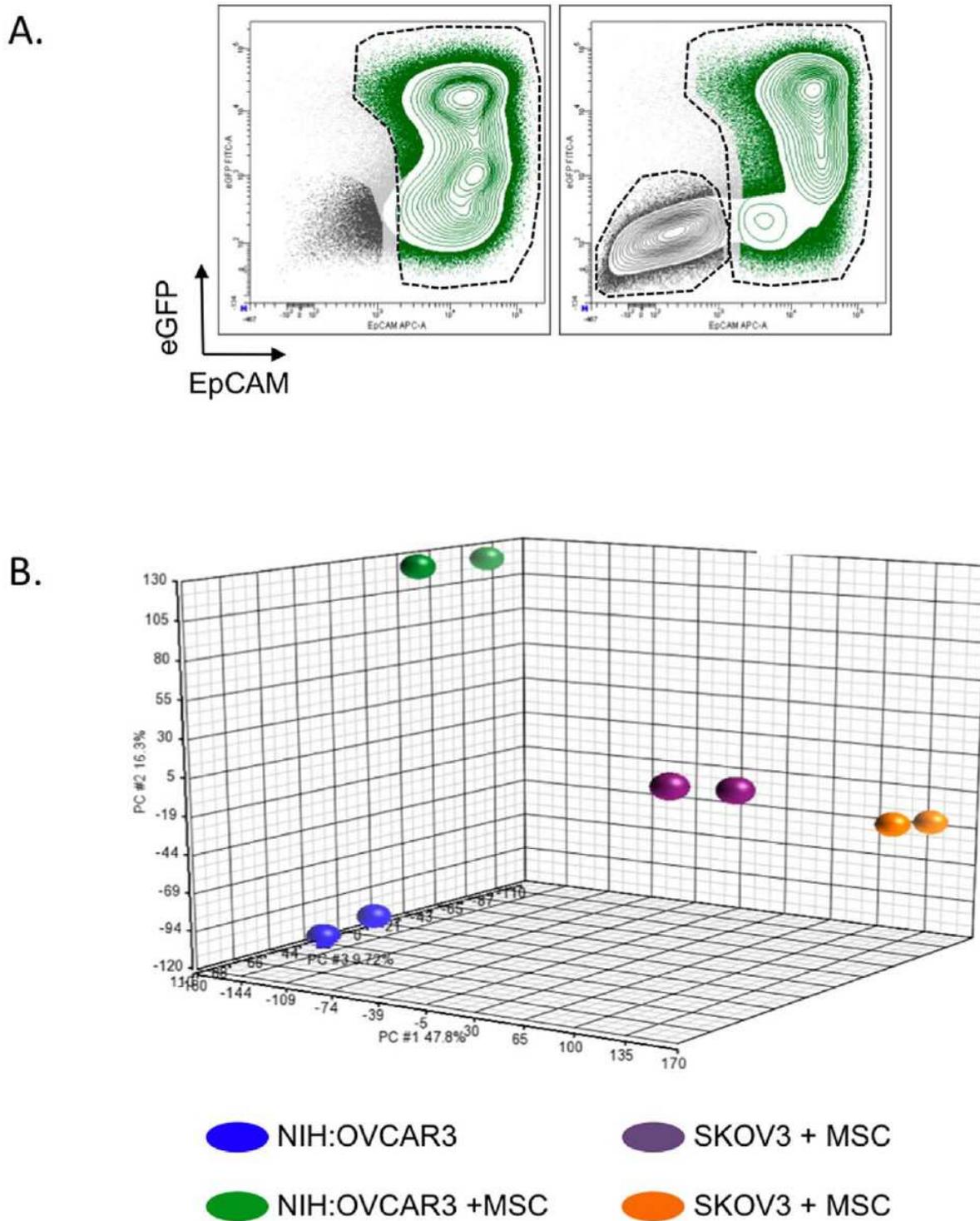


Figure 1. Modification of OCC transcriptome upon interaction with MC. **A.** Contour plot showing a typical discrimination of OCC and MC by FACS. OCC were defined as eGFP+EpCAM+ (green population) whereas MCs were defined as eGFP-EpCAM- (dark grey population). **B.** PCA analysis for the ovarian cancer cells lines alone or post-contact with the Mesenchymal cells.
doi:10.1371/journal.pone.0038340.g001

$p = 4.36.48 \times 10^{-7}$; SKOV3, $p = 6.79 \times 10^{-6}$) and “Cell death of tumor cell line” (NIH:OVCA3, $p = 5.68 \times 10^{-8}$; SKOV3, $p = 7.62 \times 10^{-5}$). These clusters were shared between NIH:OVCA3-eGFP and SKOV3-eGFP (Table 1).

Taken together these data indicate that despite the lack of overlapping regarding the genes up-or down-regulated by MC contact, the same biological function clusters were enriched in the two ovarian cancer cell line we tested. In this article, we set forth

Table 1. MC contact enriches biological function gene clusters.

Biological function	OVCAR3-eGFP				SKOV3-eGFP			
	ID	Gene Name	Gene Symbol	Fold Change relative to the control	ID	Gene Name	Gene Symbol	Fold Change relative to the control
Metastasis	221577_x_at	Growth Differentiation Factor 15	GDF15	27.920	206336_at	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	CXCL6	15.511
	217678_at	Solute carrier family 7 anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member 11	SLC7A11	15.653	201438_at	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	10.121
	202672_s_at	Activating transcription factor 3	ATF3	12.425	212942_s_at	KIAA1199	KIAA1199	9.958
	201010_s_at	Thioredoxin interacting protein	TXNIP	9.983	216598_s_at	Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	8.275
	212314_at	sel-1 suppressor of lin-12-like 3	SEL1L3	5.560	228128_x_at	Pregnancy-associated plasma protein A	PAPPA	7.330
	200953_s_at	cydin D2	CCND2	5.423	205828_at	Matrix metalloproteinase-3	MMP3	5.878
	210105_s_at	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	FYN	5.237				
	201438_at	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	-9.575				
	211719_x_at	Fibronectin 1	FN1	-10.982				
Proliferation of cell lines	221577_x_at	Growth Differentiation Factor 15	GDF15	27.920	1556499_s_at	Collagen, type I, alpha 1	COL1A1	31.150
	217678_at	Solute carrier family 7 anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member 11	SLC7A11	15.653	202291_s_at	Matrix gla protein	MGP	16.068
	206085_s_at		CTH	14.916	216598_s_at	Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	8.275
	202672_s_at	Activating transcription factor 3	ATF3	12.425	204051_s_at	Secreted frizzled-related protein 4	SFRP4	7.872
	201010_s_at	thioredoxin interacting protein	TXNIP	9.983	228128_x_at	Pregnancy-associated plasma protein A	PAPPA	7.330
	208763_s_at	TSC2 domain family, member 3	TSC2D3	9.287	228335_at	Claudin-11	CLDN11	6.752
	203725_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, GADD45A alpha	GADD45A	8.742	212667_at	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine	SPARC	6.460
	203543_s_at	Kruppel-like factor 9	KLF9	7.605	205828_at	Matrix metalloproteinase-3	MMP3	5.878
	203140_at	B-cell CLL/lymphoma 6	BCL6	5.544	209821_at	Interleukin 33	IL33	5.069
	200953_s_at	cydin D2	CCND2	5.423				
	212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP, beta	CEBPB (includes EG:1051)	5.386				
	210105_s_at	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	FYN	5.237				
	202581_at	heat shock 70kDa protein 1A/1B	HSPA1A/HSPA1B	-5.105				
	1556499_s_at	Collagen, type I, alpha 1	COL1A1	-9.175				

Table 1. Cont.

OV/CAR3-eGFP			SKOV3-eGFP					
Biological function	ID	Gene Name	Gene Symbol	Fold Change relative to the control	ID	Gene Name	Gene Symbol	Fold Change relative to the control
	211719_x_at	Fibronectin 1	FN1	-10.982				
	200665_s_at	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine	SPARC	-11.110				
Cell Death of tumor cell line	221577_x_at	Growth Differentiation Factor 15	GDF15	27.920	216598_s_at	Chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	8.275
	205047_s_at	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	ASNS	23.756	204051_s_at	Secreted frizzled-related protein 4	SFRP4	7.872
	217678_at	Solute carrier family 7 anionic amino acid transporter light chain, xc-system, member 11	SLC7A11	15.653	212667_at	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine	SPARC	6.460
	202672_s_at	Activating transcription factor 3	ATF3	12.425	208998_at	Uncoupling Protein 2	UCP2	-5.162
	209383_at	DNA-damage-inducible transcript 3	DDIT3	9.775				
	203725_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha		8.742				
	202887_s_at	DNA-damage-inducible transcript 4	DDIT4	6.046				
	203140_at	B-cell CLL/lymphoma 6	BCL6	5.544				
	212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB (includes EG:1051)	5.386				
	202581_at	heat shock 70kDa protein 1A/1B	HSPA1A/HSPA1B	-5.105				
	210338_s_at	heat shock 70kDa protein 8	HSPA8	-7.289				
	211719_x_at	Fibronectin 1	FN1	-10.982				
	200665_s_at	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine	SPARC	-11.110				

Table showing the biological clusters identified by IPA analysis. p-values for the different clusters are: "Metastasis" (NIH:OV/CAR3, p = 6.48*10⁻⁶; SKOV3, p = 5.42*10⁻⁵), "Proliferation of cell lines" (NIH:OV/CAR3, p = 4.36.48*10⁻⁷; SKOV3, p = 6.79*10⁻⁹) and "Cell death of tumor cell line" (NIH:OV/CAR3, p = 5.68*10⁻⁶; SKOV3, p = 7.62*10⁻⁵). These clusters were shared between NIH:OV/CAR3-eGFP and SKOV3-eGFP. doi:10.1371/journal.pone.0038340.t001

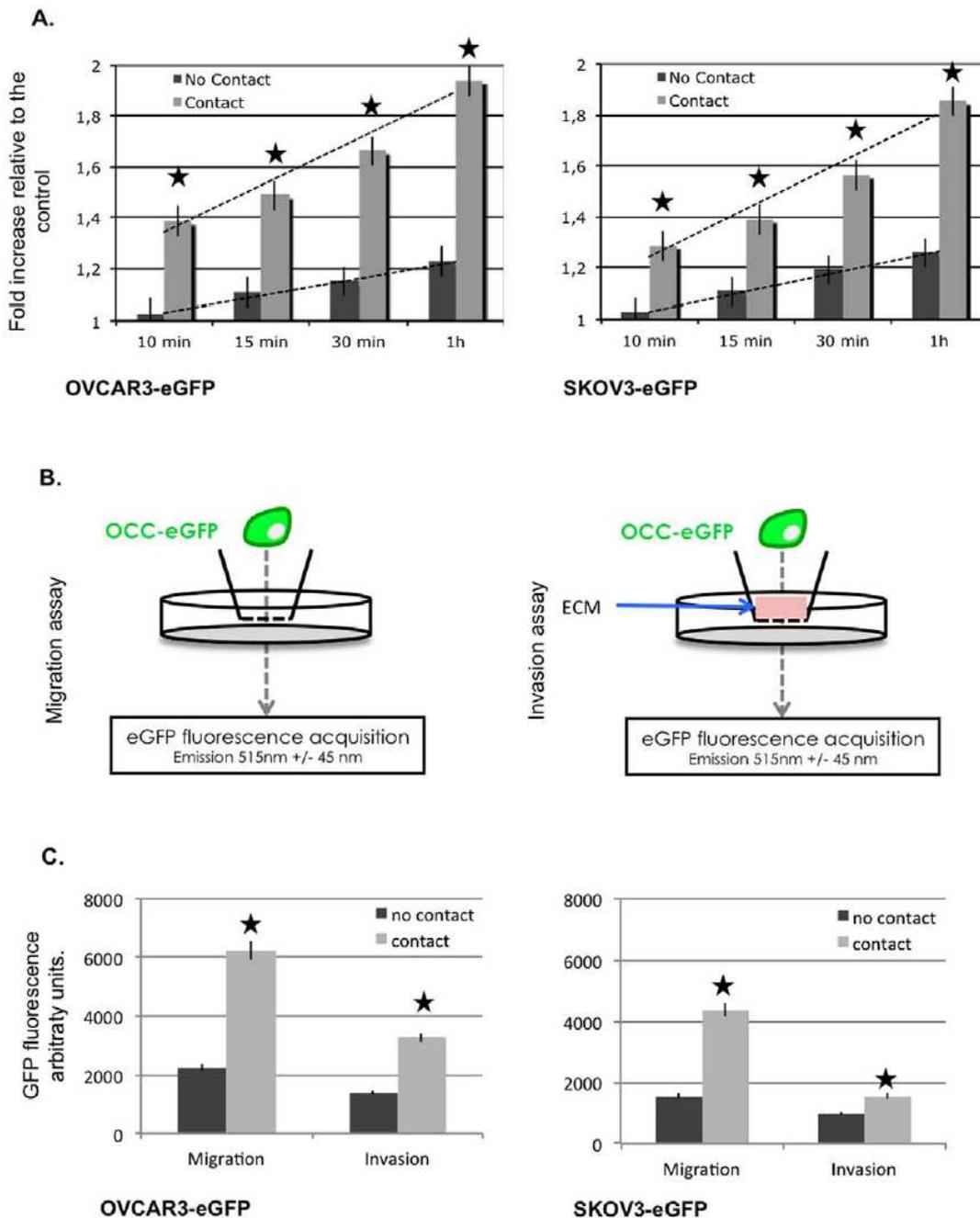


Figure 2. MCs increase OCC metastasis biological function: adherence, migration and invasion. **A.** OCC-eGFP (NIH:OVCAR3, left chart and SKOV3, right chart) were seeded on a Matrigel (BD Biosciences)-coated well for 10 min, 15 min, 30 min and 1 hour. Increased adherence to the ECM is observed when OCC were preemptively cultivated with MC (light grey bars) compared to the control (dark grey bars). **B.** Scheme representing the invasion and migration assay. **C.** Sorted OCC were seeded on (un) coated transwells and GFP signal of each well under the coated membrane was acquired after 24 h. Increased migration and invasion through the ECM is observed when OCC were preemptively cultivated with MC (light grey bars) compared to the control (dark grey bars). SEM are represented, n=3, | p<0.05 t-Student Test. doi:10.1371/journal.pone.0038340.g002

the idea that MC exert a pro-metastatic effect on OCC, therefore we decided to validate the biological function clusters described in Table 1 with *in vitro* experimentations.

MCs increase OCC metastasis biological function: adherence, migration and invasion

Peritoneal metastasis initiation involves adherence, migration, and invasion through the mesothelium. Using IPA software, we

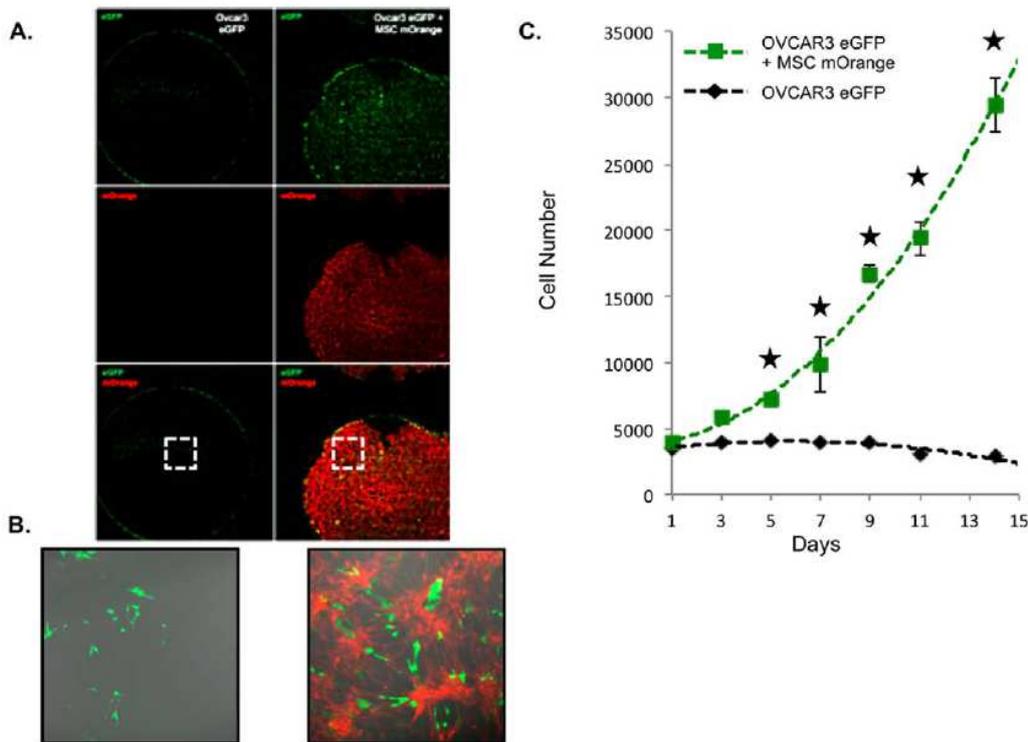


Figure 3. MC sustains OCC proliferation in a serum free cytokine free context. **A.** OCC were cultivated on a MC expressing mOrange or directly on the plastic dish. Proliferation assay was carried out in a serum free-cytokine free media. Pictures were taken every two days, and GFP cells were quantified. **B.** Detail of the well on day 14, we can notice OCC display a normal morphology. **C.** Chart displaying cell count carried over 14 days. OVCAR3 eGFP when seeded on a MC are able to sustain cell cycle in a serum free cytokine free media. Similar results were obtained with SKOV3 (data not shown). SEM are represented, $n = 3$, $p < 0.05$ t-Student Test. doi:10.1371/journal.pone.0038340.g003

identified a biological function cluster: “metastasis”, which was enriched upon ovarian cancer cell contact with MC. We therefore investigated the biological effect corresponding to this genomic pro-metastatic modification performing *in vitro* migration, adherence and invasion assays. Upon 24 hours of co-culture with MC, OCC (EpCAM+ eGFP+) were sorted (Figure 1A). We then tested OCC ability’ to adhere to ECM. OCC (NIH:OVCAR3 and SKOV3) were seeded on a Matrigel (BD Biosciences)-coated well for 10 min, 15 min, 30 min and 1 hour. We defined the adherence to the ECM as the residual GFP fluorescence we were able to acquire following PBS washing. As displayed in Figure 2.A, both ovarian cancer cell line show an increased adherence to the ECM: 1.38 fold increase relative to the control for NIH:OVCAR3-eGFP at 10 min, and 1.94 fold increase at 1 h, 1.28 and 1.85 fold for SKOV3-eGFP at 10 min and 1 hour respectively.

To perform migration assay, we seeded 8 μ m transwell with the OCC sorted upon 24 h of co-culture with MC. We tested their ability to migrate through the transwell insert and measured the GFP signal of each well after 24 h. We observed a 2 fold and 2.5 fold increased migration with NIH:OVCAR3 and SKOV3 after MC contact, respectively.

To perform invasion assay, we used Matrigel (BD Biosciences)-coated 8 μ m transwells. Sorted OCC were seeded on coated transwells and GFP signal of each well under the coated membrane was acquired after 24 h. Cell migration was increased by 2.5 times and 1.5 times for NIH:OVCAR3 and SKOV3 after MC contact, respectively.

We demonstrated here, that MC through direct interaction with OCC were able to change drastically OCC behavior. Following

MC contact OCC displayed a greater adherence to the ECM, a faster migration and a more efficient invasion through the ECM. Taken all together these observations emphasize the role of MC, to enhance at both the transcriptional and functional level the metastatic potential of OCC.

Mesenchymal cells sustain ovarian cancer cells proliferation

Following mesothelial infiltration, development of peritoneal carcinosis involves proliferation of ovarian cancer cells within their surrounding stroma. We clustered genes based on their biological function, and demonstrated that genes involved in proliferation of cell lines were enriched upon MC contact with OCC (Table 1). We therefore investigated the ability of the MC to sustain OCC proliferation. Since the use of serum in order could greatly hamper the study of the effect of the microenvironment on the ovarian cancer cell, we performed the proliferation assay in a serum free, cytokine free context. OCC-eGFP (NIH:OVCAR3 and SKOV3) were cultured alone or on a MC-mOrange monolayer. We observed that MC sustained cancer cell growth at least for 15 days while OCC were quiescent in their absence (Figure 3A–C).

MC induce Chemoresistance of ovarian cancer cells

The treatment of ovarian cancer with peritoneal carcinosis, i.e. advanced stage disease, includes chemotherapy before or after surgery. We clustered genes based on their biological function, and demonstrated that genes involved in “Cell death of tumor cell

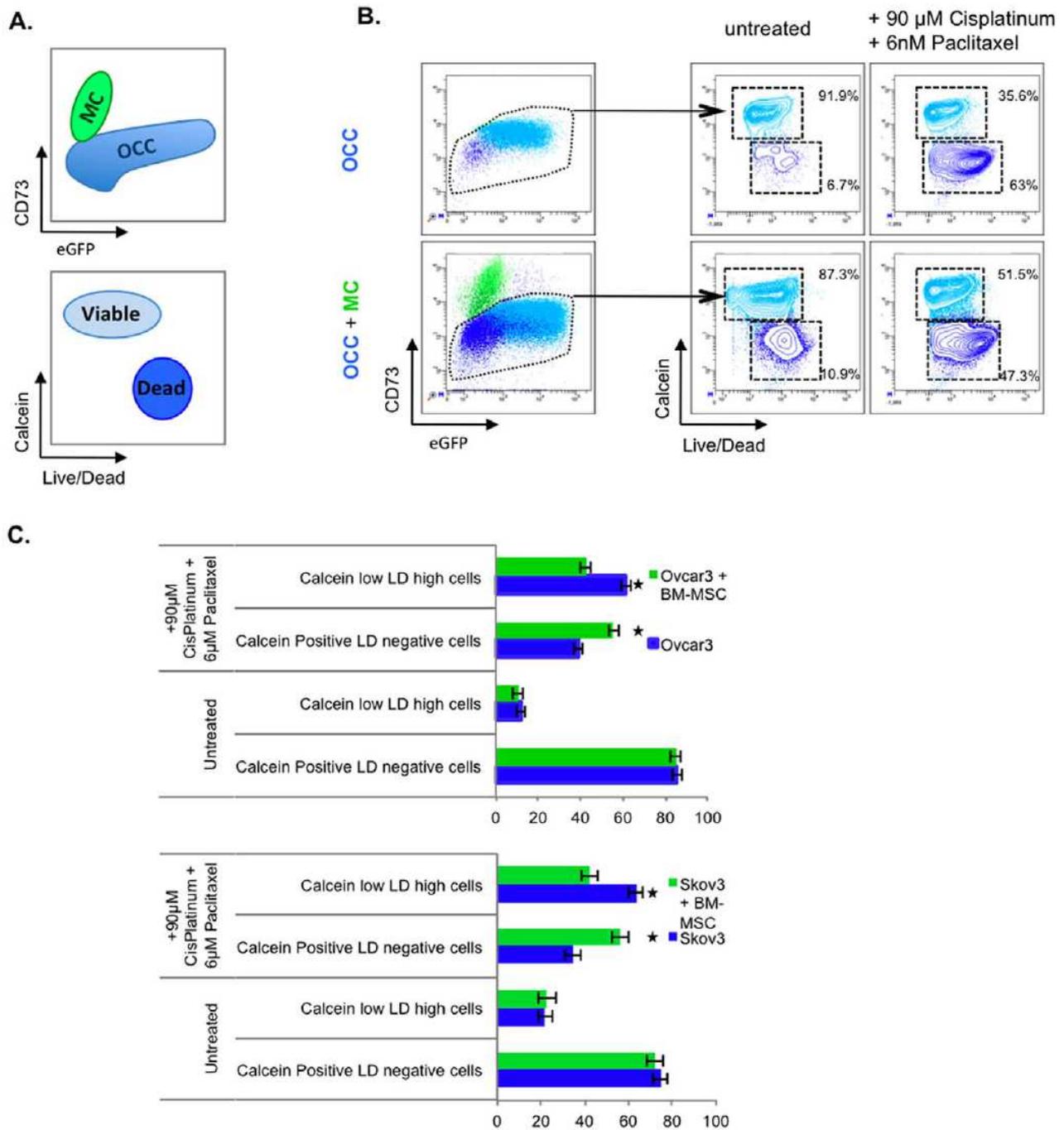


Figure 4. MC protects OCC from chemotherapy induced cell death. **A.** Explanative scheme of FACS analysis. **B.** OCC or OCC co-cultivated with MSC were treated for 48 hours with 90 μ M of Cisplatin and 6 nm of Paclitaxel. Cell types were discriminated by FACS using GFP as a cancer cell marker, and CD73 as an MC marker. Cell death analysis was carried out using the dual Calcein/Live Dead staining. **C.** Quantitation of cell death analysis experiments. OCC display a resistance to conventional chemotherapy treatment when co-cultivated with MC compared to the control. SEM are represented, n=3, | p<0.05 t-Student Test. doi:10.1371/journal.pone.0038340.g004

line” of cell lines were enriched upon MC contact with OCC (Table 1). We therefore investigated whether MC are capable of promoting OCC resistance to chemotherapy.

OCC were cultivated for 24 h in absence or presence of MC in a serum free, cytokine free media. The mono- or cocultures were then treated for 24 hours with 90 μ M Cisplatin and 6nm

Paclitaxel. Prior FACS analysis, cells were stained with a viability dye (Calcein) and a cell death dye (LIVE/DEAD). OCC and MSC were discriminated on their differential expression of CD73 and eGFP, OCC were defined as eGFP+CD73- (figure 4.A, upper panel). Viable OCC after chemotherapy treatment was defined as Calcein High/Live Dead (LD) negative (figure 4.A, lower panel).

Co-culture of OCC with MC did not modify cell viability or mortality before chemotherapy (Figure 4.B and 4.C). Chemotherapeutic treatment resulted in 61.4% (NIH:OVCAR3) and 63.4% (SKOV3) of OCC death (Calcein low, LD high cells) (Figure 4.C). While OCC death was reduced after chemotherapy with 42.3% (NIH:OVCAR3) and 42% (SKOV3) of Calcein low, LD high cells in presence of MC (Figure 4.C).

In corroboration with our IPA results, we demonstrated that MC were not only able to enrich gene clusters that are involved in regulation of cell death, but were also promoting OCC resistance (1.45 and 1.50 fold decrease in cell death for NIH:OVCAR3 and SKOV3 respectively) to chemotherapy.

Discussion

Our study demonstrated that MCs modify OCC transcriptome toward a metastatic profile. Upon contact with MC, OCC lines (NIH:OVCAR3 and SKOV3) enriched three biological function clusters: “Metastasis”, “Proliferation of cell lines”, “Cell death of tumor cell line”. We validated that these functions were modified *in vitro*. Our data indicated that MC contact with OCC increased adherence, migration and invasion to/through the ECM, proliferation, and resistance to chemotherapy. This is consistent with reports of MCs modifying ovarian cancer cells behavior [7,8,11,12,17].

The peritoneal cavity is lined by a continuous single layer of mesothelial cells [18]. Mesothelial cells are described in the literature as the first line of defense against all abdominally metastasizing tumors. Therefore, the development of peritoneal carcinosis in ovarian cancer involves several key steps: adhesion and clearance to/of the mesothelial layer, migration and invasion through the mesothelial and sub-mesothelial layers, and proliferation of the ovarian cancer cells [2,19]. While mesothelial cells have been described to inhibit ovarian cancer cell adhesion and invasion [20], carcinoma-associated fibroblasts (CAF) display the opposite effects [12,20]. In our study, we demonstrated that mesenchymal cells (MC) increased ovarian cancer cells adhesion and invasion. This is in line with Kenny and al data where they described mesenchymal cells-derived fibroblasts promote ovarian cancer cell migration and invasion in a MMP2 dependant manner [21]. Recently, they also showed the role of adipocytes in ovarian cancer progression [22]. Noteworthy, MC are described to differentiate into CAF and adipocytes when they are exposed to ovarian cancer cell supernatant [11,17]. Taken together these data demonstrate that the mesenchymal lineage (MC, CAF, adipocytes) constitutes a permissive niche to ovarian cancer cells, and could explain the peritoneal tropism of ovarian tumor metastatic outgrowth.

In this study we demonstrated that MC sustain ovarian cancer cell proliferation in a serum free, cytokine free context. These data obtained *in vitro*, are in corroboration with several *in vivo* report. For instance, Pasquet and al. demonstrated that mesenchymal ascites derived stromal cells promote ovarian tumor growth in nude mice [9]. This ability of mesenchymal ascites derived stromal cells to promote ovarian tumor growth was explained by the induction of ovarian cancer cell proliferation, and by an increase of angiogenesis [9]. More recently, Mac Lean and al. showed that MC could also increase ovarian tumor heterogeneity. Altered secretion of BMP2 by MCs is able to increase the number of ovarian cancer stem cells and consequently stimulate ovarian tumor growth in an immuno-compromised mouse [12]. Another component of mesenchymal lineage, the adipocytes, was also

reported to increase *in vitro* and *in vivo* tumor growth by providing energy to the cancer cells through the production of fatty acids [22]. The role of the fatty acid on the ovarian cancer cell biology is recently emerging. A recent work showed that chemoresistance were induced by MC through the release of platinum-induced fatty acids [23]. These fatty acid demonstrated the ability, in a context of xenograft, to protect OCC from numerous chemotherapeutic agents [23]. Since the main clinical issue regarding the ovarian disease is the relapse emerging from a platinum resistant minimal disease, it is interesting to note that MC and other mesenchymal components are able to drive both proliferation and resistance to therapy by providing a permissive “metabolic” niche.

Therefore MC and MC-derived cells determine both ovarian cancer biology and ovarian cancer response to therapy. Understanding gene expression changes that occur in OCC upon their interaction with their MC niche could help to define new therapeutic approaches. Our aim in this study was to describe a relationship between changes that occur in ovarian cancer cell line at the transcriptomic level and differences in cell behavior we observed with the coculture assay we performed. One limitation of this study is that compared transcriptomic analysis of NIH:OVCAR3 and SKOV3 in contact with MC failed to define a shared global change at the gene expression level. Recently the cancer genome atlas published their work on ovarian serous adenocarcinomas [24]. They were able to define four new subsets (differentiated, immunoreactive, mesenchymal and proliferative) of ovarian high-grade serous adenocarcinomas based on a gene expression study of 489 patients [24]. One explanation for the lack of overlap in gene expression changes between NIH:OVCAR3 and SKOV3 could be that each cell line belongs to different subset of ovarian high-grade serous adenocarcinomas. Indeed OVCAR3 and SKOV3 could represent different cell types based on the principal component analysis (Figure 1.B). Despite the apparent discrepancy, we were able to define three identical biological-function gene clusters enriched upon MC contact that corroborated our *in vitro* data. Surprisingly, the mesenchymal niche seems to be permissive to two different subsets of ovarian serous adenocarcinomas adhesion, migration, invasion, proliferation and chemoresistance. Further studies on the effect of the microenvironment on each different subset of ovarian serous adenocarcinomas (differentiated, immunoreactive, mesenchymal and proliferative) are therefore required to refine the genes involved and define innovative therapeutic approaches.

Supporting Information

Table S1 Gene expression analysis. Fold changes represents the gene expression changes in NIH:OVCAR3 after contact with MC compared to the control. (DOC)

Table S2 Gene expression analysis. Fold changes represents the gene expression changes in SKOV3 after contact with MC compared to the control. (DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RL CT AR. Performed the experiments: RL CT. Analyzed the data: RL CT JM KS. Contributed reagents/materials/analysis tools: CR. Wrote the paper: RL CT MM AR.

References

- Cannistra SA (2004) Cancer of the Ovary. *New England Journal of Medicine* 351: 2519–2529.
- Ceelen WP, Bracke ME (2009) Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *The Lancet Oncology* 10: 72–79.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y (2006) Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermine lung metastasis. *Nat Cell Biol* 8: 1369–1375.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, et al. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438: 820–827.
- Kaplan RN, Rafii S, Lyden D (2006) Preparing the “Soil”: The Premetastatic Niche. *Cancer Research* 66: 11089–11093.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284: 143–147.
- Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zvezdaryk KJ, Dembinski JL, et al. (2009) The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 3806–3811.
- Lis R, Touboul C, Mirshahi P, Ali F, Mathew S, et al. (2011) Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *International Journal of Cancer* 128: 715–725.
- Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, et al. (2010) Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *International Journal of Cancer* 126: 2090–2101.
- Martinet L, Poupot R, Mirshahi P, Rafii A, FourniÉ, J-J, et al. (2010) Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *International Journal of Cancer* 126: 2143–2152.
- Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, et al. (2009) Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *PLoS ONE* 4: e4992.
- McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, et al. (2011) Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *The Journal of Clinical Investigation* 121: 3206–3219.
- Zhang S, Wang J, Bilen M, Lin S-H, Stupp S, et al. (2009) Modulation of prostate cancer cell gene expression by cell-to-cell contact with bone marrow stromal cells or osteoblasts. *Clinical and Experimental Metastasis* 26: 993–1004.
- Carolan BJ, Harvey B-G, De BP, Vanni H, Crystal RG (2008) Decreased Expression of Intelectin 1 in the Human Airway Epithelium of Smokers Compared to Nonsmokers. *The Journal of Immunology* 181: 5760–5767.
- Hackett NR, Heguy A, Harvey B-G, O'Connor TP, Luettich K, et al. (2003) Variability of Antioxidant-Related Gene Expression in the Airway Epithelium of Cigarette Smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 331–343.
- Harvey B-G, Heguy A, Leopold P, Carolan B, Ferris B, et al. (2007) Modification of gene expression of the small airway epithelium in response to cigarette smoking. *Journal of Molecular Medicine* 85: 39–53.
- Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, et al. (2008) Cancer-Derived Lysophosphatidic Acid Stimulates Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Myofibroblast-Like Cells. *STEM CELLS* 26: 789–797.
- Kenny HA, Nieman KM, Mitra AK, Lengyel E (2011) The First Line of Abdominal Metastatic Attack: Breaching the Mesothelial Cell Layer. *Cancer discovery* 1: 100–102.
- Iwanicki MP, Davidowitz RA, Ng MR, Besser A, Muran T, et al. (2011) Ovarian cancer spheroids use myosin-generated force to clear the mesothelium. *Cancer discovery* 1: 144–157.
- Kenny HA, Krausz T, Yamada SD, Lengyel E (2007) Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. *International journal of cancer* *Journal international du cancer* 121: 1463–1472.
- Kenny HA, Lengyel E (2009) MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell cycle* 8: 683–688.
- Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, et al. (2011) Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine* 17: 1498–1503.
- Roodhart JML, Daenen LGM, Stigter ECA, Prins H-J, Gerrits J, et al. (2011) Mesenchymal Stem Cells Induce Resistance to Chemotherapy through the Release of Platinum-Induced Fatty Acids. *Cancer Cell* 20: 370–383.
- (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474: 609–615.

II. Article 2 : les cellules souches mésenchymateuses augmentent la dissémination tumorale ovarienne par la sécrétion d'IL6 dans un modèle 3D à base de membrane chorioamniotique :

Ce travail fait actuellement l'objet d'une soumission dans « Journal of Translational Medicine ».

- Résumé long :

Alors que de nombreux travaux portent sur la dissémination métastatique à distance des cancers, la biologie de la dissémination péritonéale du cancer de l'ovaire de stade avancé est moins étudiée. Nous savons qu'il existe des interactions entre les cellules mésothéliales du péritoine et les cellules tumorales ovariennes permettant à ces dernières de s'engouffrer dans une brèche mésothéliale, première barrière péritonéale. En effet, Kenny a montré que les cellules tumorales ovariennes adhéraient aux cellules mésothéliales grâce aux intégrines, après fractionnement de la fibronectine par la MMP-2 [56]. Iwanicki montre lui la dissociation des cellules mésothéliales par les forces de tractions liées à l'activation de la myosine dans les cellules tumorales [36]. Durant l'envahissement sous-mésothélial les cellules tumorales sont ensuite en contact avec un stroma complexe contenant des cellules inflammatoires comme les cellules mésenchymateuses souches (MSC). Nous avons déjà montré l'influence des MSC sur la croissance et la résistance aux traitements des cellules tumorales ovariennes [28, 226]. Malheureusement, le manque de modèle permettant de mimer l'extension péritonéale limite l'étude des mécanismes moléculaires impliquant les cellules tumorales et les cellules stromales.

Nous avons donc étudié les mécanismes d'invasion stromale des cellules tumorales ovariennes en utilisant un modèle en 3 dimensions (3D) à base de membrane amniochorionique. En effet la membrane amniochorionique a été utilisée pour mimer le péritoine et elle est composée en abondance de cellules ayant les caractéristiques des MSCs.

Dans cette étude nous avons développé un modèle d'infiltration tumorale en 3D et démontré le rôle des MSCs dans l'envahissement précoce des cellules tumorales ovariennes. Les tumeurs étaient développées dans les régions riches en MSC dans 70% des cas et infiltraient significativement plus profondément la membrane que dans les zones pauvres en MSC. Nous avons mis en évidence le rôle déterminant de l'IL6 comme médiateur du dialogue entre les MSC et les cellules tumorales ovariennes, indispensable à l'infiltration des cellules tumorales ovariennes et plus particulièrement dans les zones riches en MSC.

Ces données, en accord avec des données récentes de la littérature, montrent l'intérêt de bloquer spécifiquement les interactions entre les cellules tumorales ovariennes et les MSCs. Cibler L'IL6 et son récepteur pourraient être une des voies à tester afin d'enrichir l'arsenal thérapeutique disponible dans le cancer de l'ovaire de stade avancé.

**Mesenchymal stem cells enhance ovarian cancer cell infiltration through IL6
secretion in an amniochorionic membrane based 3D model**

Cyril Touboul, MD,^{1,2,*} Raphael Lis, PhD,^{1,3,*} Halema Al Farsi,¹ Christophe M.
Raynaud, PhD,¹ Mohamed Warfa,¹ Eliane Mery, MD,⁴ Massoud Mirshahi, MD,
PhD,² Arash Rafii, MD, PhD,^{1,3}

Short title: Mesenchymal stem cells enhance ovarian cancer cell infiltration

* These authors contributed equally to this work.

Affiliation:

¹*Stem cell and microenvironment laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar, Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar.*

²*UMRS 872 INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Equipe 18, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Medecine, 75270, Paris Cedex 06, France.*

³*Department Genetic Medicine, Weill Cornell Medical College, NY, USA.*

⁴*Department of Pathology, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France.*

Corresponding author:

Dr Arash Rafii.

Department of Genetic Medicine and Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, Stem cell and microenvironment laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar, Qatar-Foundation PO: 24144, Doha, Qatar.

Phone: +974 3313 5828. Fax: +974 4492 8422. Mail: jat2021@qatar-med.cornell.edu

Key words: Ovarian cancer, IL6, Tumor infiltration, 3d model, Mesenchymal stem cell

Research article

Novelty and impact of the work: We used amniochorionic membrane scaffold to mimic early invasion of epithelial ovarian cancer in a 3D context. Mesenchymal stem cells (MSC) and their interactions with ovarian cancer cells (OCC) mediated by IL6, were determinant for cancer migration and infiltration. Thus cytokine inhibitors interrupting the cross-talk between OCC and MSC such as IL6 should be investigated as a new therapeutic approach in ovarian cancer.

Abstract

The early peritoneal invasion of epithelial ovarian cancer (EOC) by tumoral aggregates presents in ascites is a major concern. The role of the microenvironment seems to be important in this process but the lack of adequate models to study such interactions does not allow to uncover the molecular pathways involved. Thus we used millimetric pieces of amniochorionic membrane - referred to as amniotic membrane scaffold (AMS) - to create 3D peritoneal nodules mimicking EOC early invasion. Here we show that ovarian cancer cells (OCC) tumors were located in regions rich in MSC (70%). The tumors infiltrated deeper within AMS in regions rich in mesenchymal stem cell (MSC) ($p < 0.001$). In vitro tests revealed that higher IL6 secretion in a context of MSC-OCC co-culture could enhance migration and invasion of OCC. After IL6 receptor antagonism, OCC infiltration was significantly decreased, mostly in regions rich in MSCs, indicating that recruitment and tridimensional invasion of OCC was dependent of IL6 secretion. The use of tridimensional models using AMS could be a useful tool to decipher early molecular events in ovarian cancer metastasis. Cytokine inhibitors interrupting the cross-talk between OCCs and MSCs such as IL6 should be investigated as a new therapeutic approach in ovarian cancer.

Introduction

Epithelial Ovarian carcinoma (EOC) is the sixth most common malignancy in woman and the leading cause of death from gynecological cancer [2, 3]. One of the main differences between EOC and other neoplasm is burden of local extension. Indeed tumor cells spread leads rapidly to peritoneal carcinosis. Hence the majority of mortality in EOC is due to extensive peritoneal disease, with an overall survival ranging from 20 to 30 % at 5 year [141].

While many studies in the literature address the issue of distant metastasis through blood circulation, the biology of peritoneal tumor spread in advanced EOC is not well known. Development of peritoneal carcinomatosis involves well-defined critical steps, including cells shedding and transport, interaction and adhesion to mesothelial layer, as well as colonization and proliferation into the sub-mesothelial microenvironment [227]. During the invasion of the sub-mesothelium ovarian cancer cells (OCC) interact with a complex stroma containing cells such as inflammatory cells and mesenchymal stem cells (MSC). A growing number of studies underlie the role of the microenvironnement in EOC peritoneal spreading. Bourguignon et al. enlightened the involvement of hyaluronan-CD44 (hyaluronan receptor) in early adhesion of OCC to peritoneal sheath [233]. We have previously demonstrated the role of MSC in ovarian tumor growth and resistance to therapy [28, 226, 234]. The lack of optimal models to mimic peritoneal extension is a limitation to decipher molecular events implicated in the interaction between cancer and stromal cells. Indeed most OCC exfoliate in the peritoneal cavity and evolve as

aggregates or spheroids. Hence, classical 2D cultures might not represent an ideal model to reproduce stepwise metastasis initiation [191].

The peritoneum is a complex organ composed by the mesothelium, a simple squamoid epithelium lining also the pleural and pericardial cavities. This surface epithelium is attached to a basement membrane lying on a stroma of variable thickness constituted by a collagen-based matrix, blood and lymphatic vessels, nerve fibers, and, in the normal state, rare hematogenous cells [54]. Two joint membranes compose the amniochorionic membrane (AM): the amnion and the chorion. The amnion is composed by a monolayer of epithelial cells separated from a mesenchymal cellular stroma by a thick basement membrane [212]. It has been used in various studies to mimick the peritoneum [235, 236]. The rich content of MSCs in the amniochorionic membrane might also be an optimal tool to understand the interaction between cancers cells and stromal cells [212, 237].

In this study, we hypothesized that MSCs could play a role in the infiltration of OCC in the sub-mesothelial layer. We demonstrated that AMS is an appropriate tool to study early adhesion of OCC aggregates to epithelial sheath and early invasion into sub-mesothelial layer. We were able to correlate the distribution of OCCs infiltration with the presence of MSC within the AMS. IL6 was found as a factor secreted in co-culture between MSC and OCC and was a determinant factor for OCC infiltration within the AMS.

Material and methods

Culture of ovarian cancer spheroids with amniochorionic membrane

Fifty thousand ovarian cancer cells (OCC) were cultivated in ultralow attachment 48 well plate (Corning) in DMEM/F12 (1:1) (Hyclone) basal media supplemented with 2mM L-Glutamine (Hyclone), 1x Non Essential Amino Acid (NEAA) (Hyclone), PenStrepAmpB (Sigma), 20 ng/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Peprotech), 20 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) (Peprotech), 5µg/ml Insulin (Sigma), 2% B27 supplements (Invitrogen) and 4% basement matrigel (BD Biosciences). Cultures were incubated in humidified 5% CO₂ incubators and the media was replaced every 3 days.

Following approval from the Internal review Board (HMC- IRB protocol 9109/09, Weill Cornell Medical College in Qatar), placenta and amniochorionic membranes were collected from donors at Woman's Hospital at Hamad Medical Corporation immediately after elective caesarean section in the absence of labor, preterm rupture of membrane-chorioamnionitis. The amniochorionic membrane was washed with PBS and red blood cells were removed using RBC lysis buffer (eBiosciences). Millimetric pieces of amniochorionic membrane (referred to as amniotic membrane scaffold (AMS)) were co-cultivated with the OCC.

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) analysis.

Amniochorionic membrane was washed with PBS and red cells were removed with RBC lysis buffer (eBiosciences). We then chunked and digested the membrane in a pre-warmed cocktail of Dispase 2 (1mg/ml, Stem Cells Inc) and Collagenase / Hyaluronidase (300 µg/ml and 100 µg/ml respectively, Stem Cells Inc) during 45 minutes at 37°C. We then filtered the digested tissue in a 100µm filter and obtained a

cell suspension. Cell suspension was stained with Mouse anti-human CD45 antibody (BD Biosciences, #339192, clone 2D1) coupled with Amcyan, Mouse anti-human CD34 (BD Biosciences, #555821, clone 581) coupled with FITC, Mouse anti-human CD105 (biolegend, #323212, clone 43A3) coupled with AF647, Mouse anti-human CD73 (BD Biosciences, #550257, clone AD2) coupled with PE, Mouse anti-human CD29 (biolegend, #323212, clone TS2/16) coupled with APC-Cy7, Mouse anti-human CD90 (BD Biosciences, #550402, clone 5E10) coupled with AF700, Mouse anti-human CD44 (BD Biosciences, #555479, clone G44-26) coupled with PE.

Briefly, 1.10^6 cells were harvested and non-specific binding prevented by blocking in PBS- 5%FBS-1%BSA-10%FcR Blocking Reagent (Myltenyi Biotec) for 30 minutes on ice. Cell suspension was incubated with specific antibodies for 45 minutes on ice. Filtered, single-cell suspension was analyzed by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) on a SORP FACSAria2 (BD Biosciences). Data were processed with FACSDiva 6.3 software (BD Biosciences). Doublets were excluded by FSC-W x FSC-H and SSC-W x SSC-H analysis, single stained channels were used for compensation, and fluorophore minus one (FMO) controls were used for gating, 500 000 events were acquired per sample.

Confocal analysis

Tumors were washed two times with PBS and fixed with paraformaldehyde 3.7% (Sigma) before staining. The antibodies used were the mouse anti human CD73_APC (Biolegend, #344006, clone AD2) and CD90_PerCP-Cy5.5 (Biolegend, #328118, clone 5E10). The non-specific sites were blocked with PBS with 0.3% bovine serum albumin and 0.5% HS during one hour. Tumors were incubated with the antibodies and FcR bloking reagent (Miltenyi, #120-000-442) overnight and washed

third in PBS. Slides were mounted with the Fluoromount Kit containing 4-, 6-diamidino-2- phenylindole (Invitrogen) to counterstain the nuclei. The slides were analyzed with a Zeiss confocal microscope Laser Scanning Microscope 710 (Carl Zeiss). Pictures were analyzed with Zen 2008 V5,0,0228 software (Carl Zeiss).

Migration and invasion assays:

Wound healing assay: OCC OVCAR3 (50 000 cells/well) were plated in 24-well plates in triplicate for each condition. The cells were starved from serum during 24 hours in a serum free cytokine free context. The same straight scratch was made in all the wells with a 1 mL pipette tip. After washing the well with PBS to remove the detached cells, a fresh medium containing specific molecule for each condition was used, including positive control 20% serum medium and negative control serum-free, cytokine-free medium. The cytokines IL6 (100 ng/ml, #20006 PeproTech), IL8 (100 ng/ml, #20008 PeproTech), TNFa (100 ng/ml, #AF-30001A PeproTech) and Rantes (100 ng/ml, #30006 PeproTech) were added as indicated. Photos were taken and the rate of closure was determined at 6, 12, 24 and 48 hours. Experiments were performed in triplicate.

Migration and invasion assays: Assays were done in invasion chambers pre-coated with reduced growth factor matrix from BD Biosciences. 50 000 viable cells were added to the upper chamber in 200 mL of serum-free medium and incubated in 5% CO₂ at 37°C. For invasion assays, the lower chamber was filled with 600 mL of specific medium for each condition: 100ng/mL IL6, 100ng/mL IL8, 100ng/mL Rantes, 100ng/mL TNFa, positive and negative controls. OCC migration and invasion was then assessed counting the cells at the bottom of the well. Experiments were performed in triplicate.

IL6 inhibition: Inhibition of IL6 receptor was performed by incubation of OCC and AMS in ultralow attachment plate (Corning) with specific anti-IL6 receptor antagonist antibody (Abcam, #ab47215) at the concentration of 1µg/ml in ultralow attachment 48 well plate (Corning) containing DMEM/F12 (1:1) (Hyclone) basal media supplemented with 2mM L-Glutamine (Hyclone), 1x Non Essential Amino Acid (NEAA) (Hyclone), PenStrepAmpB (Sigma), 20 ng/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Peprotech), 20 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) (Peprotech), 5µg/ml Insulin (Sigma), 2% B27 supplements (Invitrogen) and 4% basement matrigel (BD Biosciences). After 24 hours, analysis of the infiltration was performed by confocal microscopy (as described above).

Statistical analysis

Student-t tests, Fisher exact tests and chi-square tests were performed as appropriate. All p-values are two-sided with statistical significance evaluated at the 0.05 alpha levels. Ninety-five percent confidence intervals (95% CI) were calculated to assess the precision of the obtained estimates.

Results

Cancer cell invasion of amniochorionic membrane scaffold (AMS) recapitulates peritoneal metastasis

We cultured OCCs in suspension in serum-free media with small pieces of amniochorionic membrane, referred as amniotic membrane scaffold (AMS). We obtained OCC spheroids within the 24 first hours (Figure 1A). We observed adhesion of eGFP-OVCAR3 and eGFP-SKOV3 spheroids on the AMS with optic and fluorescent microscope after 24 hours (Figure 1A). Twenty-four hours after adhesion, we could demonstrate infiltration of eGFP-OCC within AMS stromal cells stained with APC-CD73 using confocal microscopy (Figure 1B). In our model we could see the distribution of the fluorescence of OCCs (green) on the surface of AMS (1C, upper picture). Using Z-stack reconstruction in confocal microscopy, we measured the depth of infiltration of OCC within AMS (1C, lower picture).

In order to confirm the infiltration we performed histologic examination after hematoxylin & eosin staining and compared morphologic aspect of AMS infiltration with peritoneal metastatic nodules (Figure 1D-G). Peritoneal nodules were characterized by an infiltration of the sub-mesothelial region compared to normal peritoneum (Figure 1D-E). Histologic examination of AMS also revealed a sub-epithelial region, infiltrated by OCC 72 hours after co-culture, thus recapitulating peritoneal carcinosis (Figure 1F-G).

We established a non-adherent co-culture system of OCC spheroids and AMS. As we demonstrated AMS based 3D model could replicate early invasion steps of EOC infiltration mimicking peritoneal carcinosis, we went further and used this 3D model to understand the initial steps involved in invasion.

OCC enrichment in regions with MSC

We have previously demonstrated that the AMS has a high content in mesenchymal progenitor cells (defined here by AMCD 73⁺CD90⁺ cells) [237]. We have also shown the role of MSCs in resistance to treatment as well as acquisition of a metastatic phenotype [226]. We wondered whether MSCs could have a role in the initial invasion of the AMS. We observed that AMS invasion was not homogenous indeed most of the tumor implants were located in regions rich in MSC (7/10 tumors) compared with regions without MSC (3/10 tumors) (P=0.03). The distribution of OCC nodules was correlated with MSC distribution (Figure 2A to 2D). Using 3D z-stack reconstruction, we found that tumor infiltration of the AMS was deeper within regions rich in MSC (26.2 +/- 11.2 μm vs 14.3 +/- 4.3 μm , p<0.05) (Figure 2E to 2G).

We illustrated that MSCs played a role in a 3D model of tumor infiltration of OCC. In this model, the presence of MSC enhanced tumoral aggregates adhesion and infiltration. We investigated potential molecular determinants that could play a role in the cross-talk between OCC and the MSC-niche.

Interaction between MSC and OCC results in increased migration and invasion through IL6 secretion

To study the role of MSC interaction with OCC in vitro, we identified MSC population within the AMS used in this study. As we have previously described, we defined amniotic MSCs as CD90⁺CD73⁺CD105⁺CD29⁺CD45⁻CD34⁻ (Figure 3A) [237]. The MSC population represented 15% of the AMS live cells. They displayed

classical mesenchymal phenotype after cell sorting and expansion (Figure 3A-B), concordant with previous data [212]. We established a co-culture system with OCCs. Interestingly, as shown in Figure 3C, OCCs and MSCs formed spontaneously nodular networks where MSC trapped tumor nodules. We hypothesized that secreted mesocrine factors could be responsible for increased invasion; we therefore screened cytokines secreted in a serum-free cytokine-free context in the co-culture setting using cancer cell culture as a control (Figure 3D). IL6, IL8 and Rantes had increased secretion in co-culture compared to OCC and MSC monoculture (Figure 3C). Furthermore, TNF α was demonstrated to orchestrate the ovarian tumor microenvironment and promote tumor progression [114]. While many of the cytokines have been described for their role in cell migration we decided to screen the potential pro-metastatic mesocrine factor using migration (wound healing assay and Boyden chamber), and invasion (Matrigel coated Boyden chamber) assays. In vitro tests revealed that IL6 was the only molecule increasing both migration and invasion. Rantes, IL8 and TNF α increased inconstantly cell migration and invasion (Figure 4). We observed a 1.5 to 15 fold increased migration and >10 fold increased invasion with IL6.

The effect of the inhibition of IL6 on AMS infiltration by OCC was tested using a specific antagonist antibody (Figure 5). We observed significant global decreased AMS infiltration (Figure 5E). The decrease in OCC infiltration was more important in regions rich in MSC indicating that recruitment and 3D invasion of OCC was dependant of IL6 secretion (7.2 fold versus 2.1 fold, $p=0.03$) (Figure 6).

Discussion

In this study we illustrated the important role of MSC in early OCC invasion with a 3D model of metastatic nodule based on an amniochorionic membrane scaffold. We investigated the interaction between OCC and MSC and found that IL6 was determinant for OCC to migrate and infiltrate 3D structures resembling the peritoneum.

Peritoneal mesothelium is the first barrier against spreading ovarian cancer cells. OCC adhere to mesothelial cells via integrins after MMP2-mediated digestion of vitronectin and fibronectin [56]. Previous studies showed that the mesothelium could not be detected under the proliferating OCC implants suggesting that mesothelial cells are dissociated before peritoneal involvement [55][36]. After breaking peritoneal mesothelial layer, OCCs can invade the sub-mesothelial area, constituted by an extra-cellular matrix, and various cell types including MSCs and fibroblasts. Tumoral secreted factors such as leucine, leucine-37 (LL-37) or lysophosphatidic acid (LPA) could recruit MSCs and induce their differentiation in cancer-associated fibroblasts (CAF) through signalling pathways involving Rho kinase, ERK, PLC, and phosphoinositide-3-kinase [108, 111]. LPA present in the EOC microenvironment was also reported to induce STAT3 phosphorylation and ovarian cancer cell motility through the secretion of IL-6 and IL-8 [109]. This is in line with the increased invasion of OCCs through the AMS after stimulation with recombinant IL6.

Several authors [110, 231, 238] showed that MSCs promoted tumor growth through increased micro-vascularization, stromal networks, and production of tumor stimulating paracrine factors. They also demonstrated that these properties were

activated after Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts, through the paracrine secretion of IL6. We observed increased production of IL6 among other cytokines in co-cultures of OCCs and MSCs indicating cross-talk between the two cell lines. Mc Lean et al. demonstrated differences between MSCs and tumor associated MSCs [113]. They reported an enhance ovarian cancer stem cell compartment upon the interaction of cancer cells with Tumor associated mesenchymal cells compare to "wild type" MSCs [113]. Similarly Liu et al. [239] reported that MSCs could support breast cancer stem cell compartment through IL6 and IL8 secretion. In concordance we found an increased number of MSCs in most OCCs nodules within the AMS suggesting an important role in the early invasion for the constitution of an inflammatory reactive stroma: "never healing wound theory" [34, 38]. As illustrated above the cross-talk between MSCs and cancer cells and the role of mesencrine factors increasing the metastatic potential have been widely illustrated. Using a unique 3D model based on an amniotic membrane scaffold we were able to replicate the early invasion steps, e.g. (i) formation of tumor spheroids, (ii) adhesion to mesothelial layer (iii) microscopic invasion. We illustrated that MSCs could also play a role in very early attachment and invasion of ovarian cancer nodules. Indeed the significant enrichment of MSCs around invasive nodules suggested their ability to provide the adequate signalling cues for attachment and invasion of ovarian cancer spheroids.

IL6 has been associated with progression in multiple cancer types, including ovarian cancer. Increased expression of IL6 and its specific receptor IL6R α is associated with disease stage [240]. Recent works also reported the importance of IL6 for early metastatic process in EOC. We found that IL6 inhibition limited early adhesion and infiltration of OCCs in our *in-vitro* 3D model. Giridhar et al. showed

that IL6 regulated *in-vivo* adhesion of OCCs to the omentum through up-regulation of LY75 [241]. Using mice with conditional IL6Ra deficiency, they found that host IL6 regulation was important for OCC adhesion [241].

There are some limitations in our study. First, we didn't define the origin of IL6 secretion. We showed increased IL6 secretion in co-cultures of OCCs and MSCs but we did not identify if it was secreted by MSCs, OCCs or both. Spaeth et al. co-injected Skov3 with and without MSCs into mice and demonstrated that MSCs stimulated tumor growth through paracrine production of IL6 [110]. They found MSCs-induced IL-6 secretion to be critical for the enhanced proliferation observed in Skov-3/MSC tumor growth assay [242]. We showed that IL6 stimulation increased OCC mobility and invasiveness and inhibiting IL6 receptor decreased OCCs infiltration in a 3D model. Colomiere et al. reported increased epithelial to mesenchymal transition (EMT) after EGF treatment of OCCs [243]. In their model OCCs secretion of IL6 was increased upon EGF stimulation. Several authors have demonstrated similar findings in other models [107, 244]. In our model, increased EMT and/or cancer stem cell compartment upon IL6 stimulation could explain increased invasiveness and this remains to be investigated.

In conclusion using an amniotic membrane scaffold might allow us to follow early invasion in a 3D context. We were able to demonstrate the essential role of MSCs. Their interactions with OCCs seemed mediated by IL6, which has been described determinant for cancer migration and infiltration mechanisms. Thus cytokine inhibitors interrupting the cross-talk between OCC and MSC such as IL6 should be investigated as a therapeutic approach in ovarian cancer. In-vitro 3D models will therefore be useful to screen for potential efficient inhibitors of early invasion.

Acknowledgments

None

References

1. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004;351:2519-29.
2. Tretarre B, Remontet L, Menegoz F, Mace-Lesec'h J, Grosclaude P, Buemi A, Guizard AV, Velten M, Arveux P, Peng J, Jouglu E, Laffargue F, et al. [Ovarian cancer: incidence and mortality in France]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2005;34:154-61.
3. Pfisterer J, Ledermann JA. Management of Platinum-Sensitive Recurrent Ovarian Cancer. *Seminars in Oncology* 2006;33:12-6.
4. Ceelen WP, Bracke ME. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *The Lancet Oncology* 2009;10:72-9.
5. Bourguignon LY, Gilad E, Peyrollier K. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *J Biol Chem* 2007;282:19426-41.
6. Lis R, Touboul C, Raynaud CM, Malek JA, Suhre K, Mirshahi M, Rafii A. Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells triggers pro-metastatic properties. *PLoS One* 2012;7:e38340.
7. Lis R, Touboul C, Mirshahi P, Ali F, Mathew S, Nolan DJ, Maleki M, Abdalla SA, Raynaud CM, Querleu D, Al-Azwani E, Malek J, et al. Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. *International Journal of Cancer* 2011;128:715-25.
8. Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, Faussat AM, Simon A, Ducros E, Mery E, Couderc B, Lis R, Capdet J, Bergalet J, Querleu D, et al. Oncologic trogocytosis of

an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. PLoS One 2008;3:e3894.

9. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. Cell 2007;130:601-10.

10. Freedman RS, Deavers M, Liu J, Wang E. Peritoneal inflammation - A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). J Transl Med 2004;2:23.

11. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? Placenta 2009;30:2-10.

12. van der Linden PJ, de Goeij AF, Dunselman GA, Erkens HW, Evers JL. Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes. Fertil Steril 1996;65:76-80.

13. Groothuis PG, Koks CA, de Goeij AF, Dunselman GA, Arends JW, Evers JL. Adhesion of human endometrium to the epithelial lining and extracellular matrix of amnion in vitro: an electron microscopic study. Hum Reprod 1998;13:2275-81.

14. Raynaud CM, Maleki M, Lis R, Ahmed B, Al-Azwani I, Malek J, Safadi FF, Rafii A. Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. Stem cells international 2012;2012:658356.

15. Charles KA, Kulbe H, Soper R, Escorcio-Correia M, Lawrence T, Schultheis A, Chakravarty P, Thompson RG, Kollias G, Smyth JF, Balkwill FR, Hagemann T. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. The Journal of Clinical Investigation 2009;119:3011-23.

16. Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest* 2008;118:1367-79.

17. Kenny H, Nieman K, Mitra A, Lengyel E. The First Line of Intra-abdominal Metastatic Attack: Breaching the Mesothelial Cell Layer. *Cancer Discovery* 2011;1:100-2.

18. Iwanicki M, Davidowitz R, Ng M, Besser A, Muranem T, Merritt M, Danuser G, Ince T, Brugge J. Ovarian Cancer Spheroids Use Myosin-Generated Force to Clear the mesothelium. *Cancer Discovery* 2011;1:144-7.

19. Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zvezdaryk KJ, Dembinski JL, LaMarca HL, Tomchuck SL, zu Bentrup KH, Danka ES, Henkle SL, Scandurro AB. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:3806-11.

20. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh D-S, Yoon M-S, Chang CL, Jung JS, Kim JH. Cancer-Derived Lysophosphatidic Acid Stimulates Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Myofibroblast-Like Cells. *STEM CELLS* 2008;26:789-97.

21. Seo JH, Jeong KJ, Oh WJ, Sul HJ, Sohn JS, Kim YK, Cho do Y, Kang JK, Park CG, Lee HY. Lysophosphatidic acid induces STAT3 phosphorylation and ovarian cancer cell motility: their inhibition by curcumin. *Cancer Lett* 2010;288:50-6.

22. Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One* 2012;7:e30563.

23. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *PLoS ONE* 2009;4:e4992.

24. Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie J, Mirshahi M, Couderc B. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *International Journal of Cancer* 2010;126:2090-101.

25. McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, Cabrera L, Keller E, McCauley L, Cho KR, Buckanovich RJ. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *The Journal of Clinical Investigation* 2011;121:3206-19.

26. Chen J, Yao Y, Gong C, Yu F, Su S, Liu B, Deng H, Wang F, Lin L, Yao H, Su F, Anderson KS, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PTPN23. *Cancer Cell*;19:541-55.

27. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011;147:275-92.

28. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883-99.

29. Rath KS, Funk HM, Bowling MC, Richards WE, Drew AF. Expression of soluble interleukin-6 receptor in malignant ovarian tissue. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:230 e1-8.

30. Giridhar PV, Funk HM, Gallo CA, Porollo A, Mercer CA, Plas DR, Drew AF. Interleukin-6 receptor enhances early colonization of the murine omentum

by upregulation of a mannose family receptor, LY75, in ovarian tumor cells. *Clinical & experimental metastasis* 2011;28:887-97.

31. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *STEM CELLS* 2009;27:2614-23.

32. Colomiere M, Ward AC, Riley C, Trenerry MK, Cameron-Smith D, Findlay J, Ackland L, Ahmed N. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 2009;100:134-44.

33. Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 2011;145:926-40.

34. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, Korkaya H, Heath A, Dutcher J, Kleer CG, Jung Y, Dontu G, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res*;71:614-24.

Figure legends

Figure 1. Amniochorionic membrane based 3D model: involvement of the amniochorionic membrane scaffold (AMS) by ovarian cancer cell lines compared to histologic involvement of the peritoneum.

A. Picture by fluorescence microscopy of Ovar3_eGFP spheroids after 24 hours 3D culture (upper picture). Early attachment (day 1) of the tumoral aggregates on AMS in fluorescence microscopy (lower picture).

B. Early involvement (day 2) of AMS stained with CD73 APC (red) by Ovar3_eGFP (green) in confocal microscopy.

C. Visualisation of the fluorescence of OCC (green) on AMS at day3 (upper picture). Z-stack reconstruction in confocal microscopy allowing the measure of the infiltration of Ovar3_eGFP cells within AMS (lower picture).

D-G. On the histologic sections stained with hematoxylin & eosin, the area below the mesothelium (star) of a normal peritoneum (D) and amniochorionic membrane (F) was free whereas it was filled with tumoral cells (rhombus) in sections of peritoneal metastasis (E) and involved AMS at day 2 (G).

Figure 2. The distribution of OCC within AMS is following expression of MSC markers.

A-D. Confocal microscopy tile scan reconstruction of Ovar3_eGFP (green) distribution after staining with CD90 (red) and CD73 (yellow). The distribution of OCC (B) is following the distribution of CD90 (C) and CD 73 (D)

E-F. Confocal tile scan reconstruction showing the distribution of OCC within AMS in regions rich in MSC (E) and without MSC (F)

G. OCC infiltration was significantly increased in regions rich in MSC (* $p < 0.05$)

Figure 3. Cytokine array after extraction and culture of the amniotic MSC with OCC.

A. By flow cytometry analysis, we identified a population of MSC defined by negative for CD45 & 34 and positive for CD29, 73, 90 & 105. This population represented 15% of the total cell population of the amniochorionic membrane.

B. Picture of the cultured cells after sorting by optical microscopy.

C. Picture of a coculture between MSC stained with calcein red and OCC (Ovar3_eGFP in green) by fluorescence microscopy.

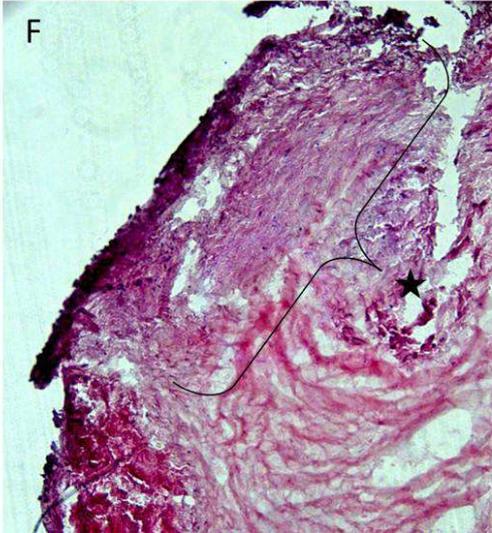
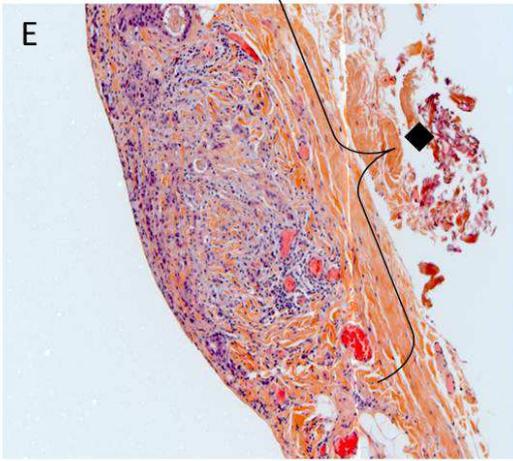
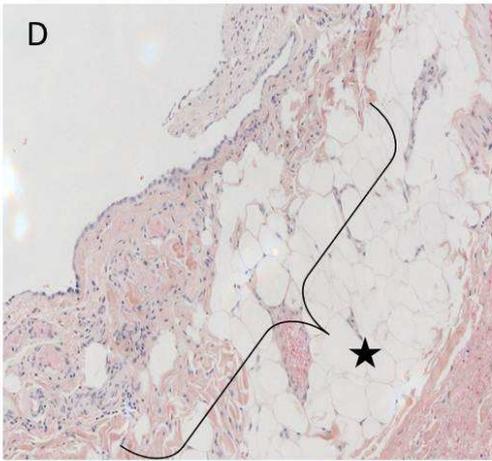
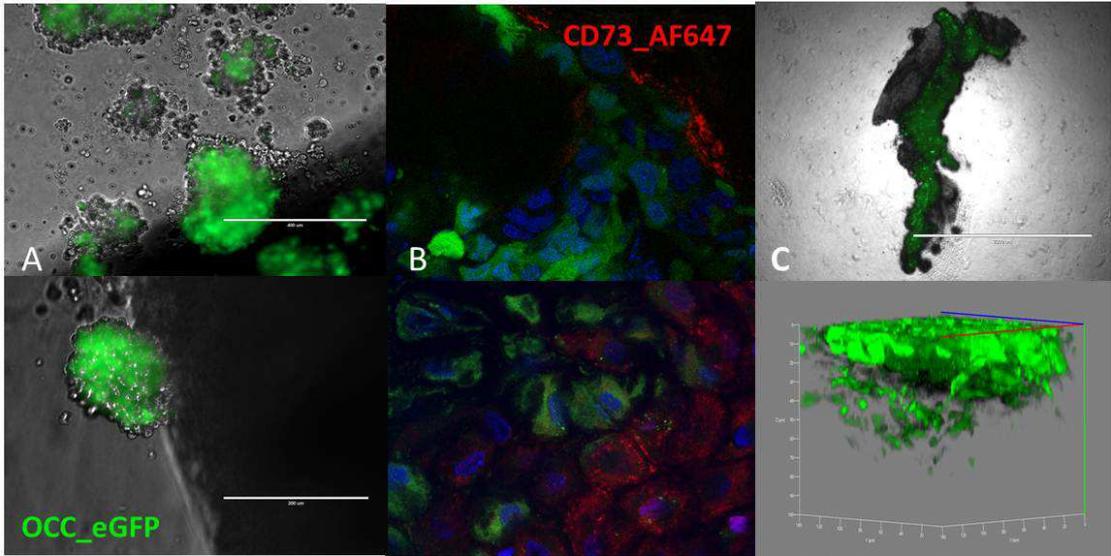
D. Cytokine array results after MSC and OCC coculture.

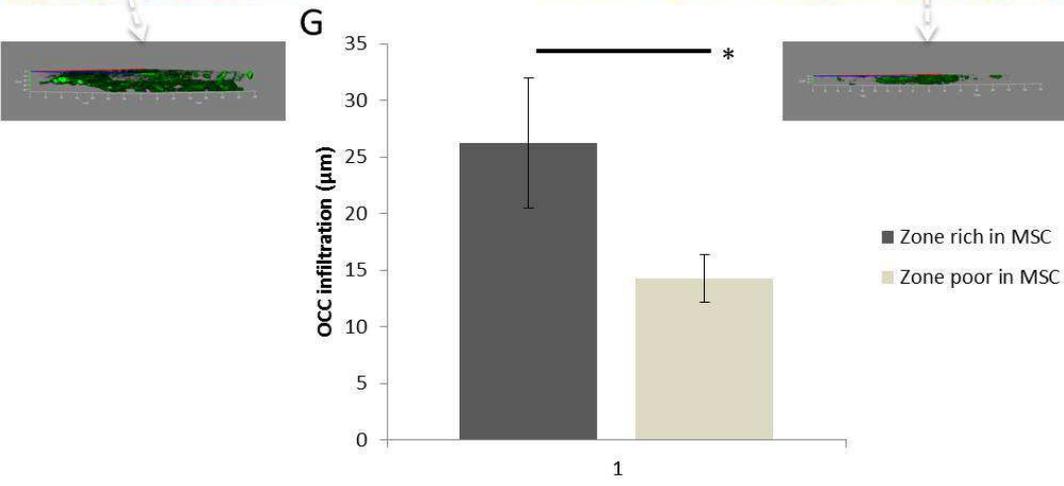
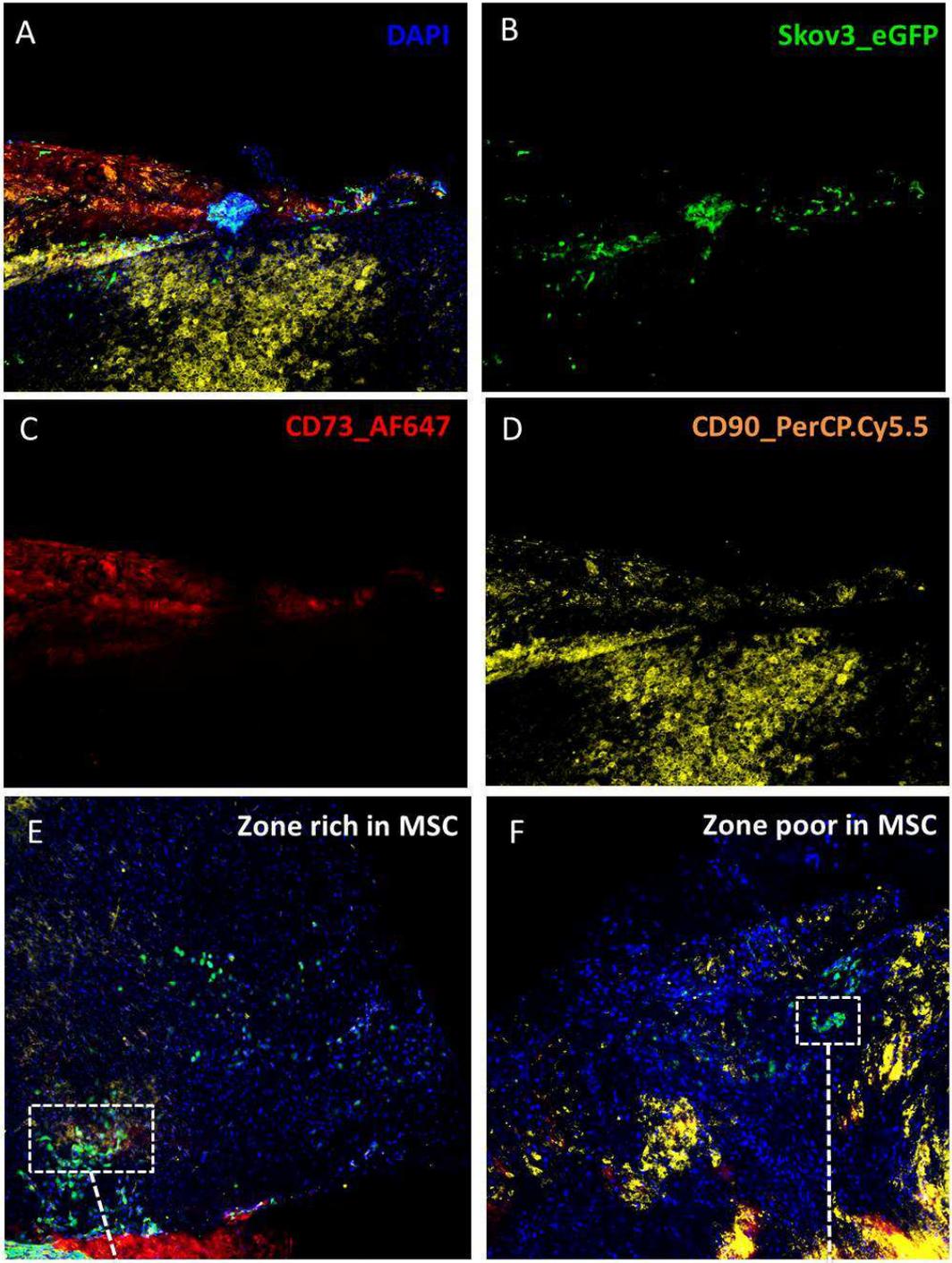
Figure 4: Wound healing assay and Transwell with Ovc3 stimulated by IL6, IL8, TNF α and Rantes:

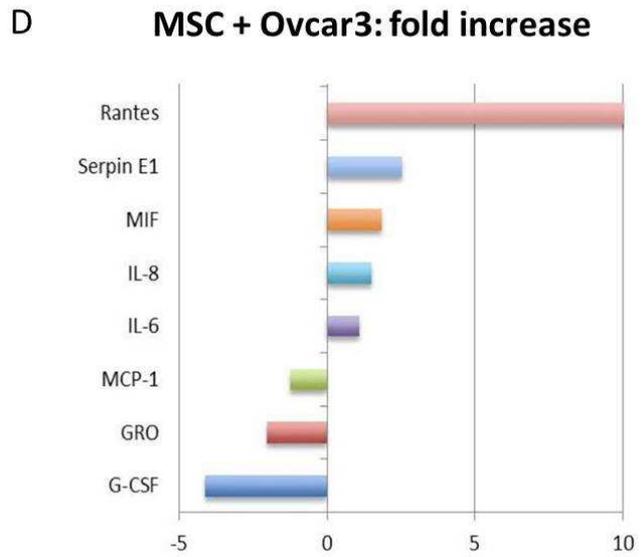
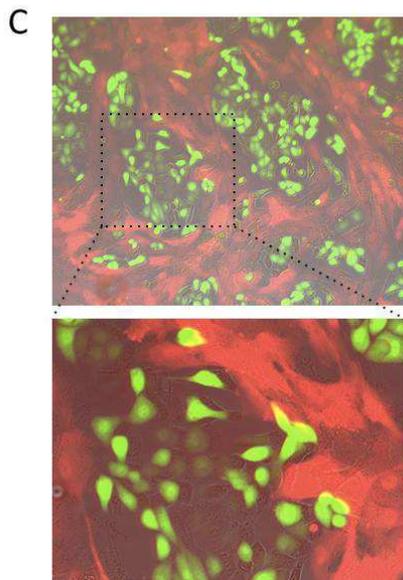
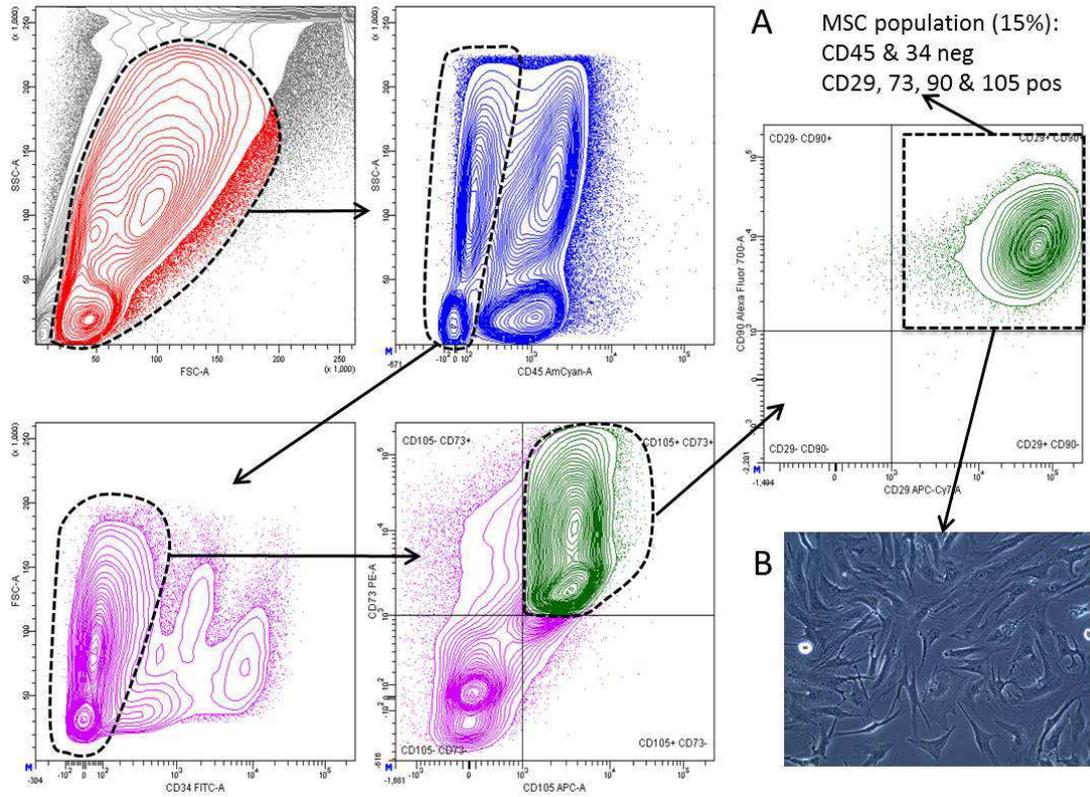
- A. Wound healing assay: Pictures of the different conditions at 3, 6 24 and 48 hours.
- B. Wound healing assay: Representation of the rate of closure for each condition. TNF α , IL6 and IL8 significantly increased the migration of Ovc3 compared with Rantes and serum free medium.
- C. Transwell: Increased migration was observed with TNF α , IL6 and Rantes (p<0.001 ***).
- D Transwell coated with basement membrane: Increased invasion was observed with IL6 (p<0.001 ***).

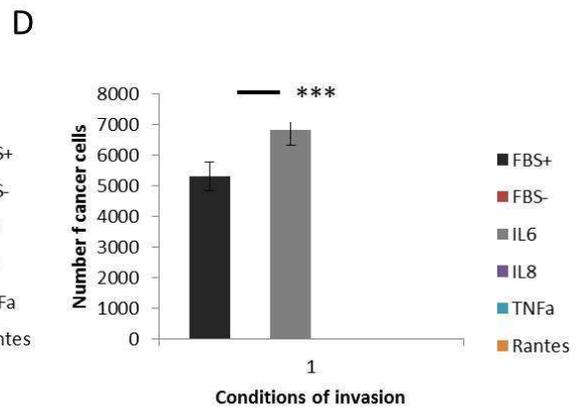
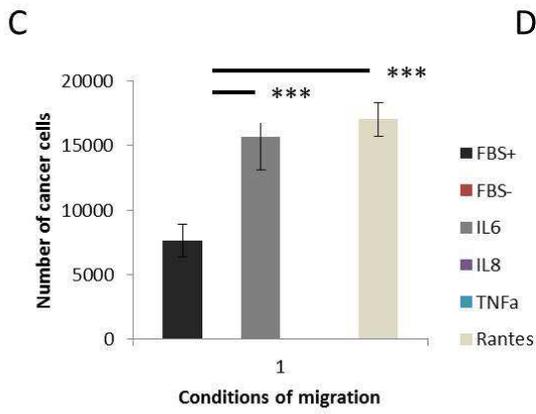
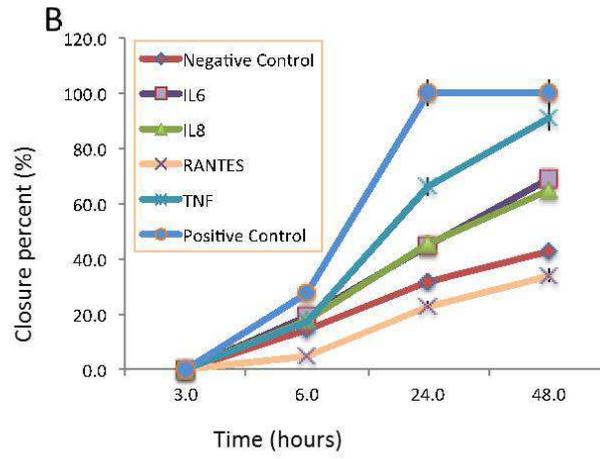
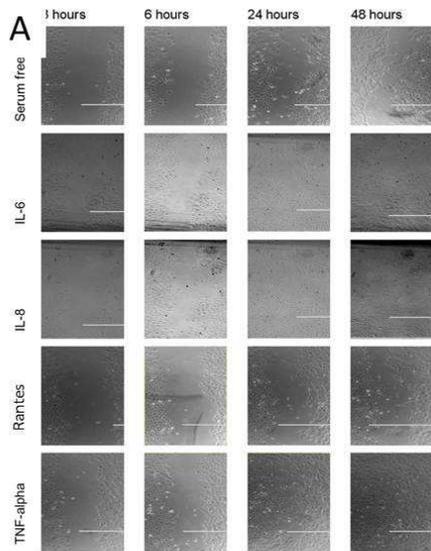
Figure 5: IL6 inhibition decreased adhesion and infiltration of OCC on AMS

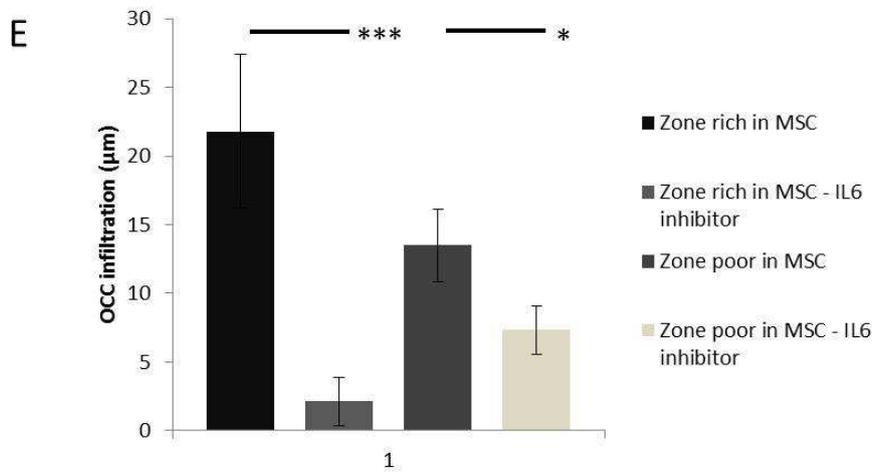
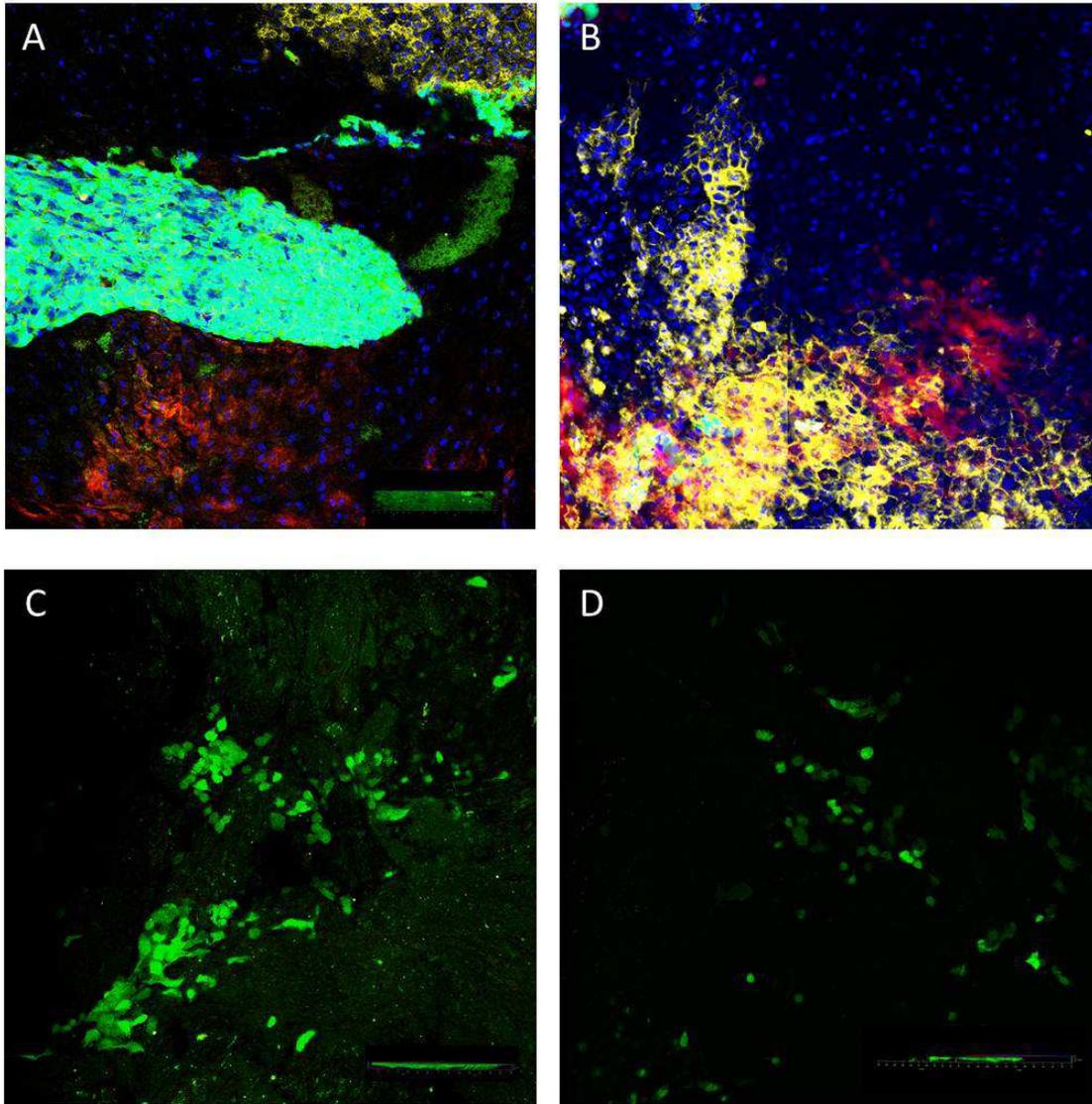
- A and C. Confocal tile scan showing distribution of OCC within AMS in regions rich in MSC (A) and without MSC (C)
- B and D. Confocal tile scan showing, after IL6 inhibition, distribution of OCC within AMS in regions rich in MSC (B) and without MSC (D)
- E. OCC infiltration was significantly decreased in regions rich in MSC (p<0.001 ***) and in regions without MSC (p<0.05 *)











III. Article 3 : les cellules souches mésenchymateuses protègent les cellules tumorales ovariennes de la mort induite par l'hyperthermie grâce à la sécrétion de la cytokine CXCL12 :

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans « the International Journal of Cancer » et est référencé sous :

Lis R. & Touboul C. et al. Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. International Journal of Cancer 128, 715-725 (2011).[133]

- Résumé long.

Les patientes atteintes de cancer de l'ovaire se présentent à un stade avancé avec une ascite et une carcinose péritonéale dans la majorité des cas. De nombreux essais de chimio hyperthermie intrapéritonéale (CHIP) dans les carcinoses péritonéales d'origine gastrique, mésothéliale, colorectale ou encore ovarienne, évaluant la synergie entre la chimiothérapie et l'hyperthermie à la fin du traitement chirurgical, ont été réalisés ces dernières années [245, 246]. Un essai randomisé de phase III comparant le traitement standard délivré en intra-veineux à la même chimiothérapie délivrée en intra-péritonéal, a montré un bénéfice clinique significatif en terme de survie global dans le bras expérimental [19]. Cependant, malgré les différents protocoles testés, la CHIP n'a pas obtenu les résultats escomptés sur les adénocarcinomes ovariens séreux de stade avancé [247]. Dans les carcinoses d'origine ovarienne, la médiane de survie du bras traité par CHIP varie de 22 à 64 mois avec une médiane de survie sans progression variant de 10 à 57 mois [27, 247]. Chez les patientes ayant bénéficié d'un debulking

optimal, c'est-à-dire permettant l'obtention d'un résidu tumoral nul, le taux de survie à 5 ans peut varier de 12% à 66% [27, 247]. Cependant, la morbidité liée à la CHIP est bien plus importante que celle du traitement standard ; variant respectivement de 0% à 40%, et de 0% à 10% [27, 247]. Ces résultats sont décevants dans la mesure où les carcinomes ovariens sont fréquemment associés à une maladie péritonéale extensive et devrait être une indication privilégiée de CHIP. Si la chimiorésistance est une thématique de recherche classique, il existe peu de données concernant l'hyperthermie dans le cancer de l'ovaire.

Un nombre croissant de publications suggère que le microenvironnement péritonéal pourrait jouer un rôle important sur le développement des adénocarcinomes ovariens séreux [114, 248, 249]. Récemment, notre groupe a pu démontrer qu'un sous-type cellulaire de cellule mésenchymale associée à la tumeur, isolé dans la cavité péritonéale de patientes atteintes de cancer de l'ovaire, était capable de protéger les cellules tumorales ovariennes de la chimiothérapie [28]. Il a également été montré que ces mêmes cellules mésenchymales étaient capables d'entretenir la croissance tumorale in vivo, et de procurer aux cellules tumorales ovariennes un environnement immunotolérant [230, 231].

De nombreuses données de la littérature suggèrent qu'il existe un dialogue entre les cellules tumorales ovariennes et les cellules stromales péritonéales, et qu'il participerait à diminuer l'efficacité des thérapeutiques anticancéreuses. Les travaux de H. Cho et al. et H. Park et al. démontrent que le surnageant de MSC préalablement exposées à l'hyperthermie possède des propriétés anti-tumorales [250, 251].

Notre but a donc été d'étudier le l'influence des MSC sur le comportement des cellules tumorales face à un traitement hyperthermique. Nous avons d'étudié la viabilité des cellules tumorales ovariennes suite à un traitement hyperthermique à 42°C dans un contexte de co-culture avec les MSC. Nous avons pu démontrer que les MSC étaient capables d'induire chez les cellules tumorales ovariennes un phénotype thermotolérant [133]. Cette thermotolérance était la résultante de la sécrétion d'une cytokine par les MSC : le CXCL12 [133]. Ces données montrent qu'en dehors d'un effet sur la résistance à la chimiothérapie, les MSC jouent également un rôle protecteur contre l'hyperthermie dans la CHIP. Elles suggèrent donc que la part de thermotolérance, et plus particulièrement liée au stroma, devrait être prise en compte dans les recherches futures sur le développement de la CHIP dans les carcinoses d'origine ovarienne.

Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12

Raphael Lis^{1,2}, Cyril Touboul^{1,2}, Pejman Mirshahi², Fadoua Ali¹, Sharon Mathew¹, Daniel J. Nolan³, Mahtab Maleki¹, Salma A. Abdalla¹, Christophe M. Raynaud¹, Denis Querleu^{4,5}, Eman Al-Azwani⁶, Joel Malek⁶, Massoud Mirshahi² and Arash Rafii^{1,7}

¹Stem Cell and Microenvironment Laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar (WCMC-Q, Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar)

²UMRS 872 INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 and Université Paris Descartes, Equipe 18, Centre de Recherche des Cordeliers, 75270, Paris Cedex 06, France

³Howard Hughes Medical Institute, Department of Genetic Medicine and Ansbary Stem Cell Institute, Weill Cornell Medical College, New York, NY

⁴Institut Claudius Regaud, Department of Oncologic Surgery, Toulouse 31052, France

⁵McGill University, Department of Gynecologic Oncology, Montreal, Canada

⁶Genomic Core, Weill Cornell Medical College in Qatar (WCMC-Q, Education city, Qatar Foundation, Doha, Qatar)

⁷Department of Genetic Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY

Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) has shown promise in treatment of ovarian carcinosis. Despite its efficiency for the treatment of peritoneal carcinosis from digestive tract neoplasia, it has failed to demonstrate significant benefit in ovarian cancers. It is therefore essential to understand the mechanism underlying resistance to HIPEC in ovarian cancers. Mesenchymal stem cells (MSC) play an important role in the development of ovarian cancer metastasis and resistance to treatments. A recent study suggests that MSCs may be cytotoxic for cancer cells upon heat shock. In contrast, we describe the protective role of MSC against hyperthermia. Using cytokine arrays we determined that the tumor associated MSC (TAMC) secrete pro-tumoral cytokines. We studied the effect of hyperthermia in co-culture setting of TAMC or BM-MSC associated with ovarian cancer cell lines (SKOV3 and CaOV3) with polyvariate flow cytometry. We demonstrate that hyperthermia does not challenge survival of TAMC or bone marrow derived MSC (BM-MSC). Both TAMC and BM-MSC displayed strong protective effect inducing thermotolerance in ovarian cancer cells (OCC). Transwell experiments demonstrated the role of secreted factors. We showed that CXCL12 was inducing thermotolerance and that inhibition of CXCL12/CXCR4 interaction restored cytotoxicity of hyperthermia in co-culture experiments. Contrary to the previous published study we demonstrated that TAMC and BM-MSC co-cultured with OCC induced thermotolerance in a CXCL12 dependant manner. Targeting the interaction between stromal and cancer cells through CXCL12 inhibition might restore hyperthermia sensitivity in ovarian cancers, and thus improve HIPEC efficiency.

Epithelial ovarian carcinoma (EOC) is the sixth most common malignancy in women and the leading cause of death from gynecological cancer worldwide.¹ EOC has a predisposi-

Key words: mesenchymal stem cells, hyperthermia, ovarian cancer resistance, CXCL12

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Qatar-Foundation NPRP; **Grant number:** 08-663-3-140; **Grant sponsor:** Qatar foundation UREP; **Grant number:** 07-170-3-031; **Grant sponsor:** Qatar Foundation, Qatar Technology Transfer

DOI: 10.1002/ijc.25619

History: Received 29 Mar 2010; Accepted 16 Jul 2010; Online 19 Aug 2010

Correspondence to: Dr Arash Rafii, Department of Genetic Medicine and Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, Stem cell and Microenvironment laboratory Weill Cornell Medical College in Qatar, Qatar-Foundation, Doha, Qatar, Tel.: 974-313-5828, Fax: 974-492-8422, E-mail: jat2021@qatar-med.cornell.edu

tion to metastatic involvement of the peritoneal cavity.^{2,3} Late stage EOC is characterized by widespread peritoneal dissemination, ascitis and a high rate of mortality with an overall survival ranging from 20 to 30% at 5 years.⁴

Platinum associated to taxanes chemotherapy, is the standard treatment for ovarian cancers, and has achieved high response rate. The development of drug-resistant cancer cells exhibiting multidrug resistance phenotype is one of the major limitations of the efficacy illustrated in the literature for platinum or taxanes chemotherapy.^{4,5} Therefore, new therapeutic modalities are critical to improve overall survival in ovarian cancer. Intra-peritoneal (IP) chemotherapy emerged as one therapeutic option from the natural history of ovarian cancers (*e.g.*, local extension to the peritoneum, chemosensitivity). Indeed it has been demonstrated that IP delivery of certain chemotherapeutic agents leads to increased peritoneal cavity drug exposure.⁶ Randomized control trials demonstrated superiority of IP chemotherapy over classical intravenous therapy in patients with optimally debulked Stage III ovarian cancer.^{6,7} More recently, hyperthermic intraperitoneal

chemotherapy (HIPEC) has emerged as a new option to increase the efficacy of chemotherapy. Its efficacy has already been demonstrated in carcinosis from colon cancer.⁸

Hyperthermia is tumoricidal and increases the cytotoxicity of many chemotherapeutic agents in cell cultures as well as in animal models.^{9,10} Synergistic effects of hyperthermia in conjunction with cisplatin treatment include increased DNA cross-linking, increased DNA adducts formation and deeper penetration into peritoneal tumor implants.^{11,12} Furthermore, cancer cells operate under increased acidity due to their inability to expel waste created by the anaerobic metabolism and are thus sensitive to hyperthermia. Hyperthermia also disrupts the stability of cellular proteins, cell membranes and the cytoskeleton. Finally hyperthermia inhibits DNA replication forks, which leads to cancer cells displaying greater sensitivity to chemotherapy than normal cells.¹³

Many clinical trials in peritoneal carcinosis studying different tumor types (gastric, mesothelioma, endometrial, colorectal) have been launched based on the described synergy between hyperthermia and chemotherapy, and possibility of concomitant IP delivery of these two modalities.^{6,14,15} A Phase III randomized study of HIPEC following cyto-reductive surgery compared to traditional intravenous chemotherapy and palliative care, in patients with peritoneal spread of colorectal carcinoma showed a statistically significant prolongation of life in the experimental arm.⁶ However despite different protocols, HIPEC could not demonstrate a real benefit compared to the standard treatment in ovarian cancer carcinosis.¹⁶ In the case of ovarian cancers most of the studies are Phase I or II feasibility trials. The overall median survival following HIPEC ranged from 22 to 64 months with a median disease-free survival ranging from 10 to 57 months. In patients with optimal cytoreduction, a 5-year survival rate ranging from 12 to 66% could be achieved. The overall rate of severe perioperative morbidity and mortality is higher than standard treatment ranging from 0 to 40% and from 0 to 10%, respectively.^{16,17}

Hyperthermia by itself is not a treatment in ovarian cancers. However the growing amount of publication in the literature demonstrate that it might be of interest in the treatment of peritoneal carcinosis when associated to chemotherapy. Despite various modifications of the protocols, the optimal results have not been achieved and there are no demonstrated benefits for survival with associated high morbidity.¹⁷ Several randomized trial are trying to address these issues. Some authors suggest that in patients with epithelial ovarian cancer with no residual disease, HIPEC should be considered as a consolidation treatment option.¹⁸

Indeed surgical optimal cytoreduction immediately followed by HIPEC ensures intraperitoneal delivery of the drug to all peritoneal surfaces and the advantages of combined hyperthermia to be exploited to target microscopic residual disease.¹⁹

A growing amount of evidence is underlying the role of microenvironment in EOC development.²⁰⁻²² Recently, our group was able to demonstrate that a subset of the mesothe-

lial cells isolated from the peritoneal cavity of patients with ovarian cancer was able to induce chemoresistance through oncologic trogocytosis.²³ We went further in demonstrating that these cells were also able to sustain tumor growth *in-vivo* through the production of IL8 and their role in angiogenesis.²⁴ Finally we demonstrated that these cells could provide an immunotolerant microenvironment to cancer cells.²⁵

Evidences in the literature are suggesting a “cross-talk” between cancer cells and peritoneal stromal cells that might impact different therapeutic modalities. Thus far, there has been only one study on the role of hyperthermia on mesenchymal stem cells (MSCs) and their effect on ovarian cancer cells (OCC). Our study demonstrated that conditioned medium of hyperthermia treated MSCs exerted suppressive effects on the tumor progression and malignancy, suggesting that hyperthermia enables MSC to provide a sensitizing environment for tumor cells to undergo cell death. We choose a different approach and used a co-culture setting. We were able to display a significant protective effect of MSCs on OCC subjected to hyperthermia. We demonstrated that MSC-mediated thermotolerance upon cross-talk with the OCC was dependant on CXCL12.

Material and Methods

Isolation of tumor associated mesenchymal cells (TAMC)

Mesothelial cells are known to exfoliate at the beginning of the metastatic process. This suggests that the ovarian cancer-specific mesothelial cells could interact with the epithelial ovarian cancer cell aggregates. TAMC were isolated from the ascitis of 3 untreated patients with Stage IIIC ovarian serous adenocarcinomas, who were undergoing ascitis evacuation for clinical discomfort, as previously described.²³⁻²⁵ Lymphocytes and erythrocytes were separated from cancer cell-TAMC aggregates using a Ficoll procedure. These ascites-derived TAMC displayed a fibroblast-like morphology and could be cryopreserved and expanded *in vitro*. We determined the expression profile of surface marker proteins by fluorescence-activated cell sorting. Cells expressed MSC related markers CD9, CD10, CD29, CD146, CD166 and HLA1. TAMC do not express any hematopoietic markers like CD45, CD31, CD34, CD3, CD4, CD8 and epithelial markers such as CD324 (E-Cadherin) and CD326 (EpCAM).²³ Polyvariate flow cytometry analysis was only able to define a unique population of TAMC, thus demonstrating that TAMC constitutes a pure population.²³⁻²⁵

Ovarian cancer and mesenchymal stem cells

OCC lines SKOV3 (HTB-77) and CaOV3 (HTB-75) were purchased from the ATCC and maintained in culture following ATCC recommendations (DMEM high glucose [Hyclone, Thermo Scientific], 10% FBS [Hyclone, Thermo Scientific], 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericyn B solution [Sigma], 1× Non Essential Amino-Acid [Hyclone, Thermo Scientific]). Bone Marrow derived MSC (BM-MSC) were purchased from Stem Cells, Inc (Vancouver, CA) and maintained and expanded in

culture using MesenCult[®] MSC Basal Medium completed with Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements (Stem Cell, Vancouver, CA) according to manufacturer's recommendations.

Heat treatments

Different cell populations were heat-shocked at 42°C for 1 to 2 hr (5% CO₂, humid atmosphere). Cells were allowed to recover for a period of 2 hr before assessing cell viability.

Immunostaining and fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis

OCC were stained for the expression of CXCR4 using a rat anti-human CXCR4 antibody (BD Biosciences, clone 12G5) conjugated to APC and/or for EpCAM (CD326) using a mouse anti-human EpCAM antibody conjugated to PE (Miltenyi Biotec, clone HES125). Briefly, 2.10⁵ cells were harvested and then blocked in PBS-5%FBS-1%BSA-10%FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) for 30 min on ice. Cell suspension was stained for the CXCR4-APC and/or the EpCAM-PE or with 0.01 mg of antibody per 1.10⁶ cells for 45 min on ice. Filtered, single-cell suspension was analyzed by FACS on a SORP FACSria2 (BD Biosciences). Data were processed with FACSDiva 6.3 software (BD Biosciences). Doublets were excluded by FSC-W × FSC-H and SSC-W × SSC-H analysis, single stained channels were used for compensation, and fluorophore minus one (FMO) controls were used for gating. Calcein-violet-AM fluorescence was acquired with 405 nm violet laser excitation and a 450/50 nm filter emission, eGFP fluorescence was acquired with 488 nm blue laser excitation and a 488/40 nm filter emission, EpCAM (CD326) conjugated to PhycoErythrin (EpCAM-PE) fluorescence was acquired with a 532 nm yellow-green laser and a 582/15 nm emission, CXCR4 (CD184) conjugated to AlloPhycoCyanin (CXCR4-APC) was acquired with 633 nm red laser excitation and a 670/14 nm emission. 45,000 events were acquired per sample. Charts display the mean of fluorescence intensity (MFI) relative to the control.

Cell viability, calcein staining

Calcein-AM indicates intracellular esterase activity. OCC were exposed to hyperthermia as described. The cells were then washed twice with Phosphate buffer saline (PBS). Cells were next stained with the 2 μM of calcein-violet-AM (Molecular Probes, Invitrogen, Leiden NL) for 45 min at 37° 5% CO₂ according to manufacturers instructions. They were then immediately analyzed by FACS on a SORP FACSria2 (BD Bioscience, San Jose, CA) as described.

Cytokines array

TAMC were cultivated in serum free media for 24 hr. TAMC were then heat-shocked as described earlier. Heat-shock conditioned media was collected and protein quantified based on sample absorbance at 280 nm using nanodrop device (Thermo-Scientific, Dubai, Emirates). 200 μg of protein was loaded on RayBio[®] Human Cytokine Antibody Array G Se-

ries 1000 (Raybiotec, Norcross, GA) according to manufacturer's instructions. Unconditioned media was used as a negative control sample. Arrays were revealed using Horse-Radish Peroxidase (HRP) and SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo-Scientific, Dubai, Emirates). Data were collected using Geliance CCD camera (Perkin Elmer, MA), and extracted using ImageJ software (NIH). Briefly, the pictures of the arrays were inverted and background subtracted. We then defined the area for signal capture for all spots as 110–120 micron diameter, using the same area for every spot. We defined our signal as the median pixel density value. For the comparison, the independent arrays values were normalized on their positive control intensity value.

Co-cultures

To demonstrate the protective effect of TAMC-eGFP or BM-MS-C-eGFP on OCC during hyperthermia, we established co-cultures of OCC with TAMC-eGFP or BM-MS-C-eGFP at a ratio of 1:1. Co-cultures were established 24 hr prior to the beginning of the hyperthermia assay. OCC were differentiated from the TAMC or BM-MS-C based on their eGFP and EpCAM expression (CD326) (restricted to OCC in our model). OCC were defined as the eGFP⁻EpCAM⁺ cells. Hyperthermia assays was driven as previously described and cell viability was assessed using calcein assay (see above). The same experiments were performed using a 0.2 μm trans-well system (BD Bioscience, San Jose, CA) to study the effect of intercellular contact on survival of OCC. To avoid donor-to-donor variability, all experiments with BM-MS-C involved two different lots of BM-MS-C.

Statistical analysis

Student-t, Fisher exact or chi-square tests were performed as appropriate. All *p*-values are two-sided with statistical significance evaluated at the 0.05 alpha level. Ninety-five percent confidence intervals (95% CI) were calculated to assess the precision of the obtained estimates. All statistical analysis was done using the data analysis plug-in shipped into the Excel 2008 for the Mac (Microsoft). We first calculated the variance of two paired. Mean ± SEM are shown on the graphs. All results are representative of the indicated number of independent experiments.

Results

Characterization of heat-shocked TAMC and MSC

The TAMC or BM-MS-C were either untreated or heat-shocked as described in "Material and Methods." Phase contrast microscopy analysis of TAMC submitted to heat shock for 2 hr did not display any morphological changes (Fig. 1a). We were able to demonstrate no cytotoxic effect of hyperthermia on BM-MS-C or TAMC (Figs. 1b–1c). We went further and performed transcriptomic analysis of TAMC after heat-shock. As expected, genes involved in thermotolerance were upregulated (HSP-70, Id2). Accordingly to functional

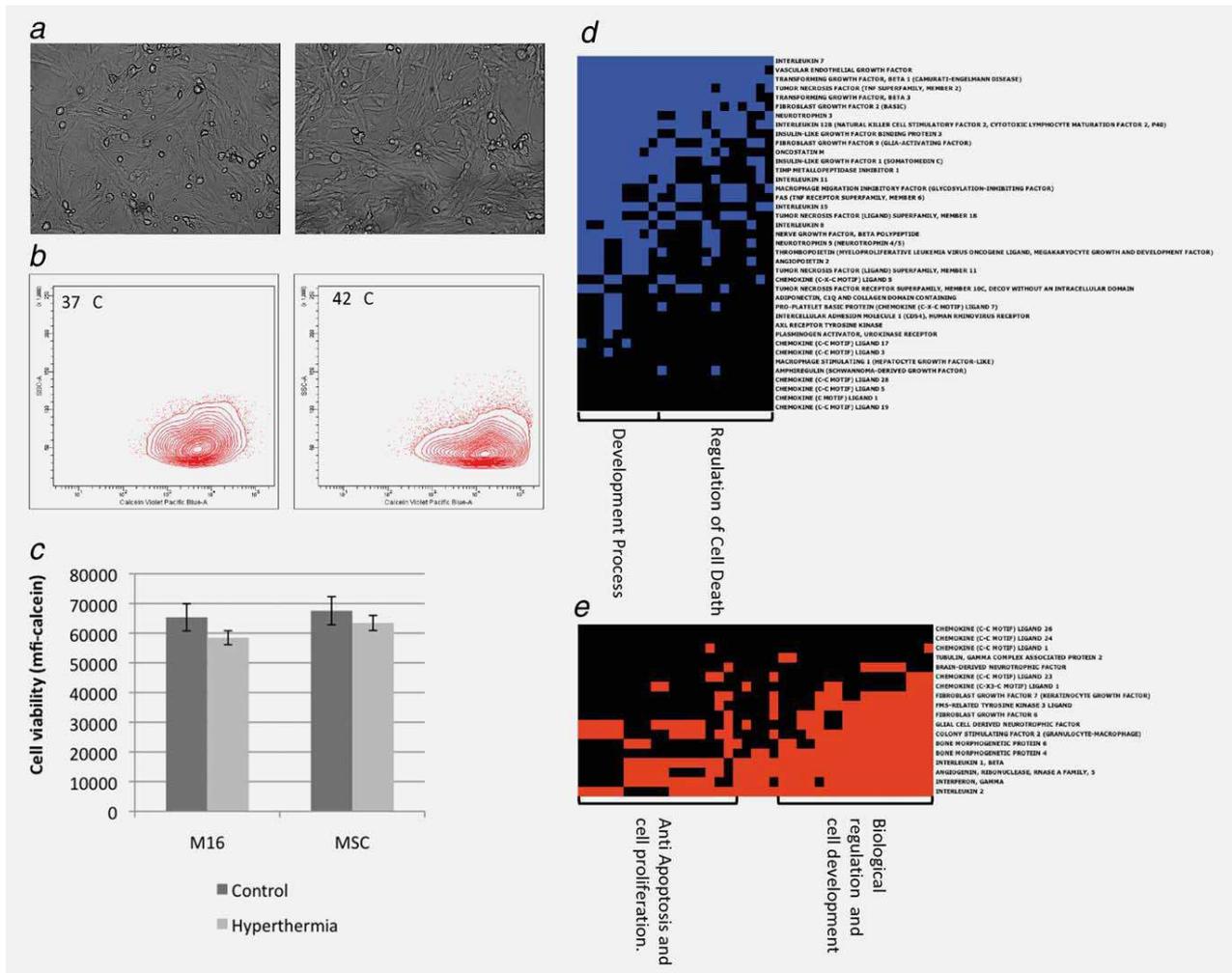


Figure 1. Effect of hyperthermia on TAMC and MSC. (a) Phase contrast analysis of the TAMC exposed to the hyperthermia for 2 hr and allowed to recover for 2 hr. (b) Scatter plot analyzing calcein Violet staining of TAMC at 37°C (control) and at 42°C (hyperthermia) as described in “Material and methods.” Briefly, the different cell populations were stained by calcein Violet AM and submitted to heat-shock for 2 hr and allowed to recover for 2 hr, cell viability was then assessed by calcein staining using polyvariate flow cytometry. (c) Quantification of the fluorescence intensity representing the living cells for the same experiments. (d and e) DAVID Functional annotation clustering charts displaying function enriched in down-regulated cytokines (d) or up-regulated cytokines (e). Representative of three independent experiences.

analysis, no genes involved in apoptosis or cell death were upregulated (Supporting Information Table 1). We then performed cytokine arrays of heat-shocked TAMC. Several cytokines involved in the inflammatory response (IL2, CCL1, CCL24 and CCL 26) as well as cytokines involved in negative regulation of cell death and cell proliferation (IFN—gamma, Angiogenin, BMP6, GM-CSF and GDNFm and CCL23) were upregulated. Cytokines involved in cell death signaling such as Fas, TNFSF18, TNFSF10C) were down-regulated (Supporting Information Figure 2). Comprehensive functional annotation chart was obtained by clustering more than 2-fold up or down regulated cytokines using DAVID Bioinformatic Resources (as described in Refs. 26,27). A number of functional groups or biological themes are identified as enriched in treated TAMC compared to the untreated control (Sup-

porting Information Table 2). As shown in Figures 1d and 1e among all cytokines tested, cytokines involved in developmental process, regulation of cell death, anti-apoptosis and cell proliferation were specifically enriched. Having demonstrated a survival of TAMC and BM-MSc upon heat-shock treatment, we investigated the effect of co-culture of TAMC or BM-MSc with OCC.

TAMC and BM-MSc induced thermotolerance of OCC

The viability of OCC (SKOV3 and CaOV3) were challenged after 30 min of hyperthermia treatment and reached a plateau after 1 hr of treatment (Supporting Information Figure 3A and B). Timelapse study confirmed the kinetic observed in the cytotoxicity assay (Supporting Information Figure 3C).

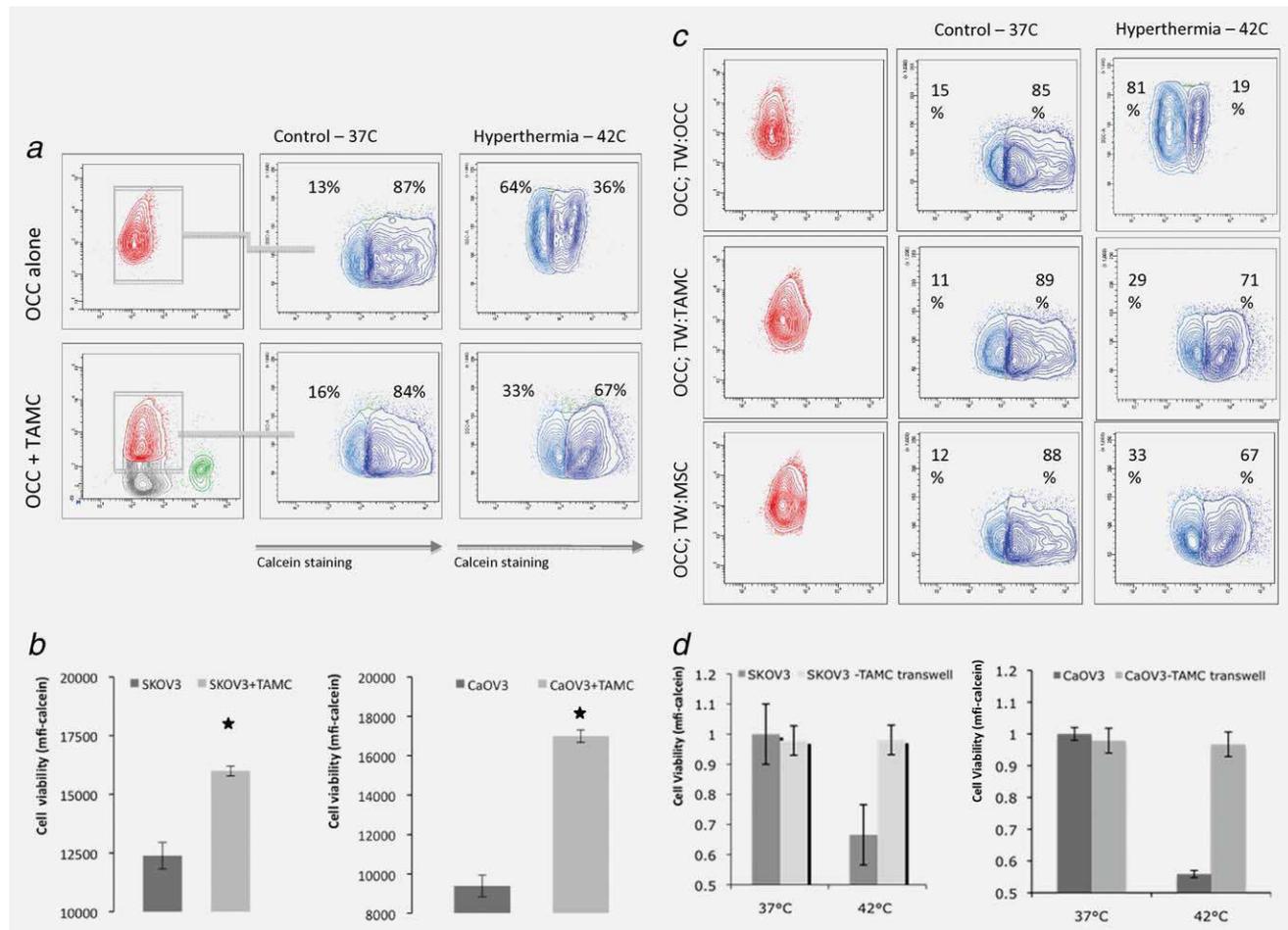


Figure 2. TAMC and MSC protects tumor cells against hyperthermia. (a) Scatter plot analyzing the effect of hyperthermia on co-culture of SKOV3 and TAMC. Ovarian cancer cells were stained with calcein violet to assess for cell viability. eGFP-TAMC were differentiated by eGFP staining (b) Graphic representation for different hyperthermia experiments performed. The cancer cell lines were either cultured alone or with the TAMC (or BM-MSC) before heat-treatment. Cell viability was assessed by calcein staining in the cancer cell population using polyvariate flow cytometry as depicted in 2A. (c) Scatter plot analyzing the effect of hyperthermia on co-culture of SKOV3 and TAMC in a transwell context. (d) Graphic representation of the same experiments. All results are representative of five different sets of experiments. (* $p < 0.05$).

For all following experiments, heat shock duration of 2 hr with recovery period of 2 hr at 37°C was applied.

We used polyvariate flow cytometry to characterize the effect of hyperthermia in co-culture of mesenchymal cells with OCC. Figure 2a represents a typical scatter plot with selection of different sub-populations and the strategy used for analyzing OCC viability upon hyperthermia treatment. In the co-culture context, no significant increase in cell viability was observed prior to the heat-shock (Figs. 2a and 2b). When treated at 42°C for 2 hr OCC's viability was decreased by up to 40% (Figs. 2a and 2b). Twenty-four hours co-culture either with BM-MSC or TAMC was able to rescue OCC from hyperthermia-induced cell death ($p < 0.05$, $n = 5$). To differentiate the role of intercellular contact from secreted factors, we reproduced the same set of experiments in the 0.2 μm transwell setting. The positive effect on cell viability persisted in the absence of a direct hetero-cellu-

lar contact, highlighting the role of secreted factors in MSC mediated thermotolerance (Figs. 2c and 2d).

CXCR4 is a determinant of MSC induced thermotolerance

In human ovarian tumor microenvironment, chemokine CXCL12 (also known as Stromal Derived Factor 1, SDF1) stimulates proliferation and invasion of OCC by establishing a permissive network.²⁸ We first investigated the expression of one of CXCL12 receptors: CXCR4. As shown in Figure 3a, both CaOV3 and SKOV3 cell lines exhibit a high expression level of CXCR4. We were previously able to demonstrate that MSC rescued OCC from hyperthermia induced cell death (Fig. 2) here we checked whether rescued cells were expressing higher level of CXCR4. We first demonstrated that the OCC were expressing CXCR4 (Fig. 3a). Using polyvariate flow cytometry we discriminated BM-MSC-eGFP or TAMC-

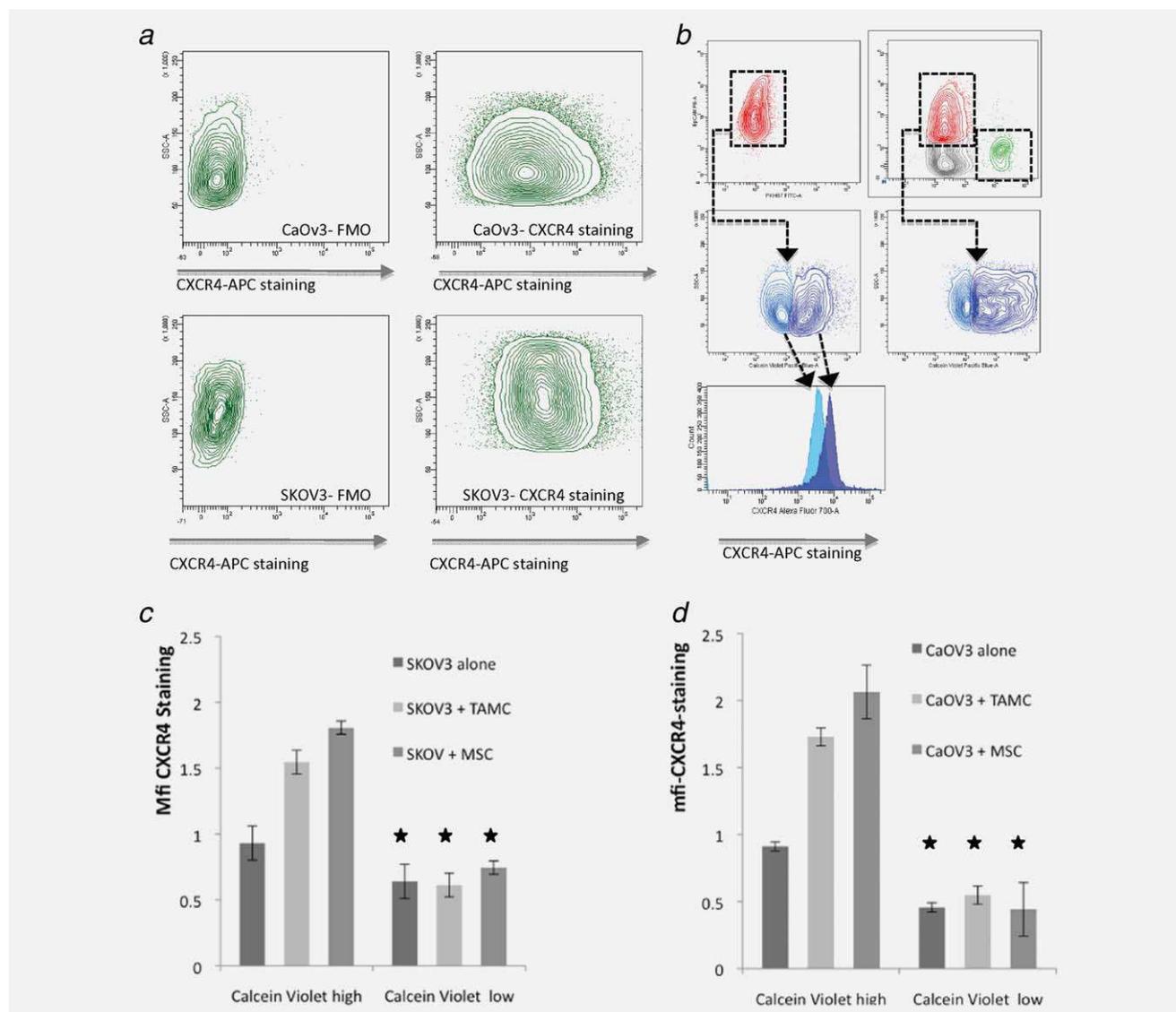


Figure 3. CXCR4 expression and cell viability. (a) Cytometry analysis of the SKOV3 and CAOV3 demonstrating expression of CXCR4 on both cell lines when compared to the controls. (b) Analysis of CXCR4 expression in the hyperthermia experience. Polyvariate flow analysis was able to demonstrate lower expression of CXCR4 on calcein-low (low viability) ovarian cancer cells. (c and d) Quantification of CXCR4 on calcein-high and low population during hyperthermia assays in the context of single or co-culture. ($\star p < 0.05$).

eGFP from OCC (CaOV3 or SKOV3) based on their eGFP fluorescence. Within the OCC population, we investigated the calcein violet fluorescence intensity and defined two populations: calcein low (nonviable) and calcein high (viable) (Fig. 3b). Then we determined the CXCR4 expression level in these two populations (Fig. 3b–3d). When co-cultivated with TAMC or BM-MSC, both CaOV3 and SKOV3 resistant to heat-shock exhibited a higher level of CXCR4 expression. According to these data, CXCR4 seems to play a role in the BM-MSC and TAMC induced thermotolerance.

CXCL12 mediates OCC thermotolerance

To further investigate the role of CXCL12 in thermotolerance induction, we stimulated the OCC (CaOV3 and SKOV3)

with 100 ng/ml of CXCL12 24 hr prior to heat-shock. As shown in the Figure 4a, CXCL12 stimulation does not increase the percentage of viable cells when at 37°C. When heat shocked, untreated OCC underwent a major hyperthermia induced cell death (87% of calcein high cell against 29% after heat-shock). However, when treated with CXCL12, no significant hyperthermia induced cell death was observed (Figs. 4b and 4c). Hence, the CXCL12 stimulation is sufficient to induce thermotolerance of OCC.

CXCR4 inhibition reverses MSC induced thermotolerance

As CXCL12 is sufficient to protect OCC from hyperthermia induced cell death, we developed a strategy in which we inhibited CXCL12 signaling. OCC/TAMC or BM-MSC co-

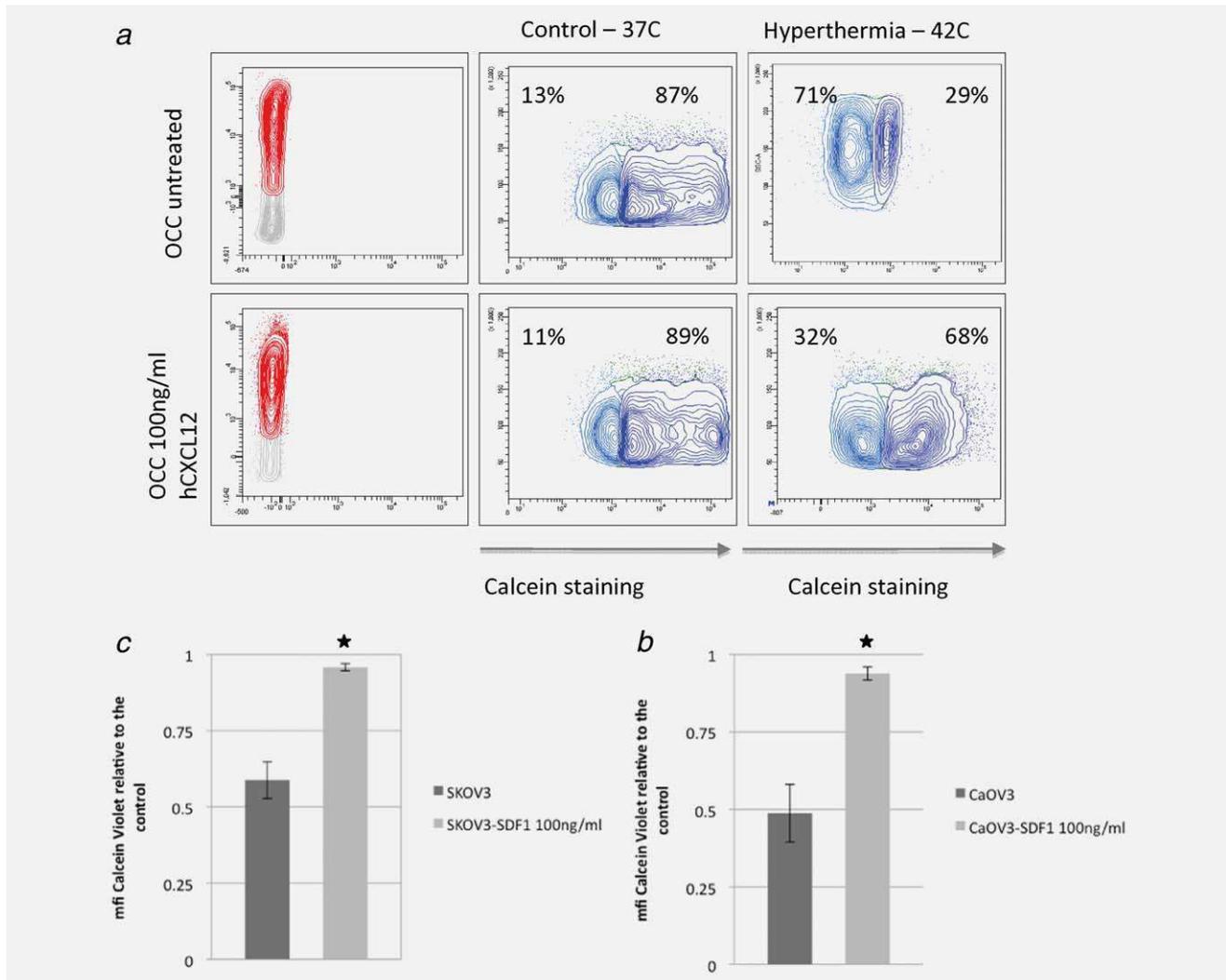


Figure 4. Role of CXCL12/CXCR4 on thermotolerance. (a) Cell viability was assessed as previously by calcein staining. Blocking monoclonal antibodies were used at (10 µg/ml). We were able to demonstrate that treating the Ovarian cancer cells by hCXCL12 (100 ng/ml) was able to recapitulate the thermotolerance induced by co-cultures of TAMC or BM-MSc and OCC. (b and c) Graphic representation for different hyperthermia experiments performed. The protective effect of hCXCL12 was equivalent for SKOV3 and CaOV3. Graphs are representative of three different experiments. (★*p* < 0.05).

cultures were treated with blocking CXCR4 antibody 24 hr before heat-shock. Treatment with CXCR4 blocking antibody did not induce any cell death prior to heat-shock on the OCC, TAMC or BM-MSc (Figs. 5a and 5b and data not shown). When exposed to hyperthermia OCC/TAMC or BM-MSc co-cultures did not display major OCC death, as shown previously. However, treatment with a CXCR4 blocking antibody critically sensitized the OCC in the co-culture context (Figs. 5c and 5d). Here, we were able to demonstrate that the MSC-induced thermotolerance relies on CXCR4/CXCL12 signaling axis.

Discussion

In our study, we were able to demonstrate that TAMC and BM-MSc are able to induce OCC thermotolerance.

Patients with peritoneal carcinosis have very poor survival. Indeed the rate of recurrence is quite high even in patients who underwent optimal debulking surgery and chemotherapy. HIPEC efficacy has been demonstrated in carcinosis from colon and gastric cancer.⁸ However, most protocols used in the treatment of ovarian cancers failed to demonstrate significant benefit regarding the overall survival. Ovarian cancer is a different entity from digestive tract cancers. Some investigators even consider ovarian cancer to be a peritoneal disease.²⁹ Most of the patients (75%) display peritoneal metastasis at the time of diagnosis, compared to the digestive tract cancers (25%). Peritoneal metastasis seems to be an early event in the natural history of the disease. Identifying peritoneal components that play a role in therapeutic resistance is therefore of essence. The role of microenvironment in

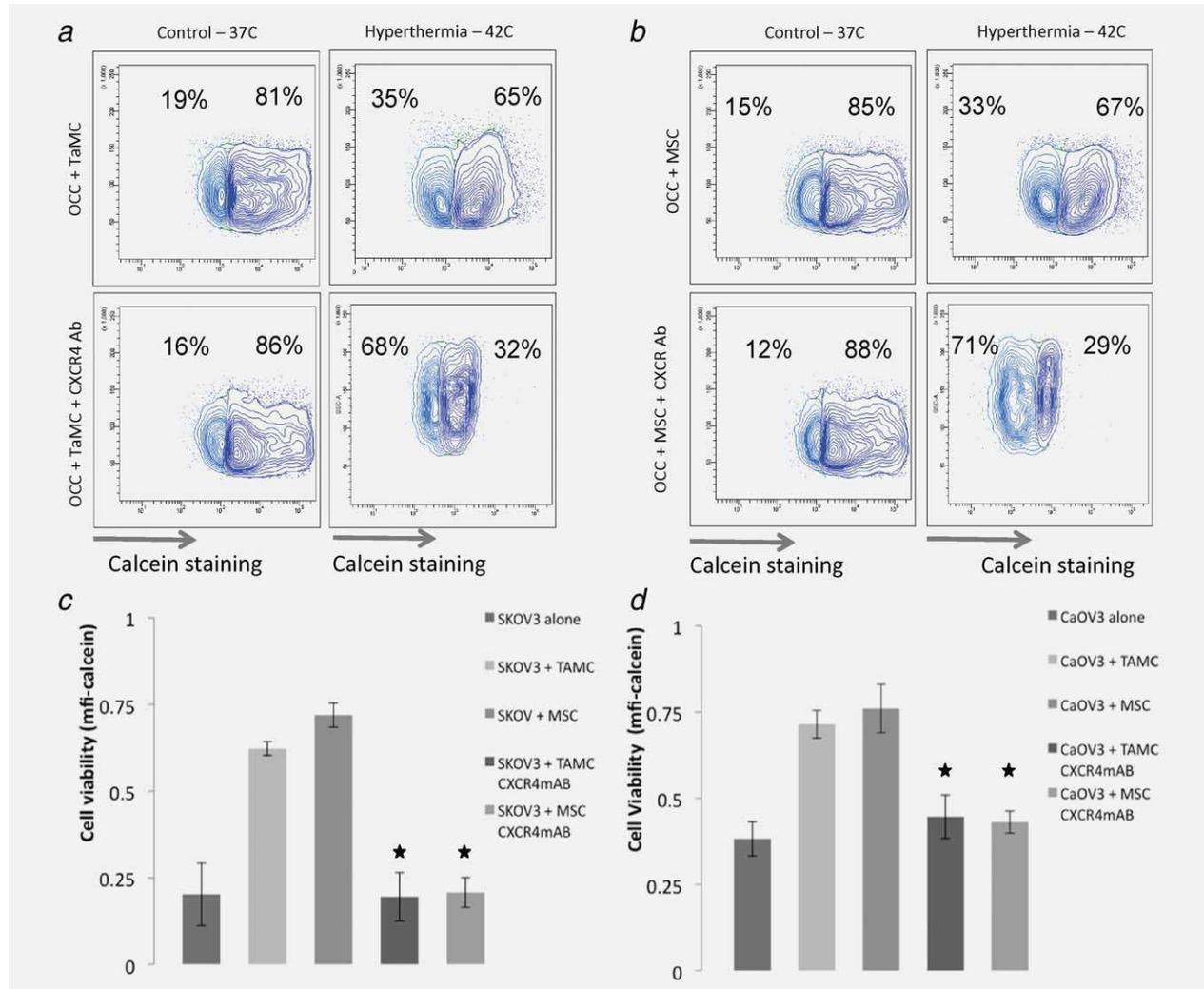


Figure 5. The protective effect of TAMC or BM-MSC is induced by CXCL12. (a and b) Scatter plot analyzing the effect of hyperthermia on co-culture of SKOV3 (OCC) with TAMC and BM-MSC respectively. OCC were stained with calcein violet to assess for cell viability. eGFP-TAMC were differentiated by eGFP staining. The co-culture experiments were performed in the presence of CXCR4 monoclonal blocking antibodies when indicated. (c and d) Graphic representation for the different hyperthermia experiments with CXCR4 monoclonal blocking antibodies involving CaOV3 and SKOV3 respectively. Representative of three different experiments, blocking CXCR4 would inhibit thermotolerance induced by TAMC or BM-MSC. (* $p < 0.05$).

ovarian cancer has already been illustrated in the literature.^{20–22} Several studies demonstrated that mesothelial cells from peritoneum of patients with ovarian cancer undergo phenotypic modification. Their transcriptomic profile demonstrated that they provide a pro-tumoral environment.^{30,31} In these studies however, the tumor interacting cells were not specifically characterized.

MSC comprise a unique population of cells playing a central role in tissue maintenance and repair.³² These cells have regenerative ability and multipotent capacity, and can differentiate into osteocytes, adipocytes, chondrocytes or myocytes.³³ Their tropism toward injury sites prompted investigators to study their ability to migrate toward neoplastic lesions considered as nonhealing wounds. Recently, it has been dem-

onstrated that MSCs are able to relocate to ovarian neoplastic lesions, where they participate in the formation of the tumor stroma. Kidd *et al.* demonstrated that the MSCs injected in the peritoneal cavity co-localize to the ovarian tumor xenografts.³⁴ Furthermore Lee *et al.*³⁵ demonstrated that LPA is responsible for enhanced migration of human adipocyte derived stem cells in response to malignant ascites from ovarian cancer patients through activation of LPA-receptor. Finally Coffelt *et al.*³⁶ demonstrated that an inflammatory microenvironment promotes ovarian cancer progression through the recruitment of MSCs in an LL-27 dependant manner. We were recently able to demonstrate that TAMC induce increased proliferation and chemoresistance through IL8 and IL6 secretion and oncologic trogocytosis.²³ Therefore,

we find the study of Cho *et al.*³⁷ demonstrating a cytotoxic effect of heated MSC on ovarian cancer cell lines quite intriguing.

In our study, we used TAMC isolated from cancer cell aggregates or BM-MSC in a co-culture context. It has been demonstrated that MSC undergo profound modification within peri-tumoral stroma. Indeed, co-culture of MSC with ovarian cancer cell lines induced the expression of tumor associated fibroblast markers such as TnC, TSP-a, FSP and increased the expression of alpha-SMA, FAP and desmin.^{38,39} We therefore used the TAMC isolated from ovarian cancer aggregates. These cells have been modified by their contact with the OCC, and might therefore be more relevant. To avoid cell-type specific effects, we controlled their functional effect using BM-MSC from different donors in a co-culture setting.

We were able to demonstrate that neither TAMC nor BM-MSC underwent apoptosis when submitted to heat shock. Transcriptomic analysis of TAMC did not display up-regulation of pro-apoptotic factors when exposed to heat-shock. The cytokine arrays performed on TAMC after heat-shock defined a pro-tumoral cytokine environment, rather than a cytotoxic one. For example, pro-survival cytokines such as FGF6, CSF2, IL2 were up-regulated. The tumor stroma is indeed a complex environment and it is hard to speculate on the role of each cytokine on their own. Therefore, we analyzed our cytokine arrays by clustering up-regulated and down-regulated cytokines using DAVID software.^{26,27} We were able to demonstrate down regulation of cytokines involved in pro-apoptotic pathways as well as an up regulation of cytokines implicated in cell proliferation.

Our approach was very different from the approach of Cho *et al.*³⁷ To recapitulate a situation as close to the clinical setting as possible we used polyvariate flow cytometry, and were able to perform all hyperthermia experiments in a co-culture context. While *in vitro* research is far from the clinical scenario, this was the best way to mimic the complex interaction between OCC and TAMC or MSC. We acknowledge that the complexity of the tumor stroma is significantly higher than our simple co-culture experiments may suggest. Other cell types such as endothelial cells and fibroblasts have important roles in tumor maintenance and resistance to therapy. The diverse components of the extra-cellular matrix also play an important role in tumor physiology. Finally, tri-dimensional aspect of the tumor should be considered when performing resistance assays. Nevertheless, a complex and practical tri-dimensional cultures have not yet been developed to allow for the reproducible assessment of therapeutic modalities.

In our co-culture context, we were able to demonstrate the induction of heat-shock resistance. This was concordant with our previously published results on the protective role of TAMC inducing chemoresistance and immunoevasion as well as with the data of other studies demonstrating supportive role of the MSC in ovarian tumor growth.^{24,25}

The discrepancy of our results with the results of the Cho *et al.* might be due to the methodological differences. Cho

*et al.*³⁷ demonstrated that conditioned media from MSC submitted to heat shock presented toxicity. However it seems than when the thermo-resistance experiments were performed in the co-culture, the TAMC as well BM-MSC provided a protective environment.

Determining the role of TAMC and BM-MSC in inducing heat-shock resistance lead to us to identify the molecular basis of this effect. As the effect was not contact mediated, one or several cytokines qualified as strong candidates. Among these, CXCL12 has been widely implicated in cancer metastasis.⁴⁰ In particular, in the context of ovarian carcinoma it has been demonstrated that lysophosphatidic acid stimulates secretion of VEGF and CXCL12.^{38,41} Kajiyama *et al.*²⁸ demonstrated the role of CXCL12 in the occurrence of peritoneal metastasis. Indeed CXCL12 increased cell adhesion to peritoneal mesothelial cells, and inhibiting CXCL12/CXCR4 axis would result in a reduction of peritoneal disease in mice. As in other tumors, CXCL12 contributed to the increased invasiveness of OCC through the activation of matrix metalloproteinase-2 and 9.⁴² Human peritoneal mesothelial cells have been described to produce a significant quantity of CXCL12.⁴⁰ Next to the metastatic properties of the CXCL12, its role in the proliferation of OCC has also been described. Indeed, CXCL12 seems to work in collaboration with EGF receptor to enhance ovarian cancer cell proliferation.⁴³ We first demonstrated that CXCL12 was able to induce resistance to hyperthermia. In co-culture experiments, through the blocking of the CXCR4 axis, we were able to demonstrate the reversion of the thermotolerance. The effect was similar when using TAMC or BM-MSC ruling out a specific cell-type effect. The role of CXCL12 does not rule out synergistic interaction or the role of other cytokines, and this should be addressed using a screening strategy. However as chemical inhibitors of CXCL12 have been tried in Phase I clinical trial, we suggest that CXCL12 blockade might be used as adjuvant therapy during HIPEC.

In this report, we demonstrate that TAMC and BM-MCS exert their thermo-protective effect by the elaboration of the CXCL12. Its role in resistance to therapeutic regimens in ovarian cancer has not yet been documented. We had previously demonstrated the role of TAMC in resistance to chemotherapy. Therefore in our study we specifically focused on the mechanism implicated in thermotolerance.

The results of the clinical trials are not yet convincing to consider HIPEC as standard treatment in ovarian cancers. HIPEC was used in ovarian cancer carcinosis upon evidences accumulated in the treatment of colon cancer carcinosis or peritoneal mesotheliome. Indeed the high morbidity rate as well as the small benefits demonstrates the need for further pre-clinical studies. Moreover we also need to evaluate the role of hyperthermia associated to other modalities than chemotherapy, such as recent targeted therapies, or anti-angiogenic therapies. Combining therapeutic modalities is mandatory to decrease the treatment failure rate in advanced

ovarian carcinoma.⁴⁴ Several randomized trials have been launched to determine the role of HIPEC in advanced ovarian cancers. The differences in the trial outcomes between colon cancer and ovarian cancer prompt us to investigate treatment modalities in-vitro and in-vivo on animal models to set-up optimal clinical trials.

Whether CXCL12 induced resistance will play a role in the context of hyperthermia associated to chemotherapy should be further studied. However, from our data it seems that the inhibition of CXCL12 might provide sensitization of OCC to hyperthermia, which might therefore be of benefit in the context of HIPEC.

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225–49.
- Bhoola SMD, Hoskins WJMD. Diagnosis and Management of Epithelial Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol* 2006;107:1399–410.
- Eisenkop SM, Spirtos NM, Lin W-CM. “Optimal” cytoreduction for advanced epithelial ovarian cancer: a commentary. *Gynecol Oncol* 2006;103:329–35.
- Pfisterer J, Ledermann JA. Management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Semin Oncol* 2006;33:12–16.
- Di Nicolantonio F, Mercer S, Knight L, Gabriel F, Whitehouse P, Sharma S, Fernando A, Glaysher S, Di Palma S, Johnson P, Somers S, Toh S, et al. Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer* 2005;5:78.
- Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA, the Gynecologic Oncology Group. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354:34–43.
- Markman M, Brady MP, Hutson AP, Berek JSMD. Survival after second-line intraperitoneal therapy for the treatment of epithelial ovarian cancer: the gynecologic oncology group experience. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:223–9.
- Esquivel J, Sticca R, Sugarbaker P, Levine E, Yan T, Alexander R, Baratti D, Bartlett D, Barone R, Barrios P, Bieligg S, Bretcha-Boix P, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. *Ann Surg Oncol* 2007;14:128–33.
- Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:487–97.
- Jones EL, Samulski TV, Dewhirst MW, Alvarez-Secord A, Berchuck A, Clarke-Pearson D, Havrilesky LJ, Soper J, Prosnitz LR. A pilot phase II trial of concurrent radiotherapy, chemotherapy, and hyperthermia for locally advanced cervical carcinoma. *Cancer* 2003;98:277–82.
- Meyn RE, Corry PM, Fletcher SE, Demetriades M. Thermal enhancement of DNA damage in mammalian cells treated with cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 1980;40:1136–39.
- van de Vaart PJM, van der Vange N, Zoetmulder FAN, van Goethem AR, van Tellingen O, ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH, Bartelink H, Begg AC. Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1998;34:148–54.
- Roti Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia* 2009; 24:3–15.
- Fujimoto S, Takahashi M, Mutou T, Kobayashi K, Toyosawa T, Isawa E, Sumida M, Ohkubo H. Improved mortality rate of gastric carcinoma patients with peritoneal carcinomatosis treated with intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion combined with surgery. *Cancer* 1997;79:884–91.
- Helm CW, Toler CR, Martins RS, III, Gordinier ME, Parker LP, Metzinger DS, Edwards RP. Cytoreduction and intraperitoneal heated chemotherapy for the treatment of endometrial carcinoma recurrent within the peritoneal cavity. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:204–09.
- Chua T, Robertson G, Liauw W, Farrell R, Yan T, Morris D. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery in ovarian cancer peritoneal carcinomatosis: systematic review of current results. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1637–45.
- Pomel C, Ferron G, Lorimier G, Rey A, Lhomme C, Classe JM, Bereder JM, Quenet F, Meeus P, Marchal F, Morice P, Elias D. Hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy using oxaliplatin as consolidation therapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. Results of a phase II prospective multicentre trial. CHIPOVAC study. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36:589–93.
- Kim JH, Lee JM, Ryu KS, Lee YS, Park YG, Hur SY, Lee KH, Lee SH, Kim SJ. Consolidation hyperthermic intraperitoneal chemotherapy using paclitaxel in patients with epithelial ovarian cancer. *J Surg Oncol* 2010;101:149–55.
- Ceelen WPF, Michael F. Intraperitoneal therapy for peritoneal tumors: biophysics and clinical evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;7:108–15.
- Charles KA, Kulbe H, Soper R, Escorcio-Correia M, Lawrence T, Schultheis A, Chakravarty P, Thompson RG, Kollias G, Smyth JF, Balkwill FR, Hagemann T. The tumor-promoting actions of TNF-CE± involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest* 2009;119:3011–23.
- Katz E, Skorecki K, Tzukerman M. Niche-dependent tumorigenic capacity of malignant ovarian ascites-derived cancer cell subpopulations. *Clin Cancer Res* 2009; 15:70–80.
- Tsiatas ML, Gyftaki R, Liacos C, Politi E, Rodolakis A, Dimopoulos MA, Bamias A. Study of T lymphocytes infiltrating peritoneal metastases in advanced ovarian cancer: associations with vascular endothelial growth factor levels and prognosis in patients receiving platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19: 1329–34.
- Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, Faussat A-M, Simon A, Ducros E, Mery E, Couderc B, Lis R, Capdet J, Bergalet J, Querleu D, et al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS ONE* 2008;3:e3894.
- Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teisse J, Mirshahi M, Couderc B. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 2010;126: 2090–101.
- Martinet L, Poupot R, Mirshahi P, Rafii A, Fourni  J-J, Mirshahi M, Poupot M. Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *Int J Cancer* 2010;126:2143–52.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protocols* 2008;4:44–57.
- Dennis G, Sherman B, Hosack D, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki R. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* 2003; 4:P3.
- Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122:91–99.

29. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol* 2008;9:1191–97.
30. Burleson KM, Hansen LK, Skubitz APN. Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers. *Clin Exp Metastasis* 2005;21:685–97.
31. Wang E, Ngilame Y, Panelli MC, Nguyen-Jackson H, Deavers M, Mueller P, Hu W, Savary CA, Kobayashi R, Freedman RS, Marincola FM. Peritoneal and subperitoneal stroma may facilitate regional spread of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:113–22.
32. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 2005;11:1198–211.
33. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–47.
34. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 2009;27:2614–23.
35. Lee MJ, Jeon ES, Lee JS, Cho M, Suh D-S, Chang CL, Kim JH. Lysophosphatidic acid in malignant ascites stimulates migration of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2008;104:499–510.
36. Coffelt SB, Marini FC, Watson K, Zvezdaryk KJ, Dembinski JL, LaMarca HL, Tomchuck SL, zu Bentrup KH, Danka ES, Henkle SL, Scandurro AB. The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3806–11.
37. Cho JA, Park H, Kim HK, Lim EH, Seo SW, Choi JS, Lee KW. Hyperthermia-treated mesenchymal stem cells exert antitumor effects on human carcinoma cell line. *Cancer* 2009;115:311–23.
38. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh D-S, Yoon M-S, Chang CL, Jung JS, Kim JH. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells* 2008;26:789–97.
39. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS ONE* 2009;4:e4992.
40. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2002;62:5930–38.
41. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrassa M, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 2005;65:465–72.
42. Yuecheng Y, Xiaoyan X. Stromal-cell derived factor-1 regulates epithelial ovarian cancer cell invasion by activating matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2. [Article]. *Eur J Cancer Prev* 2007;16:430–35.
43. Guo Z, Cai S, Fang R, Chen H, Du J, Tan Y, Ma W, Hu H, Cai S, Liu Y. The synergistic effects of CXCR4 and EGFR on promoting EGF-mediated metastasis in ovarian cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;60:1–6.
44. Susana M, Campos SG. A current review of targeted therapeutics for ovarian cancer. *J Oncol* 2009;2010:11.

Discussion et perspectives :

Dans ce travail nous avons étudié l'influence du stroma et plus particulièrement des cellules souches mésenchymateuses (MSC) sur le comportement des cellules tumorales ovariennes (OCC).

Dans la première partie nous avons mis en évidence l'émergence d'un profil pro-métastatique des OCC après contact avec les MSC. En utilisant une approche transcriptomique corrélée à des tests fonctionnels, nous avons pu mettre en évidence que les MSC augmentaient les propriétés métastatiques des lignées tumorales ovariennes en régulant positivement certains groupes de gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire, l'invasion et la motilité, ou encore la chimiorésistance. Ces résultats suggèrent que la niche créée par les cellules souches mésenchymateuses pourrait augmenter l'initiation d'un foyer métastatique.

Nous avons ensuite développé un modèle d'infiltration tumorale en 3D et démontré le rôle des MSC dans l'envahissement précoce des cellules tumorales ovariennes. Les tumeurs infiltraient significativement plus profondément la membrane que dans les zones pauvres en MSC. Nous avons mis en évidence le rôle déterminant de l'IL6 comme médiateur du dialogue entre les MSC et les cellules tumorales ovariennes, indispensable à l'infiltration des cellules tumorales ovariennes et plus particulièrement dans les zones riches en MSC.

Enfin nous avons étudié la viabilité des cellules tumorales ovariennes suite à un traitement hyperthermique à 42°C dans un contexte de co-culture avec les MSC. Nous avons pu démontrer que les MSC étaient capables

d'induire chez les cellules tumorales ovariennes un phénotype thermotolérant lié à la sécrétion CXCL12 par les MSC. Ces données montrent qu'en dehors d'un effet sur la résistance à la chimiothérapie, les MSC jouent également un rôle protecteur contre l'hyperthermie dans la CHIP.

Ces données vont donc toutes dans le même sens et démontrent les propriétés pro-tumorales des MSC facilitant ainsi la dissémination des cellules tumorales ovariennes ainsi que leur résistance au traitement. Je distinguerai donc dans la discussion 2 grands axes : l'influence des MSC sur la dissémination métastatique et l'impact des MSC sur la résistance au traitement.

I- l'influence des MSC sur la dissémination métastatique :

a) La présence des MSC dans les tumeurs :

Dans notre modèle 3D d'infiltration tumorale, nous avons mis en évidence un développement des nodules tumoraux préférentiellement dans les zones riches en MSC. En outre, les tumeurs développées dans ces zones infiltraient plus profondément la membrane amniochorionique que les tumeurs développées dans les zones pauvres en MSC, suggérant un rôle facilitant des MSC. Dans notre travail nous n'avons par contre pas recherché si les MSC étaient recrutées par les tumeurs ou si les tumeurs allaient préférentiellement dans les zones riches en MSC. Toutefois, cette question avait déjà été posée dans d'autres travaux. En effet, plusieurs travaux récents démontrent un recrutement des MSC au sein des tumeurs ovariennes. Kidd et coll. montrent que des MSC injectées dans la circulation de souris 15 jours après la greffe de tumeurs ovariennes et mammaires étaient retrouvées au sein des tumeurs

greffées [242]. Grâce à une transfection des MSC par le gène de la luciférase, ils peuvent suivre la distribution de ces dernières au cours du temps par bioluminescence. Ils montrent tout d'abord le tropisme des MSC pour les sites inflammatoires comme des plaies réalisées chez la souris. Ils montrent ensuite, après injection de ces mêmes MSC dans des souris greffées en intra-péritonéal avec des cellules tumorales ovariennes, leur distribution immédiate dans l'ensemble du péritoine. Trois jours plus tard, elles se concentrent en quelques points précis du péritoine correspondant aux zones de carcinose péritonéale ovarienne [242]. Ils montrent donc dans ce modèle que les MSC sont recrutés par les sites inflammatoires incluant les cancers de l'ovaire. Coffelt et coll. [111] montrent que ce recrutement est dépendant de la sécrétion par la tumeur du peptide pro-inflammatoire LL-37 (leucine, leucine-37). C'est en effet le LL-37 qui permet aux tumeurs le recrutement des MSC qui deviennent des cellules stromales de soutien au sein de la tumeur [111].

a) Effet du recrutement des MSC sur le développement tumoral :

Dans notre travail nous montrons clairement un rôle pro-tumoral des MSC, permettant une augmentation de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules tumorales ovariennes. En outre, dans un modèle 3D nous montrons également une augmentation de la profondeur d'infiltration des tumeurs au contact des MSC. Le rôle facilitant des MSC dans la dissémination tumorale avait déjà été rapportée dans le cancer du sein par plusieurs équipes. Karnoub et Weinberg [112] avaient décrit une sécrétion de CCL5 (Rantes) par les MSC induisant une augmentation de la mobilité, de l'invasion et du potentiel métastatique des cellules tumorales de sein. Cet

effet était réversible en bloquant CCR5, le récepteur de CCL5. Dans ce travail, les auteurs montrent que les MSC sont recrutés spécifiquement par les tumeurs mammaires, en augmentant leur mobilité. Ils décrivent également une sécrétion d'IL6 par les MSC, augmentée en contact avec les cellules tumorales, corroborant nos observations [112]. Une équipe française a elle décrit l'influence des adipocytes transformés par les cytokines inflammatoires secrétées au contact des tumeurs mammaires, avec en particulier le rôle central de l'IL6 qui induit dans les capacités pro-invasives des cellules tumorales mammaires [40]. Ils ont d'ailleurs montré que cette augmentation du potentiel invasif s'accompagnait d'une perte de l'E-Cadhérine, une des caractéristiques dans le processus d'EMT. Dans notre travail, c'est une des voies que nous pourrions également explorer en recherchant une perte du phénotype épithélial associé aux modifications de mobilité et d'invasion induites par l'IL6. L'équipe de Wicha a mis en évidence une régulation des cellules souches de cancer du sein par les MSC par la sécrétion d'IL6 et CXCL7 [107]. C'est grâce à ce réseau cytokinique que les MSC augmentent la croissance tumorale, par augmentation du compartiment souche des tumeurs [107].

Dans le cancer de l'ovaire, l'influence des MSC sur le potentiel métastatique des OCC a été décrite plus récemment. Mc Lean et Buchanovitz [113] montrent que les MSC associées au cancer (CA-MSC) diffèrent des MSC classique par leur comportement et les facteurs secrétés. En effet ces CA-MSC acquièrent des propriétés pro-tumorales. Ainsi, ils montrent que c'est la sécrétion de BMP2, 4 et 6 par les CA-MSC qui induit une augmentation du compartiment souche des cellules tumorales ovariennes en

utilisant l'activité enzymatique aldéhyde déshydrogénase (ALDH) [113, 124]. Coffelt et coll. [111] montrent également une augmentation de la croissance des tumeurs grâce au recrutement des MSC, réversible par inhibition de LL-37. Ils montrent également la transformation de ces MSC sous l'effet de LL-37, induisant une augmentation de sécrétion de cytokines pro-angiogéniques comme IL6 [111].

b) Perspectives:

Il émerge donc de notre travail une influence pro-tumorale considérable des MSC sur les cellules tumorales ovariennes et le développement des tumeurs ovariennes. Cet effet pro-métastatique est médié par l'IL6 qui est donc une cible potentiel pour le développement de nouveaux agents anti-tumoraux. Cependant, notre travail est basé sur des modèles in vitro sur des lignées cellulaires et nous n'avons pas de modèle animal permettant d'appuyer nos hypothèses.

La suite de ce travail pourrait donc être dans un premier temps la mise en place d'un modèle de carcinose péritonéale par allogreffe de cellules tumorales ovariennes dans des souris nod/scid. Les cellules greffées pourront être des cellules de lignée de carcinome de l'ovaire, mais également des cellules primaires de cancer de l'ovaire. Nous avons obtenu à cet effet un accord éthique nous permettant d'extraire et d'utiliser à des fins de recherche les cellules tumorales de cancer de l'ovaire chez les patientes prises en charge à l'hôpital Tenon. Nous avons donc mis au point l'extraction et la mise en culture des cellules tumorales ainsi que des MSC d'une même tumeur après marquage et tri par cytométrie en flux. Nous pourrions donc utiliser des

cellules primaires cancéreuses ovariennes et mésenchymateuses souches de mêmes patientes pour confirmer les résultats obtenues sur lignées cellulaires. Une comparaison de la taille et de la cinétique tumorale après injection des cellules tumorales sera d'abord réalisée, avec et sans co-injection de MSC. Nous attendons logiquement une augmentation de taille des tumeurs avec MSC. Nous réaliserons ensuite une lignée stable de cellules tumorales avec une inhibition stable du récepteur de l'IL6 (IL6Ra) à l'aide d'un shRNA. Nous répèterons l'expérience précédente en co-injectant ces cellules déficientes pour l'IL6Ra avec et sans les MSC pour rechercher une diminution de la croissance des tumeurs. Enfin nous rechercherons les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène en commençant par rechercher une activation de la voie Jak-Stat.

Le cancer de l'ovaire reste un enjeu chirurgical majeur car le facteur pronostic le plus important dans cette maladie reste le résidu tumoral après chirurgie. Malheureusement, il est très difficile d'évaluer la résecabilité des patientes avant la chirurgie et il est parfois même difficile de visualiser toutes les atteintes par voie coelioscopique. Il manque donc cruellement de marqueur associé à la résecabilité de la maladie. La seconde voie de recherche plus clinique serait donc de réaliser un dosage de certaines cytokines pro-inflammatoires dont l'IL6 dans l'ascite des patientes afin de rechercher une corrélation des taux mesurés avec l'étendue de la carcinose évaluée par des scores de carcinose comme le score de fagotti. Si nous pouvons identifier une ou plusieurs cytokines corrélées à l'importance de la maladie péritonéale, nous pourrions construire un score biologique ou clinico-biologique de résecabilité, c'est-à-dire permettant de prédire la possibilité de réaliser une

chirurgie de cytoréduction complète d'emblée. Ainsi, il suffirait alors d'une ponction d'ascite avec une mesure d'un panel de cytokines pour aider à la décision médicale, qui pourrait être permettre une meilleure reproductibilité, surtout pour des équipes peu expérimentées. Cette voie de recherche ne pourra être menée qu'à partir d'un essai clinique.

II- L'impact des MSC sur la résistance aux traitements :

Le traitement du cancer de l'ovaire de stade avancé repose sur une association entre la chirurgie et la chimiothérapie. Nous avons vu que la chirurgie doit être complète pour être efficace, c'est-à-dire avec un résidu tumorale post-opératoire nul. Cependant, dans un certain nombre de cas, cette chirurgie est impossible en raison de l'importance de la maladie péritonéale et des atteintes viscérales. C'est dans ces cas qu'une chimiothérapie néo-adjuvante est réalisée et a montré une équivalence à la chirurgie première si elle est suivie d'une chirurgie de débulking [18]. Malgré un taux de réponse initial de la chimiothérapie entre 60 et 80%, de nombreuses récives sont observées. Une chimiorésistance se développe dans de nombreux cas et explique l'échec des traitements ultérieurs. En fait, il semblerait exister une maladie résiduelle constituée d'une petite fraction de cellules qui va être à l'origine de ces récives souvent chimiorésistances.

Nous avons montré que les MSC pouvaient conférer une chimiorésistance avec environ 15% de gain de survie des cellules tumorales. Cette fraction ne parait pas très importante mais pourrait être à l'origine de la maladie résiduelle à l'origine des récives. Meads et coll. reprennent dans

une revue de la littérature les différents mécanismes de chimiorésistance médiée par l'environnement et l'importance de la maladie minimale résiduelle dans ce processus [189]. Ils montrent comment l'environnement peut protéger certaines cellules tumorales contre les effets immédiats de la chimiothérapie grâce à un dialogue impliquant des molécules telles que SDF-1 ou IL6 [189]. Cette protection qui n'est pas très importante va permettre à une maladie minimale résiduelle de survivre et d'acquérir des résistances complexes et efficaces en réponse à la pression sélective des traitements. Il propose donc de changer notre approche du traitement par chimiothérapie conventionnelle en y ajoutant des molécules permettant d'inhiber spécifiquement les interactions entre les cellules tumorales et leur stroma comme les MSC [189].

C'est donc exactement dans cet esprit que nous avons recherché les mécanismes de résistance aux traitements des cellules tumorales ovariennes liées aux MSC. Nous avons mis en évidence une protection des OCC par les MSC d'une part à la chimiothérapie, mais également à l'hyperthermie. Nous avons identifié SDF1 comme médiateur de cette thermotolérance induite par les MSC, réversible en bloquant son récepteur spécifique CXCR4. Par contre, nous n'avons pas mis en évidence le mécanisme permettant d'expliquer cette chimioprotection. Ces interactions à l'origine d'une chimiorésistance ont été explorées indirectement dans le cancer du sein. C'est ainsi que Ginestier et coll. montrent que d'IL8 secrété par les MSC [96] mais également les cellules tumorales non souches du bulk tumoral sont induit une chimioprotection des cellules tumorales mammaires en augmentant leur compartiment souche ALDH+. Ils montrent ensuite qu'en bloquant les récepteurs de l'IL8 (CXCR1) par la répertaxine en plus de la chimiothérapie, ils sont capables de diminuer

la taille des tumeurs et le nombre de métastases tumorales [106]. En fait, il existe très peu de donnée concernant les médiateurs de la chimioprotection liée aux MSC dans le cancer de l'ovaire.

Un travail récent montre dans un modèle animal que les MSC sont non seulement capables d'induire une chimiorésistance aux sels de platine de plusieurs tumeurs solides, mais également que cette protection est même plus importante lorsqu'elles sont situées à distance du site tumoral et non en contact de la tumeur [252]. Les auteurs décrivent une activation rapide des MSC par la chimiothérapie, induisant une sécrétion de facteurs protecteurs pour les cellules tumorales. En outre, ces facteurs sécrétés sous l'impulsion d'une chimiothérapie par sels de platine confèrent aux tumeurs une résistance à d'autres chimiothérapies comme l'irinotécan. Ils expliquent ce phénomène par une approche métabolomique : l'induction d'une lipolyse dans les MSC libère des acides gras polyinsaturés qui vont être les médiateurs de cette résistance. Enfin, c'est en bloquant les enzymes permettant cette libération d'acides gras qu'ils parviennent à empêcher cette chimioprotection : la Cyclooxygenase (COX)-1 et la Thromboxane Synthase (TXAS) [252]. Il est intéressant de noter que ce phénomène de lipolyse a également été décrit dans les métastases épiploïques de cancer de l'ovaire, où la libération d'acides gras par les adipocytes agit comme une source d'énergie pour les cellules tumorales ovariennes, augmentant leurs capacités de croissance et de métastases [253].

La résistance au traitement conférée par le stroma et les MSC est donc potentiellement une des clés pour sélectionner de nouveaux agents anti-tumoraux. Ces données ainsi que les nôtres, vont dans le sens d'une

association entre des chimiothérapies classiques et des agents sensibilisant ou permettant d'empêcher la protection d'un contingent de cellules tumorales par le stroma. Il existe peu de données dans la littérature concernant les agents à cibler entre les MSC et les cellules tumorales ovariennes, par contre, des travaux récents proposent des pistes à explorer pour diminuer la résistance à la chimiothérapie des tumeurs ovariennes. Une revue de la littérature s'est focalisée sur le potentiel de l'IL6 et de ses voies de signalisation [254].

Une première perspective à notre travail et au regard des données de la littérature serait donc de développer un modèle animal de carcinose péritonéale par greffe allogénique de tumeur humaine, et de tester plusieurs types de traitements visant les interactions MSC – OCC. La première partie de ce travail serait de sélectionner in vitro les inhibiteurs capables de réverser le phénomène de chimiorésistance lié aux MSC. Dans cette première phase, nous utiliserions des transwells ou des surnageants de MSC pour vérifier que cette protection ne nécessite pas de contact entre les MSC et les cellules tumorales. Ensuite, plusieurs médiateurs des interactions MSC-OCC seront testés : inhibiteur de CXCR4, inhibiteur d'IL6Ra, inhibiteur de CXCR1 et inhibiteur du récepteur de TNFa, qui paraissent être les cibles les plus pertinentes. Un ou plusieurs inhibiteurs seraient alors testés chez la souris avec ou sans traitement par chimiothérapie.

A côté du développement de nouvelles drogues et thérapies ciblées, il existe également une nécessité de pouvoir prédire quelles patientes vont présenter une chimiorésistance et lesquelles vont répondre au traitement en pratique clinique. Il est actuellement impossible de savoir quelles drogues

utiliser et sur quel type de tumeur. Une des explications possibles de la résistance au traitement est l'existence d'une population souche quiescente et donc moins sensibles aux drogues conventionnelles de chimiothérapie [255]. Ainsi, la proportion des marqueurs souches présente dans les tumeurs des patientes devrait être corrélée à la réponse au traitement. Dans le cancer de l'ovaire, plusieurs marqueurs souches ont été proposés ces dernières années [113, 121, 122, 124]. Nous pourrions donc rechercher ces marqueurs ou les molécules augmentant le compartiment souche des tumeurs dans les pièces opératoires des patientes opérées pour cancer de l'ovaire, dont les plus relevantes seraient : CD117, CD44, ALDH, CD133, BMP2, IL6 et IL8. Pour les patientes traitées par chimiothérapie néo-adjuvante, nous disposons de biopsies tumorales avant et après chimiothérapie. Nous pourrions donc analyser l'enrichissement de ses marqueurs après chimiothérapie, puisque les cellules souches sont moins ou pas sensibles à la chimiothérapie. Les patientes dites « platine résistantes » sont classiquement définies comme celles récidivant dans l'année. Nous pourrions ainsi rechercher une corrélation entre l'enrichissement des marqueurs avec le caractère chimiorésistant de certaines patientes. Nous pourrions donc définir une association de marqueurs associés à une chimiorésistance. En parallèle nous mènerions une étude par FACS des cellules circulantes dans l'ascite de ces patientes ou de cellules tumorales extraites des tumeurs biopsiées afin de déterminer l'expression de ces marqueurs dans les tumeurs des mêmes patientes. Si nous arrivons à identifier un ensemble de marqueurs dont la présence est associée à une chimiorésistance, nous pourrions ainsi sélectionner les patientes pouvant bénéficier d'une chimiothérapie classique

et celles chez qui un recours à d'autres drogues ou thérapies devrait être envisagé. Dans ce cas il faudrait élaborer un test fiable et reproductible pouvant être utilisé par la majorité des équipes. La 2^o partie de ce projet ne pourrait enfin se concevoir que dans le cadre d'un essai clinique avec nécessité d'obtention d'un comité de protection des personnes (CPP).

Le cancer de l'ovaire reste donc un challenge sur le plan de la recherche comme sur le plan clinique. Les travaux en cours explorent de nombreux axes de réflexions, notamment la problématique du rôle du stroma dans le développement et la réponse au traitement de ce cancer. Les essais cliniques à venir devront prendre en compte ces nouvelles données afin d'appréhender cette maladie dans sa complexité. Enfin, la prédiction de la résécabilité ainsi que de la réponse au traitement nous permettra au quotidien une meilleure sélection des patientes à opérer ou à traiter par chimiothérapie, et éviter leur désillusion au prix d'une morbidité et effets secondaires actuellement importantes.

Références :

1. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. 58(2): p. 71-96.
2. Cannistra, S.A., *Cancer of the ovary*. N Engl J Med, 2004. 351(24): p. 2519-29.
3. Tretarre, B., et al., [*Ovarian cancer: incidence and mortality in France*]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2005. 34(2): p. 154-61.
4. Belot, A., et al., *Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005*. Rev Epidemiol Sante Publique, 2008. 56(3): p. 159-75.
5. Eisenkop, S.M., N.M. Spirtos, and W.C. Lin, "*Optimal*" cytoreduction for advanced epithelial ovarian cancer: a commentary. Gynecol Oncol, 2006. 103(1): p. 329-35.
6. Auersperg, N., T. Ota, and G.W. Mitchell, *Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches*. Int J Gynecol Cancer, 2002. 12(6): p. 691-703.
7. Hoang-Ngoc, M., et al., [*Histologic study of the gonads in ovarian differentiation during organogenesis*]. Arch Anat Cytol Pathol, 1989. 37(5-6): p. 201-7.
8. Piek, J.M., et al., *Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer*. J Pathol, 2001. 195(4): p. 451-6.
9. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am J Surg Pathol. 34(3): p. 433-43.

10. Fleming, J.S., et al., *Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses*. Mol Cell Endocrinol, 2006. 247(1-2): p. 4-21.
11. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm*. Hum Pathol. 42(7): p. 918-31.
12. Deffieux, X., et al., *[Chemoprevention and prophylactic surgery in ovarian carcinoma]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2007. 36(8): p. 756-63.
13. Chi, D.S., et al., *What is the optimal goal of primary cytoreductive surgery for bulky stage IIIc epithelial ovarian carcinoma (EOC)?* Gynecol Oncol, 2006. 103(2): p. 559-64.
14. Bristow, R.E., et al., *Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2002. 20(5): p. 1248-59.
15. Morice, P., et al., *Results of interval debulking surgery in advanced stage ovarian cancer: an exposed-non-exposed study*. Ann Oncol, 2003. 14(1): p. 74-7.
16. Salani, R., et al., *Secondary cytoreductive surgery for localized, recurrent epithelial ovarian cancer: analysis of prognostic factors and survival outcome*. Cancer, 2007. 109(4): p. 685-91.
17. Bristow, R.E., I. Puri, and D.S. Chi, *Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer: a meta-analysis*. Gynecol Oncol, 2009. 112(1): p. 265-74.
18. Vergote, I., et al., *Neoadjuvant Chemotherapy or Primary Surgery in Stage IIIc or IV Ovarian Cancer*. New England Journal of Medicine, 2010. 363(10): p. 943-953.

19. Armstrong, D.K., et al., *Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2006. 354(1): p. 34-43.
20. Helm, C.W., *The Role of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) in Ovarian Cancer*. The Oncologist, 2009. 14(7): p. 683-694.
21. Spratt, J.S., et al., *Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy*. Cancer Res, 1980. 40(2): p. 256-60.
22. Sugarbaker, P.H. and D. Chang, *Results of treatment of 385 patients with peritoneal surface spread of appendiceal malignancy*. Ann Surg Oncol, 1999. 6(8): p. 727-31.
23. Elias, D., et al., *Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution*. Ann Oncol, 2002. 13(2): p. 267-72.
24. Ferron, G., et al., *[Importance of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in ovarian cancer]*. Bull Cancer, 2009. 96(12): p. 1243-52.
25. Deraco, M., et al., *Advanced cytoreduction as surgical standard of care and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy as promising treatment in epithelial ovarian cancer*. Eur J Surg Oncol, 2011. 37(1): p. 4-9.
26. Ansaloni, L., P. De Iaco, and L. Frigerio, *Re: "cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy as upfront therapy for advanced epithelial ovarian cancer: multi-institutional phase II trial." - Proposal of a clinical trial of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in advanced ovarian cancer, the CHORINE study*. Gynecol Oncol, 2012. 125(1): p. 279-81.

27. Pomel, C., et al., *Hyperthermic intra-peritoneal chemotherapy using Oxaliplatin as consolidation therapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. Results of a phase II prospective multicentre trial. CHIPOVAC study.* European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 2010. In Press, Corrected Proof.
28. Rafii, A., et al., *Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours.* PLoS One, 2008. 3(12): p. e3894.
29. Virchow, R., *As Based upon Physiological and Pathological Histology.* Nutrition Reviews, 1989. 47(1): p. 23-25.
30. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast.* Lancet, 1889. 133.
31. Fidler, I.J., *Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine.* J Natl Cancer Inst., 1970. 45(4): p. 773-82.
32. Hart, I.R. and I.J. Fidler, *Role of Organ Selectivity in the Determination of Metastatic Patterns of B16 Melanoma.* Cancer Research, 1980. 40(7): p. 2281-2287.
33. Tarin, D., et al., *Mechanisms of Human Tumor Metastasis Studied in Patients with Peritoneovenous Shunts.* Cancer Research, 1984. 44(8): p. 3584-3592.
34. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.* Cell, 2011. 147(2): p. 275-92.
35. Bissell, M.J. and W.C. Hines, *Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression.* Nat Med, 2011. 17(3): p. 320-9.

36. Iwanicki, M., et al., *Ovarian Cancer Spheroids Use Myosin-Generated Force to Clear the mesothelium*. *Cancer Discovery*, 2011. 1: p. 144-147.
37. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*, 2009. 139(5): p. 871-90.
38. Grivnenkov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. *Cell*, 2010. 140(6): p. 883-99.
39. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(4): p. 239-52.
40. Dirat, B., et al., *Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion*. *Cancer Res*, 2011. 71(7): p. 2455-65.
41. DeNardo, D.G., et al., *CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages*. *Cancer Cell*, 2009. 16(2): p. 91-102.
42. Gocheva, V., et al., *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion*. *Genes Dev*, 2010. 24(3): p. 241-55.
43. Finak, G., et al., *Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer*. *Nat Med*, 2008. 14(5): p. 518-27.
44. Psaila, B. and D. Lyden, *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(4): p. 285-93.
45. Erler, J.T., et al., *Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche*. *Cancer Cell*, 2009. 15(1): p. 35-44.

46. Zhang, X.H., et al., *Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals*. *Cancer Cell*, 2009. 16(1): p. 67-78.
47. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(8): p. 563-72.
48. Shibue, T. and R.A. Weinberg, *Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(25): p. 10290-5.
49. Kang, S.Y., et al., *Prosaposin inhibits tumor metastasis via paracrine and endocrine stimulation of stromal p53 and Tsp-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(29): p. 12115-20.
50. Mazziari, R., et al., *Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells*. *Cancer Cell*, 2011. 19(4): p. 512-26.
51. Salazar, H., et al., *Microscopic benign and invasive malignant neoplasms and a cancer-prone phenotype in prophylactic oophorectomies*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. 88(24): p. 1810-20.
52. Chene, G., et al., *Ovarian epithelial dysplasia and prophylactic oophorectomy for genetic risk*. *Int J Gynecol Cancer*, 2009. 19(1): p. 65-72.
53. Nakayama, K., et al., *Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms*. *Cancer Biol Ther*, 2006. 5(7): p. 779-85.
54. Freedman, R.S., et al., *Peritoneal inflammation - A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC)*. *J Transl Med*, 2004. 2(1): p. 23.

55. Kenny, H., et al., *The First Line of Intra-abdominal Metastatic Attack: Breaching the Mesothelial Cell Layer*. *Cancer Discovery*, 2011. 1: p. 100-102.
56. Kenny, H.A., et al., *The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin*. *J Clin Invest*, 2008. 118(4): p. 1367-79.
57. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. *J Orthop Res*, 1991. 9(5): p. 641-50.
58. Tavassoli, M. and W.H. Crosby, *Transplantation of marrow to extramedullary sites*. *Science*, 1968. 161(3836): p. 54-6.
59. Friedenstein A., D.U.F., Kulagina N.N., Panasuk A.F., Rudakowa S.F., Luria EA., *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method*. *Exp Hematol*, 1974. 2: p. 83-92.
60. Friedenstein, A., *Osteogenic stem cells in bone marrow*, in *Bone and Mineral Research*, J. Heersche and J. Kanis, Editors. 1990, Elsevier: Amsterdam. p. 243-272.
61. Bernardo, M.E., F. Locatelli, and W.E. Fibbe, *Mesenchymal Stromal Cells*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. 1176(1): p. 101-117.
62. Caplan, A.I., *The mesengenic process*. *Clin Plast Surg*, 1994. 21(3): p. 429-35.
63. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. *Science*, 1997. 276(5309): p. 71-4.
64. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells*. *Science*, 1999. 284(5411): p. 143-147.

65. Caplan, A.I. and S.P. Bruder, *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. Trends Mol Med, 2001. 7(6): p. 259-64.
66. in 't Anker, P.S., et al., *Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential*. Haematologica, 2003. 88(8): p. 845-52.
67. Indrawattana, N., et al., *Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 320(3): p. 914-9.
68. Sekiya, I., D.C. Colter, and D.J. Prockop, *BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 284(2): p. 411-8.
69. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays*. Cell Stem Cell, 2008. 2(4): p. 313-319.
70. Sanchez-Ramos, J., et al., *Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro*. Exp Neurol, 2000. 164(2): p. 247-56.
71. Schwartz, R.E., et al., *Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells*. J Clin Invest, 2002. 109(10): p. 1291-302.
72. Muller-Sieburg, C.E. and E. Deryugina, *The stromal cells' guide to the stem cell universe*. STEM CELLS, 1995. 13(5): p. 477-86.
73. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. 418(6893): p. 41-9.

74. Yoon, Y.S., et al., *Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction.* J Clin Invest, 2005. 115(2): p. 326-38.
75. D'Ippolito, G., et al., *Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential.* J Cell Sci, 2004. 117(Pt 14): p. 2971-81.
76. Kucia, M., et al., *A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow.* Leukemia, 2006. 20(5): p. 857-69.
77. Kogler, G., et al., *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.* J Exp Med, 2004. 200(2): p. 123-35.
78. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation.* Nat Med, 2003. 9(6): p. 685-93.
79. Krosl, J., et al., *In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein.* Nat Med, 2003. 9(11): p. 1428-32.
80. Zhang, C.C., et al., *Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells.* Nat Med, 2006. 12(2): p. 240-5.
81. Willert, K., et al., *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors.* Nature, 2003. 423(6938): p. 448-52.
82. Butler, J.M., et al., *Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells.* Cell stem cell, 2010. 6(3): p. 251-264.

83. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. 118(2): p. 149-61.
84. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. 425(6960): p. 841-6.
85. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. 425(6960): p. 836-41.
86. Kollet, O., et al., *Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells*. Nat Med, 2006. 12(6): p. 657-64.
87. Sacchetti, B., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. Cell, 2007. 131(2): p. 324-36.
88. Luboshits, G., et al., *Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma*. Cancer Res, 1999. 59(18): p. 4681-7.
89. Belperio, J.A., et al., *CXC chemokines in angiogenesis*. J Leukoc Biol, 2000. 68(1): p. 1-8.
90. Vicari, A.P., et al., *Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms*. J Immunol, 2000. 165(4): p. 1992-2000.
91. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. 410(6824): p. 50-6.
92. Mashino, K., et al., *Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma*. Cancer Res, 2002. 62(10): p. 2937-41.

93. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 217-42.
94. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. 357(9255): p. 539-45.
95. Vicari, A.P. and C. Caux, *Chemokines in cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. 13(2): p. 143-54.
96. Ginestier, C., E. Charafe-Jauffret, and D. Birnbaum, *Breast tumor microenvironment: in the eye of the cytokine storm*. Cell Cycle. 10(15): p. 2420-1.
97. Zou, W., et al., *Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells*. Nat Med, 2001. 7(12): p. 1339-46.
98. Scotton, C.J., et al., *Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer*. Cancer Res, 2002. 62(20): p. 5930-8.
99. Kryczek, I., et al., *CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers*. Cancer Res, 2005. 65(2): p. 465-72.
100. Kukreja, P., et al., *Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation*. Cancer Res, 2005. 65(21): p. 9891-8.
101. Peng, S.B., et al., *Akt activation, but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of epitheloid carcinoma cells*. Mol Cancer Res, 2005. 3(4): p. 227-36.

102. Porcile, C., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation*. *Exp Cell Res*, 2005. 308(2): p. 241-53.
103. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. *Cell*, 2005. 121(3): p. 335-48.
104. Obermajer, N., et al., *PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment*. *Cancer Res*, 2011. 71(24): p. 7463-70.
105. Duda, D.G., et al., *CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies?* *Clin Cancer Res*, 2011. 17(8): p. 2074-80.
106. Ginestier, C., et al., *CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts*. *J Clin Invest*. 120(2): p. 485-97.
107. Liu, S., et al., *Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks*. *Cancer Res*. 71(2): p. 614-24.
108. Jeon, E.S., et al., *Cancer-Derived Lysophosphatidic Acid Stimulates Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Myofibroblast-Like Cells*. *STEM CELLS*, 2008. 26(3): p. 789-797.
109. Seo, J.H., et al., *Lysophosphatidic acid induces STAT3 phosphorylation and ovarian cancer cell motility: their inhibition by curcumin*. *Cancer Lett*, 2010. 288(1): p. 50-6.
110. Spaeth, E.L., et al., *Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression*. *PLoS ONE*, 2009. 4(4): p. e4992.

111. Coffelt, S.B., et al., *The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(10): p. 3806-3811.
112. Karnoub, A.E., et al., *Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis*. Nature, 2007. 449(7162): p. 557-563.
113. McLean, K., et al., *Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. 121(8): p. 3206-3219.
114. Charles, K.A., et al., *The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans*. The Journal of Clinical Investigation, 2009. 119(10): p. 3011-3023.
115. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(7): p. 3983-8.
116. Boiko, A.D., et al., *Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271*. Nature, 2010. 466(7302): p. 133-7.
117. Dalerba, P., et al., *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(24): p. 10158-63.
118. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. 65(23): p. 10946-51.
119. Dalerba, P., R.W. Cho, and M.F. Clarke, *Cancer stem cells: models and concepts*. Annu Rev Med, 2007. 58: p. 267-84.

120. Clarke, M.F., et al., *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. Cancer Res, 2006. 66(19): p. 9339-44.
121. Bapat, S.A., et al., *Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer*. Cancer Res, 2005. 65(8): p. 3025-9.
122. Zhang, S., et al., *Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors*. Cancer Res, 2008. 68(11): p. 4311-20.
123. Kusumbe, A.P. and S.A. Bapat, *Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy*. Cancer Res, 2009. 69(24): p. 9245-53.
124. Silva, I.A., et al., *Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival*. Cancer Res, 2011. 71(11): p. 3991-4001.
125. Kryczek, I., et al., *Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells*. Int J Cancer, 2012. 130(1): p. 29-39.
126. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. 406(6797): p. 747-752.
127. Rebbeck, T.R., et al., *Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. N Engl J Med, 2002. 346(21): p. 1616-22.
128. Spentzos, D., et al., *Gene Expression Signature With Independent Prognostic Significance in Epithelial Ovarian Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2004. 22(23): p. 4700-4710.

129. Hartmann, L.C., et al., *Gene Expression Profiles Predict Early Relapse in Ovarian Cancer after Platinum-Paclitaxel Chemotherapy*. *Clinical Cancer Research*, 2005. 11(6): p. 2149-2155.
130. Crijns, A.P., et al., *A biological question and a balanced (orthogonal) design: the ingredients to efficiently analyze two-color microarrays with Confirmatory Factor Analysis*. *BMC Genomics*, 2006. 7: p. 232.
131. Helleman, J., et al., *Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer*. *Int J Cancer*, 2006. 118(8): p. 1963-71.
132. Dressman, H.K., et al., *An integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer*. *J Clin Oncol*, 2007. 25(5): p. 517-25.
133. Bell, D., A. Berchuck, and M. Birrer, *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. *Nature*, 2011. 474(7353): p. 609-15.
134. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell population*. *Science*, 1976. 194: p. 791-798.
135. Crespi, B. and K. Summers, *Evolutionary biology of cancer*. *Trends in Ecology & Evolution*, 2005. 20(10): p. 545-552.
136. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization*. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(4): p. 274-284.
137. Kerbel, R.S.W., C. ; Korc Zack B. ; Lagarde, A. ; Breitman, M.L., *Clonal dominance of primary tumours by metastatic cells : genetic analysis and biological implications*. *Cancer Surv.*, 1988. 7(4): p. 597-629.
138. Bernards, R. and R.A. Weinberg, *Metastasis genes: A progression puzzle*. *Nature*, 2002. 418(6900): p. 823-823.

139. Pignata, S., et al., *Chemotherapy in epithelial ovarian cancer*. Cancer Letters, 2011. 303(2): p. 73-83.
140. Audeh, M.W., et al., *Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial*. Lancet. 376(9737): p. 245-51.
141. Pfisterer, J. and J.A. Ledermann, *Management of Platinum-Sensitive Recurrent Ovarian Cancer*. Seminars in Oncology, 2006. 33(Supplement 6): p. 12-16.
142. Rosenberg, B., L. Van Camp, and T. Krigas, *Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode*. Nature, 1965. 205(4972): p. 698-699.
143. Jamieson, E.R. and S.J. Lippard, *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin,àíDNA Adducts*. Chemical Reviews, 1999. 99(9): p. 2467-2498.
144. Dabholkar, M., et al., *Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy*. The Journal of Clinical Investigation, 1994. 94(2): p. 703-708.
145. Dabholkar, M., et al., *ERCC1 and ERCC2 Expression in Malignant Tissues From Ovarian Cancer Patients*. Journal of the National Cancer Institute, 1992. 84(19): p. 1512-1517.
146. Cejka, P., et al., *Methylation-induced G2/M arrest requires a full complement of the mismatch repair protein hMLH1*. EMBO J, 2003. 22(9): p. 2245-2254.
147. Bellon SF., C.J., Lippard SJ., *DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II)*. Biochemistry, 1991. 13(30): p. 8026-35.

148. Knipp, M., *Metallothioneins and Platinum(II) Anti-Tumor Compounds*. Current Medicinal Chemistry, 2009. 16(5).
149. Hagrman, D., et al., *Kinetic study on the reaction of cisplatin with metallothionein*. Drug Metabolism and Disposition, 2003. 31(7): p. 916-923.
150. Kaina, B., et al., *Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agents*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. 87(7): p. 2710-2714.
151. Surowiak, P., et al., *Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome*. Virchows Archiv, 2007. 450(3): p. 279-285.
152. Wilce, M.C.J. and M.W. Parker, *Structure and function of glutathione S-transferases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1994. 1205(1): p. 1-18.
153. Ikeda K, S.K., Yamamoto R., Hareyama H., Tsumura N., Watari H., Shimizu M., Minakami H., Sakuragi N., *Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1, and p53 in stages II-IV ovarian cancer*. . International Journal of Gynecological Cancer, 2003. 13: p. 776-784.
154. Satoh, T., et al., *Expression of glutathione S-transferase pi (GST-pi) in human malignant ovarian tumors*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001. 96(2): p. 202-208.
155. Mayr D., P.U., Baretin GB., Gropp M., Meier W., Flens MJ., Sceper R., Diebold J., *Immunohistochemical analysis of drug resistance-associated proteins in ovarian carcinomas*. Pathol Res Pract, 2000. 196: p. 469-475.

156. Siu, L.L., et al., *The prognostic role of p53, metallothionein, P-glycoprotein, and MIB-1 in muscle-invasive urothelial transitional cell carcinoma*. *Clinical Cancer Research*, 1998. 4(3): p. 559-565.
157. Arts, H.J.G., et al., *Drug Resistance-associated Markers P-Glycoprotein, Multidrug Resistance-associated Protein 1, Multidrug Resistance-associated Protein 2, and Lung Resistance Protein as Prognostic Factors in Ovarian Carcinoma*. *Clinical Cancer Research*, 1999. 5(10): p. 2798-2805.
158. Komatsu, M., et al., *Copper-transporting P-Type Adenosine Triphosphatase (ATP7B) Is Associated with Cisplatin Resistance*. *Cancer Research*, 2000. 60(5): p. 1312-1316.
159. Katano, K., et al., *The Copper Export Pump ATP7B Modulates the Cellular Pharmacology of Carboplatin in Ovarian Carcinoma Cells*. *Molecular Pharmacology*, 2003. 64(2): p. 466-473.
160. Nakayama, K., et al., *Prognostic Value of the Cu-Transporting ATPase in Ovarian Carcinoma Patients Receiving Cisplatin-Based Chemotherapy*. *Clinical Cancer Research*, 2004. 10(8): p. 2804-2811.
161. Ohbu, M., et al., *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human gastric carcinoma*. *Cancer letters*, 2003. 189(1): p. 33-38.
162. Kanzaki A, T.M., Neamati N, Miyashita H, Oubu M, Nakayama K, Bando H, Ogawa K, Mutoh M, Mori S, Terada K, Sugiyama T, Fukumoto M, Takebayashi Y., *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human breast carcinoma*. *Jpn J Cancer Res*, 2002. 93(1): p. 70-7.

163. Giaccia, A.J. and M.B. Kastan, *The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals*. Genes & Development, 1998. 12(19): p. 2973-2983.
164. Haupt, S., et al., *Apoptosis - the p53 network*. Journal of Cell Science, 2003. 116(20): p. 4077-4085.
165. Zamzami, N. and G. Kroemer, *p53 in apoptosis control: An introduction*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. 331(3): p. 685-687.
166. Schuijjer, M. and E.M.J.J. Berns, *TP53 and ovarian cancer*. Human Mutation, 2003. 21(3): p. 285-291.
167. Fraser, M., et al., *Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2003. 1(1): p. 66.
168. Mabuchi, S., et al., *Inhibition of Inhibitor of Nuclear Factor- κ B Phosphorylation Increases the Efficacy of Paclitaxel in in Vitro and in Vivo Ovarian Cancer Models*. Clinical Cancer Research, 2004. 10(22): p. 7645-7654.
169. Mansouri, A., et al., *Sustained Activation of JNK/p38 MAPK Pathways in Response to Cisplatin Leads to Fas Ligand Induction and Cell Death in Ovarian Carcinoma Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(21): p. 19245-19256.
170. Niedner, H., et al., *Identification of Genes That Mediate Sensitivity to Cisplatin*. Molecular Pharmacology, 2001. 60(6): p. 1153-1160.

171. Jordan, M.A., et al., *Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit and Apoptotic Cell Death*. *Cancer Research*, 1996. 56(4): p. 816-825.
172. Schiff, P.B.e.a., *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 77(3): p. 1561-1565.
173. Rowinsky, E.K. and R.C. Donehower, *Paclitaxel (Taxol)*. *New England Journal of Medicine*, 1995. 332(15): p. 1004-1014.
174. Snyder, J.P., et al., *The binding conformation of Taxol in α -tubulin: A model based on electron crystallographic density*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. 98(9): p. 5312-5316.
175. Carolan, B.J., et al., *Decreased expression of intelectin 1 in the human airway epithelium of smokers compared to nonsmokers*. *J Immunol*, 2008. 181(8): p. 5760-7.
176. Lecureur, V., et al., *Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein*. *Mol Pharmacol*, 2000. 57(1): p. 24-35.
177. Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters*. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(1): p. 48-58.
178. Hopper-Borge, E., et al., *Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel*. *Cancer Res*, 2004. 64(14): p. 4927-30.
179. Le, L.H., et al., *Phase I study of the multidrug resistance inhibitor zosuquidar administered in combination with vinorelbine in patients with advanced solid tumours*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005. 56(2): p. 154-60.

180. Hill, B.T., et al., *Differential cytotoxic effects of docetaxel in a range of mammalian tumor cell lines and certain drug resistant sublines in vitro*. Invest New Drugs, 1994. 12(3): p. 169-82.
181. Kemper, E.M., et al., *Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein*. Eur J Cancer, 2004. 40(8): p. 1269-74.
182. Gokmen-Polar, Y., et al., *beta-Tubulin mutations are associated with resistance to 2-methoxyestradiol in MDA-MB-435 cancer cells*. Cancer Res, 2005. 65(20): p. 9406-14.
183. Hari, M., et al., *Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules*. Mol Cancer Ther, 2006. 5(2): p. 270-8.
184. Shalli, K., et al., *Alterations of beta-tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel*. FASEB J, 2005. 19(10): p. 1299-301.
185. Diaz, J.F., et al., *Changes in microtubule protofilament number induced by Taxol binding to an easily accessible site. Internal microtubule dynamics*. J Biol Chem, 1998. 273(50): p. 33803-10.
186. Sale, S., et al., *Conservation of the class I beta-tubulin gene in human populations and lack of mutations in lung cancers and paclitaxel-resistant ovarian cancers*. Mol Cancer Ther, 2002. 1(3): p. 215-25.
187. Shionoya, M., et al., *DJ-927, a novel oral taxane, overcomes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro and in vivo*. Cancer Sci, 2003. 94(5): p. 459-66.

188. Roche, M., H. Kyriakou, and M. Seiden, *Drug evaluation: tesetaxel--an oral semisynthetic taxane derivative*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006. 7(12): p. 1092-9.
189. Meads, M.B., R.A. Gatenby, and W.S. Dalton, *Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease*. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(9): p. 665-74.
190. Teicher, B.A., et al., *Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo*. *Science*, 1990. 247(4949 Pt 1): p. 1457-61.
191. Yamada, K.M. and E. Cukierman, *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*. *Cell*, 2007. 130(4): p. 601-10.
192. Birgersdotter, A., R. Sandberg, and I. Ernberg, *Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems*. *Semin Cancer Biol*, 2005. 15(5): p. 405-12.
193. Cukierman, E., R. Pankov, and K.M. Yamada, *Cell interactions with three-dimensional matrices*. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. 14(5): p. 633-9.
194. Cukierman, E., et al., *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. *Science*, 2001. 294(5547): p. 1708-12.
195. Griffith, L.G. and M.A. Swartz, *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(3): p. 211-24.
196. Nelson, C.M. and M.J. Bissell, *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006. 22: p. 287-309.
197. Grinnell, F., *Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices*. *Trends Cell Biol*, 2003. 13(5): p. 264-9.

198. Amatangelo, M.D., et al., *Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts*. Am J Pathol, 2005. 167(2): p. 475-88.
199. Pankov, R., et al., *A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration*. J Cell Biol, 2005. 170(5): p. 793-802.
200. Zaman, M.H., et al., *Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(29): p. 10889-94.
201. Knight, Z.A. and K.M. Shokat, *Chemical genetics: where genetics and pharmacology meet*. Cell, 2007. 128(3): p. 425-30.
202. Gahwiler, B.H., et al., *Organotypic slice cultures: a technique has come of age*. Trends Neurosci, 1997. 20(10): p. 471-7.
203. Sakai, T., M. Larsen, and K.M. Yamada, *Fibronectin requirement in branching morphogenesis*. Nature, 2003. 423(6942): p. 876-81.
204. Hicks, K.O., et al., *Use of three-dimensional tissue cultures to model extravascular transport and predict in vivo activity of hypoxia-targeted anticancer drugs*. J Natl Cancer Inst, 2006. 98(16): p. 1118-28.
205. Smalley, K.S., M. Lioni, and M. Herlyn, *Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2006. 42(8-9): p. 242-7.
206. Kunz-Schughart, L.A., et al., *The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model*. J Biomol Screen, 2004. 9(4): p. 273-85.
207. Wartenberg, M., et al., *Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid*

- bodies grown from pluripotent embryonic stem cells.* FASEB J, 2001. 15(6): p. 995-1005.
208. Frieboes, H.B., et al., *An integrated computational/experimental model of tumor invasion.* Cancer Res, 2006. 66(3): p. 1597-604.
209. Winters, B.S., S.R. Shepard, and R.A. Foty, *Biophysical measurement of brain tumor cohesion.* Int J Cancer, 2005. 114(3): p. 371-9.
210. Bissell, M.J. and M.A. Labarge, *Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment?* Cancer Cell, 2005. 7(1): p. 17-23.
211. Kaplan, R.N., et al., *VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche.* Nature, 2005. 438(7069): p. 820-827.
212. Ilancheran, S., Y. Moodley, and U. Manuelpillai, *Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?* Placenta, 2009. 30(1): p. 2-10.
213. Sakuragawa, N., et al., *Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells.* J Neurosci Res, 2004. 78(2): p. 208-14.
214. In 't Anker, P.S., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta.* STEM CELLS, 2004. 22(7): p. 1338-45.
215. Portmann-Lanz, C.B., et al., *Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration.* Am J Obstet Gynecol, 2006. 194(3): p. 664-73.

216. Soncini, M., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. 1(4): p. 296-305.
217. Parolini, O., et al., *Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells*. STEM CELLS, 2008. 26(2): p. 300-11.
218. Kim, J., et al., *Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells*. Cloning Stem Cells, 2007. 9(4): p. 581-94.
219. Alviano, F., et al., *Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro*. BMC Dev Biol, 2007. 7: p. 11.
220. Tamagawa, T., et al., *Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro*. Hum Cell, 2007. 20(3): p. 77-84.
221. Zhao, P., et al., *Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes*. Transplantation, 2005. 79(5): p. 528-35.
222. Meller, D., et al., *Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns*. Ophthalmology, 2000. 107(5): p. 980-9; discussion 990.
223. Tseng, S.C., et al., *Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency*. Arch Ophthalmol, 1998. 116(4): p. 431-41.
224. Hackett, N.R., et al., *Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. 29(3 Pt 1): p. 331-43.

225. Harvey, B.G., et al., *Modification of gene expression of the small airway epithelium in response to cigarette smoking*. J Mol Med (Berl), 2007. 85(1): p. 39-53.
226. Lis, R., et al., *Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells triggers pro-metastatic properties*. PLoS One, 2012. 7(5): p. e38340.
227. Ceelen, W.P. and M.E. Bracke, *Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment*. The Lancet Oncology, 2009. 10(1): p. 72-79.
228. Hiratsuka, S., et al., *Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis*. Nat Cell Biol, 2006. 8(12): p. 1369-1375.
229. Kaplan, R.N., S. Rafii, and D. Lyden, *Preparing the 'Soil': The Premetastatic Niche*. Cancer Research, 2006. 66(23): p. 11089-11093.
230. Martinet, L., et al., *Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses*. International Journal of Cancer, 2010. 126(9): p. 2143-2152.
231. Pasquet, M., et al., *Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis*. International Journal of Cancer, 2010. 126(9): p. 2090-2101.
232. Zhang, S., et al., *Modulation of prostate cancer cell gene expression by cell-to-cell contact with bone marrow stromal cells or osteoblasts*. Clinical and Experimental Metastasis, 2009. 26(8): p. 993-1004.
233. Bourguignon, L.Y., E. Gilad, and K. Peyrollier, *Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent*

- ovarian tumor cell growth and migration*. J Biol Chem, 2007. 282(27): p. 19426-41.
234. Lis, R., et al., *Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12*. International Journal of Cancer, 2011. 128(3): p. 715-725.
235. van der Linden, P.J., et al., *Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes*. Fertil Steril, 1996. 65(1): p. 76-80.
236. Groothuis, P.G., et al., *Adhesion of human endometrium to the epithelial lining and extracellular matrix of amnion in vitro: an electron microscopic study*. Hum Reprod, 1998. 13(8): p. 2275-81.
237. Raynaud, C.M., et al., *Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation*. Stem Cells Int, 2012. 2012: p. 658356.
238. Kidd, S., et al., *Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma*. PLoS One, 2012. 7(2): p. e30563.
239. Chen, J., et al., *CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3*. Cancer Cell. 19(4): p. 541-55.
240. Rath, K.S., et al., *Expression of soluble interleukin-6 receptor in malignant ovarian tissue*. Am J Obstet Gynecol, 2010. 203(3): p. 230 e1-8.
241. Giridhar, P.V., et al., *Interleukin-6 receptor enhances early colonization of the murine omentum by upregulation of a mannose family receptor, LY75, in ovarian tumor cells*. Clin Exp Metastasis, 2011. 28(8): p. 887-97.

242. Kidd, S., et al., *Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging*. STEM CELLS, 2009. 27(10): p. 2614-2623.
243. Colomiere, M., et al., *Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinomas*. Br J Cancer, 2009. 100(1): p. 134-44.
244. Scheel, C., et al., *Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast*. Cell, 2011. 145(6): p. 926-40.
245. Fujimoto, S., et al., *Improved mortality rate of gastric carcinoma patients with peritoneal carcinomatosis treated with intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion combined with surgery*. Cancer, 1997. 79(5): p. 884-891.
246. Helm, C.W., et al., *Cytoreduction and intraperitoneal heated chemotherapy for the treatment of endometrial carcinoma recurrent within the peritoneal cavity*. International Journal of Gynecological Cancer, 2007. 17(1): p. 204-209.
247. Chua, T., et al., *Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery in ovarian cancer peritoneal carcinomatosis: systematic review of current results*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2009. 135(12): p. 1637-1645.
248. Katz, E., K. Skorecki, and M. Tzukerman, *Niche-Dependent Tumorigenic Capacity of Malignant Ovarian Ascites-Derived Cancer Cell Subpopulations*. Clinical Cancer Research, 2009. 15(1): p. 70-80.
249. Tsiatas, M.L.M.D.P., et al., *Study of T Lymphocytes Infiltrating Peritoneal Metastases in Advanced Ovarian Cancer: Associations With Vascular*

- Endothelial Growth Factor Levels and Prognosis in Patients Receiving Platinum-Based Chemotherapy.* Int J Gynecol Cancer, 2009(1048-891X).
250. Cho, J.A., et al., *Hyperthermia-treated mesenchymal stem cells exert antitumor effects on human carcinoma cell line.* Cancer, 2009. 115(2): p. 311-323.
251. Choi, J.-H., et al., *Jagged-1 and Notch3 Juxtacrine Loop Regulates Ovarian Tumor Growth and Adhesion.* Cancer Research, 2008. 68(14): p. 5716-5723.
252. Roodhart, J.M.L., et al., *Mesenchymal Stem Cells Induce Resistance to Chemotherapy through the Release of Platinum-Induced Fatty Acids.* Cancer Cell, 2011. 20(3): p. 370-383.
253. Nieman, K.M., et al., *Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth.* Nat Med, 2011. 17(11): p. 1498-503.
254. Dijkgraaf, E.M., et al., *Interleukin-6/interleukin-6 Receptor Pathway as a New Therapy Target in Epithelial Ovarian Cancer.* Curr Pharm Des, 2012. 18(25): p. 3816-27.
255. Ahmed, N., et al., *Cancerous ovarian stem cells: Obscure targets for therapy but relevant to chemoresistance.* J Cell Biochem, 2012.

Annexes

Research

Open Access

Identification of glucocorticoid-induced leucine zipper as a key regulator of tumor cell proliferation in epithelial ovarian cancer

Nassima Redjimi¹, Françoise Gaudin¹, Cyril Touboul¹, Dominique Emilie^{1,2}, Marc Pallardy⁵, Armelle Biola-Vidamment⁵, Hervé Fernandez⁴, Sophie Prévot³, Karl Balabanian¹ and Véronique Machelon*¹

Address: ¹UMR-S 764, INSERM/Université Paris-Sud, Clamart, France, ²Service de Microbiologie - Immunologie Biologique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris-Hôpital Antoine Béchère, Clamart, France, ³Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris/Hôpital Antoine Béchère, Clamart, France, ⁴Service de Gynécologie-Obstétrique et de Médecine de la Reproduction, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris/Hôpital Antoine Béchère, Clamart, France and ⁵UMR-S 749, INSERM/Université Paris-Sud, Chatenay-Malabry, France

Email: Nassima Redjimi - nessedjimi@yahoo.fr; Françoise Gaudin - france.gaudin@laposte.net; Cyril Touboul - cyril.touboul@gmail.com; Dominique Emilie - dominique.emilie@u-psud.fr; Marc Pallardy - marc.pallardy@u-psud.fr; Armelle Biola-Vidamment - armelle.biola-vidamment@u-psud.fr; Hervé Fernandez - herve.fernandez@abc.aphp.fr; Sophie Prévot - sophie.prevot@abc.aphp.fr; Karl Balabanian - karl.balabanian@u-psud.fr; Véronique Machelon* - veronique.machelon@u-psud.fr

* Corresponding author

Published: 8 October 2009

Received: 21 July 2009

Molecular Cancer 2009, **8**:83 doi:10.1186/1476-4598-8-83

Accepted: 8 October 2009

This article is available from: <http://www.molecular-cancer.com/content/8/1/83>

© 2009 Redjimi et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Little is known about the molecules that contribute to tumor progression of epithelial ovarian cancer (EOC), currently a leading cause of mortality from gynecological malignancies. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ), an intracellular protein widely expressed in immune tissues, has been reported in epithelial tissues and controls some of key signaling pathways involved in tumorigenesis. However, there has been no report on GILZ in EOC up to now. The objectives of the current study were to examine the expression of GILZ in EOC and its effect on tumor cell proliferation.

Results: GILZ expression was measured by immunohistochemical staining in tissue sections from 3 normal ovaries, 7 benign EOC and 50 invasive EOC. GILZ was not detected on the surface epithelium of normal ovaries and benign tumors. In contrast, it was expressed in the cytoplasm of tumor cells in 80% EOC specimens. GILZ immunostaining scores correlated positively to the proliferation marker Ki-67 (Spearman test in univariate analysis, $P < 0.00001$, $r = 0.56$). They were also higher in tumor cells containing large amounts of phosphorylated protein kinase B (p-AKT) (unpaired t test, $P < 0.0001$). To assess the effect of GILZ on proliferation and AKT activation, we used the BG-1 cell line derived from ovarian tumor cells as a cellular model. GILZ expression was either enhanced by stable transfection or decreased by the use of small interfering (si) RNA targeting GILZ. We found that GILZ increased cell proliferation, phospho-AKT cellular content and AKT kinase activity. Further, GILZ upregulated cyclin D1 and phosphorylated retinoblastoma (p-Rb), downregulated cyclin-dependent kinase inhibitor p21, and promoted the entry into S phase of cell cycle.

Conclusion: The present study is the first to identify GILZ as a molecule produced by ovarian cancer cells that promotes cell cycle progression and proliferation. Our findings clearly indicate that GILZ activates AKT, a crucial signaling molecule in tumorigenesis. GILZ thus appears as a potential key molecule in EOC.

Background

Epithelial ovarian cancer (EOC) accounts for nearly 90% of ovarian malignant tumors [1,2]. Early stage ovarian carcinoma is silent in nature and therefore these carcinoma often expand into the peritoneal cavity and metastasize to the omentum before diagnosis. Consequently, treatment is particularly challenging and this malignancy is a leading cause of death among gynecological malignancies in developed countries [3]. The prognosis for patients with ovarian carcinoma is determined by conventional criteria, including tumor stage, histological type, and grade. Indeed, there is also a need to identify molecular markers that drive ovarian tumor progression, one of the least determined process in cancer research, to offer novel, targeted, biological therapy [4].

Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ) is a small leucine zipper protein of 17 kDa and a member of the TSC22D (Transforming Growth Factor1 Stimulated Clone 22 Domain) family of proteins also known as TSC22D3. GILZ was discovered as a dexamethasone-induced transcript in murine thymocytes [5]. It is widely expressed in immune tissues and has also been reported in epithelial tissues often associated to a hormonal background. It is rapidly induced by glucocorticoids in T lymphocytes [6-8], macrophages, dendritic cells and mast cells [9-11]. GILZ expression in the anterior pituitary during embryonic development in the chick is consistent with regulation by corticosteroids [12]; in the kidney cortical collecting duct, GILZ is induced by aldosterone [13]; and in human cervical adenocarcinoma HeLa cells, GILZ expression is controlled by estradiol [14].

GILZ interferes with Raf-1, nuclear factor- κ B (NF- κ B), AP-1 and FoxO forkhead transcription factor FoxO3 [15,8,16,17], all are key signaling molecules important for tumorigenesis [18]. There have, however, been few studies of GILZ in cancer. GILZ has been reported in multiple myeloma, in lymphoblastic leukemia and in human osteosarcoma cells [19-22]. Most relevant work has been in cell lines and very few data from human tumor specimens are available. To our knowledge, there is no report on GILZ in EOC. We therefore investigated GILZ expression and function in these malignant tumors. Our findings are supported by parallel and complementary data accumulated in tumor specimens and in the BG-1 cellular model. We report evidence that GILZ, an intracellular factor not previously described in EOC, plays a pivotal role in tumor cell proliferation.

results

GILZ detection in human ovarian tumor samples

GILZ expression was assessed by immunohistochemical staining of sections isolated from three normal ovaries, seven benign EOC and 50 invasive EOC. GILZ was not

detected on the surface epithelium of normal ovaries and in benign tumors. In contrast, among the invasive ovarian cancers, 40 (80%) expressed GILZ. GILZ immunoreactivity was detected in the four main histological subtypes, serous, clear cell, endometrioid and mucinous tumors. It was clearly confined to the cytoplasm of tumor cells and was weak in, or absent from the tumor stroma (Figure 1A and 1B). Using the same antibody, we detected GILZ protein by western blot. GILZ was revealed at 17 kDa, which is the size of the protein described by Ricardi and co-workers in 1997 [5], in BG-1 cells transfected with the GILZ-encoding vector pcDNA3-GILZ (pGILZ BG-1 cells used as positive control), in epithelial cells from malignant ascites and in ovarian tumor samples for which frozen tissues were available, confirming the staining data (Figure 1C). Interestingly, the non-epithelial cells from malignant ascites do not express GILZ. GILZ 17 kDa protein was also detected in ovarian cancer cell lines SKOV-3, OVCAR-3 and BG-1; it was less abundant in BG-1 cell line than in SKOV-3 and OVCAR-3 (Figure 1C). BG-1 thus appeared as the best-fitted cellular model for processing up and down regulation of GILZ.

GILZ expression correlates with tumor cell proliferation and with the expression levels of phospho-AKT in EOC

GILZ immunostaining was unevenly distributed in tumor cells, from no detectable staining to strong immunoreactivity. We asked if differences in GILZ expression levels are related to the expression of two markers, the proliferation marker Ki-67 used in routine diagnostics [23] and p-AKT used to characterize malignant ovarian tumors [24]. Hyperactivation of AKT is frequently observed in ovarian neoplasms and is related to the control of cell proliferation in EOC [25,26]. Immunoreactivity of GILZ, Ki-67 and p-AKT was measured on serial sections of EOC (Figure 2A). GILZ and Ki-67 immunostainings were scored on a seven-point scale based on the staining intensity and the extent of staining. GILZ and Ki-67 expression scores were significantly correlated in the entire cohort (Spearman test in univariate analysis, $P < 0.00001$, $r = 0.56$) (Figure 2B). They were still correlated in serous carcinoma and non serous carcinoma as well (Spearman test in univariate analysis, $P < 0.001$, $r = 0.61$, $n = 26$ serous carcinoma, $P < 0.02$, $r = 0.49$, $n = 24$ non serous carcinoma). The expression of p-AKT in tumor cells was mostly cytoplasmic, although some nuclear staining was also detected (Figure 2A). Both nuclear and cytoplasmic staining patterns were considered to assess p-AKT immunoreactivity, scored as high or low. GILZ expression scores were significantly higher in p-AKT^{high} specimens (mean \pm SE = 5.2 ± 0.2 , $n = 25$) than in p-AKT^{low} specimens (mean \pm SE = 2.6 ± 0.4 , $n = 25$), (unpaired t test, $P < 0.0001$) (Figure 2C).

After applying a single cut-off on the entire cohort for identification of GILZ^{high} (scores 5-7, $n = 24$) and GILZ^{low}

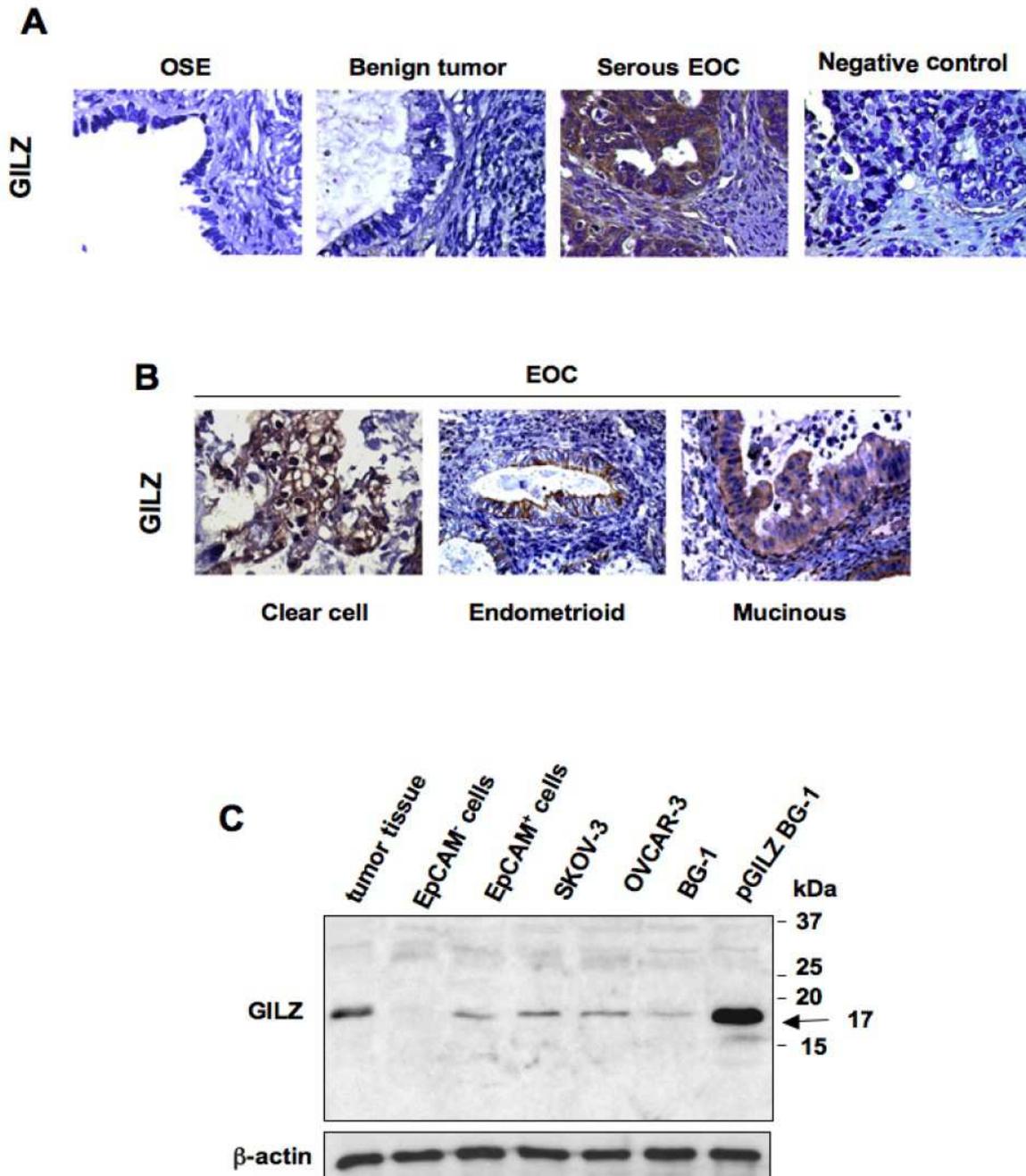


Figure 1
GILZ detection in epithelial ovarian cancer (EOC). (A) GILZ immunostaining in ovarian surface epithelium of normal ovaries (OSE), benign tumors, invasive serous ovarian carcinoma. Negative control was done without primary Ab. Original magnification, $\times 63$. (B) Cytoplasmic GILZ immunostaining in clear cell, endometrioid and mucinous EOC. Original magnification, $\times 40$. (C) GILZ immunoblots of total protein lysates from ovarian cancer tissue (representative data from several frozen tumor specimens), malignant ascites processed by the autoMacs procedure to separate EpCAM⁺ cells identified as epithelial cells from EpCAM⁻ cells, from ovarian cancer cell lines SKOV-3, OVCAR-3 and BG-1. BG-1 cells stably transfected with GILZ-encoding vector pcDNA3-GILZ (pGILZ) was used as positive control (17 kDa). Actin levels are shown for normalization. Data are representative of three different experiments.

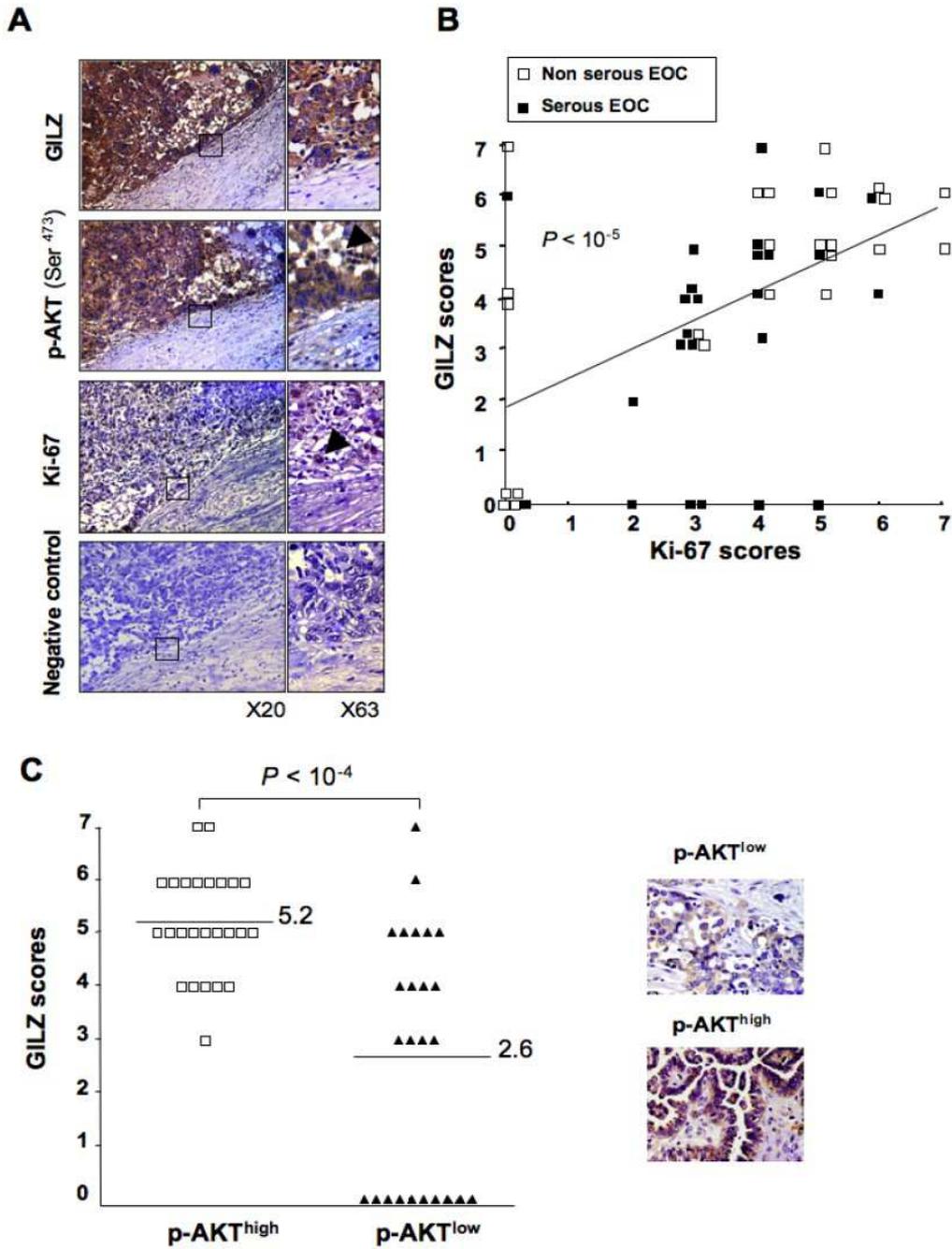


Figure 2
GILZ expression correlates with p-AKT levels and with cell proliferation in epithelial ovarian cancer (EOC). (A) Serial sections of tumors with staining for p-AKT, GILZ and Ki-67. Negative control was done without primary Ab. Original magnifications, ×20 and ×63. Pictures show cytoplasmic staining for GILZ and nuclear staining for Ki-67; p-AKT staining is mostly in the cytoplasm with some additional nuclear staining (arrow). (B) GILZ and Ki-67 final scores were positively correlated (Spearman test in univariate analysis, $P < 0.00001$, $r = 0.56$). (C) GILZ scores for p-AKT^{high} and p-AKT^{low} groups (the difference was significant at $P < 0.05$, Student's t test). Insets: high and low p-AKT immunoreactivity is shown on representative micrographs.

(scores 0-4, n = 26) cases, we found that high GILZ scores are associated with higher p-AKT staining and Ki-67 indexes (Fisher test, $P < 0.0002$ and $P < 0.0008$), (Table 1). In contrast, age at diagnosis and distribution of histological subtypes did not differ between the two groups (Table 1).

All these observations suggest that GILZ expression may regulate cell proliferation and AKT phosphorylation in EOC. To assess this hypothesis and to provide further biological evidence to support immunohistochemical data, we performed in vitro experiments using the BG-1 cell line as a cellular model.

Overexpression of GILZ increases proliferation and AKT phosphorylation in BG-1 cells

To study the effect of GILZ on cell proliferation in epithelial ovarian cancer, we generated BG-1 clones that stably and strongly express GILZ (pGILZ). As a control BG-1 cells were stably transfected with an empty vector (CTRL). pGILZ and CTRL clones were randomly selected for further experiments. The GILZ protein content was significantly higher in pGILZ clones than CTRL clones (Figure 3A). We then compared their spontaneous cell proliferation: it was significantly higher in pGILZ clones ($P < 0.01$) (Figure 3B). To confirm that GILZ overexpression

increased the proliferation rate, CTRL and pGILZ clones were seeded at equal densities, and viable cells were counted over a 4-day period. Cells overexpressing GILZ grew faster than CTRL cells (Figure 3C). There was no difference in spontaneous apoptosis between pGILZ and CTRL clones [see Additional file 1].

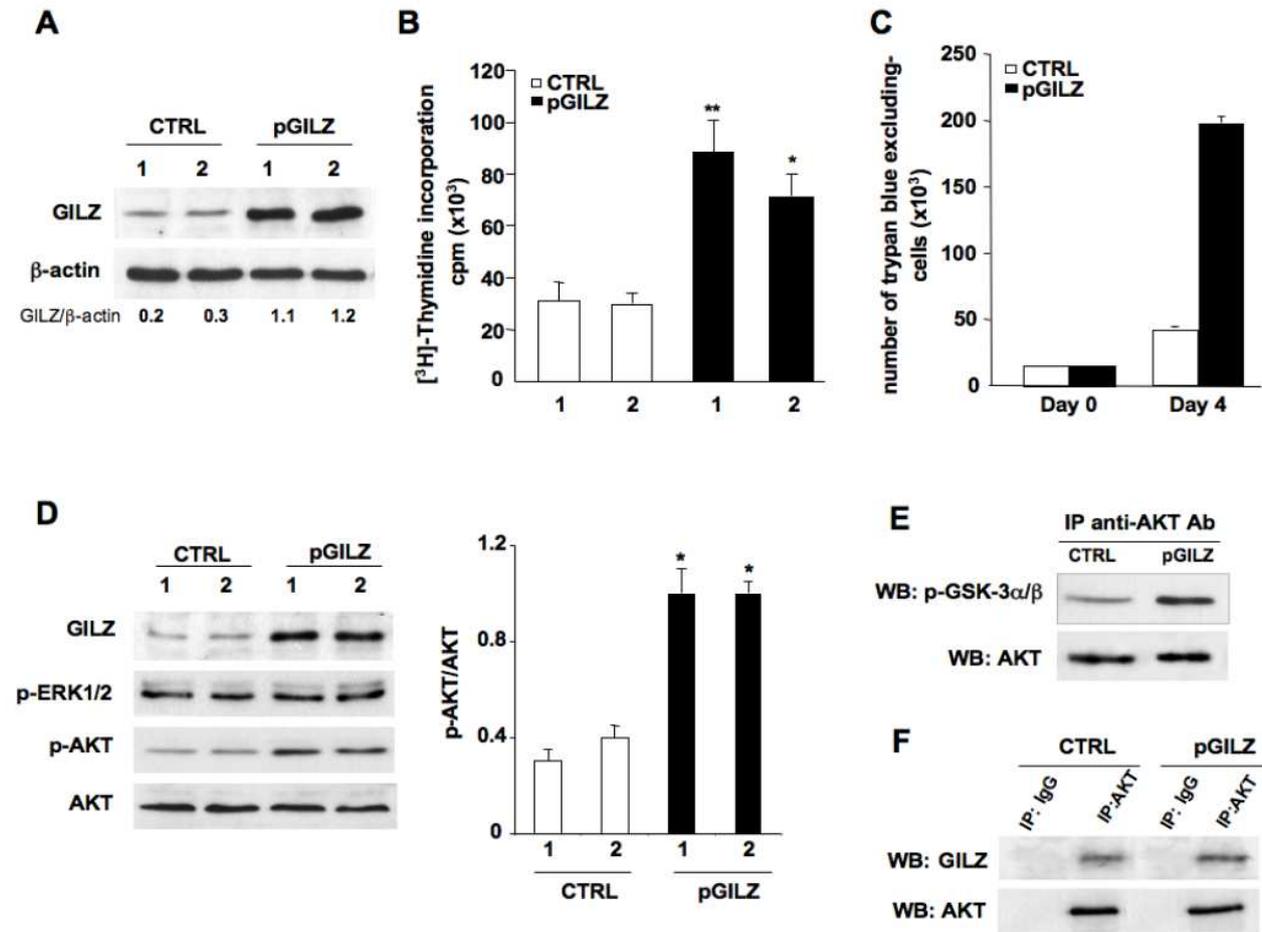
We next investigated whether over-expression of GILZ affected AKT activation. p-AKT, currently the active form of AKT, was more abundant in pGILZ clones than in CTRL clones, whereas the status of phospho-ERK 1/2 remained unchanged (Figure 3D). In parallel, AKT activity was higher in pGILZ clones than in CTRL clones as assessed by testing for phosphorylation of glycogen synthase kinase (GSK-3 α/β), a downstream target of AKT (Figure 3E). Thus GILZ overexpression induced an increase in p-AKT and an enhancement of AKT activity. AKT-binding proteins may cause structural changes and phosphorylations that activate AKT [27,28]. We also revealed the presence of GILZ-AKT complexes in BG-1 cells using immunoprecipitation experiments (Figure 3F).

GILZ silencing reduces cell proliferation and AKT phosphorylation in BG-1 cells

We studied the effects of knocking down GILZ mRNAs in BG-1 cells on cell proliferation and AKT activation. Real-

Table 1: GILZ immunostaining scores versus Ki-67 proliferation index and p-AKT immunostaining in ovarian carcinoma tissues (n = 50)

	Patient number		Fisher test Statistical significance ^a
	GILZ ^{low} scores (0-4)	GILZ ^{high} scores (5-7)	
All carcinomas	26	24	
Age at diagnosis			
< 60 years	13	13	ns
> 60 years	13	11	
Histological types			
Serous	13	13	ns
Non serous	13	11	
Clear cells	3	2	ns
Mucinous	5	4	
Endometrioid	4	4	
Undifferentiated	1	1	
Ki-67 Immuno-staining			
low scores (0-4)	23 (88%)	10 (42%)	$P < 0.0008$
high scores (5-7)	3 (12%)	14 (58%)	
Phospho-AKT immuno-staining			
low	20 (77%)	5 (21%)	$P < 0.0002$
high	6 (23%)	19 (79%)	

**Figure 3**

Up regulation of GILZ increases cell proliferation and AKT activation. (A) Total protein lysates analyzed by western blotting with anti-GILZ Ab in two CTRL and pGILZ clones. (B) Cell proliferation measured by [3 H]-thymidine incorporation in two CTRL and pGILZ clones. Means \pm SD of three independent experiments. Statistics used Kruskal Wallis test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (C) Number of trypan blue-excluding cells among CTRL and pGILZ clones seeded at 15×10^3 cells/well and cultured for 4 days. Means of triplicates of one representative experiment of three; error bars represent SE. (D) Left: total protein lysates from CTRL or pGILZ clones cultured overnight without serum analyzed by western blotting using specific Abs. Right: p-AKT signal quantified by densitometric analysis and normalized to total AKT. Mean \pm SE of three experiments, * $P < 0.05$, unpaired Student's t test. (E) Total lysates from CTRL or pGILZ were immunoprecipitated (IP) using an anti-AKT Ab, and then incubated with GSK-3-fusion protein in an *in vitro* kinase assay. GSK-3 phosphorylation was assessed by western blot (WB) with phospho-specific GSK-3 Ab. Total AKT was used for normalization. (F) Total protein lysates from BG-1 cells were immunoprecipitated with anti-AKT Ab or control rabbit IgG, and submitted to western blotting with anti-GILZ Ab. After stripping, membranes were reblotted with anti-total AKT mouse Ab. Blots: one representative experiment of three.

time PCR and western blot analyses revealed that siRNA duplexes efficiently and specifically inhibited the expression of GILZ (mRNA and protein abundance) more than 75% lower than in cells treated with irrelevant control siRNA (Figure 4A).

Silencing *GILZ* gene expression led to a marked inhibition of cell proliferation and AKT phosphorylation, without changing phospho-ERK1/2 status (Figure 4, B and 4C).

Down regulation of GILZ expression in OVCAR3 cells, an ovarian cancer cell line that contains high amount of GILZ, also resulted in a decrease of cell proliferation [see Additional file 2]. These various findings reveal a previ-

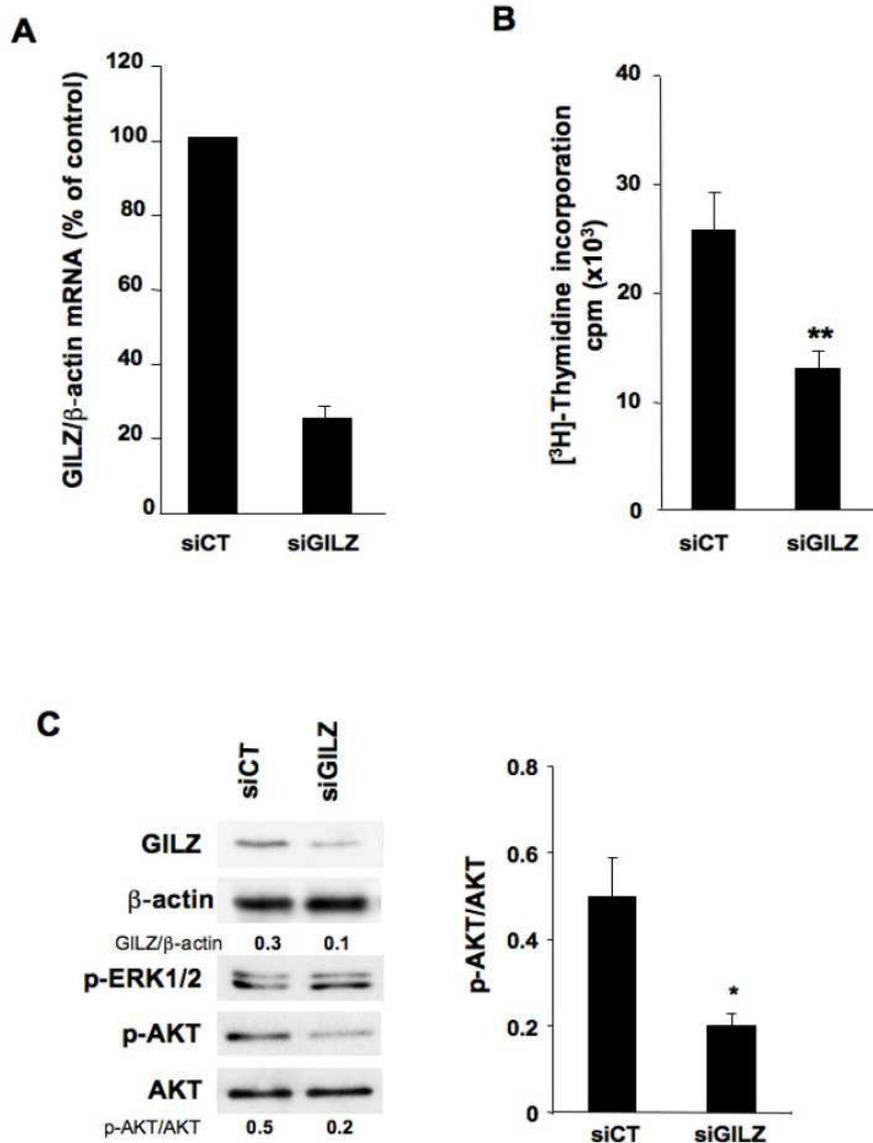


Figure 4

GILZ down-regulation reduces cell proliferation and AKT phosphorylation in BG-1 cells. BG-1 cells were transfected with 4 μ g of control (siCT) or GILZ-specific (siGILZ) siRNA. (A) GILZ mRNA assayed by real-time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA, 48 h after transfection. Results expressed as percentage of control from three independent experiments, mean \pm SE. (B) Cell proliferation assayed by [³H]-thymidine incorporation 48 h after transfection with siRNA, mean \pm SD, unpaired Student's t test was used for comparisons, ***P* < 0.01. (C) Left: total protein lysates were analyzed by western blotting using specific Abs. Blots: one representative experiment of three. Right: p-AKT expression levels were quantified by densitometric analysis and normalized to the signal for total AKT. Histogram represents mean \pm SE of three experiments. Unpaired Student's t test was used for comparisons, **P* < 0.05.

ously unappreciated role of GILZ in the regulation of proliferation and AKT activation.

GILZ controls p21 and cyclin D1 expression

The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cyclin D1 are two AKT targeted proteins that negatively (p21) and positively (cyclin D1) control cell cycle progression and proliferation [29]. Cyclin D1 activates cyclin-dependent-kinases (CDK4/6), leading to phosphorylation of retino-

blastoma (Rb) with the resulting promotion of cell cycle progression [30]. We found that the overexpression of GILZ caused the up-regulation of cyclin D1 (mRNA and protein) and increased the amount of phosphorylated Rb (p-Rb); in contrast, p21 was down-regulated (Figure 5A). At the opposite, down regulation of GILZ resulted in decreased amount of *cyclin D1* gene products (mRNA and protein) and p-Rb whereas those of *p21* increased (Figure

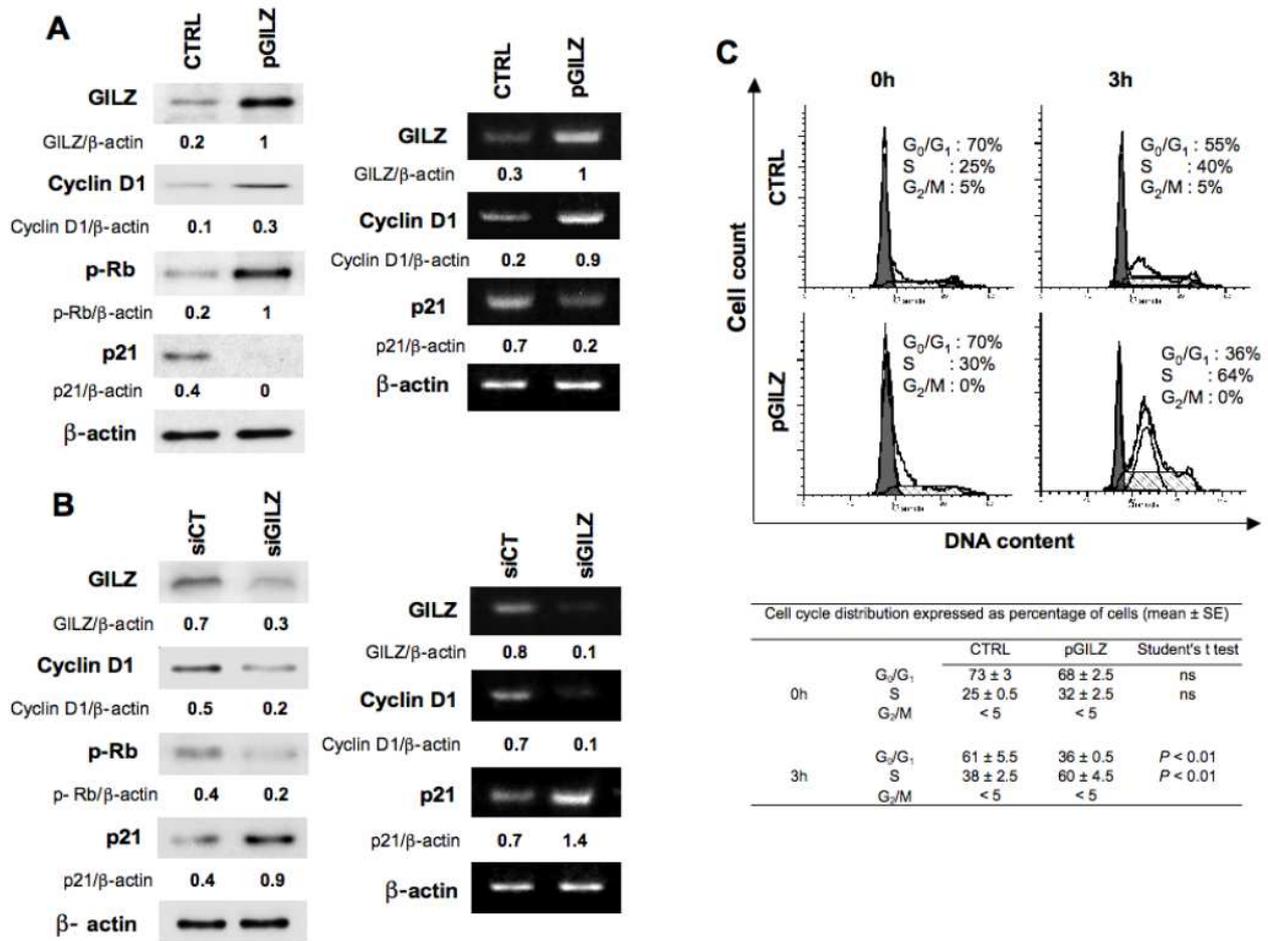


Figure 5

GILZ controls cyclin D1 and p21 expression. (A) Left: cyclin D1, phosphorylated retinoblastoma (p-Rb) and p21 were measured by western blot in CTRL and in pGILZ clones. β-actin was used as a loading control. Right: the steady-state levels of cyclin D1 and p21 mRNAs were assayed by semi-quantitative RT-PCR in CTRL and in pGILZ clones; β-actin was used as a loading control. (B) *p21* and *cyclin D1* gene products were measured by western blot (left) or by semi-quantitative RT-PCR (right) 48 h after BG-1 cells were transfected with 4 μg of control (siCT) or GILZ-specific (siGILZ) siRNA; β-actin was used as a loading control. Blots: one representative experiment of three. (C) Top: CTRL and pGILZ clones were synchronized by double thymidine block. Following removal of the block, cells were analyzed for DNA content by PI staining and cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry at various time points; the percentages of cells in different cycle phases were determined by ModFit Cell Cycle Analysis software. Data are representative of three independent experiments. Bottom: Percentage of cells in each phase of the cell cycle. Results from three independent experiments (mean ± SE). Unpaired Student's t test was used for comparisons.

5B). Thus the effects of down regulation of GILZ mirrored those of overexpression.

GILZ caused changes in p21 and cyclin D1 expression in such a way that increases in GILZ expression would accelerate cell cycle progression. To confirm this prediction we analyzed the cell cycle distribution of synchronized cells following removal of the thymidine block. We found that pGILZ cells entered S phase earlier than CTRL cells (Figure 5C).

AKT activation contributes to BG-1 cell proliferation

To investigate whether AKT activation is required for control of BG-1 cell proliferation, we used Triciribine, a specific pharmacological inhibitor of AKT phosphorylation. Triciribine treatment (5-20 μ M) reduced p-AKT levels and in parallel decreased spontaneous proliferation of pGILZ and CTRL clones (Figure 6A). These findings indicate that AKT phosphorylation contributes to BG-1 cell proliferation. Further, Triciribine also caused an up-regulation of p21 expression in both CTRL and pGILZ clones. Interestingly, cyclin D1 expression remained unchanged. In addition, GILZ levels remained unchanged suggesting that p-AKT inhibition did not significantly affect GILZ expression (Figure 6B).

These various experiments show that AKT activation controls the expression level of p21 and contributes to cell proliferation in BG-1 cells. The enhancement of AKT activation by GILZ therefore accounts for GILZ effect, at least in part, on cell proliferation. In contrast, the enhancement of cyclin D1 promoted by GILZ is disconnected of its action on AKT.

Discussion

The effects of GILZ have been mostly described in immune cells, particularly T-lymphocytes [17] or dendritic cells [10]. The role of GILZ in cancer is still poorly understood and most relevant work has been done in cell lines [19-22]. Here, we identified GILZ as a significant factor in the control of tumor cell proliferation in EOC.

This is the first report of the constitutive expression of GILZ in ovarian tumor specimens from patients with invasive ovarian carcinoma. Epithelial cells from malignant ascites, tumor specimens, and the ovarian cancer cell lines SKOV-3, OVCAR-3 and BG-1, all contain GILZ with a molecular weight of 17 kDa which is the original variant described by Riccardi and co-workers in 1997 [5].

Although contrasting views of the origin and histogenesis of EOC have been proposed, the epithelium that lines the ovarian surface is traditionally considered to be the most common origin of the neoplastic transformation [1,31]. Here, we did not detect GILZ on the surface epithelium of

normal ovaries or in benign tumors, whereas it was expressed in most of EOC specimens, suggesting that GILZ is a molecule associated with malignant processes in ovaries. Ovarian epithelial tumors generally display morphological heterogeneity that pathologists classify into serous, clear cell, endometrioid, and mucinous subtypes on the basis of histopathological examination. Each subtype is characterized by specific genetic risk factors, molecular features, and mRNA expression profiles [32-34], suggesting that ovarian carcinoma is a heterogeneous disease [35]. Despite this heterogeneity, GILZ was detected in all the well-defined histological types and appears to be widely expressed in EOCs, and not restricted to particular histological subtypes.

GILZ was clearly confined to the cytoplasm in ovarian tumor cells. The intensity of GILZ staining and the proportion of tumor cells that were stained for GILZ differed between tumor sections. We found that this uneven production of GILZ in EOC correlated with the expression levels of Ki-67 when all the tumors were considered and also when the serous group was only considered. These findings were further supported by *in vitro* data demonstrating that tumor cell proliferation is regulated by GILZ expression level. Along with Ki-67, GILZ correlated with p-AKT, commonly used to characterize malignant tumor cells [23,24]. These findings were supported by *in vitro* data demonstrating that GILZ enhances p-AKT level and AKT activity. The PI3K/AKT pathway transmits mitogenic signals and controls cell cycle progression in ovarian cancer cells [26]. We found that p-AKT, the active form of AKT, accumulated in strongly positive GILZ tumor specimens. Further, up and down regulation of GILZ in BG-1 cells grown *in vitro* promoted parallel changes in the cellular abundance of p-AKT and in cell proliferation. In contrast, there was no feed back control of GILZ expression by p-AKT, unlike what has recently been reported in multiple myeloma [19]. AKT is frequently hyperactivated in EOC and contributes to the pathogenesis of ovarian cancer [25,36,37]. However, little is known about intracellular molecules that control AKT activation in tumor cells. Protein-protein interactions between GILZ and Raf and between GILZ and Ras have been reported in primary spleen T Lymphocytes and thymocytes [15,38]. As a consequence, GILZ inhibits downstream AKT cascades leading to antiproliferative effects in these cells. In contrast, our data are consistent with a model in which GILZ activates AKT and promotes cell proliferation. These findings probably reflect the large spectrum of GILZ actions and how they may differ substantially according to cell type and physio-pathological conditions. We also reveal the presence of GILZ-AKT complexes in BG-1 cells, suggesting that GILZ may be a novel partner of AKT. AKT-interacting proteins that bind to different functional domains have been widely reported [27]. They cause phosphorylations

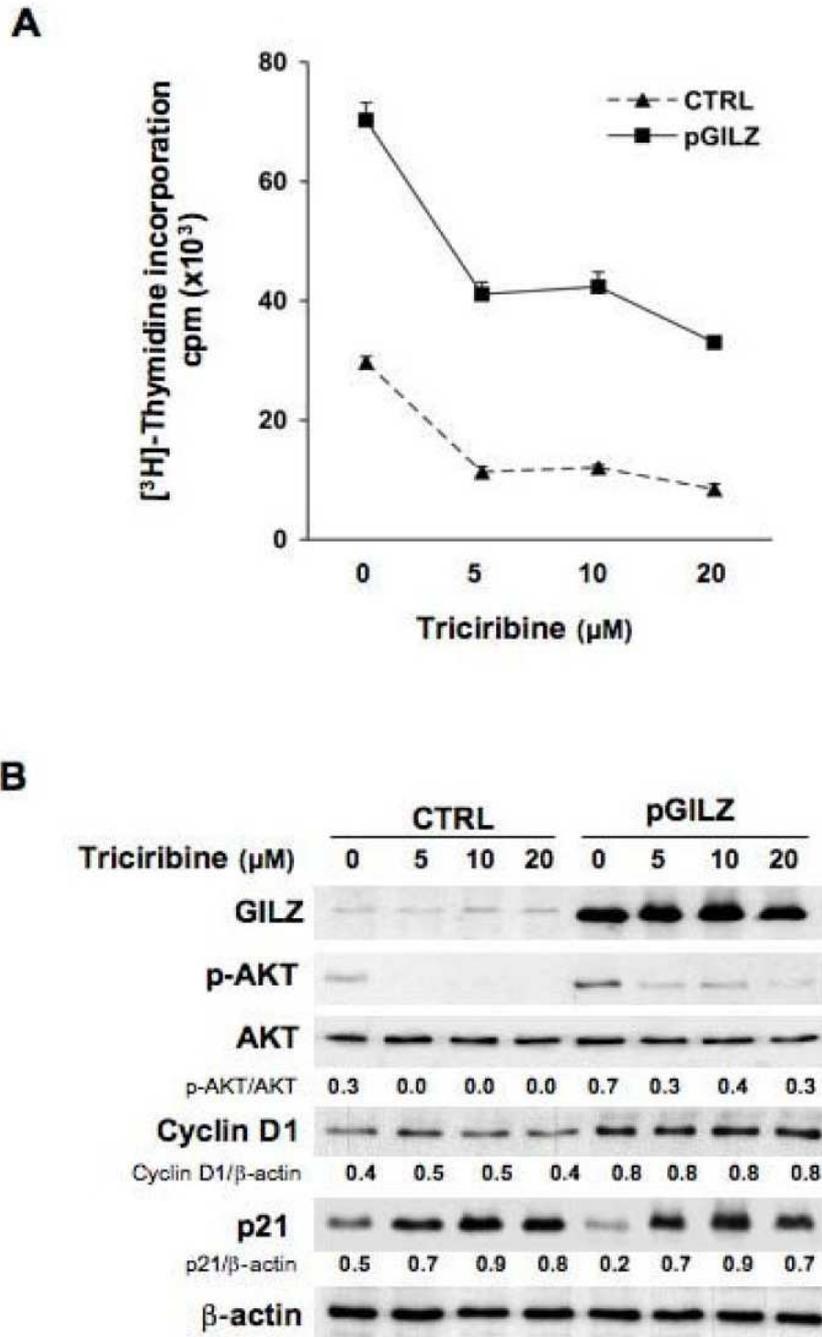


Figure 6
AKT activation is required for BG-I cell proliferation. (A) Cell proliferation was measured by [³H]-thymidine incorporation in CTRL and pGILZ clones treated with indicated Triciribine doses for 24 h. Results are means ± SE of 3 independent experiments. (B) western blots of total protein lysates from CTRL or pGILZ clones treated with indicated Triciribine doses for 24 h. Membranes were probed with specific antibodies. The expression of GILZ, p-AKT, cyclin D1 and p21 proteins were quantified by densitometric analysis and normalized to β-actin or total AKT; results are expressed as GILZ/β-actin, p-AKT/AKT, cyclin D1/β-actin or p21/β-actin ratios. Blots: one representative experiment of three.

and/or structural changes that activate AKT and lock it in an active conformation. Our findings suggest that GILZ may provide intrinsic signals for AKT activation in the absence of external stimulation. Further studies will be needed to determine the precise molecular mechanisms underlying GILZ/AKT interaction.

Most of the G1-S regulators which control the G1-S transition, a crucial step in cell cycle progression, play also an important role in the tumor progression. Cyclin D1 is a positive regulator of progression through the G1 phase of the cell cycle. The transition to S phase is triggered by the activation of the cyclin D/CDK complex, which phosphorylates Rb, a well known regulator of cell proliferation [30]. At the opposite, p21, a universal CDK inhibitor, prevents cell cycle progression by acting at checkpoint G1 that causes sustained G1 blockade [29]. Importantly, we reveal that GILZ increases cyclin D1 expression and the amount of p-Rb, the essential substrate of cyclin D-CDK4/6 complex, whereas at the opposite it decreases p21 expression. All these effects that have never been reported before, are consistent with GILZ action on S-phase entry.

Using Triciribine, a pharmacological inhibitor of AKT activation, we reveal that BG-1 cell proliferation depends on AKT phosphorylation. In the same time we reveal that p21 which is negatively regulated by GILZ, is also reduced by AKT activation. This is consistent with a possible control of p21 expression by AKT as previously reported in various cell types [39]. Thus, GILZ-mediated enhancement of AKT activity may contribute to decrease p21 and to promote cell proliferation. In contrast, AKT is not required for cyclin D1 up regulation in BG-1 cells unlike what has been reported up to now in other cell types [40,41]. Possibly, GILZ may directly control the transcriptional activity of cyclin D1 as already demonstrated for other molecules [42].

Conclusion

Few studies have identified particular molecules and their roles in the molecular mechanisms of tumor progression in EOC. Here, we report a previously unsuspected and important role for GILZ in the control of tumor cell proliferation in EOC. Our findings were supported by parallel and complementary data from tumor specimens and work with the BG-1 cellular model. They demonstrate that, in EOC, GILZ increases tumor cell proliferation, activates AKT, down-regulates p21 and promotes cyclin D1 expression; all these molecules are involved in the progression of malignant tumors and their deregulations are often associated to poor clinical outcome [43-46,25]. These findings highlight GILZ as a potential key molecule in EOC.

Materials and methods

Tissue samples

Approval was obtained from the ethics commission of the Antoine Bécélère Hospital (Clamart, France) for all analyses of tumor material from clinical samples and from archival material from patients with a diagnosis of invasive ovarian carcinoma. Immunohistochemical examination of GILZ, phosphorylated protein kinase B/AKT (p-AKT) and Ki-67 proliferation index was performed retrospectively on tissue specimens of primary invasive ovarian carcinomas taken for routine diagnostic and therapeutic purposes from 50 patients who were treated surgically following a diagnosis of ovarian tumor at Antoine Bécélère Hospital between 1998 and 2007. Clinical and pathological characteristics of the patients are detailed in Table 2. None of the patients had received neo-adjuvant chemotherapy before surgery. Clinical stage was assigned according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system (FIGO); histological subtypes and grades were assigned according to the criteria of the World Health Organization (WHO) classification [47].

Immunohistochemistry

We tested for GILZ, Ki-67 and p-AKT in EOC samples. Paraffin-embedded tissue sections were cut from representative blocks of tumor biopsies and probed with the following antibodies by the avidin-biotin peroxidase method (LSAB kit, Dako-France, Trappes): GILZ polyclonal antibody (Ab) (Santa Cruz, Le Perray-en-Yvelines, France, 1:100), Ki-67 monoclonal (m)Ab (Dako, 1:50) and phospho-AKT(ser473) Ab (Cell Signaling, St Quentin-Yvelines, 78053, France, 1:50) which recognizes only the phosphorylated form of AKT [25,48]. Antigens were unmasked by incubation in 10 mmol/L sodium citrate buffer (Dako) and heating at 90°C using a microwave oven. Tissues were counterstained with hematoxylin. Negative controls were done without the primary Ab. Immunohistochemical staining was simultaneously interpreted by two independent investigators without knowledge of the patients' clinicopathological outcome. Immunostaining for GILZ and for Ki-67 were scored on a seven-tiered scale as follows: negative (0), 1 (weak intensity), 2 (moderate intensity) or 3 (strong intensity) combined with the percentage of positive cells scored as 0 (0%), 1 (1-10%), 2 (10-50%), 3 (50-80%), 4 (>80%) as previously reported [49]. P-AKT immunoreactivity was scored as low versus high, because sections with high AKT kinase activity have been reported to immunoreact strongly with phospho-AKT (ser473) Ab, presumably reflecting overexpression of the PI3K/AKT pathway, whereas no or weak p-AKT immunostaining has been described in tumor samples without increased AKT activity [49,50].

Table 2: Clinical and histological parameters of patients

	Patient number	Median	Percentage	Min-Max
Clinical parameters				
Invasive ovarian tumors	50			
Age (years)		57		[30-86]
Histologic types				
Serous	26		52%	
Endometrioid	8		16%	
Mucinous	9		18%	
Clear Cells	5		10%	
Undifferentiated	2		4%	
FIGO stages				
FIGO stages IA-IC	14 (11 IA + 3 IC)		28%	
FIGO stages IIA-IIC	4 (2 IIA + 2 IIC)		8%	
FIGO stages IIIA-IIIC	30 (2 IIIA + 7 IIIB + 21 IIIC)		60%	
FIGO stage IV	2 IV		4%	
Histologic Grades				
Grade 1	9		18%	
Grade 2	11		22%	
Grade 3	23		46%	
undetermined	7		14%	

Tumor cell enrichment from ascites

Tumor cell enrichment was based on the expression of CD326, a human epithelial antigen also known as EpCAM, which is broadly expressed on cells of epithelial origin and derived tumor cells [51]. CD326+ cells were positively selected using autoMACs columns (Mytenyi Biotech, Paris, France) from ascites collected from patients diagnosed with EOC. The percentage of CD326+ cells in the positive fraction was more than 80% as assessed using a FACScan flow cytometer (BD Biosciences).

Cell culture and reagents

BG-1 cells derived from a solid tumor tissue of a patient with stage III ovarian adenocarcinoma (a kind gift from Dr G. Lazennec, U844 Inserm Montpellier, France) were maintained in Dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L L-glutamine, 0.1 mg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin (Invitrogen, Illkirch, France). The human ovarian carcinoma cell lines SKOV-3 and OVCAR-3 (American Type Culture Collection) were maintained in RPMI 1640 medium containing 0.1 mg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, 2 mmol/L L-glutamine and 10% FBS. Triciribine was purchased from Calbiochem (VWR International SAS, Fontenay-sous-bois, France).

Generation of BG-1 clones stably overexpressing GILZ

BG-1 cells were transfected using jetPEI (Polyplus-transfection, France) according to the manufacturer's protocol, with the GILZ-encoding vector pcDNA3-GILZ or with the empty vector pcDNA3 as a control. Forty-eight hours after transfection, stably transfected cells were selected by a 2-

week treatment with 500 µg/mL of Geneticin (G-418; Invitrogen) and cloned by limiting dilution. Clones were then screened for GILZ expression using quantitative real-time PCR and immunoblot assays. GILZ expression remained stable over 7 days in culture. We thus generated BG-1 clones that stably and strongly expressed GILZ, named pGILZ clones. BG-1 clones stably transfected with an empty vector, named CTRL clones, were used as control.

GILZ silencing

Small interfering RNA (siRNAs) duplexes were synthesized and tested for specific inhibition of GILZ expression as described previously [10]. BG-1 cells (5×10^5 cells/well) were transfected with 4 µg/well GILZ siRNA (siGILZ) or control siRNA (siCT), purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France), by the lipofectamine method using X-tremeGENE siRNA transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France). Transfection efficiency was between 80% and 90%, as assessed by using fluorescent random siRNA: siRNA AlexaFluor 488 (Qiagen).

RT-PCR procedures

Total RNA was extracted using a RNeasy Mini kit (Qiagen). The RNA was transcribed into cDNA by reverse transcription with random hexamers (Roche Diagnostics) and Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Invitrogen). GILZ mRNA was quantified by real-time PCR on a Light Cycler instrument (Roche Diagnostics) using the FastStart DNA Master SYBER Green kit (Roche Diagnostics) as described previously [9,10]. Values were normalized to those for β-actin mRNA and are

thus expressed as the GILZ/ β -actin ratio. *p21* and *cyclin D1* mRNAs were assayed by semi-quantitative RT-PCR as described previously [52]. The primers used were as following: GILZ (294 bp) sense 5'-TCTGCTTGGAGGGGATGTGG-3', antisense 5'-ACTTGTGGGATTCGGGAGC-3'; Cyclin D1 (413 bp) sense 5'-TGCATGTTTCGTGGCCTCTAA-3', antisense 5'-CAGTCCGGGTCACACTTGAT-3'; p21 (331 bp) sense 5'-CCACTGTGATGCGCTAATGG-3', antisense 5'-CCGTTTTCGACCCTGAGAG-3'; β -actin (237 bp) sense 5'-GGGT-CAGAAGGATTCCTATG-3', antisense 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'.

[³H] thymidine uptake

Cells were seeded in triplicate on 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well in DMEM medium with 10% FBS. Twenty-four hours later, [³H] thymidine (0.5 μ Ci/well) (PerkinElmer, Boston, US) was added and the samples incubated overnight. The radioactivity incorporated was determined as described previously [52] and results are expressed as counts per minute (cpm).

Western blot and immunoprecipitation

Cells (2×10^6) were lysed as described previously [17]. Equivalent amounts of proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham, Saclay, France) and probed with rabbit polyclonal Abs recognizing GILZ (Santa Cruz), AKT phosphorylated at Ser⁴⁷³, total AKT, and ERK1/2 phosphorylated at Thr^{202/204}, and retinoblastoma phosphorylated at Ser^{807/811} (all from Cell Signaling). Anti-cyclin D1 and anti-p21 mAbs were purchased from Cell Signaling. Loading controls used goat anti- β -actin Ab from Santa Cruz. Primary Abs were visualized using HRP-conjugated anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat IgG (Santa Cruz) and enhanced chemiluminescence detection (Amersham). ScanAnalysis software (Biosoft, Cambridge, United Kingdom) was used for densitometric analysis.

Total protein lysates from BG-1 clones were immunoprecipitated with polyclonal anti-AKT Ab (Santa Cruz) overnight and then the immune complexes were precipitated with protein G bound to sepharose beads (Sigma-Aldrich). The immunoprecipitates were immunoblotted with anti-GILZ Ab to investigate the presence of GILZ.

In Vitro kinase assay

The nonradioactive AKT kinase assay kit was used according to the manufacturer's instructions (Cell Signaling). Immobilized AKT mAb was used to immunoprecipitate AKT from cell lysates and the samples subjected to an *in vitro* kinase assay using GSK-3 fusion protein as a substrate. Phosphorylation of GSK-3 was measured by west-

ern blotting using phosphorylated GSK-3 α/β (Ser^{21/9}) Ab and chemiluminescent detection.

Cell-cycle analysis

BG-1 cells were synchronized by double thymidine block as described previously [53]. After releasing the block in DMEM-10% FBS, cell cycles were analyzed using propidium iodide (PI) staining and fluorescence was measured using a FACScan flow cytometer. Cell cycle profiles were analyzed by ModFit Cell Cycle Analysis software.

Statistical analysis

StatEL statistical software (Adscience, Paris, France) was used. The Spearman test was used to analyze the relationship between GILZ and Ki-67 scores. The two-tailed unpaired Student's *t* test was used to compare two groups and the Kruskal Wallis test followed by Dunn's test was used to compare several groups. Fisher's exact test was used to compare the relationship between the expression levels of GILZ and Ki-67 and of GILZ and p-AKT. Significance was set at $P < 0.05$.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

NR conceived the ideas with VM, performed all the *in vitro* experiments, analyzed data and contributed to manuscript draft. FG carried out immunohistochemical staining of tissue slides, quantified immunostaining and contributed to data analysis. CT collected tumor specimens and clinical data from patients and contributed to data analysis. MP and DE have been involved in revising the manuscript critically. A B-V contributed to GILZ overexpression experiments. HF provided with ovarian tumor specimens. SP analyzed tissue slides as a pathologist and contributed to provide ovarian tumor specimens as head of anatomo-cytology department. KB contributed to manuscript draft and writing. VM conceived the ideas with NJ, coordinated the experiments, analyzed the data, completed statistical analyses and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Effects of GILZ overexpression on spontaneous apoptosis. CTRL or pGILZ cells were cultured at equal density in medium with 10% FBS for 24 h, and then stained with annexin V-FITC and propidium iodide and analyzed by flow cytometry. There was no difference in spontaneous apoptosis between pGILZ and CTRL clones. Bottom, summary data from three independent experiments (mean \pm SE).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-83-S1.TIFF>]

Additional file 2

GILZ down-regulation reduces cell proliferation in OVCAR-3 cells. OVCAR-3 cells were transfected with 4 μ g of control (siCT) or *GILZ*-specific (si*GILZ*) siRNA. (A) *GILZ* mRNA assayed by real-time RT-PCR and normalized to β -actin mRNA, 48 h after transfection. Results expressed as percentage of control from three independent experiments; error bars represent SE. (B) Cell proliferation assayed by [³H]-thymidine incorporation 48 h after transfection with siRNA. Results are mean of three independent experiments; error bars indicate the SE.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-83-S2.TIFF>]

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and by a grant from La Ligue contre le cancer.

References

- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC: **Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology.** *Endocr Rev* 2001, **22**:255-288.
- Yancik R: **Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality.** *Cancer* 1993, **71**:517-523.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ: **Cancer statistics, 2008.** *CA Cancer J Clin* 2008, **58**:71-96.
- Raspollini MR, Taddei GL: **Tumor markers in ovarian carcinoma.** *Int J Gynaecol Obstet* 2007, **97**:175-181.
- D'Adamo F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G, Riccardi C: **A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death.** *Immunity* 1997, **7**:803-812.
- Riccardi C, Cifone MG, Migliorati G: **Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of G1TR and G1LZ, two dexamethasone-induced genes.** *Cell Death Differ* 1999, **6**:1182-1189.
- Riccardi C, Zollo O, Nocentini G, Bruscoli S, Bartoli A, D'Adamo F, Cannarile L, Delfino D, Ayroldi E, Migliorati G: **Glucocorticoid hormones in the regulation of cell death.** *Therapie* 2000, **55**:165-169.
- Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, D'Adamo F, Riccardi C: **Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB.** *Blood* 2001, **98**:743-753.
- Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L, Maillot MC, Portier A, Couderc J, Galanaud P, et al.: **Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10.** *Blood* 2003, **101**:729-738.
- Cohen N, Mouly E, Hamdi H, Maillot MC, Pallardy M, Godot V, Capel F, Balian A, Naveau S, Galanaud P, et al.: **GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response.** *Blood* 2006, **107**:2037-2044.
- Godot V, Garcia G, Capel F, Arock M, Durand-Gasselin I, Asselin-Labat ML, Emilie D, Humbert M: **Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells.** *Allergy* 2006, **61**:886-890.
- Ellestad LE, Malkiewicz SA, Guthrie HD, Welch GR, Porter TE: **Expression and regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper in the developing anterior pituitary gland.** *J Mol Endocrinol* 2009, **42**:171-183.
- Robert-Nicoud M, Flahaut M, Elalouf JM, Nicod M, Salinas M, Bens M, Doucet A, Wincker P, Artiguenave F, Horisberger JD, et al.: **Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:2712-2716.
- Tynan SH, Lundeen SG, Allan GF: **Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, **91**:225-239.
- Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A, Di Marco B, Marchetti C, Riccardi C: **Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:7929-7941.
- Mittelstadt PR, Ashwell JD: **Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ.** *J Biol Chem* 2001, **276**:29603-29610.
- Asselin-Labat ML, David M, Biola-Vidamment A, Lecoeuche D, Zenaro MC, Bertoglio J, Pallardy M: **GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis.** *Blood* 2004, **104**:215-223.
- Downward J: **Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:11-22.
- Grugan KD, Ma C, Singhal S, Krett NL, Rosen ST: **Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, **110**:244-254.
- Bachmann PS, Gorman R, Papa RA, Bardell JE, Ford J, Kees UR, Marshall GM, Lock RB: **Divergent mechanisms of glucocorticoid resistance in experimental models of pediatric acute lymphoblastic leukemia.** *Cancer Res* 2007, **67**:4482-4490.
- Blind RD, Garabedian MJ: **Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isofoms to glucocorticoid-induced genes.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008, **109**:150-157.
- Chen W, Rogatsky I, Garabedian MJ: **MED14 and MED1 differentially regulate target-specific gene activation by the glucocorticoid receptor.** *Mol Endocrinol* 2006, **20**:560-572.
- Khouja MH, Baekelandt M, Nesland JM, Holm R: **The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma.** *Int J Gynecol Pathol* 2007, **26**:418-425.
- Guo RX, Qiao YH, Zhou Y, Li LX, Shi HR, Chen KS: **Increased staining for phosphorylated AKT and nuclear factor-kappaB p65 and their relationship with prognosis in epithelial ovarian cancer.** *Pathol Int* 2008, **58**:749-756.
- Altomare DA, Wang HQ, Skele KL, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, Testa JR: **AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth.** *Oncogene* 2004, **23**:5853-5857.
- Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH: **G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, **287**:C281-291.
- Franke TF: **PI3K/Akt: getting it right matters.** *Oncogene* 2008, **27**:6473-6488.
- Mitsuuchi Y, Johnson SW, Selvakumar M, Williams SJ, Hamilton TC, Testa JR: **The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signal transduction pathway plays a critical role in the expression of p21WAF1/CIP1/SDI1 induced by cisplatin and paclitaxel.** *Cancer Res* 2000, **60**:5390-5394.
- Sherr CJ, Roberts JM: **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes Dev* 1999, **13**:1501-1512.
- Weinberg RA: **The retinoblastoma protein and cell cycle control.** *Cell* 1995, **81**:323-330.
- Naora H, Montell DJ: **Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**:355-366.
- Shih le M, Kurman RJ: **Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis.** *Am J Pathol* 2004, **164**:1511-1518.
- Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, Misek DE, Wu R, Zhai Y, Darrah DM, et al.: **Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas.** *Cancer Res* 2002, **62**:4722-4729.
- Zorn KK, Bonome T, Gangi L, Chandramouli GV, Awtry CS, Gardner GJ, Barrett JC, Boyd J, Birrer MJ: **Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:6422-6430.

35. Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, et al: **Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies.** *PLoS Med* 2008, **5**:e232.
36. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW: **PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer.** *Nat Genet* 1999, **21**:99-102.
37. Altomare DA, Testa JR: **Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer.** *Oncogene* 2005, **24**:7455-7464.
38. Ayroldi E, Zollo O, Bastianelli A, Marchetti C, Agostini M, Di Virgilio R, Riccardi C: **GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling.** *J Clin Invest* 2007, **117**:1605-1615.
39. Abbas T, Dutta A: **p21 in cancer: intricate networks and multiple activities.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**:400-414.
40. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN, Rosen N: **Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway.** *J Biol Chem* 1998, **273**:29864-29872.
41. Liang J, Slingerland JM: **Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression.** *Cell Cycle* 2003, **2**:339-345.
42. Zhang W, Yang N, Shi XM: **Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ).** *J Biol Chem* 2008, **283**:4723-4729.
43. Nam EJ, Kim YT: **Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer.** *Int J Gynecol Cancer* 2008, **18**:1169-1182.
44. Vivanco I, Sawyers CL: **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:489-501.
45. Alao JP: **The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic intervention.** *Mol Cancer* 2007, **6**:24.
46. Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM: **Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:5168-5177.
47. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG: **Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up.** *Cancer* 1998, **82**:893-901.
48. Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN: **AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:965-1014.
49. Noske A, Kaszubiak A, Weichert W, Sers C, Niesporek S, Koch I, Schaefer B, Sehouli J, Dietel M, Lage H, Denkert C: **Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: increased expression of AKT in advanced ovarian cancer.** *Cancer Lett* 2007, **246**:190-200.
50. Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tschlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ: **AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells.** *Am J Pathol* 2001, **159**:431-437.
51. Runz S, Keller S, Rupp C, Stoeck A, Issa Y, Koensgen D, Mustea A, Sehouli J, Kristiansen G, Altevoigt P: **Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM.** *Gynecol Oncol* 2007, **107**:563-571.
52. Belot MP, Abdennebi-Najar L, Gaudin F, Emilie D, Machelon V: **Progesterone increases csk homologous kinase in HMC-1560 human mast cells and reduces cell proliferation.** *J Cell Biochem* 2007, **102**:1271-1280.
53. Sansregret L, Goulet B, Harada R, Wilson B, Leduy L, Bertoglio J, Nepveu A: **The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:2441-2455.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

