

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DE MOLÉCULES IMMUNOMODULATRICES SUR LA TRANSITION
ÉPITHÉLIO-MÉSENCHYMATEUSE DANS UN MODÈLE CELLULAIRE DE
CANCER OVARIEN

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
SAMANEH KAMYABIAZAR

JUILLET 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout premièrement remercier mon directeur de recherche, le professeur Borhane Annabi, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir intégrée dans son équipe de recherche. Je le remercie pour ses encouragements, ses connaissances, sa motivation, sa grande disponibilité, sa patience et son support constant qui m'ont permis de bien réussir tout au long de ma maîtrise.

Je remercie le professeur Moutih Rafei pour m'avoir fait confiance dans ce projet en me laissant une grande liberté.

Je remercie également mes collègues qui sont devenus mes amis (es) au fil du temps, Alain Zgheib, Tiziana Dao, Jean-Christophe Currie, Marbelis Fernandez et plus particulièrement, Audrey-Ann Sicard.

Je remercie aussi madame Chantal Gamache pour sa présence et sa disponibilité à répondre à toutes mes questions sur la langue française.

J'aimerais remercier toute ma famille, particulièrement, mon époux qui m'a accompagnée au Canada et pour son soutien, son encouragement et sa présence dans mon parcours académique et personnel. Merci à ma petite Atrine, ma source d'énergie.

Je veux remercier mes parents pour leur source d'inspiration et leur source de courage, pour m'avoir toujours soutenue et motivée dans mes choix.

Enfin, je remercie la Fondation UQAM et la Chaire en Prévention et Traitement du Cancer pour le support financier.

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
RÉSUMÉ	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Généralité	1
1.1.2 Statistiques.....	2
1.2 Le cancer des ovaires.....	4
1.2.1 Les facteurs de risque.....	4
1.2.2 La classification histologique.....	5
1.2.3 Le diagnostic.....	6
1.2.4 Les traitements.....	7
1.2.5 La chimiorésistance.....	8
1.3 La métastase et l'invasion.....	11
1.4 L'angiogénèse.....	14
1.4.1 L'angiogénèse tumorale.....	14
1.5 La transition épithélio-mésenchymateuse	15
1.5.1 Les facteurs de transcription Snail, Slug et Twist.....	17
1.6 Les cytokines.....	20
1.6.1 Définition.....	20
1.6.2 Le rôle des cytokines dans le cancer.....	21

1.7 Le facteur de croissance transformant-beta.....	23
1.7.1 Les récepteurs du TGF- β	24
1.7.2 Le TGF- β comme cible thérapeutique.....	26
1.8 Criblage et identification de composés immunomodulateurs.....	28
1.9 Corrélation entre la TEM et stress oxydatif.....	32
CHAPITRE II PROJET DE RECHERCHE	37
2.1 Problématique et hypothèse de recherche	37
2.2 Objectifs de recherche	38
CHAPITRE III MATÉRIELS ET MÉTHODES	39
3.1 Matériels.....	39
3.2 Méthodes	40
3.2.1 Culture cellulaire.....	40
3.2.2 Extraction d'ARN, synthèse d'ADNc et PCR en temps réel.....	41
3.2.3 Lyse cellulaire	42
3.2.4 Dosage des protéines.....	42
3.2.5 Analyse de l'expression protéique par immunobuvardage	43
3.2.6 Immunodétection des protéines.....	43
3.2.7 Migration cellulaire en temps réel.....	44
3.2.8 Mesure d'apoptose par cytométrie en flux.....	45
3.2.9 Mesure des ROS par cytométrie en flux.....	45
3.2.10 Analyse statistique.....	46
CHAPITRE IV RÉSULTATS	47
4.1 Impact de TACIMA-218 sur la TEM.....	49
4.2 Effet de TACIMA-218 sur la voie d'AKT/GSK-3 β	50
4.3 Impact de TACIMA-218 sur la voie de signalisation MAPK p38.....	53

4.4	Effet de TACIMA-218 sur la migration des cellules ES-2 et SKOV-3.....	55
4.5	Effet de TACIMA-218 sur la mort cellulaire ES-2 et SKOV-3.....	57
4.6	Effet coopératif de TACIMA-218 avec BSO et 3-MPA.....	60
4.7	Effet de TACIMA-218 sur la génération des ROS.....	62
4.8	Étude de la prolifération des cellules ES-2 et SKOV-3 dans le contexte d'une déprivation de glucose et glutamine.....	64
4.9	Expression génique des marqueurs associés au stress oxydatif.....	66
CHAPITRE V DISCUSSION.....		68
CHAPITRE VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES		78
BIBLIOGRAPHIE		79

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Étapes de la cancérogenèse	2
1.2 Distribution en pourcentage des différents stades de cancer au moment du diagnostic	3
1.3 Modèle hypothétique de chimiorésistance et chimiosensibilité dans des cellules du cancer de l’ovaire humain	10
1.4 Le processus métastatique.....	13
1.5 Cytokines impliquées dans l'inflammation liée au cancer	23
1.6 Les récepteurs du TGF- β	25
1.7 Le TGF- β comme cible thérapeutique	27
1.8 Disposition de la plaque de 384 puits	30
1.9 Criblage à haut débit de petites molécules à l'aide d'un essai lymphocytaire basé sur la fluorescence	31
1.10 Schéma mécanistique montrant comment les ROS peuvent promouvoir la progression de la TEM.....	34
4.1 Impact de TACIMA-218 sur l’expression des protéines impliquées dans la TEM.....	49
4.2 Impact de TACIMA-218 sur la voie de signalisation AKT et GSK-3 β	51

4.3	Impact de TACIMA-218 sur la voie de signalisation MAPK p38 dans les cellules ES-2 et SKOV-3	54
4.4	Impact de TACIMA-218 sur la migration des cellules ES-2 et SKOV-3...	56
4.5	Analyse de la mort cellulaire induite par TACIMA-218	58
4.6	Analyse de la mort cellulaire induite par TACIMA-218, BSO, 3MPA et les différentes combinaisons des trois composés.....	61
4.7	Mesure de la génération de ROS dans les cellules ES-2 et SKOV-3.....	63
4.8	Étude de la prolifération des cellules ES-2 et SKOV-3 dans le contexte d'une déprivation de glucose ou de glutamine.	65
4.9	Analyse de l'expression génique des biomarqueurs impliqués dans le stress oxydatif.....	67
5.1	Schéma proposé pour expliquer l'effet de BSO avec TACIMA-218 associé au stress oxydatif dans les cellules ES-2.	72
5.2	TACIMA-218 induit la mort cellulaire, l'apoptose dans les cellules chimiosensibles ES-2 et également inhibe la TEM dans les cellules ES-2 et SKOV-3.	74
5.3	Schéma récapitulatif de l'effet de TACIMA-218 dans le stress oxydatif, l'induction de l'apoptose et dans la migration cellulaire.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Résumé des effets des lignées de cellules cancéreuses après la TEM avec les cellules effectrices immunitaires.....	17

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ACE	Antigène carcinoembryonnaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFP	Alpha-fœtoprotéine
ARN	Acide ribonucléique
AKT	Protéine kinase B
ARNm	ARN messenger
BSA	Albumine sérique bovine
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
CEO	Cancer épithélial de l'ovaire
CSF	Facteurs stimulant les colonies
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated-kinase</i>
FBS	Serum bovin foetal
FGF	Facteurs de croissance des fibroblastes
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPx	Glutathion peroxydase
GSK-3	<i>Glycogen synthase-3 kinase</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transférase
HCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HMOX1	<i>Heme oxygenase-1</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase</i>

IL-I	Interleukine I
IRIC	l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie de l'UdeM
JAK	Janus Kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MMPs	Métalloprotéinases matricielles
MMP2	Métalloprotéinase matricielle 2
NAC	N-acetylcysteine
NF-kB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NQO1	<i>NAD(P) H:quinone oxidoreductase</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
p53	Protéine issue du gène <i>p53</i> suppresseur de tumeurs
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de la polymérase en chaîne
PDVF	Difluorure de polyvinylidène
PI3K	Phosphotidyl inositol triphosphate kinase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOD	Superoxyde dismutase
TCR	Récepteur des cellules T
TEMED	N, N, N', N' -tétrarnéthyléthylènediarnine
TGF- β	<i>Transforming growth factor Beta</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor Alpha</i>
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TXNRD1	<i>Thioredoxin reductase -1</i>
VEGF	Facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire

RÉSUMÉ

Le cancer de l'ovaire représente la cause principale de mortalité liée au cancer des femmes dans le monde. La plupart des patientes sont diagnostiquées alors qu'elles sont malheureusement déjà atteintes de métastases. La formation de métastases est en partie régulée par un processus cellulaire crucial nommé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Durant la TEM, les cellules perdent leur caractère épithélial et acquièrent un caractère invasif fondamental dans la formation de métastases. Ce processus est favorisé par des cytokines telles que le *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β). Le mécanisme par lequel le système immunitaire peut affecter la transition des cellules cancéreuses épithéliales en cellules mésenchymateuses est encore méconnu. Nous nous sommes intéressés à de nouveaux composés thérapeutiques immunomodulateurs identifiés par essai lymphocytaire basé sur la fluorescence des cellules T ou B dérivées de souris transgéniques Nur77-GFP. Nous avons testé l'efficacité du composé immunomodulateur, TACIMA-218, dans un modèle de carcinome ovarien chimiosensible ES-2 et un autre chimiorésistant SKOV-3, sur l'induction des voies de signalisation impliquées dans la TEM, la migration et l'apoptose. Nous émettons l'hypothèse que TACIMA-218 peut antagoniser l'induction de la TEM, inhiber la migration et, également, induire l'apoptose dans le cancer ovarien.

Nous avons mesuré l'expression de divers biomarqueurs associés à la TEM tels que Twist et Slug par électrophorèse et immunobuvardage de type Western. L'étude sur la survie et le stress oxydatif a aussi été évaluée par cytométrie en flux, pour quantifier l'apoptose précoce, tardive ou la nécrose. Enfin, la migration cellulaire a été évaluée en temps réel par xCELLigence. Nous avons découvert que TACIMA-218 diminue l'expression des marqueurs mésenchymateux Slug et Twist. Nos résultats démontrent que TACIMA-218 induit l'apoptose par la génération des ROS et l'inactivation de p38 MAPK dans un modèle de cancer ovarien chimiosensible. De plus, nous avons montré que TACIMA-218 peut induire à 100% l'apoptose en présence d'agents anticancéreux tels que 3-MPA et BSO. Nous avons également vu que TACIMA-218 peut diminuer la migration des cellules cancéreuses. Dans la présente étude, nous avons démontré que la glutamine favorise la croissance des cellules ES-2.

Le pouvoir inhibiteur de TACIMA-218 suggère qu'il aurait la capacité de prévenir la TEM et la formation de métastases. Les données recueillies serviront, éventuellement, à aborder les problèmes de chimiorésistance associés à certains types de cancers ovariens. De plus, nos expériences servent à mieux comprendre le mécanisme d'action de TACIMA-218 afin de développer de nouveaux agents anticancéreux plus spécifiques.

Mots-Clés : Transition épithélio-mésenchymateuse, *Transforming Growth Factor beta*, composés immunomodulateurs (TACIMA-218), cancer ovarien

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralité

Parmi les cancers les plus mortels chez les femmes, les cancers de l’ovaire occupent une place importante. Lorsqu’un cancer s’est propagé depuis son site d’origine dans d’autres parties du corps, on parle de cancer généralisé ou de cancer métastatique. Le cancer de l’ovaire est malheureusement souvent diagnostiqué à un stade tardif, et les événements précoces de la cancérogenèse demeurent encore peu connus (Auersperg *et al.*, 2002).

La cancérogenèse s’effectue en trois étapes principales : l’initiation, la promotion et la progression tumorale (Beliveau et Gingras, 2007). La première étape est l’initiation où la cellule subit une mutation induite par les substances chimiques, les virus ou la radiation (Beliveau et Gingras, 2007). Dans la deuxième étape, la promotion, les cellules mutées se développent en lésions cancéreuses. Dans la troisième étape, la progression, la cellule se développe en tumeur maligne c’est-à-dire que la prolifération continue et que les gènes suppresseurs de tumeurs perdent leur activité normale. Par la suite, les cellules cancéreuses se détachent de leur site primaire et colonisent d’autres tissus sains distants (Pratheeshkumar *et al.*, 2012) (Figure 1.1).

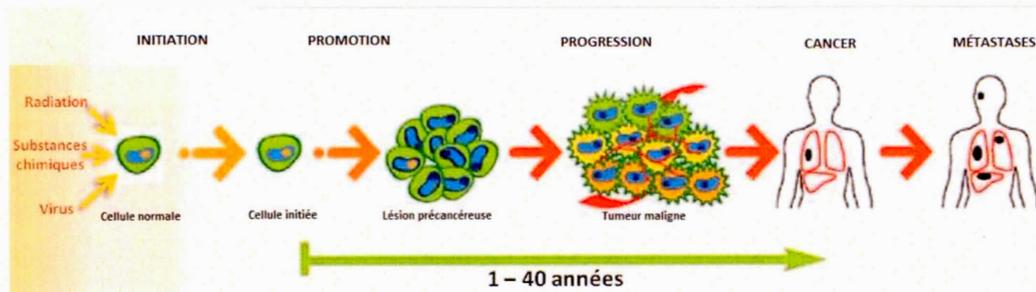


Figure 1.1 Étapes de la cancérogenèse. Des agents cancérogènes affectent une cellule normale. Durant la promotion, la cellule initiée subit des lésions au niveau de l'ADN et cela déclenche une prolifération incontrôlée. Durant la progression, des oncogènes sont activés et des gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés, et cela peut s'étendre sur plusieurs années. Finalement, le cancer s'établit et peut se propager dans le corps. (Adapté de : Béliveau et Gingras, 2007)

1.1.2 Statistiques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2017), le cancer constitue la deuxième cause de décès avec 8,8 millions de morts en 2015 dans le monde et près d'un décès sur six est dû au cancer. La Société Canadienne du Cancer indique que 206 200 Canadiens ont reçu un diagnostic de cancer et que 80 800 en sont décédés en 2017 (OMS, 2017). Il est estimé qu'environ un Canadien sur deux développer un cancer au cours de sa vie, et qu'un sur quatre en mourra. Depuis 1988, le taux de mortalité dû au cancer a diminué de 32% chez les hommes et 17% chez les femmes (OMS, 2017). Le stade permet de classifier les cancers selon l'étendue de la maladie dans le corps. La base de données du registre canadien du cancer de Statistique Canada montre des variations dans la distribution par stade selon le type de cancer. Il y a une partie élevée

de diagnostics de stade IV pour les cancers du pancréas (56,7%), de la bouche (52,7%), de l'estomac (43,5%), de l'œsophage (39,9%) et de l'ovaire (14,1%) (Figure 1.2).

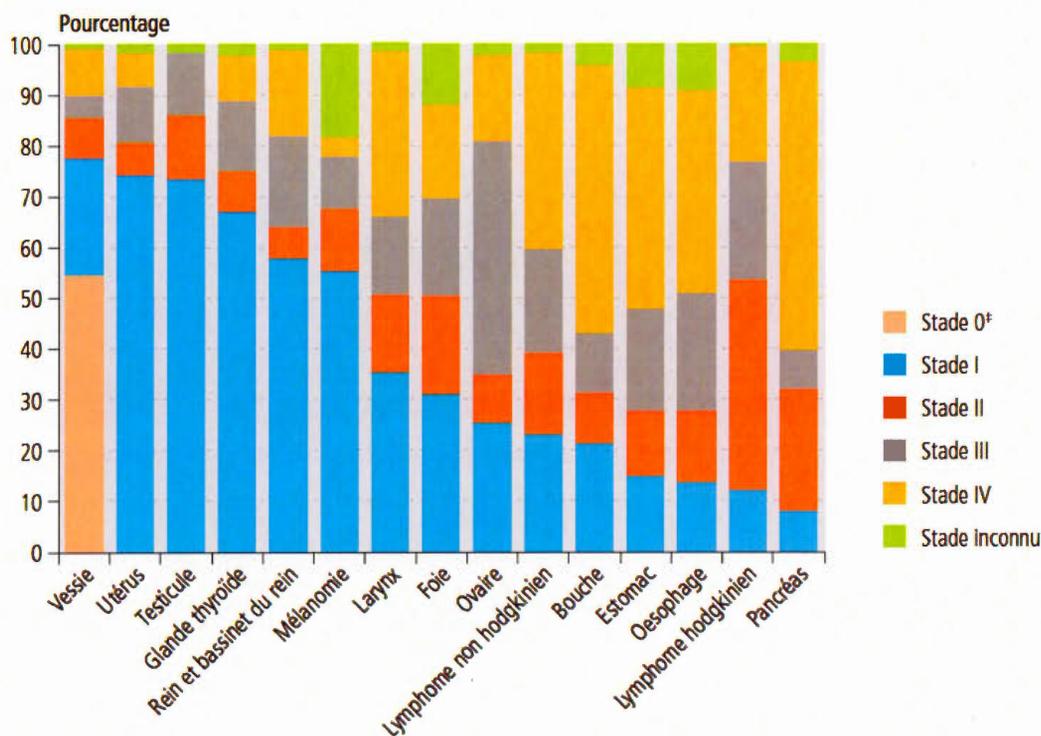


Figure 1.2 Distribution en pourcentage du stade de différents types de cancer au moment du diagnostic (Canada, 2011–2015). Au Stade 0 : Il y a un groupe de cellules anormales qui ne sont pas encore considérées comme cellules cancéreuses. Stade I: La tumeur est de petite taille et limitée à l'organe dans lequel elle a pris naissance. Stade II : La tumeur est plus grosse qu'au stade I et le cancer ne s'est pas encore propagé dans d'autres tissus. Stade III : Le cancer est de grande taille et la tumeur a envahi les ganglions lymphatiques ou les tissus environnants. Stade IV : Le cancer s'est propagé par le sang ou par le système lymphatique, ce qui suggère la présence de métastases dans d'autres organes à distance de la tumeur d'origine.

En 2017, 2 800 Canadiennes ont reçu un diagnostic de cancer de l'ovaire et 1 800 en sont mortes. Le risque de cancer de l'ovaire est de 1 sur 69 et le risque d'en mourir est de 1 sur 100 chez les femmes (statistiques canadiennes sur le cancer, 2017). Les statistiques canadiennes sur le cancer montrent que le cancer du poumon est la principale cause de mortalité par cancer avec approximativement 26%. La deuxième cause de mortalité chez les hommes est le cancer colorectal (représentant 12 %) et, chez les femmes, le cancer du sein (représentant 13%). La troisième cause la mortalité chez les hommes est le cancer de la prostate (représentant 10%) et, chez les femmes, le cancer colorectal (représentant 12%) (Statistiques canadiennes sur le cancer, 2017).

1.2 Le cancer des ovaires

1.2.1 Les facteurs de risque

Le cancer des ovaires se situe au cinquième rang de mortalité chez les femmes (Kurman, 2014). Le développement du cancer de l'ovaire est peu connu. Le tabagisme, les antécédants familiaux de cancer de l'ovaire, les mutations des gènes BRCA, le syndrome de Lynch, l'absence de grossesse ou d'accouchement, l'hormonothérapie substitutive, et l'exposition à l'amiante en milieu de travail sont les principaux facteurs de risque du cancer de l'ovaire dans le monde (Auersperg *et al.*, 2001; Davidson *et al.*, 2014). Des études épidémiologiques suggèrent que l'ovulation soit aussi un cofacteur important dans le développement du cancer de l'ovaire (Reid *et al.*, 2017). L'utilisation de contraceptifs oraux, qui suppriment l'ovulation et qui induisent l'apoptose dans les cellules épithéliales de l'ovaire, peut réduire de 50% le risque de développer un cancer de l'ovaire (Société Canadienne du Cancer, 2018).

1.2.2 La classification histologique

Le cancer ovarien est classifié en fonction du type de cellules à partir desquelles il se développe. L'OMS a déterminé trois formes histologiques principales de tumeurs : Les tumeurs épithéliales, les tumeurs germinales et les tumeurs stromales. Les tumeurs épithéliales se trouvent à la surface externe de l'ovaire. C'est une forme plus courante de cancer de l'ovaire (Kurrey *et al.*, 2005) avec environ 90 % des cas (Société Canadienne du Cancer, 2018). Il existe des sous-types distincts de cancer de l'ovaire épithélial :

1) Les carcinomes séreux, qui sont les sous-types de cancer de l'ovaire les plus courants et qui correspondent à environ 50 % des tumeurs épithéliales, ce qui correspond à 80% de tous les cas de cancers ovariens. Il peut toucher les deux ovaires et peut aussi présenter un haut ou un faible degré de malignité. Le cancer de l'ovaire épithélial de bas degré de malignité représente jusqu'à 15 % et touche les femmes plus jeunes. Le cancer de l'ovaire épithélial de haut degré de malignité représente jusqu'à 70 % de tous les cas de cancer de l'ovaire. Ces types de carcinomes sont présents dans les cancers héréditaires avec mutations des gènes BRCA (Barnhill *et al.*, 1995).

2) Les carcinomes endométrioïdes, attribuables à l'endométriose, sont le deuxième type histologique de cancer de l'ovaire le plus courant, et représentent environ 10 % de tous les cancers ovariens. Ces types de carcinomes sont présents avec des mutations des gènes PTEN et KRAS (Dinulescu *et al.*, 2005).

3) Les carcinomes mucineux (les cellules de la tumeur produisent du mucus) sont des tumeurs épithéliales qui surviennent généralement dans un seul ovaire (Tulpin *et al.*, 2008) et touchent environ 4 % des femmes. (Société Canadienne du Cancer, 2018). En effet, les carcinomes mucineux sont associées à une mucosécrétion de type intestinal, et présentent des mutations KRAS (Gemignani *et al.*, 2003).

4) Les carcinomes à cellules claires, associés à l'endométriose et au syndrome Lynch (Chene *et al.*, 2015), constituent le cancer ovarien le plus courant. Il touche environ 10 % des femmes. Il est souvent diagnostiqué à un stade plus précoce que le carcinome séreux (Cancer de l'ovaire Canada, 2017).

Les tumeurs germinales se trouvent à l'intérieur des ovaires et prennent naissance dans les cellules qui produisent les ovules. Ces tumeurs représentent de 2 % à 3 % de tous les cancers de l'ovaire (Société Canadienne du Cancer, 2018). Elles comprennent les sous-types suivants: dysgerminome, tumeurs du sinus endodermique, carcinome embryonnaire, tératome malin, choriocarcinome et polyembryome. (Tulpin *et al.*, 2008).

Les tumeurs stromales représentent moins de 7 % de tous les cas de cancers de l'ovaire, et constituent le tissu structural qui retient les ovaires et qui peut produire des hormones féminines comme l'œstrogène, la progestérone et les androgènes (Société Canadienne du Cancer, 2018).

1.2.3 Le diagnostic

Les diagnostics permettent de définir le stade de développement du cancer de l'ovaire. Les symptômes de cancer de l'ovaire restent longtemps 'silencieux' dans le corps et ils ne se manifestent qu'à un stade avancé. Le stade du cancer dépend de la taille de la tumeur et de son degré de propagation dans l'organisme. Les symptômes du cancer de l'ovaire sont de différents types et incluent les troubles digestifs, les nausées, la constipation, la perte d'appétit, la perte de poids, des douleurs à l'estomac, les troubles gynécologiques comme une perturbation des règles, les tensions dans les seins ou les pertes vaginales anormales. Les perturbations locales associées à la masse tumorale sont, notamment, l'augmentation du volume de l'abdomen et les pertes

urinaires (McGuire *et al.*, 2003). Ces symptômes peuvent être causés par une autre maladie, aucun de ces symptômes n'est spécifique (Société Canadienne du Cancer, 2018).

Certains marqueurs tumoraux sont étudiés afin d'évaluer la progression du cancer de l'ovaire. Ils se trouvent en concentration élevée dans le sang quand le cancer est présent. Il existe plusieurs biomarqueurs tumoraux potentiels, comme l'alpha-fœtoprotéine (AFP), l'antigène tumoral 125 (CA 125), l'antigène tumoral 15-3 (CA 15-3), l'antigène carbohydrate 19-9 (CA 19-9), l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), la gonadotrophine chorionique humaine (HCG ou BHCG) et l'antigène prostatique spécifique (APS) (Cloven *et al.*, 2004; Davidson *et al.*, 2014; Ozols, 2003). La présence de ces marqueurs ne peut être considérée comme un diagnostic de cancer et les résultats des analyses doivent être combinés avec d'autres examens tels que l'examen physique, l'échographie, l'examen d'imagerie et d'autres analyses.

1.2.4 Les traitements

Les traitements du cancer de l'ovaire font essentiellement appel à la chirurgie et à la chimiothérapie (Dauplat *et al.*, 2000). Lorsque la maladie est très avancée, la chimiothérapie est généralement combinée à la chirurgie. Les chirurgiens décident d'enlever les tumeurs en fonction de plusieurs facteurs comme le stade du cancer et l'âge de la femme (femme planifiant des grossesses, femme ménopausée) (McGuire *et al.*, 2003). Une chimiothérapie peut être utilisée en complément à la chirurgie afin de réduire la masse tumorale pour faciliter la chirurgie. Les platines (carboplatine ou cisplatine) et les taxanes sont les médicaments les plus utilisés en chimiothérapie pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (Armstrong *et al.*, 2006; McGuire *et al.*, 2003; Vasey, 2003). Le cisplatine est l'un des agents chimiothérapeutiques les plus efficaces et les plus utilisés dans le traitement du cancer de l'ovaire (Marzano *et al.*,

2007). On pense que la mort cellulaire induite par le cisplatine inhibe la réplication et la transcription de l'ADN (Siomek *et al.*, 2006). D'autres approches thérapeutiques seront utilisées si le cancer de l'ovaire réapparaît moins de 6 mois après la fin du traitement. Il s'agit des médicaments suivants : topotécan, gemcitabine, paclitaxel et cyclophosphamide (Société Canadienne du Cancer, 2018).

1.2.5 La chimiorésistance

Les mécanismes exacts de la chimiorésistance et de la formation des métastases du cancer de l'ovaire ne sont pas encore clairs (Deng *et al.*, 2016). La chimiorésistance limite le succès d'un traitement thérapeutique dans le cancer de l'ovaire. La chimiorésistance est le principal défi dans le traitement du cancer de l'ovaire. Comprendre les mécanismes de la chimiorésistance dans le cancer de l'ovaire aiderait à prédire la progression de la maladie, à développer de nouveaux traitements et à personnaliser le traitement systémique (Davidson *et al.*, 2014).

Les mécanismes moléculaires de la chimiorésistance incluent les éléments suivants : des protéines membranaires (pompes), des gènes suppresseurs de tumeur, l'altération mitochondriale, la réparation de l'ADN, l'autophagie et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Deng *et al.*, 2016). Des études préliminaires démontrent qu'il existe une relation étroite entre la TEM et la chimiorésistance dans le cancer de l'ovaire (Cornelison *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2016).

Les cellules cancéreuses qui n'ont pas été éliminées par la chimiothérapie peuvent subir des modifications dans leur génome, des mutations ou des modifications de la cible des médicaments qui les rendent résistantes aux traitements (Fraser *et al.*, 2003). L'efficacité des médicaments chimiothérapeutiques détermine la réponse des cellules

cancéreuses aux signaux de mort cellulaire. Ainsi, la modulation des facteurs et gènes pro-apoptotiques et des gènes anti-apoptotiques pourrait rendre une cellule cancéreuse sensible à la chimiothérapie (Figure 1.3). La chimiorésistance peut impliquer certains événements des voies de survie (AKT et PI3K, MAPK, EGFR, mTOR) et des suppresseurs de tumeurs (P53) (Bast *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2016; See *et al.*, 2003). Les voies de survie jouent un rôle majeur dans les mécanismes de chimiorésistance des cancers de l’ovaire. Dans ce type de cancer, la surexpression de AKT est, en partie, la cause de résistance des cellules cancéreuses de l’ovaire au paclitaxel et au cisplatine (Deng *et al.*, 2016; Zheng, 2017). P53 est un suppresseur de tumeur bien connu, impliqué dans le développement de la résistance observée en relation avec la voie PI3K / AKT dans les cancers de l’ovaire (Deng *et al.*, 2016). En effet, il a été démontré que p53 peut inhiber l’activité de la PI3K et, par conséquent, de l’AKT (Bast *et al.*, 2009; Zheng, 2017).

La MAPK est une autre voie de survie à considérer dans les cancers de l’ovaire. Elle est constituée de cascades de phosphorylation impliquant plusieurs protéines kinases, qui peuvent être activées par divers stimuli, notamment, des facteurs de croissance ou un stress génotoxique (Appella *et al.*, 2001). Dans le cancer de l’ovaire, une diminution de l’activité de MAPK dans les cascades JNK et p-38 a été associée à des modèles de cancers résistants au platine (See *et al.*, 2003). En fait, la chimiorésistance associée à AKT dans le cancer de l’ovaire est liée à l’incapacité du cisplatine d’activer JNK et p-38 à induire l’apoptose (Mansouri *et al.*, 2003).

bas de p53, malgré la présence de cisplatine. De plus, le cisplatine ne parvient pas à réguler négativement Xiap, ainsi qu'un état actif de la voie PI3K/AKT. De plus, la liaison de TNFR2 par TNF α conduit à une régulation positive de FLIP par la voie NF κ B, inhibant ainsi les actions pro-apoptotiques de la cytokine par TNFR1. C'est suite à un défaut d'activation de la cascade de la caspase, en réponse à l'agent chimiothérapeutique, que ces cellules ont perdu leur capacité à subir l'apoptose et sont donc devenues chimiorésistantes (Fraser *et al.*, 2003).

1.3 La métastase et l'invasion

Les métastases causent 90% des décès liés au cancer chez les patients. Les métastases altèrent plusieurs fonctions vitales à la fois en se développant au niveau de plusieurs organes en même temps. On conclut que le cancer métastatique est plus dangereux par rapport au cancer qui ne touche qu'un seul organe (futura-sciences Grégory Ségala ; 2012).

La formation de métastases est un processus complexe composé d'étapes au cours desquelles des cellules cancéreuses se détachent du site original et migrent vers d'autres parties du corps par le système lymphatique ou par le système sanguin. Pour ce faire, des cellules cancéreuses se séparent de la tumeur primaire et s'attachent aux protéines qui composent la matrice extracellulaire (MEC). En dégradant cette MEC, elles peuvent s'évader vers des sites distants (Gassmann *et al.*, 2008).

Les mécanismes de métastases ont été classés en différentes étapes commençant par l'intravasation, l'extravasation et la colonisation (Gassmann *et al.*, 2008). L'intravasation est l'entrée des cellules cancéreuses dans les vaisseaux sanguins. Les cellules cancéreuses dégradent la paroi d'un vaisseau sanguin pour qu'elles puissent y entrer. L'extravasation est le passage de produits intraveineux d'un vaisseau

sanguin vers les tissus environnants. La prolifération est limitée, car les cellules ne sont pas adaptées à leur nouvel environnement (Figure 1.4). La colonisation est un processus de formation de la métastase. Dans ce processus, les cellules cancéreuses doivent s'adapter au nouveau tissu. Ce nouvel environnement n'est pas favorable à la croissance tumorale et les cellules cancéreuses métastatiques forment une petite tumeur invisible appelée une micrométastase (Grégory Ségala, 2012) (Figure 1.4). L'invasion fait référence à l'extension et à la pénétration directe de cellules cancéreuses dans les tissus voisins. L'augmentation progressive de la taille de la tumeur et la prolifération de cellules transformées entraînent une coupure dans les barrières séparant les tissus, entraînant une extension de la tumeur dans les tissus adjacents (Gassmann *et al.*, 2008).

Plusieurs enzymes protéolytiques sont activées lors de l'invasion tumorale tels les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Nagase *et al.*, 2006). Les MMPs sont responsables de la majorité de la protéolyse matricielle, et agissent comme des molécules régulatrices dans le développement tumoral et dans l'angiogénèse (Van den Steen *et al.*, 2002).

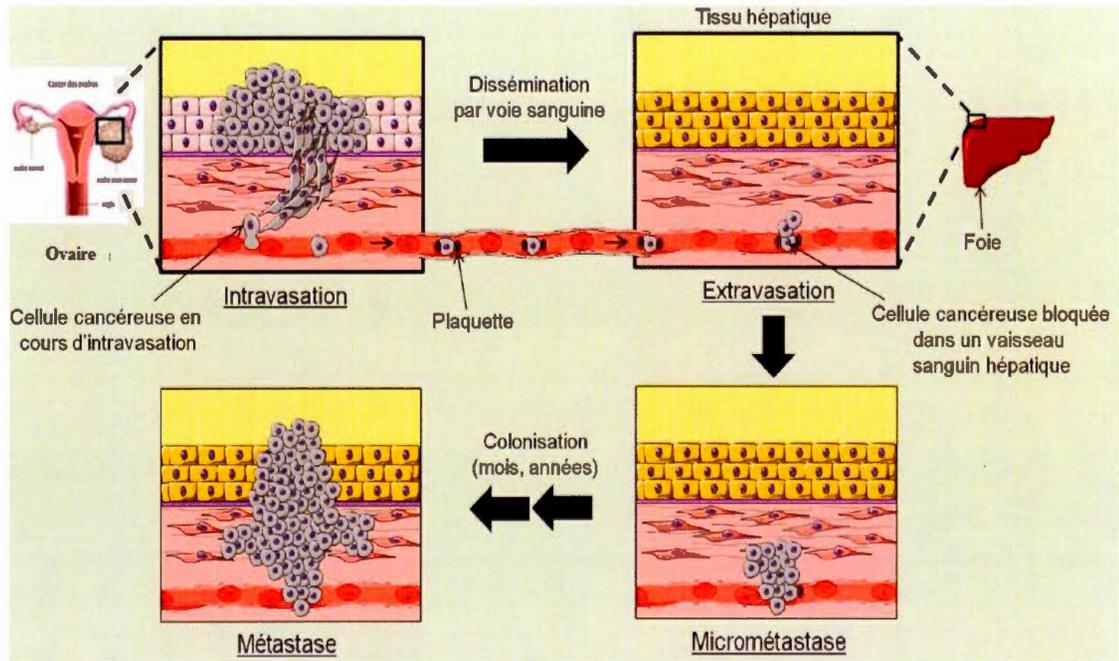


Figure 1.4 Le processus métastatique. Les cellules cancéreuses de l’ovaire se détachent de la tumeur primaire, puis entrent dans la circulation sanguine par intravasation. Par après, les cellules cancéreuses vont se diriger vers un organe cible et y proliférer, puis passent par extravasation vers le tissu, le foie dans la Figure, pour former des micrométastases. Dans les micrométastases, la prolifération est limitée, car les cellules cancéreuses doivent s’adapter à leur nouvel environnement. Lorsque les cellules cancéreuses s’y adaptent, elles peuvent alors former une métastase. Adapté de (Grégory Ségala, 2012).

1.4 L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (la néo-vascularisation) (Folkman, 2002). Cette néo-vascularisation est un processus physiologique que l'on retrouve lors du développement embryonnaire, le renouvellement tissulaire et la croissance de l'endomètre (Pepper *et al.*, 2000). Elle est induite par différents facteurs simultanés tels l'inflammation, l'hypoxie, la croissance des tumeurs malignes et les métastases (Lamalice *et al.*, 2007). L'angiogenèse tumorale est contrôlée par différents facteurs tels que les cytokines et la MEC (Folkman, 2002). L'angiogenèse joue un rôle majeur dans le processus métastatique ainsi que dans le développement de tumeurs solides.

1.4.1 L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale est un processus impliquant des interactions entre les cellules endothéliales et leur microenvironnement, et une régulation des facteurs de croissance et cytokines tels le TNF- α et TGF- β (Berse *et al.*, 1999). L'angiogenèse est régulée par différents facteurs activateurs et inhibiteurs produits par les cellules saines et tumorales. Lors d'une déstabilisation de l'équilibre angiogénique, les cellules cancéreuses augmentent l'expression des facteurs pro-angiogéniques comme les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), et diminuent l'expression d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse tels l'interféron- β ou la thrombospondine-1 (Hanahan *et al.*, 2000). Tout ce processus s'appelle le «switch» angiogénique (Hanahan *et al.*, 1996).

L'angiogenèse tumorale s'effectue en quelques étapes clés. D'abord, les cellules du microenvironnement tumoral induisent le développement et la croissance des cellules endothéliales vasculaires et dégradent les composantes de la MEC par des facteurs pro-angiogéniques (Folkman, 2002; Hanahan *et al.*, 1996). Puis, les MMPs induisent la dégradation de la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales migrent dans la MEC vers les stimuli angiogéniques. Elles prolifèrent et forment des structures en tube (tubulogenèse) afin de se réorganiser en nouveaux capillaires sanguins (De Rossi *et al.*, 2014). La plupart des tumeurs solides demeurent dormantes jusqu'à un volume de 1 mm³ même pendant des décennies (Folkman, 2002).

1.5 La transition épithélio-mésenchymateuse

Les deux principaux types tissulaires qui vont nous intéresser dans les processus métastatiques sont le tissu mésenchymateux (ou mésenchyme) et le tissu épithélial (ou épithélium). La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) convertit le passage d'un groupe de cellules épithéliales à une forme mésenchymateuse (Katsuno *et al.*, 2013). La TEM est un processus qui modifie la forme et le mouvement des cellules. Ainsi, les cellules épithéliales acquièrent les caractéristiques des cellules mésenchymateuses. Le processus de la TEM est important pour la progression des tumeurs et des métastases (Takebe *et al.*, 2011). La TEM est un événement pathogénique bien décrit dans la progression du cancer et le développement des métastases. Dans les cellules mammaires de souris, il a été démontré que la TEM se produisait avant l'acquisition d'un phénotype invasif métastatique (Martin *et al.*, 2005). Différents inducteurs de TEM ont été identifiés, y compris TGF- β , TNF- α , IL-6 et les voies de signalisation moléculaires de Wnt, Notch et Hedgehog (Ricciardi *et al.*, 2015). Tous ces stimuli induisent la TEM en régulant l'augmentation des facteurs de transcription tels que

Snail, Slug et Twist, les protéines matricielles, Fibronectine et Vimentine (Ricciardi *et al.*, 2015).

Les réponses inflammatoires jouent aussi un rôle important à toutes les étapes du développement de la tumeur, telles que l'initiation, la promotion et la métastase. De plus, l'inflammation a récemment été considérée comme un inducteur clé de la TEM au cours de la progression du cancer (Ricciardi *et al.*, 2015). Pour cette raison, la TEM est prise en compte dans le lien entre l'inflammation et le cancer par les modifications micro-environnementales capables de réguler la progression tumorale. Il faut mentionner que, suite à la TEM induite par l'inflammation, les mécanismes inhibiteurs répondent différemment selon les lignées de cellules cancéreuses (Ricciardi *et al.*, 2015). Par exemple, les cellules MCF-7, dérivées du cancer du sein, sont capables d'affecter la prolifération des cellules lymphocytes tueuses naturelles (NK), sans induire l'apoptose, elles altèrent de manière significative les fonctions des cellules B en réduisant leur viabilité et leur prolifération, elles génèrent des cellules régulatrices B et inhibent la réponse des cellules T par des effets pro-apoptotiques, sans modification du taux de prolifération et d'induction de cellules régulatrices T. En revanche, les cellules A549, dérivées d'un adénocarcinome du poumon, semblent influencer les réactions immunitaires, principalement en réduisant la viabilité et la prolifération des cellules NK et inhibent la prolifération des lymphocytes T, sans induction significative de lymphocytes B et T régulateurs. Enfin, les cellules HepG2 d'un hépatocarcinome entravent clairement les fonctions des cellules T en inhibant la survie et en les induisant. Cependant, elles ont des effets opposés sur les cellules NK, en induisant à la fois l'apoptose et la prolifération cellulaire, et sur les cellules B, sélectionnant ainsi probablement certains sous-ensembles de cellules NK et B qui pourraient être déterminants pour la survie des cellules HepG2 (Tableau 1.1) (Ricciardi *et al.*, 2015). L'apparition d'une TEM à la suite d'une inflammation provoque de multiples effets immunitaires de régulation dans les cellules cancéreuses, ce qui entraîne une apoptose ainsi qu'une inhibition de la prolifération des lymphocytes (Chae *et al.*, 2018).

Résumé des effets des lignées de cellules cancéreuses après la TEM avec les cellules effectrices immunitaires

Ligne cellulaire	cellules NK		cellules B		cellules T	
	Viabilité	Prolifération	Viabilité	Prolifération	Viabilité	Prolifération
A549 (lung)	↓	↓	=	=	=	↓
MCF7 (breast)	=	↓	↓	↓	↓	=
HEPG2 (liver)	↓	=	=	↑	↓	=

Tableau 1.1 Abréviations: TEM = transition épithéliale-mésenchymateuse; NK = tueur naturel; ↓ = régulé négativement; ↑ = régulé à la hausse; '=' = inchangé (adapté de Ricciardi *et al.*, 2015).

1.5.1 Les facteurs de transcription Snail, Slug et Twist

Slug, Snail et Twist sont des facteurs de transcription impliqués dans le déclenchement de la TEM et dans la régulation de l'expression des suppresseurs de tumeurs tels que l'E-cadhérine (Martin *et al.*, 2005). Il a été montré que Snail réprime E-cadhérine et est associé à une meilleure chance de survie chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (Blechschmidt *et al.*, 2008). Snail et Slug sont conservés parmi les espèces au cours de l'évolution. Les facteurs de transcription Snail et Slug ont été signalés comme étant importants dans la migration cellulaire au cours du développement ainsi que lors de la métastase tumorale (Kurrey *et al.*, 2005). Ils encodent des facteurs de transcription exprimés à différents stades de développement dans différents tissus. Ces facteurs de transcription sont nécessaires à la gastrulation et à la formation du mésoderme et

interviennent dans des fonctions biologiques, telles que la différenciation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Martin *et al.*, 2005).

Snail a été décrit pour la première fois chez *Drosophila melanogaster*, où il s'avérait essentiel pour la formation du mésoderme (Wang *et al.*, 2013). L'expression de Snail a été démontrée dans les tumeurs humaines primaires, avec une corrélation entre l'expression de Snail et une réduction ou l'absence d'expression de l'E-cadhérine dans plusieurs tumeurs (Martin *et al.*, 2005). L'expression de Snail est en corrélation inverse avec le degré de différenciation des tumeurs. Le niveau d'expression et la localisation nucléaire de Snail étaient en corrélation avec l'expression de l'E-cadhérine et prédisaient le pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (Wang *et al.*, 2013). Les recherches précédentes ont conclu que Snail est localisé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des tumeurs ovariennes à un stade précoce, il est exclusivement localisé dans le noyau des tumeurs à un stade avancé et dans les lésions métastatiques (Jin *et al.*, 2010). Le niveau d'expression et la localisation nucléaire de Snail étaient inversement corrélés à l'expression de l'E-cadhérine. Ces informations confirment que l'activité de Snail est régulée à la fois par la stabilité de la protéine et par sa localisation cellulaire (Jin *et al.*, 2010). Il y a plusieurs informations sur le rôle de Snail dans la régulation des métastases du cancer de l'ovaire. Une étude démontre que l'activité des MMPs est cruciale pour la métastase médiée par Snail dans le cancer de l'ovaire (Jin *et al.*, 2010). La capacité des cellules cancéreuses à envahir les tissus hôtes et à établir des lésions métastatiques distantes nécessite la perturbation de l'architecture tissulaire et la modulation des contacts cellule-matrice et cellule-cellule. Ces résultats suggèrent que Snail joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité protéolytique des MMPs pendant l'invasion et la métastase (Jin *et al.*, 2010).

Il a été démontré que Slug peut agir à la fois comme un oncogène ou un suppresseur de tumeur dans différents cancers (N. Cui *et al.*, 2016). L'expression de Slug est augmentée dans les tumeurs (Martin *et al.*, 2005). L'expression de Slug régule une étape

initiale et est essentielle durant le processus de la TEM. De plus, l'expression de Slug est réduite dans les tumeurs lobulaires par rapport aux tumeurs canalaire ou aux tumeurs d'autres types (Martin *et al.*, 2005). Ces résultats sont différents de Snail, même si les deux sont des facteurs de transcription de la même famille (Martin *et al.*, 2005). De plus, il a été suggéré que Snail et Slug soient impliqués dans l'acquisition de la résistance à l'apoptose, favorisant ainsi la survie de la tumeur (Kurrey *et al.*, 2005).

Twist peut être impliqué dans la régulation négative de la différenciation de plusieurs lignées cellulaires, notamment durant la neurogenèse, la myogenèse et l'ostéogenèse (Martin *et al.*, 2005). Twist peut contribuer à la métastase en favorisant la TEM. Twist est capable d'inhiber la mort cellulaire dépendante de p53, il est donc connu comme un facteur anti-apoptotique (Martin *et al.*, 2005). Twist est également connu pour déclencher la TEM, en régulant éventuellement le switch E à N-cadhérine au cours de la TEM. L'expression de Twist est associée à une résistance cellulaire au paclitaxel, mais pas à d'autres médicaments (Martin *et al.*, 2005). De même, il a été observé que le cisplatine induisait l'expression de Twist accompagné par une migration cellulaire (Latifi *et al.*, 2011). Cela suggère ainsi qu'une stratégie thérapeutique puisse être développée pour surmonter la résistance acquise par une régulation de l'expression de Twist dans le cancer (Martin *et al.*, 2005). Donc, les marqueurs TEM et les facteurs de transcription sont en corrélation avec la chimiorésistance du cancer de l'ovaire (Deng *et al.*, 2016). Ces données confirment le rôle important joué par la TEM dans la progression de cancer de l'ovaire (Deng *et al.*, 2016). Les recherches préliminaires indiquent que le ciblage de la TEM est un nouveau domaine de recherche en développement et qu'il est prometteur pour contrer la chimiorésistance du cancer de l'ovaire (Deng *et al.*, 2016).

1.6 Les cytokines

1.6.1 Définition

Les cytokines sont un groupe important de protéines, peptides ou glycoprotéines sécrétés par des cellules spécifiques du système immunitaire (J. M. Zhang *et al.*, 2007). Les cytokines sont une catégorie de molécules de signalisation qui assurent la régulation de l'immunité, de l'inflammation et de l'hématopoïèse (Artlett, 2018; Dinarello, 2006; J. M. Zhang *et al.*, 2007). Les cytokines, selon leurs fonctions biologiques, se divisent en plusieurs grandes familles telles les interleukines, les chimiokines, les facteurs stimulant les colonies (CSF), les interférons et les familles des facteurs de croissance transformant (TGF) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) (Lippitz, 2013). Les familles de cytokines contiennent également d'importantes paires de récepteurs et de ligands régulateurs de la membrane cellulaire. Les cytokines agissent sur leurs cellules cibles en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques et par la suite régulent différentes l'expression de gènes, et régulent également différentes voies de signalisation (Goldsby *et al.*, 2003). Les récepteurs de cytokines sont divisés en plusieurs familles tels: les récepteurs de cytokines de type I, les récepteurs de cytokines de type II, les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines, les récepteurs des TNF qui contiennent des cytokines immunorégulatrices, y compris TNF- α , les lymphotoxines et des ligands cellulaires, tels que CD40L, qui intervient dans l'activation des lymphocytes T et B, et tel que CD95, qui favorise l'apoptose, les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs IL-17 et les récepteurs des TGF- β (Nicolini *et al.*, 2006; Ozaktay *et al.*, 2006; Rochman *et al.*, 2009; Tato *et al.*, 2008). Ainsi, les cytokines jouent un rôle important dans l'adhésion entre les cellules et régulent plusieurs fonctions biologiques telles la prolifération, le chimiotactisme, la différenciation, la survie et la mort cellulaire (Tato *et al.*, 2008).

1.6.2 Le rôle des cytokines dans le cancer

Les cytokines produites dans le microenvironnement tumoral jouent un rôle important dans la pathogénèse du cancer. Les cytokines libérées en réponse à l'inflammation, à l'infection et à l'immunité peuvent inhiber la progression du cancer en activant les cellules (tueur naturel) NK et les lymphocytes T (Germano *et al.*, 2008). Les conditions inflammatoires dans certains tissus augmentent le risque de cancer. D'autres cytokines, sécrétées dans le microenvironnement de la tumeur par les cellules cancéreuses favorisent les métastases, l'angiogenèse, la modification de la réponse aux hormones et aux agents chimiothérapeutiques (Dranoff, 2004).

Le facteur de nécrose tumoral alpha (TNF- α) est une molécule causant la nécrose tumorale (Carswell *et al.*, 1975). Le TNF- α est principalement produit par les macrophages, les lymphocytes T et les monocytes, mais plusieurs autres types cellulaires peuvent aussi le synthétiser (Chu, 2013; Zelova *et al.*, 2013). Le TNF- α joue un rôle dans les fonctions physiologiques normales, mais aussi dans les processus d'inflammation, dans les maladies auto-immunes et dans l'inflammation associée au cancer (Chu, 2013). Des études sur le TNF ont fourni une preuve précoce d'une fonction pro-tumorale des cytokines inflammatoires (Germano *et al.*, 2008). La progression tumorale médiée par le TNF peut impliquer différentes voies telles un effet direct sur les cellules tumorales à faible concentration de cette cytokine; une interaction avec le système de chimiokines avec induction de C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4); ainsi qu'une stimulation de la TEM (Lippitz, 2013). Ces découvertes ont constitué la base nécessaire au développement de protocoles cliniques utilisant des antagonistes du TNF dans le traitement du cancer (Germano *et al.*, 2008).

Cytokine pro-inflammatoire interleukine-6 (IL-6) établie comme une cytokine immunorégulatrice clé dans cancer de l'ovaire (Nicolini *et al.*, 2006). Il a été démontré que l'IL-6 active les voies de signalisation, qui conduisent à la prolifération tumorale, la plus étudiée étant la voie Janus kinase (JAK) et STAT3 (Browning *et al.*, 2018). L'activation JAK/STAT, induite par l'IL-6, conduit à l'activation constitutive de STAT3, corrélée à l'augmentation de la croissance des cellules tumorales et à la résistance à la chimiothérapie. Il a également été démontré que l'IL-6 était un déclencheur de la TEM (Browning *et al.*, 2018). Le microenvironnement tumoral est généralement caractérisé par une concentration élevée de cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- β . L'IL-23, IL-1 et les chimiokines favorisent la métastase et l'invasion (Nicolini *et al.*, 2006) (Figure 1.5).

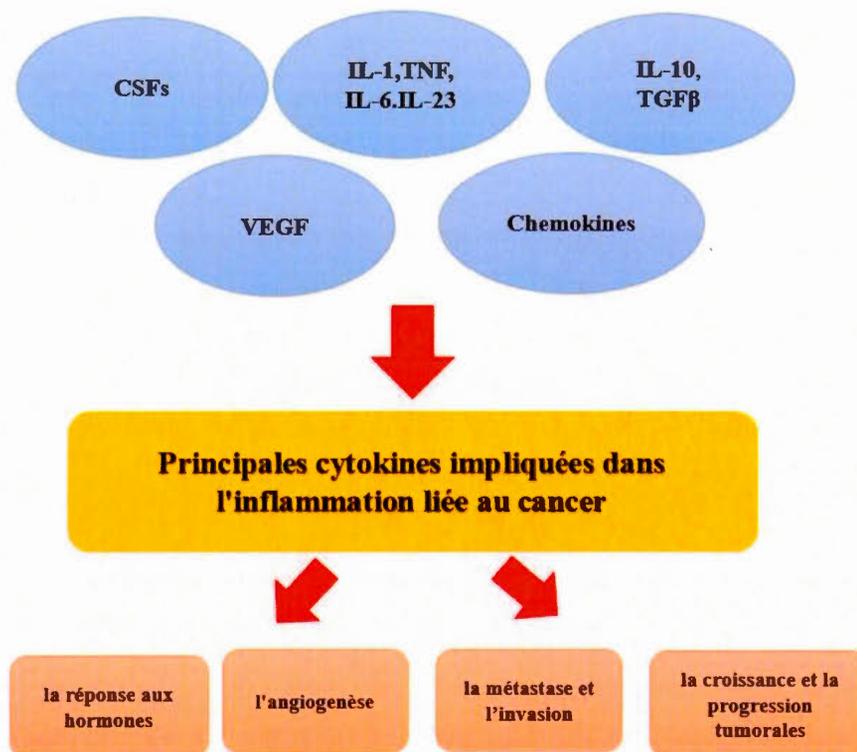


Figure 1.5 Cytokines impliquées dans l'inflammation liée au cancer

1.7 Le facteur de croissance transformant-bêta

Le facteur de croissance transformant-bêta (TGF- β) est une cytokine s'exprimant dans tous les tissus mais qui est aussi produite par les lymphocytes, les monocytes et les macrophages (Assoian *et al.*, 1987; Kehrl *et al.*, 1986; Wahl *et al.*, 1987). Le TGF- β contrôle la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire directe, jouant ainsi un rôle clé dans le développement tumoral, dans la migration, dans la métastase, dans la sécrétion d'hormones et dans la fonction immunitaire (Xu *et al.*, 2015). Chez l'humain, il y a 3 isoformes de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 qui sont codées

par différents gènes mais dont la fonction principale s'exerce via la même voie de signalisation. Le TGF- β 1 est la forme la plus courante dans les tumeurs (Katz *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2001).

1.7.1 Les récepteurs du TGF- β

Le TGF- β se lie à deux récepteurs spécifiques, TGF β R1 et TGF β R2, qui ont des affinités similaires avec les ligands, mais qui travaillent indépendamment (Miyazono, 2009). Tout d'abord, le TGF- β se lie au TGF β R2, puis le TGF β R1 est recruté au complexe et est phosphorylé par TGF β R2 (Zhu *et al.*, 2001). Par la suite, Smad2 et Smad3 sont recrutés au complexe, activés, et deviennent un complexe hétérotrimère avec Smad4, et se transloquent ensuite au noyau pour réguler la transcription des gènes cibles du TGF- β (Attisano *et al.*, 2002) (Figure 1.6).

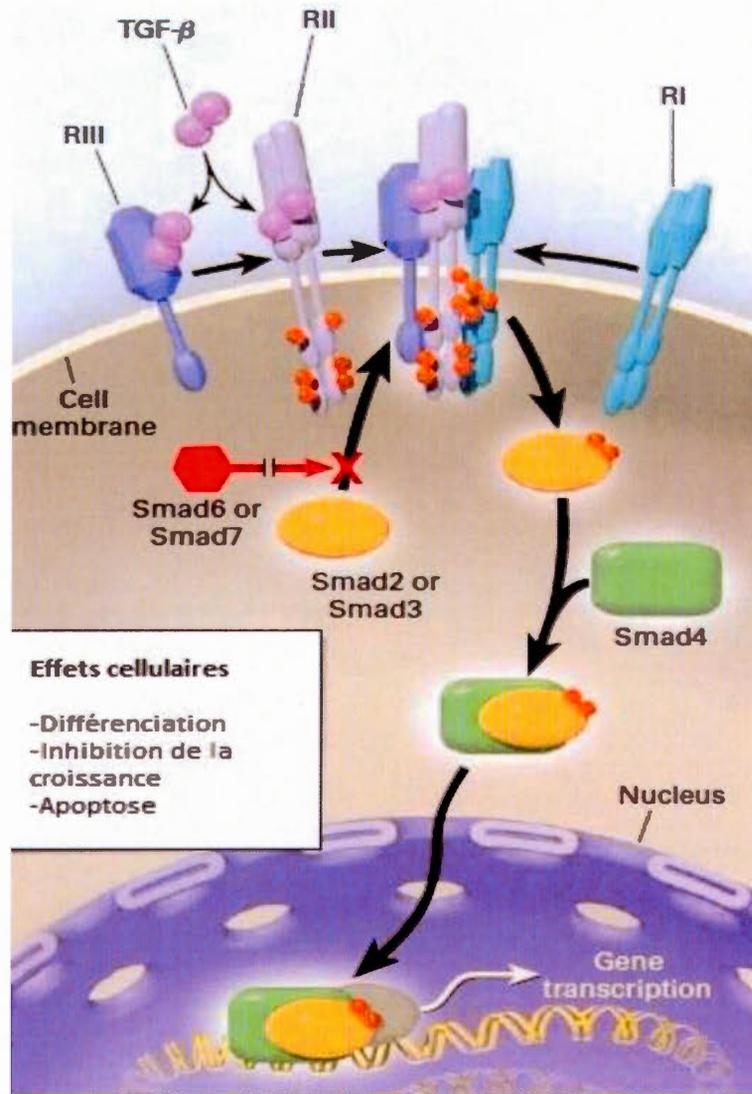


Figure 1.6 Les récepteurs du TGF- β . Dans l'espace extracellulaire, le TGF- β se lie soit au récepteur de type III (RIII) ou directement au récepteur de type II (RII) sur la membrane cellulaire. La liaison de TGF- β à RII conduit alors à la liaison du récepteur de type I (RI) au complexe et à la phosphorylation de RI (en rouge dans la figure). Cette phosphorylation active la protéine kinase RI, qui phosphoryle ensuite le facteur de transcription Smad2 ou Smad3. Smad2 ou Smad3 phosphorylés se lie à Smad4, le Smad commun et le complexe résultant passe du cytoplasme au noyau. Dans le noyau,

le complexe Smad interagit avec d'autres facteurs de transcription (en gris dans la figure) pour réguler la transcription des gènes sensibles au TGF- β . Smad6 et Smad7 inhibiteurs, normalement phosphorylés par RI, interfèrent donc avec la phosphorylation de Smad2 ou Smad3 par RI (Blobe *et al.*, 2000).

D'autres voies de signalisation peuvent être activées par le TGF- β tels : des MAPK p38, JNK et ERK et de la PI-3K (Yu *et al.*, 2002). Le rôle de ces différentes voies de signalisation dans la modification des réponses cellulaires au TGF- β est en cours et peu étudié (Yu *et al.*, 2002).

1.7.2 Le TGF- β comme cible thérapeutique

Le TGF- β peut avoir deux effets complètement opposés. Dans la première étape du développement tumoral, il agit comme suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire, en induisant l'inhibiteur CDK (*Cyclin-dependent kinases*) et en générant l'apoptose (Y. Zhang *et al.*, 2017). Dans le cas contraire, dans les stades tardifs du développement tumoral, le TGF- β devient un facteur pro-oncogénique et lorsque les cellules épithéliales deviennent résistantes à l'action inhibitrice du TGF- β , ce dernier peut induire la TEM et par la suite la migration et l'angiogenèse (Shao *et al.*, 2018).

La voie du TGF- β constitue une cible parfaite pour contrer la progression tumorale. Pour cela, il y a plusieurs approches thérapeutiques qui ont été développées afin d'inhiber la signalisation induite par le TGF- β (de Gramont *et al.*, 2017). Il existe plusieurs groupes d'inhibiteurs de TGF- β : les protéines qui ciblent T β RII-Fc, l'anticorps neutralisant de TGF- β (Fresolimumab), les antagonistes naturels comme la décorine (Akhurst, 2002; Bewersdorf *et al.*, 2019; Reid *et al.*, 2017) et certains vaccins (Vigil) (de Gramont *et al.*, 2017). Il a été montré que l'effet anti-cancéreux des

médicament chimiopréventives comme le tamoxifène est associé à leur capacité à induire la production et l'activation du TGF- β dans les cellules épithéliales (Brandt *et al.*, 2003).

La prolifération dérégulée et la tumorigenèse surviennent suite à un dysfonctionnement de la régulation du cycle cellulaire (Golias *et al.*, 2004). Dans la plupart des cellules épithéliales et endothéliales, le TGF- β est un fort inhibiteur de la prolifération cellulaire (Blobe *et al.*, 2000) (Figure 1.7).

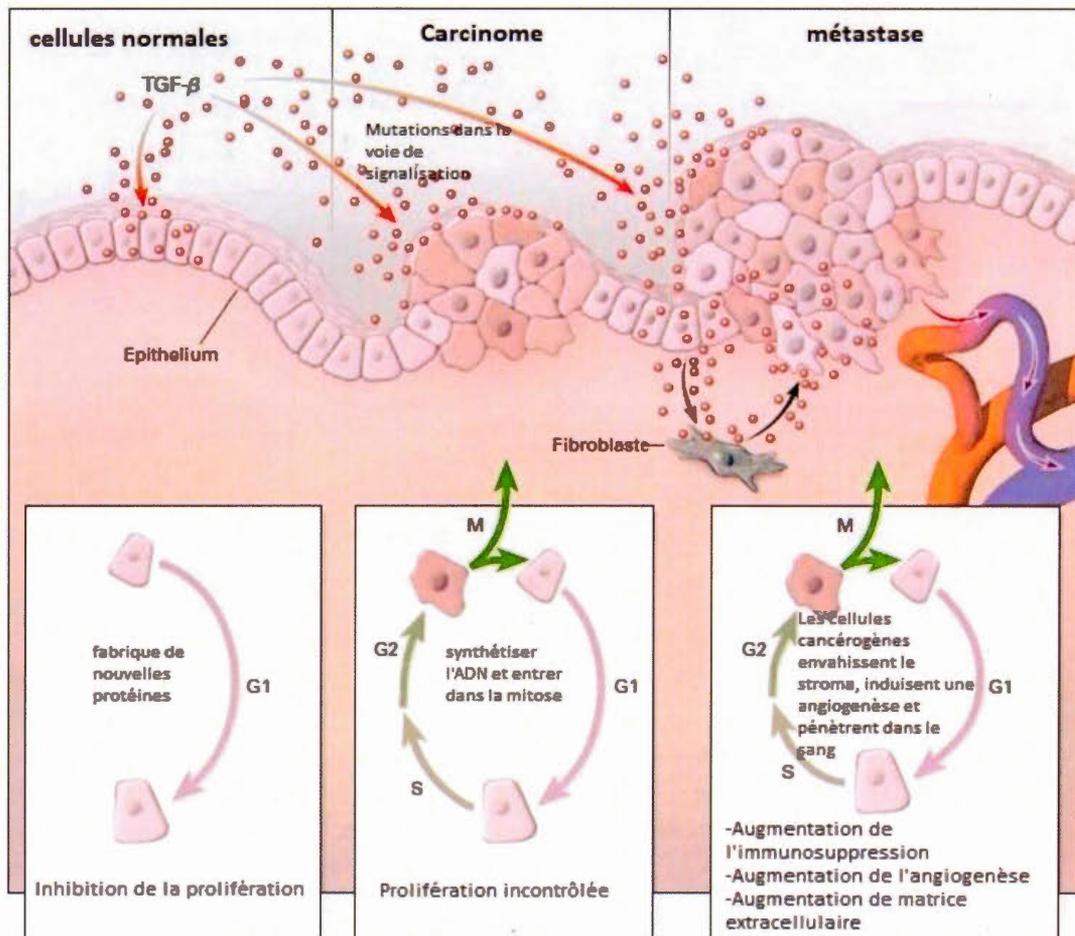


Figure 1.7 Le TGF- β comme cible thérapeutique. Dans les cellules saines, le TGF- β agit en tant que suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire (G1) ou en favorisant la différenciation cellulaire ou l'apoptose. Dans les premiers stades de la tumorigenèse, les divers composants de la voie de signalisation du TGF- β sont mutés, ce qui rend la cellule résistante aux effets du TGF- β . Ces cellules cancéreuses résistantes au TGF- β prolifèrent de manière non régulée, ainsi que les cellules stromales environnantes (fibroblastes), puis augmentent leur production de TGF- β . Donc TGF- β , en agissant sur les cellules stromales environnantes, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et épithéliales, provoque une immunosuppression et une angiogenèse et augmente le caractère invasif de la tumeur (Adapté de Blobel, *et al* 2000).

1.8 Criblage et identification de composés immunomodulateurs

Une équipe de chercheurs de l'Université de Montréal (UdeM) a récemment découvert de nouvelles petites molécules (composés bioactifs) ayant des propriétés antinéoplasiques (Fouda *et al.*, 2017). Ces composés sont aussi des inhibiteurs potentiels de lymphocytes T, car ils ont été identifiés à l'aide d'un essai lymphocytaire basé sur la fluorescence induite suite à l'activation du promoteur Nur77 (modèle de souris transgénique Nur77-GFP) (Au-Yeung *et al.*, 2014; Fouda *et al.*, 2017).

Afin d'identifier ces composés immunomodulateurs, cette équipe a d'abord sacrifié plusieurs souris Nur77GFP femelle pour isoler sa rate. Suite à la génération d'une suspension de splénocytes, les cellules T ont été isolées, puis incubées avec l'IL-7 recombinante en présence de dynabeads (billes artificielles) les CD3/CD28. Cette activation déclenche un signal GFP (signal vert). Douze heures plus tard, les dynabeads sont enlevées avec un aimant, puis les cellules sont transférées dans une plaque de 384 puits (Figure 1.8). Les cellules T sont incubées 24h avec des composés

provenant de la librairie de petites molécules de l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie de l'UdeM (IRIC). Ensuite, les cellules sont analysées bases sur leur niveau de fluorescence (Fouda *et al.*, 2017).

Nur77 est un gène précoce immédiat dont l'expression dans les cellules T est rapidement augmentée par la signalisation du récepteur des cellules T (TCR). Donc, en clonant le gène GFP sous le contrôle du promoteur Nur77, on peut facilement différencier les cellules activées suite à une stimulation de leur TCR (Ashouri *et al.*, 2017). Pour identifier les composés, 4 398 molécules ont été criblées afin d'identifier leur effet inhibiteur sur le signal GFP dans les lymphocytes T (Figure 1.9).

Les signaux GFP ont été mesurés ainsi que les signaux Hoechst. Nous pouvons suivre ce qui se passe dans l'activation des cellules T avec le signal GFP. Nous pouvons suivre la survie cellulaire avec le signal Hoechst. Les deux signaux n'ont pas changé dans 4 383 composés sur les 4 398. En mesurant les deux types de signaux, GFP et Hoechst, quatre groupes de composés, survie, activateur, inhibiteur, apoptose, ont été identifiés selon leurs activités de T (voir la figure 1.9). Lorsque le signal GFP et le signal Hoechst étaient très élevés, on a appelé le composé survie. Lorsque le signal GFP était très élevé (activation de récepteur de cellules T très élevé), mais sans changement dans le signal Hoechst, on a appelé le composé activateur. Lorsque le signal GFP diminuait et que le signal Hoechst ne changeait pas, on a appelé le composé inhibiteur. Lorsque les deux signaux diminuaient, on a appelé le composé apoptose (Figure 1.8). TACIMA-218 appartient au groupe de l'apoptose.

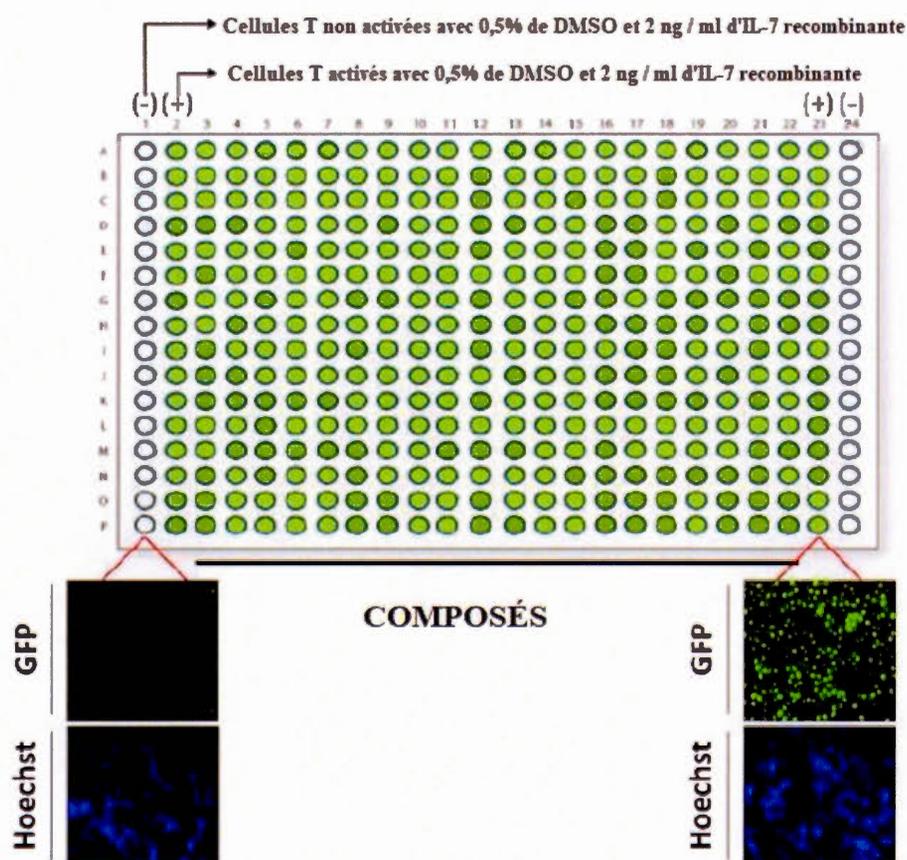


Figure 1.8 Disposition de la plaque de 384 puits. Chaque plaque utilisée dans le test contenait trois groupes. Dans le premier groupe, les puits ont été chargés avec des cellules T non-activées (contrôle négatif pour GFP de chaque côté de la plaque; puits A1-P1 et A24-P24), alors que le second groupe contenait des cellules T activées sans médicament (contrôle positif pour la GFP; puits A2-P2 et A23-P23). Tous les puits restants contenaient des lymphocytes T activés auxquels ont été ajoutés les composés chimiques utilisés. Des exemples des signaux GFP et Hoechst sont présentés pour les lymphocytes T non-activés et activés (Adapté de Fouda *et al.*, 2017).

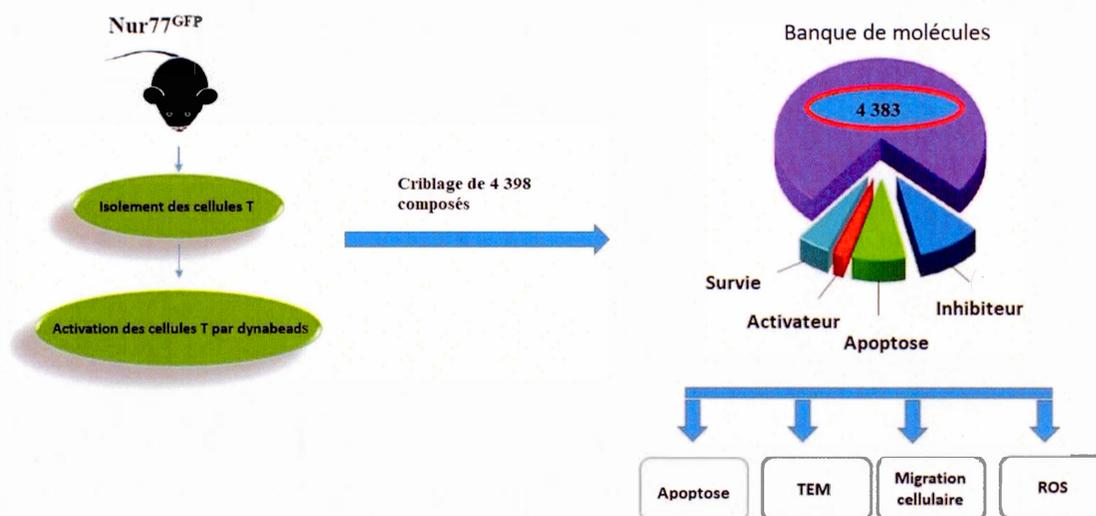


Figure 1.9 Criblage à haut débit de petites molécules à l'aide d'un essai lymphocytaire basé sur la fluorescence. L'expression du gène *Nur77* est régulée lors de la stimulation par le récepteur des cellules T (TCR). Dans le modèle de souris transgénique *Nur77-GFP*, la modification de l'expression de la GFP est reflétée par l'activité du promoteur *Nur77* induite par la stimulation de TCR.

L'impact des molécules immunomodulatrices demeure néanmoins inconnu dans les processus inflammatoires et d'acquisition d'un phénotype invasif ou métastatique via la TEM et l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). La TEM peut être activée dans les cellules cancéreuses par des ROS (Lu *et al.*, 2019). Le mécanisme par lequel le système immunitaire peut affecter la transition des cellules cancéreuses épithéliales en cellules mésenchymateuses est encore méconnu. Cependant, nous savons que certaines cytokines produites par un microenvironnement inflammatoire peuvent favoriser la TEM (Ricciardi *et al.*, 2015). L'un de ces composés, appelé TACIMA-218, présente un effet inhibiteur plus fort que les autres composés dans différentes lignées de cellules cancéreuses (En cours de publication). TACIMA-218 déclenche un effet pro-apoptotique et induit l'accumulation de ROS. Cette

accumulation joue un rôle important dans le cancer et cet aspect est considéré dans le développement de nouvelles molécules antinéoplasiques. Néanmoins, le mécanisme d'action exact demeure inconnu. Par contre, ce processus s'inverse en présence des *N-acetylcysteine* (NAC), de cystéine et de glutathion, un des agents antioxydants les plus efficaces dans les cellules (En cours de publication). Nos résultats préliminaires suggèrent que TACIMA-218 cible les enzymes du métabolisme, en inhibant certaines réactions métaboliques et en bloquant le recyclage des NADH et FADH₂. Ces cofacteurs sont importants, car ils servent comme donneurs de proton pour la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie. En inhibant cette chaîne, le potentiel membranaire de la mitochondrie diminue, ce qui bloque les fonctions et l'intégrité mitochondriale. Ces résultats ont d'importantes implications dans le développement de nouveaux agents anti-cancéreux et serviront à mieux comprendre le mécanisme d'action du composé afin de l'optimiser et de développer de nouveaux agents plus spécifiques et plus puissants.

1.9 Corrélation entre la TEM et le stress oxydatif

Les ROS sont connues pour servir de seconds messagers dans les voies de transduction des signaux intracellulaires dans divers processus cellulaires, notamment l'inflammation, la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer (Z. Wang *et al.*, 2010). De plus, les ROS ont été associés à des métastases tumorales impliquant les processus de migration, d'invasion et d'angiogenèse (Z. Wang *et al.*, 2010). Les ROS, générés en continue à partir de la chaîne respiratoire mitochondriale, comprennent les radicaux superoxydes (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical hydroxyle (OH) et l'oxygène (O). Les NADPH oxydases sont un groupe d'enzymes associées aux membranes plasmiques qui catalysent la production d'O₂⁻ à partir d'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. Les cellules de mammifères possèdent

un système de défense antioxydant efficace, composé principalement d'enzymes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion S-transférase (GST), la catalase et les peroxydases, ainsi que de petites molécules d'antioxydantes, comme le glutathion (GSH), qui peut générer des ROS.

Les ROS peuvent activer diverses voies de signalisation, tels : l'AKT, la protéine kinase B, la MAPK p38, les Rho-GTPases, les cascades Smads, la Ras-Raf-MEK-ERK (kinase régulée par le signal extracellulaire), les transducteurs de signal et les activateurs de la transcription (STAT) et la protéine kinase C (PKC) (Clerkin *et al.*, 2008; Nishikawa, 2008; J. Wang *et al.*, 2008). Les ROS affectent également de nombreuses autres cibles, telles que le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) et la p21 kinase. Un certain nombre de gènes ont été impliqués dans les voies de signalisation médiées par les ROS, notamment les métalloprotéases matricielles (MMPs), les intégrines, l'EGF, l'EGFR, le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), le TGF- β , HIF-1, HGF, les oxydases NADPH, p53, Bcl-2, caspase, etc. (Clerkin *et al.*, 2008; Goetz *et al.*, 2008; Nishikawa, 2008; J. Wang *et al.*, 2008). Le rôle des ROS dans les processus de la TEM ou dans le cancer reste peu connu mais l'implication de la signalisation ROS dans les processus de la TEM a été soulignée. Il a été montré que les ROS jouent un rôle clé dans la TEM induite par TGF- β 1, principalement par l'activation de MAPK p38, puis par l'activation de la voie Smad (Figure 1.10) (Rhyu *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2009; Z. Wang *et al.*, 2010). La plupart des tumeurs, y compris les tumeurs ovariennes, sont exposées à des niveaux élevés de stress oxydatif (van der Wijst *et al.*, 2014).

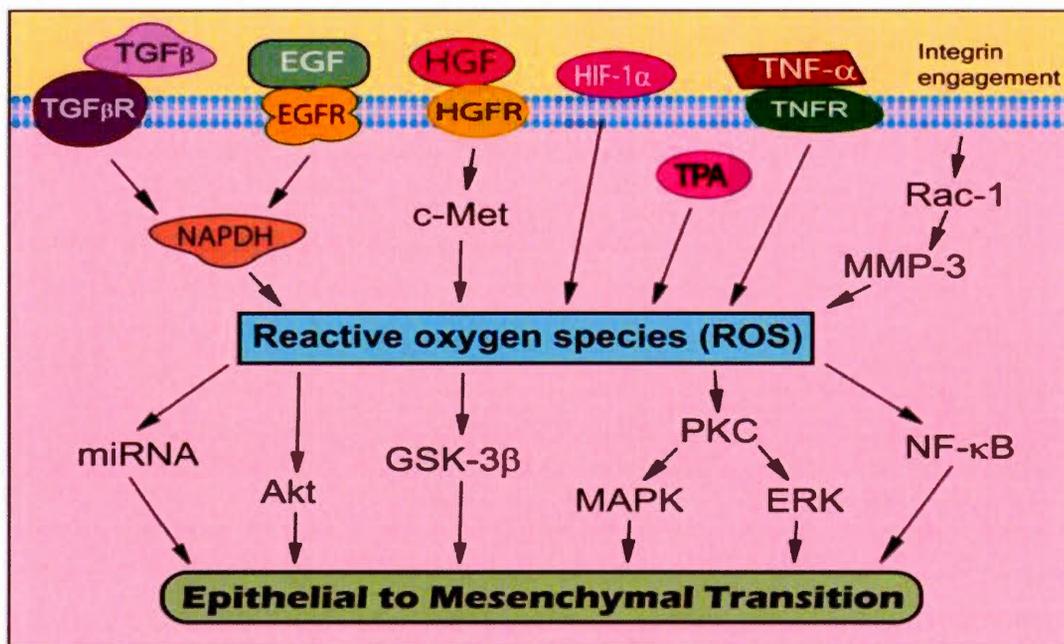


Figure 1.10 Schéma mécanistique montrant comment les ROS peuvent promouvoir la progression de la TEM (Z. Wang *et al.*, 2010).

Les conséquences d'un stress oxydatif à long terme pouvant être dommageables, les cellules disposent de mécanismes de défense importants contre le stress oxydatif, notamment via le facteur de transcription Nrf2 (Kansanen *et al.*, 2012).

Le stress oxydatif active le facteur de transcription antioxydant Nrf2, une protéine *basic leucine zipper* (bZIP) qui régule l'expression des protéines antioxydantes et qui protège, ainsi, des dommages oxydatifs provoqués par l'inflammation. Donc, en réponse au stress oxydatif, les cellules induisent des enzymes qui interceptent les antioxydants. Parmi ces enzymes, l'*Heme oxygenase-1* (HMOX1), la *Thioredoxin reductase-1* (TXNRD1), la *NAD(P) H:quinone oxidoreductase* (NQO1), la *Superoxide dismutase 1/2* (SOD1/2), la *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase* (HPRT) et *Beta-actin* (ACTB) en sont des membres bien connus (X. Cui *et al.*, 2015; Gang *et al.*, 2013;

Guo *et al.*, 2013; H. Lee *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2009; Reichard *et al.*, 2007; Siomek *et al.*, 2006; Visser *et al.*, 2002). Dans la plupart des cancers de l'ovaire, l'activation de Nrf2 a été observée (van der Wijst *et al.*, 2014; van der Wijst *et al.*, 2015). La surexpression de Nrf2 peut promouvoir la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques (van der Wijst *et al.*, 2015) car des niveaux plus élevés d'antioxydants, GSH, ont été trouvés dans les cellules résistantes par rapport aux cellules sensibles (Zeller *et al.*, 1991). Le GSH a été décrit comme un antioxydant important qui facilite la détoxification et l'excrétion de nombreux agents chimiothérapeutiques (Akçay *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2006).

Dans les paragraphes suivants sont décrits les éléments importants associés au stress oxydatif. L'activation de HMOX-1 joue un rôle clé dans la réponse anti-inflammatoire et dans la survie cellulaire. L'induction de HMOX1, provoquée par le stress oxydatif, est suivie par l'activation de Nrf2 (Loboda *et al.*, 2016).

NQO1 est associé à de nombreuses tumeurs solides, notamment celles affectant le carcinome séreux et le carcinome endométrioïde de l'ovaire. NQO1 est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses (Atiomo *et al.*, 2017; X. Cui *et al.*, 2015). Il est bien connu pour réguler la génération de ROS (Gang *et al.*, 2013).

SOD2 agit comme une première ligne de défense contre les dommages oxydatifs mitochondriaux (Miao *et al.*, 2009). Il est pro-tumorigénique et métastatique dans les cancers de l'ovaire. La voie de réponse au stress Nrf2 a été impliquée dans certains de ces changements, notamment l'augmentation de l'expression de SOD2 (Hemachandra *et al.*, 2015).

La cascade de phosphorylation de la voie AKT/GSK-3 β a également été liée à une activité accrue de Nrf2 (Kang *et al.*, 2001; L. Wang *et al.*, 2008). Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer le lien entre l'activité de l'AKT/ SK-3 β et

l'activation de Nrf2. La première explication est que l'AKT1 activé stabilise Nrf2 via sa phosphorylation. L'AKT activé est capable d'inactiver GSK-3 β par phosphorylation (Jain *et al.*, 2007). GSK-3 β est responsable de l'activation et de la translocation nucléaire de Src-A, sous-famille des kinases Src et Fgr, qui sont importantes pour l'exportation nucléaire de Nrf2. Donc, par inactivation de GSK-3 β , AKT peut stimuler l'accumulation nucléaire de Nrf2 (Niture *et al.*, 2017).

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique et hypothèse de recherche

La particularité du cancer ovarien est son caractère « silencieux » qui entraîne, par conséquent, un diagnostic tardif et une inefficacité de la thérapie due à la chimiorésistance. Des traitements comme l'immunothérapie peuvent entraîner une résistance et favoriser la TEM dans certains types de cancer (Chae *et al.*, 2018). Les liens entre la TEM et la réponse immunitaire contre le cancer ne sont encore que partiellement établis, y compris les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses peuvent surmonter des réponses immunitaires spécifiques entraînant leur survie et leur croissance (Ricciardi *et al.*, 2015). Il est important de comprendre les altérations du microenvironnement tumoral médiées par l'infiltration des lymphocytes T au cours de la TEM dans le cancer de l'ovaire. Pour cela, il est essentiel de connaître les mécanismes impliqués dans l'activation de la TEM afin de contrer le développement du cancer de l'ovaire. Malgré l'avancement de nos connaissances, l'aspect immunomodulateur est peu documenté sur des modèles cancéreux. Sur la base des propriétés antinéoplasiques de TACIMA-218 dans différents types de cellules cancéreuses, son rôle au niveau de la TEM n'a jamais été investigué. C'est pourquoi nous formulons ainsi notre hypothèse : Le composé immunomodulateur, TACIMA-218, peut antagoniser l'induction de la TEM, peut induire l'apoptose et inhiber la migration cellulaire dans une lignée cellulaire ES-2 (chimiosensible) et SKOV-3 (chimiorésistante) de cancer ovarien humain.

2.2 Objectifs de recherche

Dans la première partie de notre recherche, nous explorerons les effets de TACIMA-218 sur la TEM induite par le TGF- β dans des modèles de carcinomes ovariens ES-2 et SKOV-3. Nous avons utilisé des marqueurs mésenchymateux pour valider la réponse TEM induite par le TGF- β . Ainsi, nous mesurons l'expression de divers biomarqueurs associés à la TEM: Snail, Twist, Slug par électrophorèse et immunobuvardage de type Western. La survie cellulaire et le stress oxydatif ont aussi été évalués par cytométrie de flux, suivie d'un marquage à l'Annexine-V-PI et APC pour quantifier l'apoptose précoce et les niveaux de ROS. Enfin, la migration cellulaire a été évaluée en temps réel par xCELLigence.

CHAPITRE III

MATERIELS ET METHODES

3.1 Matériels

TACIMA-218 est acheté de Hit-2-leads. Les différentes lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome ovarien (ES-2 et SKOV-3) ont été achetées chez la compagnie ATCC (American Type Culture Collection, QC, Canada). Le TGF- β humain recombinant provenait de R & D Systems (Minneapolis, MN). Le TNF- α était d'EMD Millipore (Gibbstown, NJ). L'anticorps monoclonal anti-Twist1 était de Santa Cruz Biotechnologies. Les anticorps contre Snail, Slug, GRP78, COX-2, GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), Vimentine, β -Catenine, NF κ B105, pNF κ B105 et Akt, Phospho-JNK (9251), phospho-p38 MAPK (9211), ERK1/2 (9107), JNK (9252), et p38 MAPK(9212) ont été obtenus chez Cell Signaling Technology (Beverly, MA). L'anticorps anti-Fibronectine provenait de Sigma Aldrich (Oakville, ON). Les anticorps anti-souris secondaires liés à la peroxydase de raifort (HRP), et l'anti-lapin provenaient de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). La migration cellulaire est effectuée à l'aide du Real-Time Cell Analyzer (RTCA) dual-plate (DP), et du system xCELLigence (Roche Diagnostics, QC, CA). Les échantillons protéiques sont dosés par micro-BCA (Pierce, Rockfort). L'extraction de l'ARN total est effectuée avec du TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON). La synthèse d'ADNc est réalisée avec le kit high capacity cDNA revers transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). Par la suite, la quantification des amplicons est réalisée par PCR en temps réel avec du SYBR Green (Bio-Rad, cat. #170-8882, Mississauga, ON). Les autres réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Les amorces

proviennent de la compagnie QIAGEN (Valencia, CA). Les produits d'électrophorèse (Acrylamide, TEMED, APS, SDS) proviennent de Bio-Rad (Mississauga, ON). Les agents anticancéreux comme *Buthionine sulfoximine* (BSO) et *3-mercaptopycolinate* (3-MPA) proviennent de de la compagnie SIGMA, mais sont fournis généreusement par le docteur Moutih Rafei (UdeM).

3.2 Méthodes

3.2.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire de cancer ovarien ES-2 a été cultivée dans le milieu *Macoy's 5a* (Wisent, 317-010-CL, Saint-Bruno, QC, Canada) complété avec 10% de sérum bovin foetal (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT), 100 unités/ml pénicilline et 100 mg/ml streptomycine (Wisent, #cat 450-202-EL). Les cellules ont été cultivées dans des conditions physiologiques à 37 C° et 5 % CO₂/95 % O₂. Les cellules ont été traitées avec 10 ng/ml de TGF- β , 100 ng/ml TNF- α ou avec 1-30 μ M de TACIMA-218.

Pour la déprivation en glutamine, les cellules ont été cultivées pendant 24 h, 48 h, 72 h dans un milieu de culture *Macoy's 5a* complet. Par la suite, les cellules ont été lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), puis transférées dans un milieu sans glutamine DMEM (Cellgrow, catalogue #15-017-CV, Burlington, ON) contenant 10% FBS, 1% sodium pyruvate (Cellgro, catalogue #25-000-CI), 1% acides aminés non essentiels (NEAA) pendant 24 h, 48 h, 72 h. Pour la déprivation en glucose, les cellules ont été cultivées pendant 24 h, 48 h, 72 h dans un milieu de culture *Macoy's 5a* complet. Par la suite, les cellules ont été lavées avec une solution PBS, puis transférées dans un milieu sans glucose RPMI-1640 (Cellgro, catalogue #15-017-CV) contenant 10%

FBS, 1% sodium pyruvate (Cellgro, catalogue #25-000-CI), 1% les acides aminés non essentiels (NEAA) et 1% HEPES pendant 24 h, 48 h, 72 h.

3.2.2 Extraction d'ARN total, synthèse d'ADNc et PCR en temps réel

Suite au traitement des cellules avec TACIMA-218 pendant 18 h, l'ARN total a été extrait des cellules avec 1 ml TRizol. Par la suite, 200 µl de chloroforme ont été ajoutés, suivi d'une agitation vigoureuse de 10 sec et le mélange a été incubé à la température de la pièce pendant 3 min. Une centrifugation à 11,750 g à 4°C pendant 15 min a été effectuée et la phase supérieure a été récupérée. Un volume de 500 µl d'isopropanol a été ajouté et le tout a été mélangé par inversion, et par la suite incubé à la température de la pièce pendant 10 min. Une centrifugation de 10 min à 11,750g à 4 °C, a suivi. Le surnageant a été jeté et le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol 75%, et puis il y a eu une centrifugation de 5 min à 6, 610 g à 4°C et des tubes ont été séchés pendant 10 min et l'ARN a été dissout dans 20 µl d'eau RNase free. L'ARN obtenu a été mesuré par absorbance à une longueur d'onde de 260 nm, puis congelé à -80°C. En général, on utilise 1 µg d'ARN total pour la synthèse d'ADNc par transcription inverse (RT) avec la trousse *high capacity cDNA reverse transcription* de Applied Biosystems (Foster City, CA). Le programme RT est : 25°C pendant 10 min, 37°C pendant 120 min et 85°C pendant 5 min. L'expression génique a été quantifiée par PCR en temps réel (qPCR) en utilisant le mix SYBR Green (cat# 172-5201) de BioRad. Le programme utilisé pour la qPCR: 95°C pendant 3 min, 39 cycles de 95°C pendant 10 sec suivi de 55°C pendant 30 sec; 95°C durant 10 sec; 65°C durant 5 sec et 95°C pendant 5 sec. L'amplification des ADNc a été mesurée par fluorescence en utilisant un cycler (Bio-Rad, Hercules, CA). Durant la réaction enzymatique, le logiciel iQ5 (Bio-Rad Hercules, CA) affiche un graphique du signal de fluorescence versus le nombre de cycles de la PCR. Les différences entre les valeurs des échantillons et celle des contrôles (GAPDH

et PPIA) sont calculées en unité relative par le logiciel iQ5 Optical System Software version 2.0 (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.2.3 Lyse cellulaire

Après les traitements avec TGF- β à 10 ng/ml pendant 18 h ou avec TACIMA-218 à une concentration de (2 μ M, 4 μ M, 8 μ M). Les cellules ont ensuite été lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, PH 7.4). Par la suite les cellules ont été lysées avec du tampon de lyse (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1mM Methylenglycol-0, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.5%(vol/vol) Nonidet P-40 and 1 % (vol/vol) Triton X-100], contenant 1 mM de fluorure de sodium (NaF), d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) et un cocktail d'inhibiteurs à protéases incubées sur la glace pendant 30 min. Enfin, la récolte protéique s'est faite en prélevant les surnageant après centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4 °C.

3.2.4 Dosage des protéines

Les lysats protéiques ont été dosés par la méthode microBCA de Pierce (Rothfor IL, États-Unis). L'expérience a été effectuée en triplicata. Par la suite, une courbe standard a été effectuée avec différentes concentrations d'albumine sérique bovine (BSA). Le volume de 150 μ L a été considéré pour chaque échantillon. Ce volume de lysat a été, par la suite, mélangé avec 150 μ L de réactif microBCA dans une plaque de 96 puits. Le tout a été incubé pendant 2 h à 37°C. Après l'incubation, l'absorbance des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de 562 nm.

3.2.5 Analyse de l'expression protéique par immunobuvardage

L'expression des marqueurs de la TEM a été étudiée suite à un traitement au TGF- β ainsi que l'effet du TACIMA-218. Après la lyse cellulaire, les protéines ont été dosées selon la méthode de microBCA, puis, mélangées avec un tampon d'échantillons 5X pour électrophorèse (62,5 mM Tris/HCl à pH 6.8, 10 % de glycérol, 2 % SDS, 5 % B-mercaptoéthanol et 0,00625 % de bleu de bromophénol), puis chauffées à 95°C pendant 5 min. Par la suite, les échantillons ont été déposés sur un gel de polyacrylamide qui comprend deux phases : séparation et entassement. Le gel de séparation contient 12,5 % d'acrylamide, 0,3% de N, N-méthylène-bis-acrylamide, 0,375 M de Tris/HCl à pH 8.8, 0,1 % de SDS, 0,5 mg/ml de TEMED et de 0,5 mg/ml d'APS (Ammonium persulfate). Le gel d'entassement contient 3,8% d'acrylamide et 0,1 % N, N-méthylène-bis-acrylamide, 0,125 M de Tris/HCl pH 6.8, 0,1% de SDS, 0,5 mg/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. La migration a été faite à 100 volts pendant 1 h puis à 120 volts pendant 1 h. Par la suite, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF). Cette membrane a été activée par le méthanol, lavée avec de l'eau, et ensuite incubée au moins 10 min dans le tampon de transfert (96 mM glycine, 10 mM Tris et 10 % de méthanol). Le transfert des protéines a été effectué pendant 30 min à 100 volts. Enfin, une incubation pendant 1 h dans du tampon de blocage Tris salin (TBS) (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl à pH 7.5) contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre a été faite.

3.2.6 Immunodétection des protéines

Les membranes de PVDF ont été lavées trois fois dans du TBS-Tween 20 (0,3 %) pendant 10-15 min. Les membranes PVDF ont été incubées toute la nuit à 4°C avec

l'anticorps primaire, ou 2 h à la température de la pièce. Les membranes de PVDF ont été encore lavées trois fois pendant 10-15 min et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin IgG ou anti-souris dans du TBS-Tween 20 (0,1 %) et 5 % de lait pendant 1 h à la température de la pièce. Ensuite, les membranes de PVDF ont été encore lavées trois fois pendant 10-15 min avec la TBS-Tween 20 (0,3 %). Le matériel immunoréactif a été visualisé en utilisant un système de détection ECL (Baie d'Urfé, QC, CA). Enfin, les membranes PVDF ont été exposées à des films Fuji pour immunodétecter les protéines spécifiques. Les bandes immunoréactives ont été quantifiées avec le logiciel ImageJ.

3.2.7 Migration cellulaire en temps réel

La migration des lignées cellulaires est effectuée avec le système xCELLigence (Roche Diagnostics, QC). Après 18 h de servage des lignées cellulaires dans un milieu sans sérum, les cellules ont été trypsinisées puisensemencées sur des plaques 16 puits CIM-plates (Roche Diagnostics, QC). Dans cette expérience, avant l'ensemencement des cellules, le dessous de chaque puits de la chambre supérieure d'une plaque CIM a été recouvert de 0,15% de gélatine et incubé pendant 1 h à 37°C. Ensuite, la gélatine a été lavée avec du PBS. Par la suite, 250 000 cellules ont été ajoutées dans chaque puits sur la gélatine. La plaque a alors été incubée à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂, pendant 1 h. Après cela, la chambre inférieure des puits a été remplie d'un milieu sans sérum. On a alors procédé au traitement avec le TGF- β (10 ng/ml) et TACIMA-218 (1-8 μ M). Après 1 h d'adhésion, la migration cellulaire a été mesurée toutes les 5 min pendant 24 h.

3.2.8 Mesure d'apoptose par cytométrie en flux

L'effet sur l'apoptose des cellules ES-2 en présence de 0 , 2 μ M , 4 μ M et 8 μ M de TACIMA-218 a été déterminé par le test AnnexineV (*PE AnnexineV Apoptosis Detection Kit I*). Selon le protocole du fabricant, les cellules des groupes contrôles et TACIMA-218 ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits. Après le traitement de 18 h, les cellules ont été récoltées par grattage doux, lavées avec du PBS et culottées par centrifugation. Par la suite, le tampon Annexine a été ajouté au culot. Puis 5 μ l d'AnnexineV et 5 μ l de PI (*Propidium Iodide*) ont été ajoutés aux tubes et incubés à 37°C pendant 15 min. L'apoptose a été analysée à l'aide d'un cytométrie de flux et du logiciel BD Accuri C6.

3.2.9 Mesure des ROS par cytométrie en flux

Pour détecter les espèces réactives de l'oxygène (ROS) mitochondriales, en particulier les superoxydes, le dosage à base de MitoSOX a été utilisé, à concentration de 5 μ M de réactifs. Les cellules ont été incubées 15 min à 37°C, dans le noir. Par la suite, 400 μ L de FBS préchauffé à 2% du PBS a été ajouté, puis, les cellules ont été resuspendues dans 100 μ L de 2% FBS / PBS. Enfin, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

3.2.10 Analyse statistique

Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes ou plus. La signification statistique a été évaluée à l'aide d'un test t de Student et a été utilisée pour comparer l'effet sur les cellules traitées avec le composé par rapport au véhicule. Pour comparer deux groupes ou plus avec le groupe contrôle, une analyse de variance avec un facteur (ANOVA) a été utilisée. Toutes les analyses statistiques et graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.0b (San Diego, CA). Les différences avec $p < 0,05$ étaient considérées comme significatives.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Impact de TACIMA-218 sur la TEM

Afin de déterminer l'impact de TACIMA-218 sur la TEM, nous avons analysé l'expression protéique des biomarqueurs impliqués dans la TEM, lorsque soumis à des traitements avec le TACIMA-218, dans deux modèles de carcinomes ovariens stimulés au TGF- β : une lignée chimiosensible ES-2, et une lignée chimiorésistante SKOV-3. Les cellules ont étéensemencées et cultivées pendant 24 h, sevrées pendant 18 h, puis pré-traitées avec 2 μ M, 4 μ M et 8 μ M de composé et traitées au TGF- β pendant 18 h. Les lysats ont été analysés par électrophorèse, suivi d'un immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus dans la Figure 4.1 montrent que l'inhibition de l'expression de Twist par le composé est plus forte que l'inhibition par le TGF- β dans les cellules ES-2. L'examen de la figure 4.1 montre des réponses plus complexes du TACIMA-218 sur l'expression de Twist dans ces cellules. En absence de TGF- β , TACIMA-218 provoque une réponse biphasique dans les cellules chimiosensibles ES-2 avec une induction d'environ deux fois de l'expression de Twist pour des concentrations de 2 et 4 μ M suivi d'une forte inhibition à 8 μ M (Figure 4.1 A et B). L'ajout de TGF- β seul aux cellules ES-2 réduit le niveau de Twist d'environ la moitié (Figure 4.1 A et B). Lorsque les cellules sont co-incubées avec le TGF- β et le TACIMA-218, l'expression de Twist reste inchangée par rapport au contrôle TGF- β seul (Figure 4.1 A et B).

Nous remarquons aussi l'inhibition de l'expression de Twist par le TACIMA-218 et par le TGF- β dans les cellules SKOV-3. De plus, les résultats montrent la diminution

préférentielle de l'expression de Slug par TACIMA-218 et par le TGF- β dans les cellules chimiosensibles ES-2 et dans les cellules chimiorésistantes SKOV-3 (Figure 4.1).

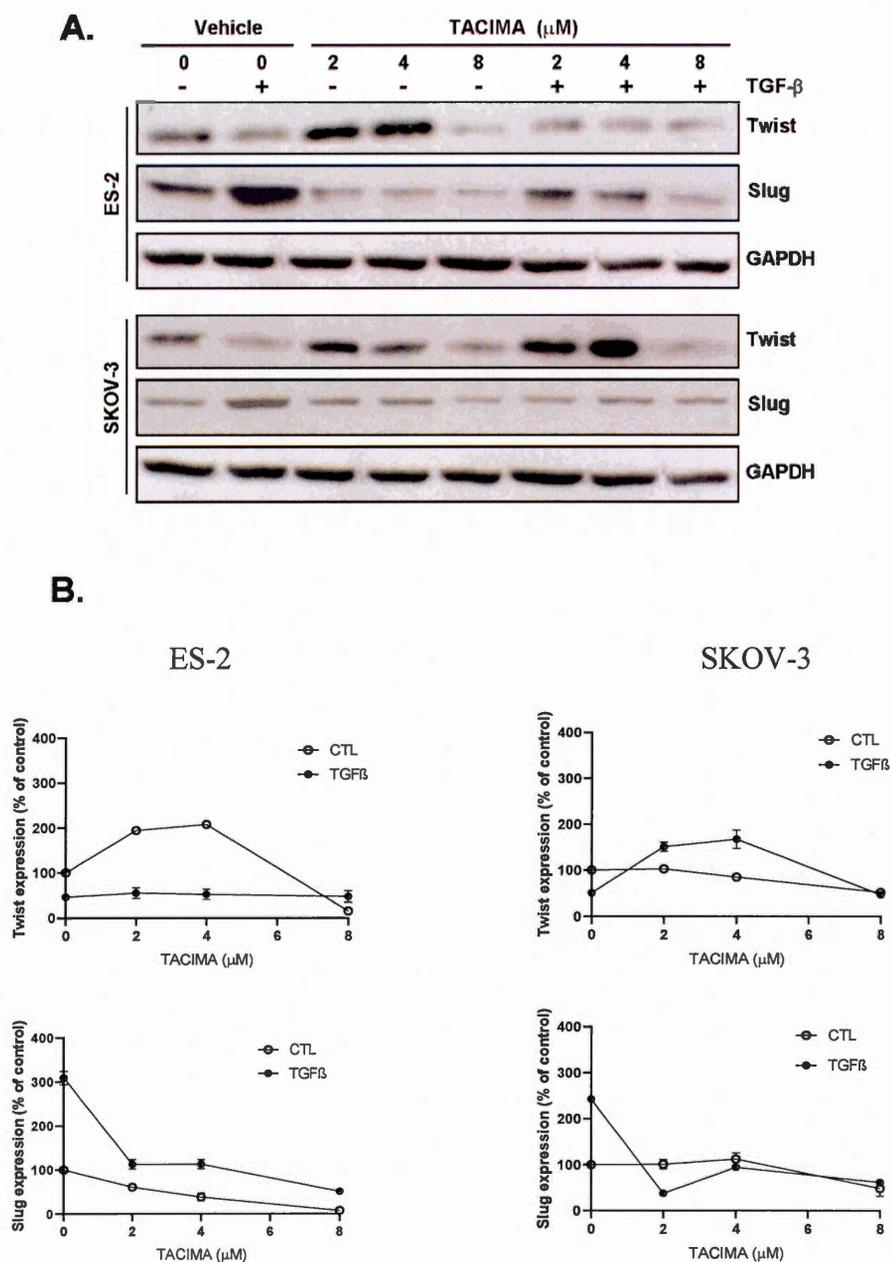
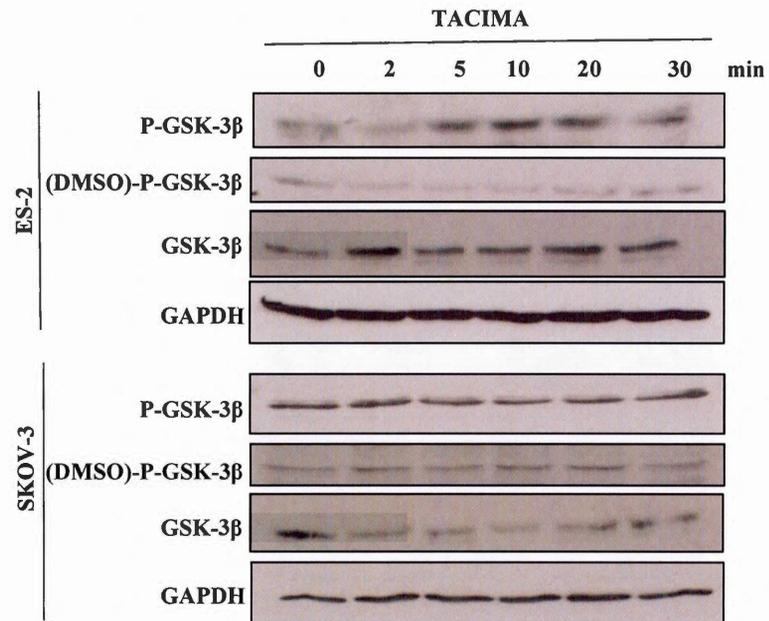


Figure 4.1 Impact de TACIMA-218 sur l'expression des protéines impliquées dans la TEM dans un modèle de carcinome ovarien chimiosensible ES-2 et chimiorésistant SKOV-3, stimulée au TGF- β et avec TACIMA-218 pendant 18 h (A). Quantification de l'expression protéique par densitométrie (B).

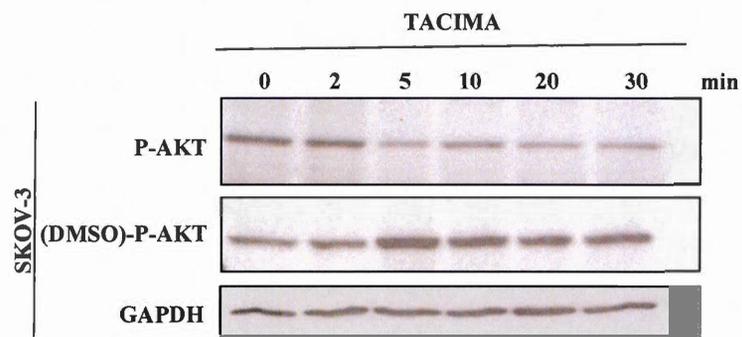
4.2 Effet de TACIMA-218 sur la voie de signalisation AKT/GSK-3 β

Afin d'étudier l'effet de TACIMA-218 au niveau de l'expression protéique de GSK-3 β et AKT, les cellules ES-2 et SKOV-3 ont étéensemencées et cultivées pendant 24 h, sevrées pendant 1 h, puis traitées avec 8 μ M TACIMA-218 pendant 0 à 30 min. Les lysats ont été analysés par électrophorèse suivi d'un immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus dans la figure 4.2 montrent que GSK-3 β semble être phosphorylé par le TACIMA-218 dans les cellules ES-2 et SKOV-3. Enfin, La phosphorylation d'AKT semble diminuée par TACIMA-218, dans les cellules SKOV-3 (Figure 4.2 B et C). Dans nos expériences, P-AKT n'était pas exprimé dans la lignée ES-2.

A.



B.



C.

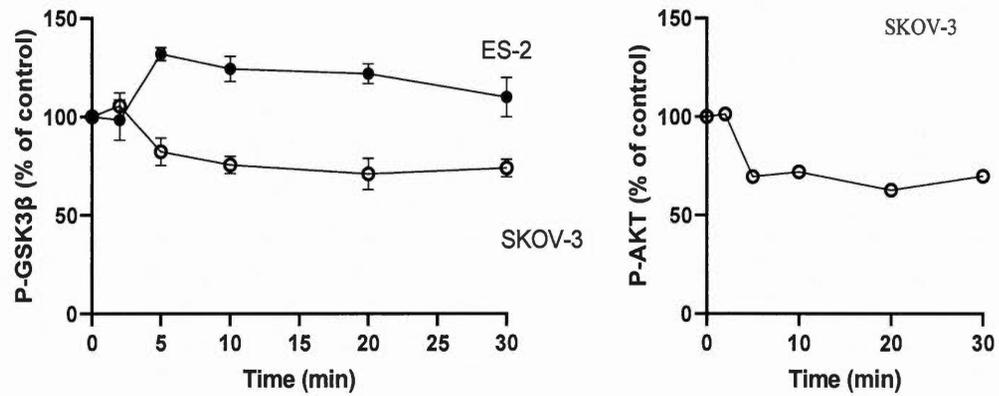


Figure 4.2 Impact de TACIMA-218 sur la voie de signalisation AKT (A) et GSK-3 β (B) dans les cellules ES-2 et SKOV-3, stimulées avec TACIMA-218 (8 μ) pendant 0-30 min. Quantification de l'expression P-AKT et P-GSK-3 β (C).

4.3 Impact de TACIMA-218 sur la voie de signalisation MAPK p38

Pour examiner l'activation de p38, une analyse par immunobuvardage a été réalisée afin de détecter la forme phosphorylée de p38 avec un anticorps anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182). L'effet de TACIMA-218 au niveau de l'expression protéique a été étudié dans les cellules ES-2 et SKOV-3. Les cellules ont étéensemencées et cultivées pendant 24 h, sevrées pendant 1 h, puis traitées avec 8 μ M de TACIMA-218 pendant une durée de 0 à 30 min. Les lysats ont été analysés par une électrophorèse suivi d'un immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus, dans la Figure 4.3 A (voir la quantification dans la Figure 4.3 B) montrent que la phosphorylation de p38 est amplifiée lorsque les cellules ES-2 sont traitées avec TACIMA-218. Par contre, la phosphorylation semble diminuée légèrement lorsque les cellules SKOV-3 sont traitées avec TACIMA-218 (Figure 4.3 A et B).

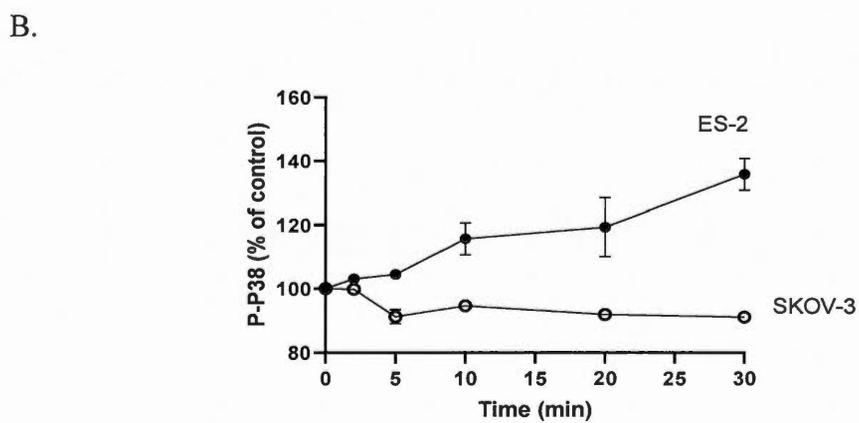
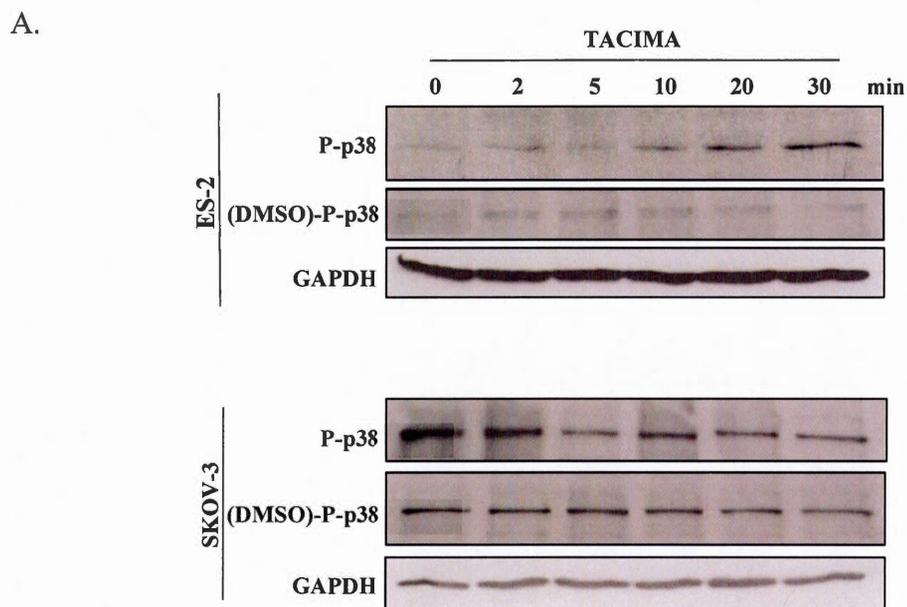


Figure 4.3 Impact de TACIMA-218 sur la voie de signalisation MAPK p38 dans les cellules ES-2 et SKOV-3 traitées avec TACIMA-218 (8 μ M) pendant 0 à 30 min (A), Quantification (B).

4.4 Effet de TACIMA-218 sur la migration des cellules ES-2 et SKOV-3

La capacité migratoire peut nous donner une indication sur la capacité des cellules cancéreuses à quitter une tumeur initiale, pour ensuite envahir d'autres parties du corps. Afin de déterminer si TACIMA-218 a la capacité d'inhiber la migration cellulaire, nous avons traité les cellules avec différentes concentrations du TACIMA-218 (2 μ M, 4 μ M, 8 μ M), puis analysé la migration cellulaire par le système xCELLigence. Dans la Figure 4.4, nous montrons la quantification de la migration relative des cellules en fonction du temps. On observe une inhibition marquée de la migration cellulaire dépendante de la concentration de TACIMA-218 dans les deux lignées. Dans la figure 4.4, nous observons que les 2 lignées cellulaires ES-2 et SKOV-3 semblent elles avoir la même sensibilité face à l'action inhibitrice du TACIMA-218 sur la migration.

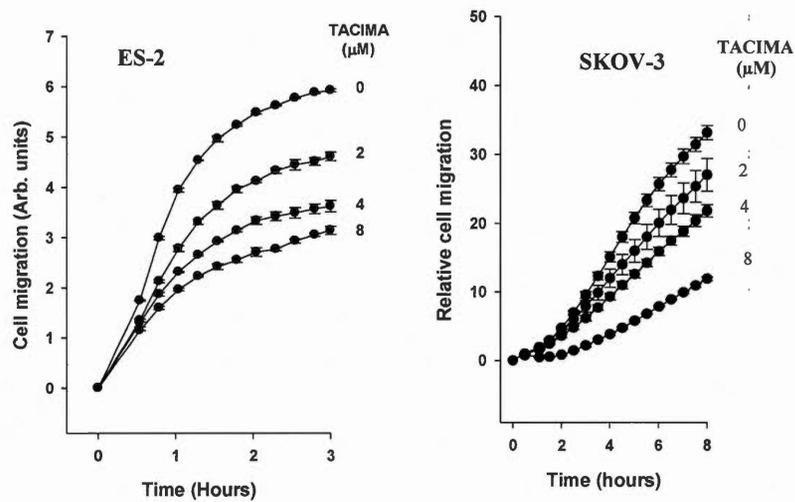
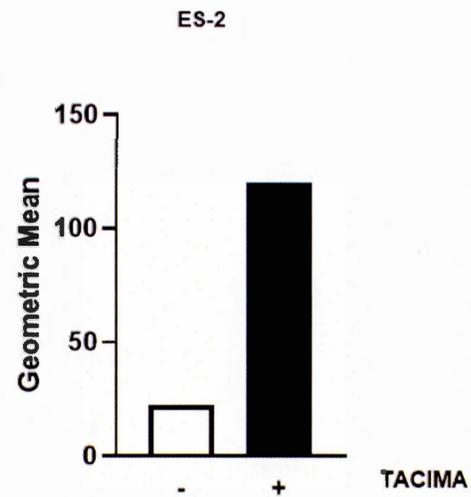
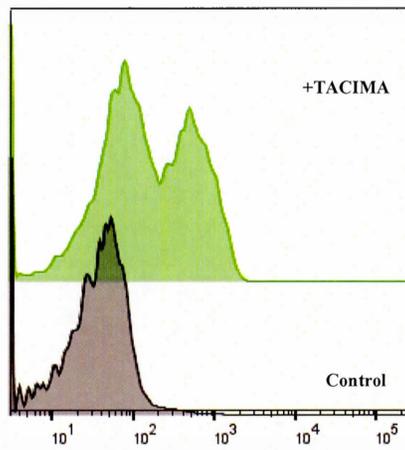


Figure 4.4 Impact de TACIMA-218 sur la migration des cellules ES-2 et SKOV-3. L'effet de TACIMA-218 sur le pouvoir migratoire des cellules ES-2 et SKOV-3 en fonction du temps.

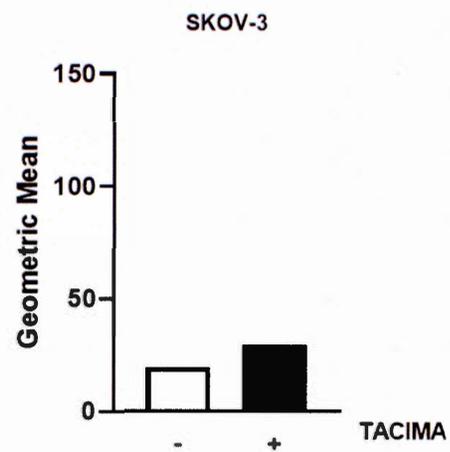
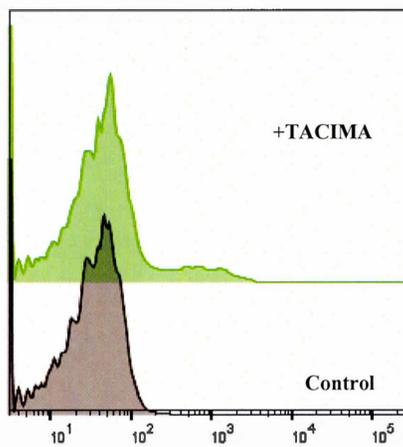
4.5 Effet de TACIMA-218 sur la mort cellulaire ES-2 et SKOV-3

Afin d'évaluer l'effet de TACIMA-218 sur l'apoptose, nous avons fait une analyse de la mort cellulaire par cytométrie de flux. Les analyses de cytométrie de flux permettaient de bien distinguer le pic correspondant à la mort cellulaire. Pour ce faire, les cellules ES-2 et SKOV-3 ont été traitées avec 8 μ M de TACIMA-218 pendant 24 h. Nous avons, par la suite, vérifié la mort cellulaire des cellules ES-2 et SKOV-3 par microscopie (Figure 4.5 C). Nous constatons que le traitement des cellules ES-2 avec TACIMA-218 permet d'induire l'apoptose (Figure 4.5 A et C), la mort cellulaire dans les cellules SKOV-3 traitées reste cependant similaire à la condition contrôle (Figure 4.5 B)

A.



B.



C.

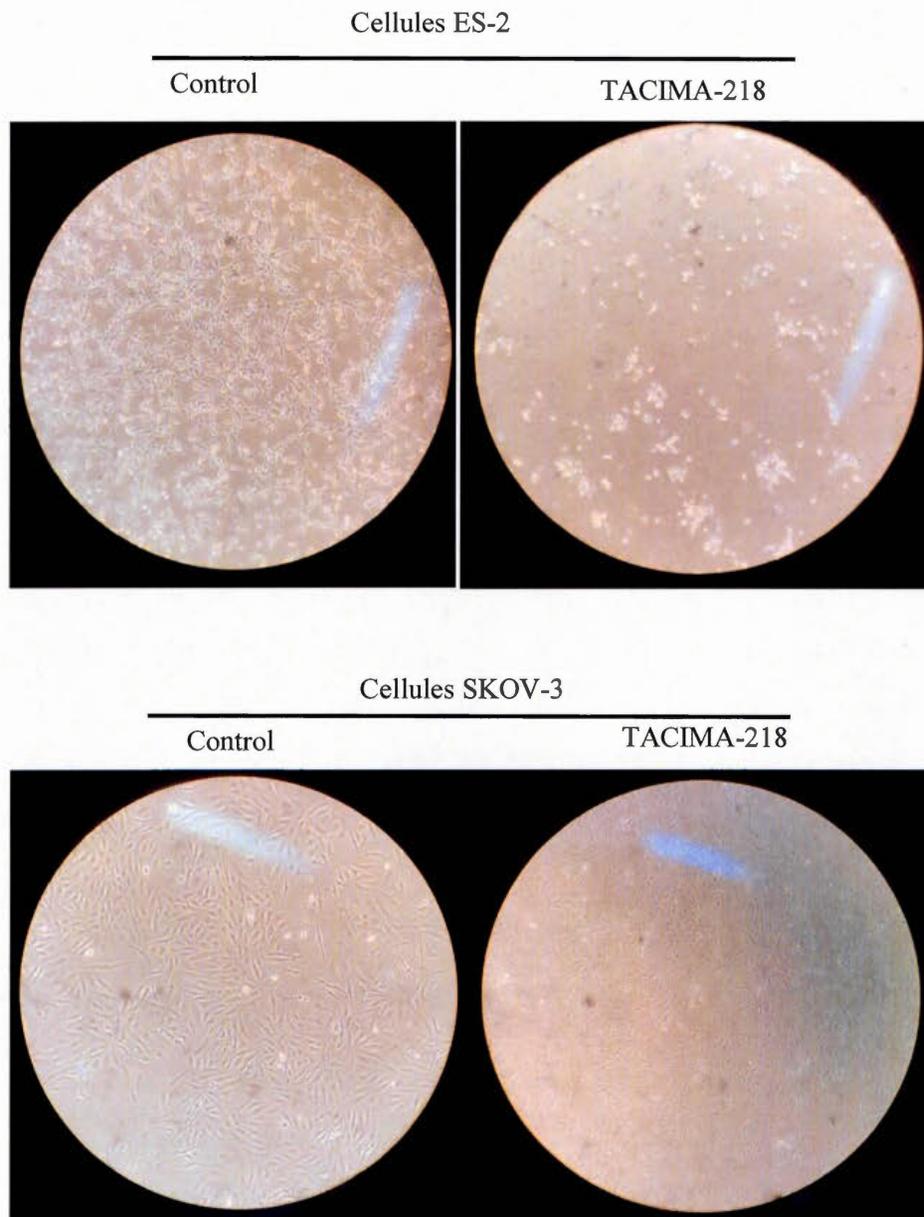


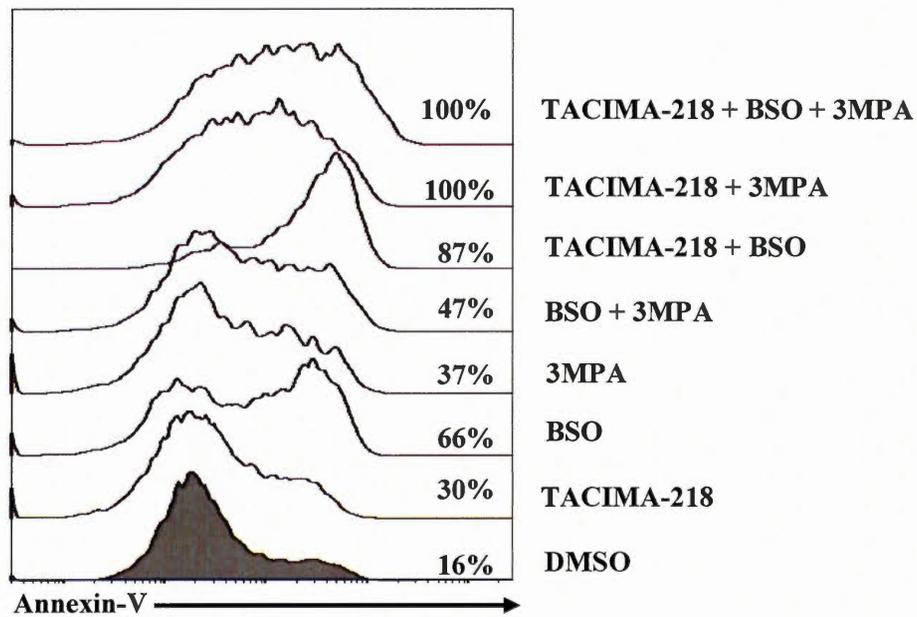
Figure 4.5 Analyse de la mort cellulaire induite par TACIMA-218 (8 μ M) par cytométrie en flux dans les cellules ES-2 (A) et SKOV-3 (B). Une vérification de la mort cellulaire des cellules ES-2 et SKOV-3 par microscopie (C).

4.6 Effet coopératif de TACIMA-218 avec BSO et 3-MPA

Afin de déterminer le niveau d'inhibition de TACIMA-218 sur les cellules cancéreuses, nous avons évalué l'action coopérative de TACIMA-218 avec d'autres agents anticancéreux comme *Buthionine sulfoximine* (BSO), une sulfoximine qui réduit les niveaux de glutathion et, *3-mercaptopicolinate* (3-MPA), un inhibiteur de phosphoenolpyruvate carboxykinase, utilisé actuellement dans le traitement du cancer de l'ovaire. Afin d'évaluer l'effet de BSO et de 3-MPA avec le TACIMA-218 sur l'apoptose, nous avons analysé la mort cellulaire par cytométrie en flux. Pour ce faire, les cellules ES-2 et SKOV-3 ont été prétraitées avec 0.5 mM de 3-MPA et 1 mM de BSO pendant 1 h. Par la suite, les cellules ES-2 et SKOV-3 ont été traitées avec 8 μ M de TACIMA-218 pendant 24 h.

Dans les cellules ES-2, nous constatons une forte induction de l'apoptose à 100% lorsque nous avons prétraité les cellules avec BSO, 3-MPA et puis traité les cellules avec TACIMA-218. Nous constatons également une forte induction de l'apoptose à 100% lorsque nous avons prétraité les cellules avec 3-MPA et puis traité les cellules avec TACIMA-218. Nous observons une induction de l'apoptose à 87% lorsque nous avons prétraité les cellules avec BSO et puis traité les cellules avec TACIMA-218. L'induction de l'apoptose est à 47% lorsque nous avons prétraité les cellules avec BSO et 3-MPA. L'effet seul de TACIMA-218 sur l'induction de l'apoptose est de 30%. L'effet seul de BSO et 3-MPA est de 66% et 37%. Les résultats globaux de cette analyse nous montrent une augmentation de l'induction de l'apoptose lorsque nous avons utilisé d'autres agents anticancéreux avec le TACIMA-218. Par contre, nous n'observons aucun changement dans les cellules SKOV-3 par rapport à la condition contrôle.

A. ES-2



B. SKOV-3

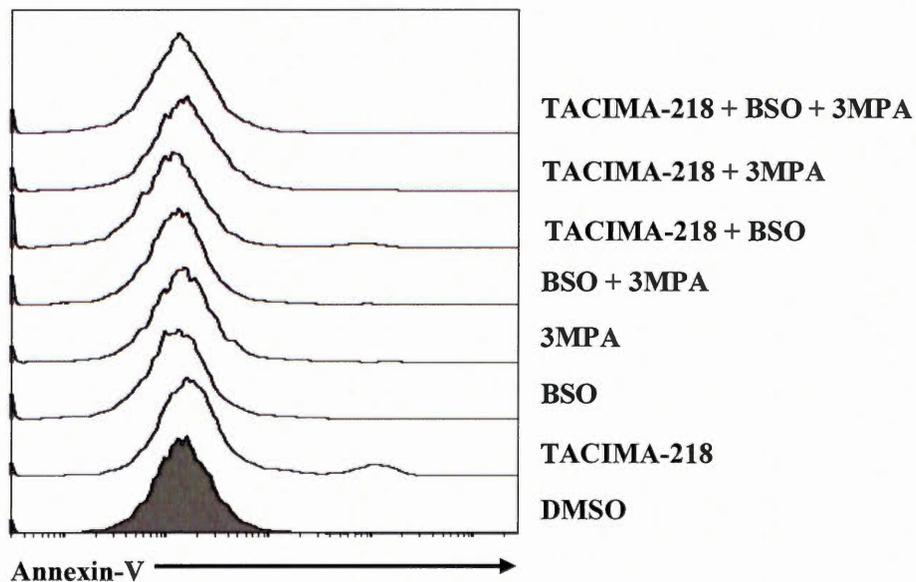


Figure 4.6 Analyse de la mort cellulaire induite par TACIMA-218, BSO, 3MPA et les différentes combinaisons des trois composés, par cytométrie en flux dans les cellules ES-2 (A) et SKOV-3 (B)

4.7 Effet de TACIMA-218 sur la génération des ROS

Pour détecter les ROS mitochondriales, en particulier les superoxydes, nous avons effectué un dosage avec MitoSOX. Après 24 h de traitement, les lignées ES-2 et SKOV-3 ont été traitées avec TACIMA-218 (8 μM), ensuite, les cellules ont été récoltées et colorées avec le réactif rouge de MitoSOX. Les résultats obtenus, dans la Figure 4.7, montrent que les ROS s'élevaient dans les cellules ES-2, suite au traitement avec TACIMA-218. Par contre, les niveaux de ROS dans les cellules SKOV-3 traitées restent similaires à la condition contrôle (Figure 4.7.B).

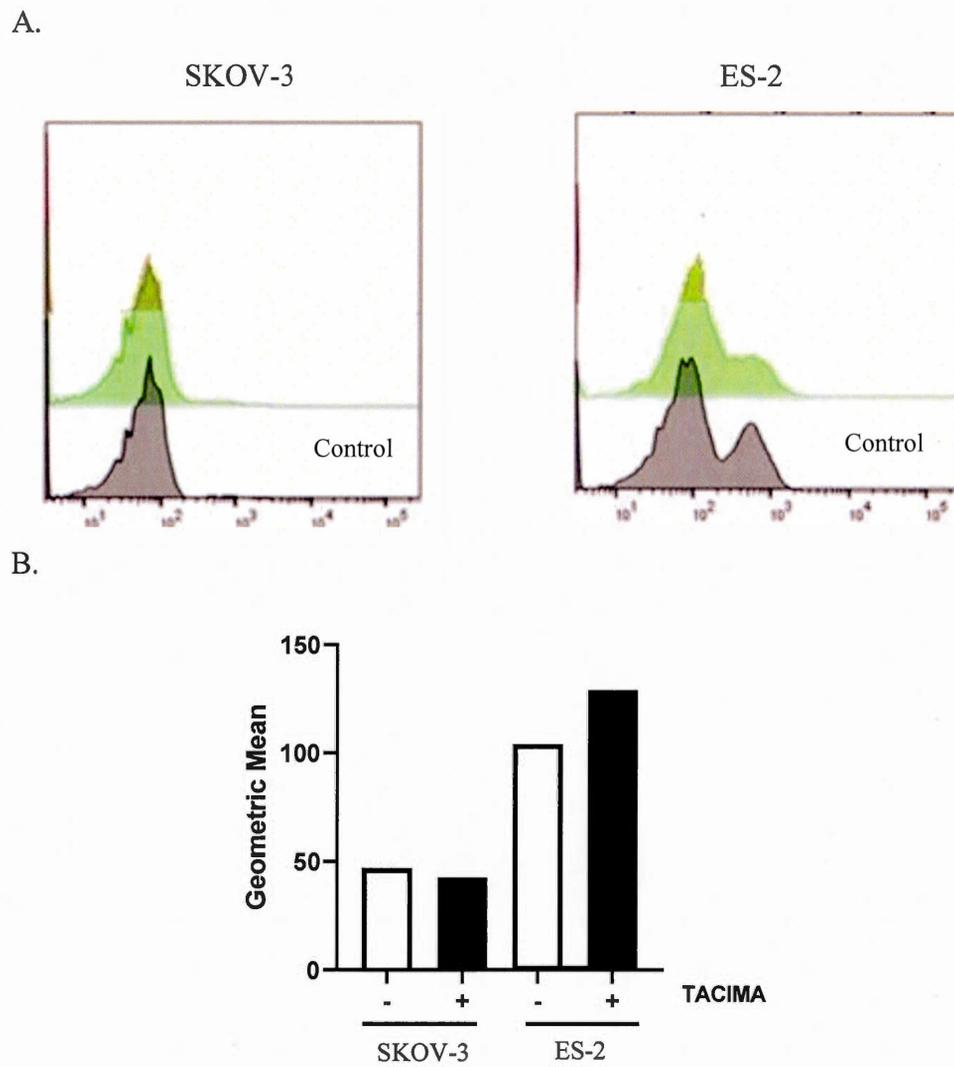


Figure 4.7 Mesure de la génération de ROS dans les cellules ES-2 et SKOV-3 par cytométrie en flux (A), Quantification (B).

4.8 Étude de la prolifération des cellules ES-2 et SKOV-3 dans le contexte d'une déprivation de glucose ou de glutamine

Pour bien comprendre l'importance du métabolisme de la glutamine et du glucose dans le maintien de la survie des cellules cancéreuses, et également pour comprendre les caractéristiques chimiorésistantes ou chimiosensibles des cellules ES-2 et SKOV-3, nous avons réalisé un essai de prolifération par comptage cellulaire pendant 24 h, 48 h, 72 h. Les cellules ES-2 et SKOV-3 ont été cultivées pendant 24 h dans un milieu complet. Par la suite, les cellules ont été transférées dans un milieu sans glucose ou sans glutamine pendant 24 h, 48 h, 72 h. La prolifération de chacune des lignées semble différer selon les conditions de traitement. Dans les cellules ES-2, nous avons observé que la déplétion de glutamine, en présence de glucose ($\text{glut}^-/\text{gluc}^+$), inhibait fortement la croissance et allait jusqu'à entraîner la mort complète des cellules ES-2, après 48 h (ce qui montre de la cytotoxicité). Par contre, dans les cellules SKOV-3 nous avons observé que cette même déplétion de glutamine, en présence de glucose ($\text{glut}^-/\text{gluc}^+$) affectait moins significativement la croissance. Par opposition, dans un milieu déplété en glucose, en présence de glutamine ($\text{gluc}^-/\text{glut}^+$), la croissance était moins significativement inhibée chez ES-2 que chez SKOV-3, où l'on a constaté la mort complète des cellules après 48 h. Nos résultats suggèrent que les cellules SKOV-3 dépendent principalement du glucose pour leur croissance, alors qu'ES-2 dépendent de la glutamine (Figure 4.8).

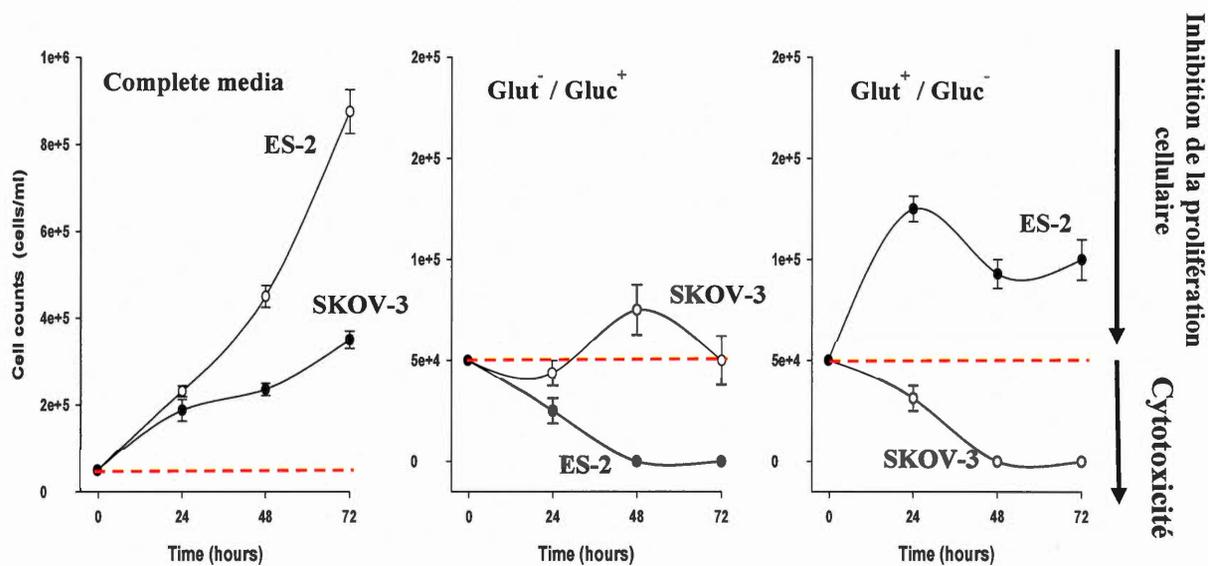


Figure 4.8 Prolifération des cellules ES-2 et SKOV-3, dans le contexte d'une déprivation de glucose ou de glutamine.

4.9 Expression génique des marqueurs associés au stress oxydatif

Afin de déterminer si TACIMA-218 avait la capacité d'induire l'expression d'antioxydants impliqués dans la réponse au stress oxydatif, nous avons analysé l'expression génique de marqueurs de stress oxydatifs des cellules ES-2 et SKOV-3. Pour ce faire, les cellules ES-2 et SKOV-3 sont traitées pendant 18 h dans un milieu sans sérum, pour les échantillons contrôles, ou traitées avec 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M de TACIMA-218. L'expression génique est mesurée par RT-qPCR. Les résultats obtenus, illustrés dans la Figure 4.9, montrent une forte augmentation de l'expression génique de HOMX1, ainsi qu'une augmentation légère de NQO1 et SOD2 dans les cellules ES-2 traitées, par rapport aux autres marqueurs. Nous observons également qu'il n'y a pas de différences significatives de l'expression de SOD1, TXNRD1, HPRT et β -Actine entre les deux lignées cellulaires (Figure 4.9).

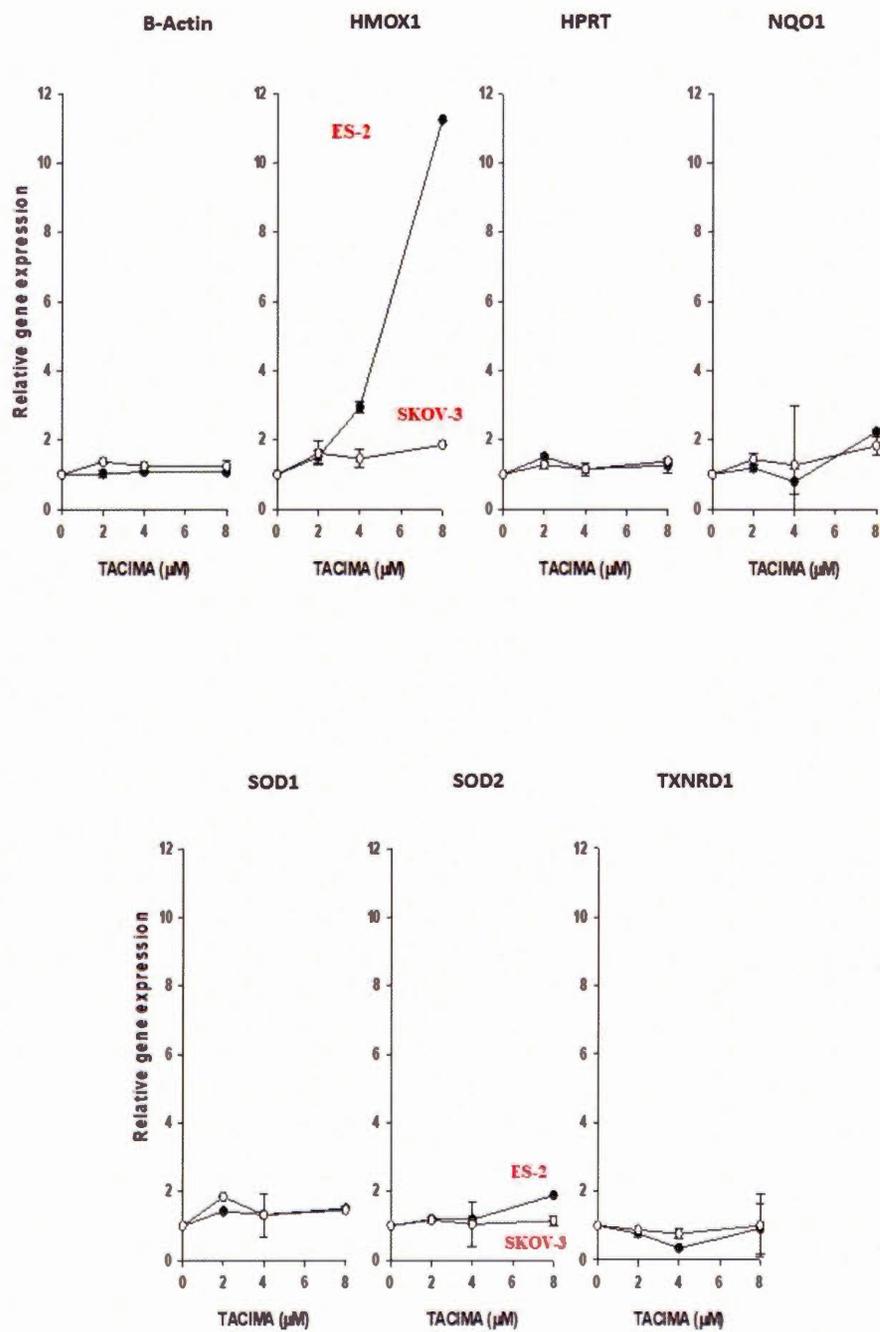


Figure 4.9 Analyse de l'expression génique des biomarqueurs impliqués dans le stress oxydatif dans les cellules ES-2 et SKOV-3.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Le cancer ovarien est malheureusement souvent diagnostiqué à un stade tardif. La plupart des patientes sont alors déjà atteintes de métastases (Société Canadienne du Cancer, 2018). La chimiorésistance limite le succès d'un traitement thérapeutique et représente le principal défi dans le traitement du cancer de l'ovaire. Bien que les mécanismes exacts de la chimiorésistance et des métastases du cancer de l'ovaire ne soient toujours pas clairs, de plus en plus d'évidences suggèrent que la TEM est un processus clé dans le développement de la résistance à la chimiothérapie, de la récurrence tumorale et de la formation de métastases, chez des patientes atteintes du cancer de l'ovaire (Nutti *et al.*, 2014). Ainsi, une équipe de chercheurs à l'UdeM a récemment découvert de nouvelles petites molécules ayant des propriétés antinéoplasiques à l'aide d'un essai lymphocytaire basé sur la fluorescence (Fouda *et al.*, 2017). L'utilisation de cet essai convient aux programmes de découverte de médicaments explorant de grandes banques de produits chimiques avant de poursuivre d'autres études de validation *in vitro/ in vivo* (Fouda *et al.*, 2017). Dans ce but, nous avons voulu tester une molécule immunomodulatrice sur la TEM associée à la métastase afin d'évaluer son effet dans les deux lignées cellulaires de cancer ovarien chimiosensible ES-2 et chimiorésistances SKOV-3. Parmi ces composés, TACIMA-218 présente un effet inhibiteur plus fort dans différentes lignées de cellules cancéreuses comme EL-4 (leucémie lymphoïde T) (En cours de publication). Ainsi, nous nous sommes intéressés à découvrir le mécanisme d'action de TACIMA-218 afin d'optimiser et développer de nouveaux agents plus spécifiques pour le cancer.

Cibler la TEM dans le traitement du cancer de l'ovaire

Des recherches préliminaires ont démontré qu'il existe une relation étroite entre la TEM et la chimiorésistance dans le cancer de l'ovaire (Deng *et al.*, 2016). Comprendre les mécanismes de la chimiorésistance dans le cancer de l'ovaire pourrait nous permettre de prédire la progression de la maladie (Davidson *et al.*, 2014; Marchini *et al.*, 2013). Aussi, le ciblage de la TEM est prometteur pour améliorer les traitements actuels du cancer de l'ovaire et prolonger la survie des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire récurrent (Kajiyama *et al.*, 2007). Dans ce but, au cours de nos travaux et pour comprendre le rôle des composés immunomodulateurs dans le mécanisme impliqué dans l'activation de la TEM, nous avons d'abord étudié plusieurs composés immunomodulateurs afin d'évaluer leurs effets seuls ou avec le TGF- β dans la lignée cellulaire chimiosensible ES-2 et chimiorésistante SKOV-3. Nous avons sélectionné les résultats d'un composé en particulier présentant des effets prometteurs, le TACIMA-218. Le pouvoir inhibiteur de TACIMA-218 sur les biomarqueurs mésenchymateux (Figure 4.1.B) et sur la migration cellulaire (Figure 4.4), suggère que TACIMA-218 est un composé immunomodulateur prometteur dans la prévention de la TEM et de la métastase. Nos résultats obtenus sur inhibition des marqueurs la TEM, par TACIMA-218 dans la lignée cellulaire ES-2 et SKOV-3 sont supportés par la phosphorylation de GSK-3 β ; une protéine de signalisation impliquée dans la TEM et nécessaire au maintien de l'architecture épithéliale (Bachelder *et al.*, 2005). Les résultats sont concluants avec notre hypothèse, TACIMA-218 peut diminuer l'expression des marqueurs impliqués dans la TEM, en inhibant la voie de signalisation GSK3 β (Figure 5.2). Nos résultats représentent une avancée importante dans la recherche puisqu'ils apportent de nouvelles données sur l'effet chimiopréventif de TACIMA-218 sur la TEM.

L'activation de la voie MAPK par le TACIMA-218

La famille des MAP kinases p38 joue un rôle crucial dans le destin des cellules. Les p38 MAPK sont activés en réponse au stress cellulaire et semblent exercer à la fois des

fonctions protectrices et pro-apoptotiques (Hseu *et al.*, 2012; Kennedy *et al.*, 2007). MAPK p38 a été montré pour induire l'apoptose dans certaines cellules, mais empêche, toutefois, l'apoptose dans d'autres (Bradham *et al.*, 2006). Pour mieux comprendre la voie d'apoptose activée par TACIMA-218, nous avons étudié la voie de MAPK p38. Nos résultats dans la Figure 4.3 B, sont en corrélation avec les autres observations d'apoptose et la mesure des ROS. Par conséquent, nous concluons que l'activation de p38 MAPK pourrait être impliquée dans l'apoptose induite par le TACIMA-218 dans les cellules ES-2.

L'induction de l'apoptose par le TACIMA-218

Puisque la résistance à l'apoptose est une caractéristique essentielle souvent acquise par les cellules cancéreuses, il est important d'étudier les voies de l'apoptose et de la résistance pour comprendre la sensibilité des cellules à la mort cellulaires (Hanahan *et al.*, 2000). Pour comprendre le potentiel antiprolifératif de TACIMA-218, nous avons voulu étudier l'induction de la mort cellulaire. Par conséquent, l'induction de l'apoptose dans la lignée cellulaire ES-2 par TACIMA-218 (Figure 4.5 A) est supportée par l'augmentation de P-p38 de façon dose dépendante (Figure 4.3 B).

En outre, nous avons constaté que TACIMA-218 inhibe l'activation d'AKT, une kinase jouant un rôle dans la survie des cellules (Fresno Vara *et al.*, 2004). Les perturbations d'AKT peuvent exercer une fonction importante dans le cancer chez l'homme. Il est maintenant bien établi que l'activation d'AKT favorise la survie cellulaire, en phosphorylant GSK-3 β et en inhibant ainsi la voie de signalisation (Fresno Vara *et al.*, 2004; McCubrey *et al.*, 2014). Nous avons observé une diminution de la phosphorylation d'AKT, dans les cellules SKOV-3 traitées avec TACIMA-218, accompagné d'une phosphorylation basale de GSK-3 β , ce qui suggère que, dans les cellules SKOV-3, TACIMA-218 inactive la voie AKT responsable de la survie et permet ainsi d'activer la mort cellulaire. Au contraire, dans les cellules ES-2, c'est une

inhibition directe la voie de GSK3- β , indépendamment de AKT, qui entraîne un arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose.

L'effet des prétraitements de BSO et 3-MPA avec TACIMA-218

Le glutathion (GSH) a souvent été impliqué dans le mécanisme de résistance aux médicaments anticancéreux au platine dans les cellules ES-2 et SKOV-3 (Jazaeri *et al.*, 2013; Mistry *et al.*, 1993). Il a également été démontré que des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire humain provenant de patients résistants aux médicaments augmentaient les niveaux de glutathion (Jazaeri *et al.*, 2013; Mistry *et al.*, 1993).

De plus, la baisse des taux de GSH avec la BSO réduit les niveaux de GSH dans le traitement du cancer de l'ovaire (Fojo *et al.*, 1987; K. S. Lee *et al.*, 1992). Dans ce but, nous avons montré l'action coopérative de TACIMA-218 avec d'autres agents utilisés dans le traitement du cancer de l'ovaire tels BSO et 3-MPA (Figure 4.6). Les résultats confirment que l'effet de TACIMA-218 avec BSO dans les cellules ES-2 mènent à une forte induction de l'apoptose contrairement aux cellules SKOV-3. Ces résultats peuvent expliquer en partie que TACIMA-218 puisse bloquer la voie de la glutamine et les cellules ES-2 dépendent de la glutaminolyse et, par la suite, elles peuvent générer les ROS (Figure 5.1).

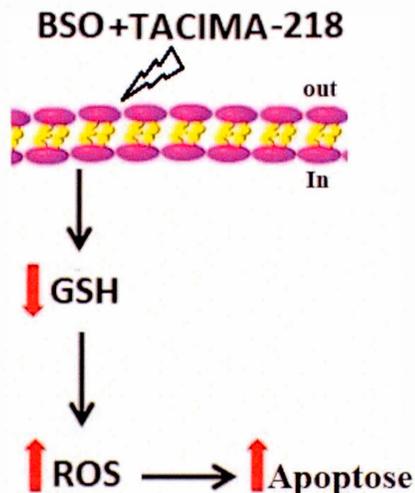


Figure 5.1 Schéma proposé basé sur nos conclusions et la littérature pour expliquer l'effet de BSO avec TACIMA-218 associé au stress oxydatif dans les cellules ES-2.

La phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) est bien connue pour son rôle dans la gluconéogenèse (Montal *et al.*, 2015). 3-MPA, qui est inhibiteur de PEPCK, est également utilisé dans le traitement du cancer (Carroll *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018). Dans ce but, nous avons montré l'action coopérative de TACIMA-218 avec 3-MPA dans la Figure 4.6, suggéré que l'induction de l'apoptose par TACIMA-218 et avec 3-MPA dans les cellules ES-2 est plus forte par rapport au traitement avec le 3-MPA seul.

Lorsque l'utilisation de la voie de la glutamine est inhibée, les cellules s'adaptent en passant par la voie du glucose en tant que source de nutriments (Choo *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2014). À l'inverse, lorsque l'utilisation du glucose est bloquée, les cellules augmentent leur utilisation de la glutamine ou d'autres sources de nutriments. Cela permet aux cellules cancéreuses de s'adapter métaboliquement pour proliférer et survivre au stress associé à la réduction de la disponibilité des nutriments afin de satisfaire les exigences bioénergétiques et anaboliques (Montal *et al.*, 2015).

Par conséquent, cibler la capacité des cellules cancéreuses à utiliser le glucose et la glutamine fournirait un avantage thérapeutique significatif. Dans ce but, les résultats dans la Figure 4.6 peuvent expliquer en partie comment TACIMA-218 peut coopérer avec BSO et 3-MPA pour bloquer les deux sources majeures de carbone et d'énergie, en induisant les ROS dans les cellules ES-2.

TACIMA-218 induit l'apoptose par la génération de ROS et l'activation de p38 MAPK

Il a été suggéré que de nombreux médicaments anticancéreux génèrent des ROS, qui provoquent l'apoptose induite par le stress oxydatif dans les cellules cancéreuses (Ozben, 2007). La TEM peut être activée dans les cellules cancéreuses par des ROS (Kinugasa *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2019), alors que ce mécanisme de TEM médié par les ROS n'est pas complètement compris (Lu *et al.*, 2019; Z. Wang *et al.*, 2010). Par conséquent, nos résultats suggèrent que cibler les ROS par TACIMA-218 (Figure 4.7) conduirait à une altération des caractéristiques de la TEM (Figure 4.1) ou tuerait les cellules cancéreuses (Figure 4.5 C).

L'interaction entre l'activation de p38 MAP kinase et la formation de ROS n'est pas vraiment claire, mais une formation de ROS contribue à l'activation de p38 MAP kinase (Corre *et al.*, 2017). Par conséquent, nos résultats obtenus sur l'accumulation de ROS intracellulaire dans les cellules ES-2 (Figure 4.7) nous permettent de supposer que TACIMA-218 induit la phosphorylation de p38 et induit l'apoptose via l'accumulation de ROS (Figure 5.2).

De plus, étant donné l'interaction entre l'inactivation de GSK-3 β et la formation de ROS (Z. Wang *et al.*, 2010), nos résultats obtenus sur l'accumulation de ROS intracellulaire dans les cellules ES-2 et SKOV-3 confirment que TACIMA-218 inactive la voie de GSK-3 β et par la suite inhibe la TEM (Figure 5.2).

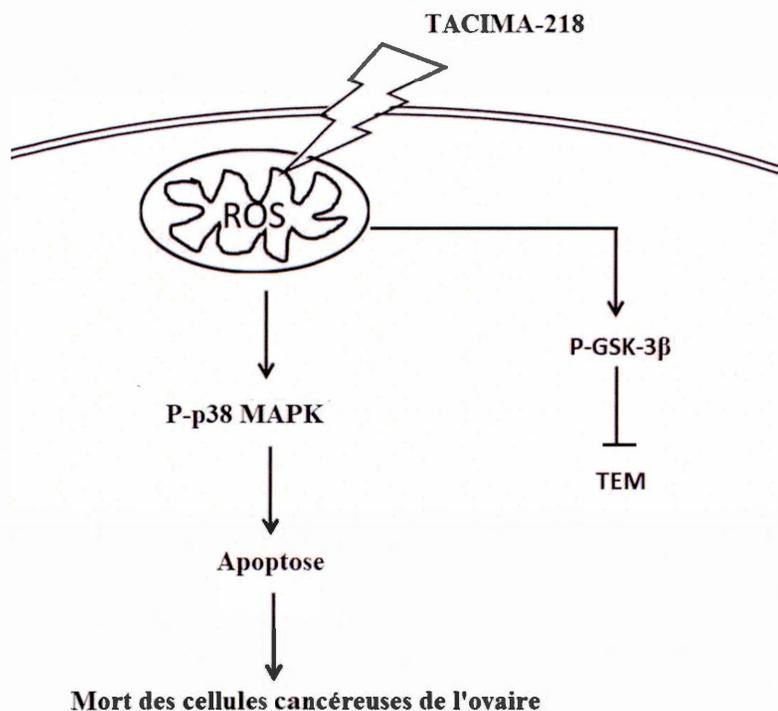


Figure 5.2 TACIMA-218 induit la mort cellulaire, l'apoptose dans les cellules chimiosensible ES-2 et également inhibe la TEM dans les cellules ES-2 et SKOV-3 de cancer de l'ovaire.

La glutamine favorise la croissance cellulaire des cellules cancéreuses de l'ovaire ES-2

La glutamine est l'acide aminé le plus courant dans les tissus et dans le plasma, et il représente une source majeure de carbone et d'énergie dans les cellules cancéreuses (Helmlinger *et al.*, 2002). La déprivation d'oxygène et de glucose, due à une circulation sanguine insuffisante, peut réduire la survie et la prolifération des cellules cancéreuses dans les tumeurs solides (Helmlinger *et al.*, 2002; H. Lee *et al.*, 2015). L'impact de la

déprivation de glutamine sur la prolifération des cellules cancéreuses de l'ovaire est cependant moins bien caractérisé. Pour cela, comprendre les effets de la déprivation en glutamine sur la croissance cellulaire est nécessaire pour bien comprendre l'importance du métabolisme de la glutamine dans le maintien de la survie des cellules cancéreuses (Yuan *et al.*, 2015). Dans ce but, pour mieux comprendre quelle source de carbone utilisent les cellules ES-2 et SKOV-3, nous avons voulu étudier les effets de la glutamine et du glucose sur la croissance des cellules cancéreuses de l'ovaire. De plus, le métabolisme du glucose et de la glutamine peut réguler l'induction de la TEM (S. Y. Lee *et al.*, 2016; Morandi *et al.*, 2017) et en altérant le métabolisme de la glutamine on peut contrer l'induction de la TEM médiée par des facteurs de croissance (par exemple, TGF- β) (Morandi *et al.*, 2017). L'analyse de l'expression génique dans les cellules ES-2 et SKOV-3, dans le contexte d'une déprivation de glucose et glutamine, nous permet de comprendre la raison pour laquelle les deux cellules présentent des caractéristiques chimiorésistantes ou chimiosensibles. Par conséquent, les résultats obtenus dans la figure 4.8 suggèrent que les cellules SKOV-3 dépendent principalement du glucose comme source de carbone pour leur croissance, alors que les cellules ES-2 dépendent plutôt de la glutamine.

De plus, l'activité de la glutaminase (GLS), première enzyme de la glutaminolyse, ainsi que son niveau dans le milieu est en corrélation directe avec la prolifération des cellules cancéreuses (Kim *et al.*, 2014). Nos résultats suggèrent que les cellules ES-2 dépendent de la glutaminolyse, et par la suite, elles peuvent générer le GSH et des ROS. Par conséquent, le ciblage du métabolisme de la glutamine pourrait constituer une stratégie efficace pour bloquer la TEM et donc réduire les capacités invasives des cellules cancéreuses ES-2.

Corrélation entre le TACIMA-218 et stress oxydatif

Au sein de notre étude, l'analyse de l'expression génique par RT-qPCR, suite à un traitement par TACIMA-218 dans des cellules ES-2 et SKOV-3, permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires employés par cet antagoniste dans son action anti-cancéreuse. Des gènes régulés par Nrf2 tels que HMOX1, NQO1, SOD2, SOD1, TXNRD1 et HPRT, sont de bons candidats pour étudier le stress oxydatif dans les cellules cancéreuses. Suite au traitement avec TACIMA-218, les cellules ES-2 ont démontré une forte augmentation de l'expression génique de HMOX1 (Figure 4.9) et de l'expression protéique de P-GSK-3 β (Figure 4.2.C). Contrairement aux cellules SKOV-3 traitées avec le TACIMA-218, où l'altération des niveaux d'expression génique HMOX1 et d'expression protéique de P-GSK-3 β était moins prononcée. Ce qui suggère qu'en inactivant la voie de GSK-3 β /AKT, les cellules peuvent stimuler l'accumulation nucléaire de Nrf2, par la suite, amplifier HMOX1 et enfin, générer du stress oxydatif. NQO1 était surexprimé dans le carcinome ovarien (X. Cui *et al.*, 2015; Siegel *et al.*, 2000). Nous avons démontré que l'activité de NQO1 augmentait après l'exposition des cellules au TACIMA-218 dans les deux lignées cellulaires mais légèrement dans les SKOV-3. L'expression de SOD2 dans notre modèle d'étude ES-2, suggère que la voie de réponse au stress Nrf2 a été impliquée dans l'augmentation de l'expression de SOD2 (Figure 5.3). Étant donné que l'on n'a pas évalué l'expression de tous les gènes régulés par Nrf2, le mécanisme d'action de TACIMA-218 reste toujours inconnu.

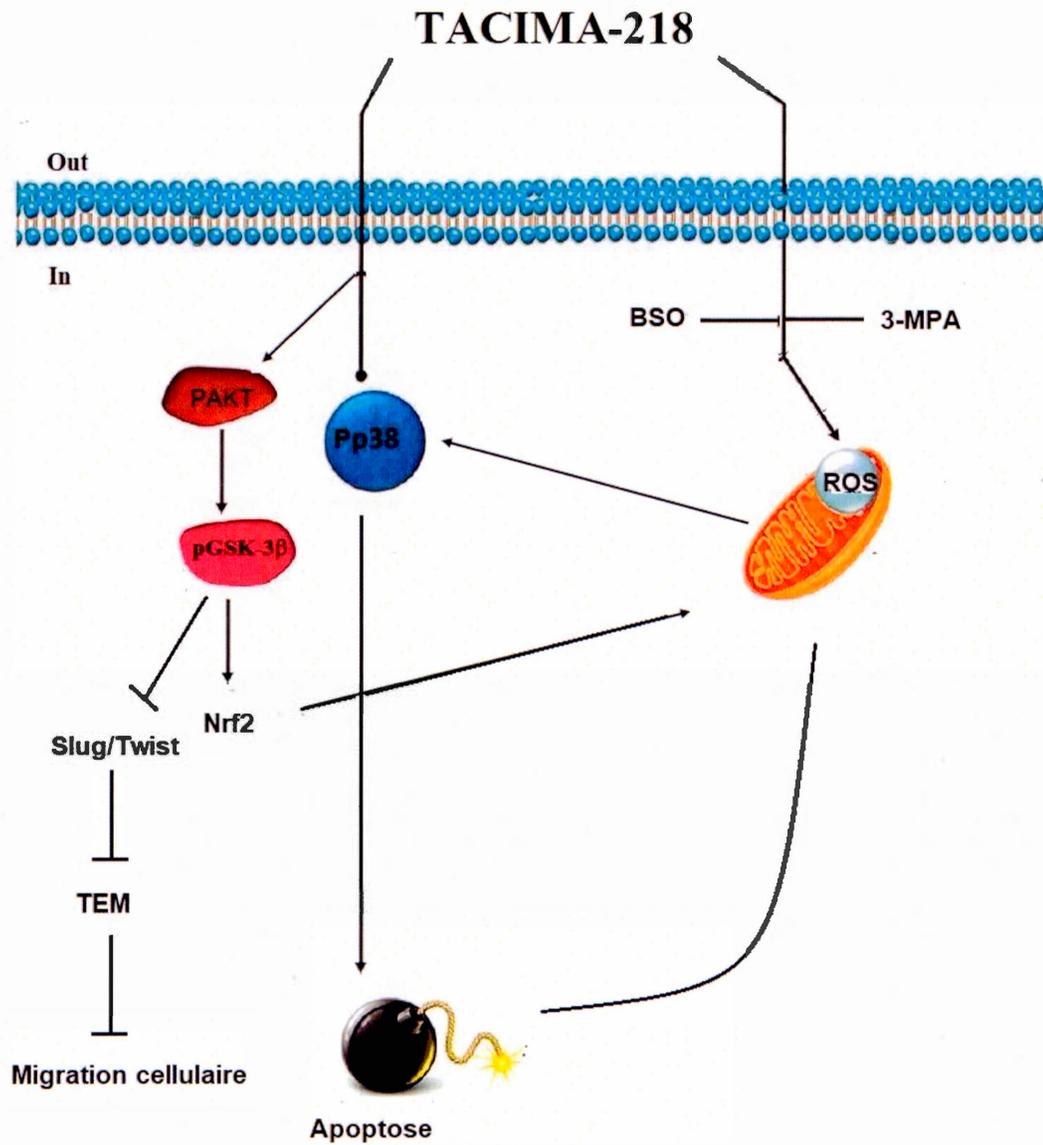


Figure 5.3 Schéma récapitulatif de l'effet de TACIMA-218 sur le stress oxydatif, l'induction de l'apoptose et dans la migration cellulaire.

CHAPITRE VI

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ce projet de recherche a été de déterminer un rôle antinéoplasique de TACIMA-218 dans les deux lignées cancéreuses ovariennes qui se caractérisent pour être soit sensibles (ES-2), soit résistantes (SKOV-3) à la chimiothérapie. Notre étude a permis de constater la puissante inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire par TACIMA-218 chez des cellules de cancer de l'ovaire. Le pouvoir inhibiteur de TACIMA-218 sur la voie AKT/GSK-3 β / Slug-Twist suggère que celui-ci a la capacité d'inhiber le processus de la TEM et la formation de métastases.

Nos résultats démontrent qu'un traitement avec TACIMA-218 induit la phosphorylation de p38, MAPK connue pour induire l'apoptose dans certaines cellules soumises à un stress cellulaire. Le traitement a aussi été corrélé avec l'induction d'un pic d'apoptose chez les cellules ES-2, ainsi qu'une élévation de l'expression des gènes associés au stress oxydatif. On peut supposer que les propriétés antinéoplasiques de TACIMA-218 s'expliquent par sa capacité à élever le niveau global de ROS et, par le fait même, activer la voie MAPK p38.

Nos expériences nous ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de notre composé, des connaissances précieuses qui permettront peut-être de développer de nouveaux agents anti-cancéreux plus spécifiques. De plus, plusieurs expériences complémentaires pourraient être réalisées telles qu'étudier le cycle cellulaire ou encore étudier l'expression de plusieurs autres biomarqueurs protéiques impliqués dans la TEM dans d'autres lignées cellulaires de cancers ovariens pour trouver le mécanisme d'action de TACIMA-218, étudier l'expression génique et protéique de Nrf2 dans les cellules Es-2 et SKOV-3, ou encore tester TACIMA-218 *in vivo* sur les souris.

BIBLIOGRAPHIE

- Akcay, T., Dincer, Y., Alademir, Z., Aydinli, K., Arvas, M., Demirkiran, F., et alKosebay, D. (2005). Significance of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase and glutathione S-transferase activity in the sera of patients with malignant and benign ovarian tumors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 119(1), 108-113. doi:10.1016/j.ejogrb.2004.06.037
- Akhurst, R. J. (2002). TGF-beta antagonists: why suppress a tumor suppressor? *J Clin Invest*, 109(12), 1533-1536. doi:10.1172/jci15970
- Appella, E., et alAnderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, 268(10), 2764-2772.
- Armstrong, D. K., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H. Q., Baergen, R., Lele, S., Copeland, L. J., Walker, J. L., et alBurger, R. A. (2006). Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 354(1), 34-43. doi:10.1056/NEJMoa052985
- Artlett, C. M. (2018). The IL-1 family of cytokines. Do they have a role in scleroderma fibrosis? *Immunol Lett*, 195, 30-37. doi:10.1016/j.imlet.2017.11.012
- Ashouri, J. F., et alWeiss, A. (2017). Endogenous Nur77 Is a Specific Indicator of Antigen Receptor Signaling in Human T and B Cells. *J Immunol*, 198(2), 657-668. doi:10.4049/jimmunol.1601301
- Assoian, R. K., Fleurdelys, B. E., Stevenson, H. C., Miller, P. J., Madtes, D. K., Raines, E. W., Ross, R., et alSporn, M. B. (1987). Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(17), 6020-6024.
- Atiomo, W., Shafiee, M. N., Chapman, C., Metzler, V. M., Abouzeid, J., Latif, A., Chadwick, A., Kitson, S., Sivalingam, V. N., Stratford, I. J., Rutland, C. S., et al. (2017). Expression of NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1) is increased in the endometrium of women with endometrial cancer and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 87(5), 557-565. doi:10.1111/cen.13436

- Attisano, L., et alWrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, 296(5573), 1646-1647. doi:10.1126/science.1071809
- Au-Yeung, B. B., Zikherman, J., Mueller, J. L., Ashouri, J. F., Matloubian, M., Cheng, D. A., Chen, Y., Shokat, K. M., et alWeiss, A. (2014). A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(35), E3679-3688. doi:10.1073/pnas.1413726111
- Auersperg, N., Ota, T., et alMitchell, G. W. (2002). Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. *Int J Gynecol Cancer*, 12(6), 691-703.
- Auersperg, N., Wong, A. S., Choi, K. C., Kang, S. K., et alLeung, P. C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*, 22(2), 255-288. doi:10.1210/edrv.22.2.0422
- Bachelder, R. E., Yoon, S. O., Franci, C., de Herreros, A. G., et alMercurio, A. M. (2005). Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 168(1), 29-33. doi:10.1083/jcb.200409067
- Barnhill, D. R., Kurman, R. J., Brady, M. F., Omura, G. A., Yordan, E., Given, F. T., Kucera, P. R., et alRoman, L. D. (1995). Preliminary analysis of the behavior of stage I ovarian serous tumors of low malignant potential: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 13(11), 2752-2756. doi:10.1200/jco.1995.13.11.2752
- Bast, R. C., Jr., Hennessy, B., et alMills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 415-428. doi:10.1038/nrc2644
- Beliveau et Gingras, D. (2007). Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician*, 53(11), 1905-1911.
- Berse, B., Hunt, J. A., Diegel, R. J., Morganelli, P., Yeo, K., Brown, F., et alFava, R. A. (1999). Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 115(1), 176-182.
- Bewersdorf, J. P., et alZeidan, A. M. (2019). Transforming growth factor (TGF)-beta pathway as a therapeutic target in lower risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. doi:10.1038/s41375-019-0448-2

- Blehschmidt, K., Sassen, S., Schmalfeldt, B., Schuster, T., Hofler, H., et alBecker, K. F. (2008). The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *Br J Cancer*, 98(2), 489-495. doi:10.1038/sj.bjc.6604115
- Blobe, G. C., Schieman, W. P., et alLodish, H. F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, 342(18), 1350-1358. doi:10.1056/nejm200005043421807
- Bradham, C., et alMcClay, D. R. (2006). p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle*, 5(8), 824-828. doi:10.4161/cc.5.8.2685
- Brandt, S., Kopp, A., Grage, B., et alKnabbe, C. (2003). Effects of tamoxifen on transcriptional level of transforming growth factor beta (TGF-beta) isoforms 1 and 2 in tumor tissue during primary treatment of patients with breast cancer. *Anticancer Res*, 23(1a), 223-229.
- Browning, L., Patel, M. R., Horvath, E. B., Tawara, K., et alJorcyk, C. L. (2018). IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag Res*, 10, 6685-6693. doi:10.2147/cmar.s179189
- Carroll, P. A., Diolaiti, D., McFerrin, L., Gu, H., Djukovic, D., Du, J., Cheng, P. F., Anderson, S., Ulrich, M., Hurley, J. B., Raftery, D., Ayer, D. E., et alEisenman, R. N. (2015). Deregulated Myc requires MondoA/Mlx for metabolic reprogramming and tumorigenesis. *Cancer Cell*, 27(2), 271-285. doi:10.1016/j.ccell.2014.11.024
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., et alWilliamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(9), 3666-3670.
- Chae, Y. K., Chang, S., Ko, T., Anker, J., Agte, S., Iams, W., Choi, W. M., Lee, K., et alCruz, M. (2018). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) signature is inversely associated with T-cell infiltration in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Sci Rep*, 8(1), 2918. doi:10.1038/s41598-018-21061-1
- Chene, G., Ouellet, V., Rahimi, K., Barres, V., Provencher, D., et alMes-Masson, A. M. (2015). The ARID1A pathway in ovarian clear cell and endometrioid carcinoma, contiguous endometriosis, and benign endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet*, 130(1), 27-30. doi:10.1016/j.ijgo.2015.02.021

- Choo, A. Y., Kim, S. G., Vander Heiden, M. G., Mahoney, S. J., Vu, H., Yoon, S. O., Cantley, L. C., et alBlenis, J. (2010). Glucose addiction of TSC null cells is caused by failed mTORC1-dependent balancing of metabolic demand with supply. *Mol Cell*, 38(4), 487-499. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.007
- Chu, W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*, 328(2), 222-225. doi:10.1016/j.canlet.2012.10.014
- Clerkin, J. S., Naughton, R., Quiney, C., et alCotter, T. G. (2008). Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. *Cancer Lett*, 266(1), 30-36. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.029
- Cloven, N. G., Kyshtoobayeva, A., Burger, R. A., Yu, I. R., et alFruehauf, J. P. (2004). In vitro chemoresistance and biomarker profiles are unique for histologic subtypes of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 92(1), 160-166.
- Cornelison, R., Llana, D. C., et alLanden, C. N. (2017). Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review. *Int J Mol Sci*, 18(10). doi:10.3390/ijms18102171
- Corre, I., Paris, F., et alHuot, J. (2017). The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget*, 8(33), 55684-55714. doi:10.18632/oncotarget.18264
- Cui, N., Yang, W. T., et alZheng, P. S. (2016). Slug inhibits the proliferation and tumor formation of human cervical cancer cells by up-regulating the p21/p27 proteins and down-regulating the activity of the Wnt/beta-catenin signaling pathway via the trans-suppression Akt1/p-Akt1 expression. *Oncotarget*, 7(18), 26152-26167. doi:10.18632/oncotarget.8434
- Cui, X., Li, L., Yan, G., Meng, K., Lin, Z., Nan, Y., Jin, G., et alLi, C. (2015). High expression of NQO1 is associated with poor prognosis in serous ovarian carcinoma. *BMC Cancer*, 15, 244. doi:10.1186/s12885-015-1271-4
- Das, G. C., Bacsı, A., Shrivastav, M., Hazra, T. K., et alBoldogh, I. (2006). Enhanced gamma-glutamylcysteine synthetase activity decreases drug-induced oxidative stress levels and cytotoxicity. *Mol Carcinog*, 45(9), 635-647. doi:10.1002/mc.20184
- Dauplat, J., Le Bouedec, G., Pomel, C., et alScherer, C. (2000). Cytoreductive surgery for advanced stages of ovarian cancer. *Semin Surg Oncol*, 19(1), 42-48.

- Davidson, B., et alTrobe, C. G. (2014). Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects. *Womens Health (Lond)*, 10(5), 519-533. doi:10.2217/whe.14.37
- de Gramont, A., Faivre, S., et alRaymond, E. (2017). Novel TGF-beta inhibitors ready for prime time in onco-immunology. *Oncoimmunology*, 6(1), e1257453. doi:10.1080/2162402x.2016.1257453
- De Rossi, G., Evans, A. R., Kay, E., Woodfin, A., McKay, T. R., Nourshargh, S., et alWhiteford, J. R. (2014). Shed syndecan-2 inhibits angiogenesis. *J Cell Sci*, 127(Pt 21), 4788-4799. doi:10.1242/jcs.153015
- Deng, J., Wang, L., Chen, H., Hao, J., Ni, J., Chang, L., Duan, W., Graham, P., et alLi, Y. (2016). Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(34), 55771-55788. doi:10.18632/oncotarget.9908
- Dinarello, C. A. (2006). The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 25(3), 307-313. doi:10.1007/s10555-006-9000-8
- Dinulescu, D. M., Ince, T. A., Quade, B. J., Shafer, S. A., Crowley, D., et alJacks, T. (2005). Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med*, 11(1), 63-70. doi:10.1038/nm1173
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(1), 11-22. doi:10.1038/nrc1252
- Fojo, A., Hamilton, T. C., Young, R. C., et alOzols, R. F. (1987). Multidrug resistance in ovarian cancer. *Cancer*, 60(8 Suppl), 2075-2080.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 29(6 Suppl 16), 15-18. doi:10.1053/sonc.2002.37263
- Fouda, A., Tahsini, M., Khodayarian, F., Al-Nafisah, F., et alRafei, M. (2017). A Fluorescence-based Lymphocyte Assay Suitable for High-throughput Screening of Small Molecules. *J Vis Exp*(121). doi:10.3791/55199
- Fraser, M., Leung, B., Jahani-Asl, A., Yan, X., Thompson, W. E., et alTsang, B. K. (2003). Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 66. doi:10.1186/1477-7827-1-66

- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., et alGonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 30(2), 193-204. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007
- Gang, G. T., Kim, Y. H., Noh, J. R., Kim, K. S., Jung, J. Y., Shong, M., Hwang, J. H., et alLee, C. H. (2013). Protective role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett*, 221(3), 165-175. doi:10.1016/j.toxlet.2013.06.239
- Gassmann, P., et alHaier, J. (2008). The tumor cell-host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. *Clin Exp Metastasis*, 25(2), 171-181. doi:10.1007/s10585-007-9130-6
- Gemignani, M. L., Schlaerth, A. C., Bogomolny, F., Barakat, R. R., Lin, O., Soslow, R., Venkatraman, E., et alBoyd, J. (2003). Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 90(2), 378-381.
- Germano, G., Allavena, P., et alMantovani, A. (2008). Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine*, 43(3), 374-379. doi:10.1016/j.cyto.2008.07.014
- Goetz, M. E., et alLuch, A. (2008). Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett*, 266(1), 73-83. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.035
- Goldsby, R. A., Kindt T.J, et alB.A, O. (2003). Les cytokines. In: Immunologie: Le cour de Janis Kuby. Paris. ISBN: 2-1 0-007396-6., Editions Dunod: 2003.
- Golias, C. H., Charalabopoulos, A., et alCharalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract*, 58(12), 1134-1141.
- Grégory Ségala. (2012). <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453>, Consulté le Mars 2, 2019 sur la site.
- Guo, C., Liu, S., Wang, J., Sun, M. Z., et alGreenaway, F. T. (2013). ACTB in cancer. *Clin Chim Acta*, 417, 39-44. doi:10.1016/j.cca.2012.12.012
- Hanahan, D., et alFolkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364.
- Hanahan, D., et alWeinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.

- Helmlinger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N. S., et al Jain, R. K. (2002). Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res*, 8(4), 1284-1291.
- Hemachandra, L. P., Shin, D. H., Dier, U., Iuliano, J. N., Engelberth, S. A., Uusitalo, L. M., Murphy, S. K., et al Hempel, N. (2015). Mitochondrial Superoxide Dismutase Has a Protumorigenic Role in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Cancer Res*, 75(22), 4973-4984. doi:10.1158/0008-5472.can-14-3799
- Hseu, Y. C., Lee, M. S., Wu, C. R., Cho, H. J., Lin, K. Y., Lai, G. H., Wang, S. Y., Kuo, Y. H., Kumar, K. J., et al Yang, H. L. (2012). The chalcone flavokawain B induces G2/M cell-cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells through the intracellular ROS generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway. *J Agric Food Chem*, 60(9), 2385-2397. doi:10.1021/jf205053r
- Jain, A. K., et al Jaiswal, A. K. (2007). GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem*, 282(22), 16502-16510. doi:10.1074/jbc.M611336200
- Jazaeri, A. A., Shibata, E., Park, J., Bryant, J. L., Conaway, M. R., Modesitt, S. C., Smith, P. G., Milhollen, M. A., Berger, A. J., et al Dutta, A. (2013). Overcoming platinum resistance in preclinical models of ovarian cancer using the neddylation inhibitor MLN4924. *Mol Cancer Ther*, 12(10), 1958-1967. doi:10.1158/1535-7163.mct-12-1028
- Jin, H., Yu, Y., Zhang, T., Zhou, X., Zhou, J., Jia, L., Wu, Y., Zhou, B. P., et al Feng, Y. (2010). Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma. *Int J Cancer*, 126(9), 2102-2111. doi:10.1002/ijc.24901
- Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., et al Kikkawa, F. (2007). Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol*, 31(2), 277-283.
- Kang, K. W., Cho, M. K., Lee, C. H., et al Kim, S. G. (2001). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt by tert-butylhydroquinone is responsible for antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction in H4IIE cells. *Mol Pharmacol*, 59(5), 1147-1156.
- Kansanen, E., Jyrkkanen, H. K., et al Levonen, A. L. (2012). Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic Biol Med*, 52(6), 973-982. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.038

- Katsuno, Y., Lamouille, S., et alDerynck, R. (2013). TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*, 25(1), 76-84. doi:10.1097/CCO.0b013e32835b6371
- Katz, L. H., Li, Y., Chen, J. S., Munoz, N. M., Majumdar, A., Chen, J., et alMishra, L. (2013). Targeting TGF-beta signaling in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 17(7), 743-760. doi:10.1517/14728222.2013.782287
- Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B., et alFauci, A. S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*, 163(5), 1037-1050.
- Kennedy, N. J., Cellurale, C., et alDavis, R. J. (2007). A radical role for p38 MAPK in tumor initiation. *Cancer Cell*, 11(2), 101-103. doi:10.1016/j.ccr.2007.01.009
- Kim, D. S., Jue, S. S., Lee, S. Y., Kim, Y. S., Shin, S. Y., et alKim, E. C. (2014). Effects of glutamine on proliferation, migration, and differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*, 40(8), 1087-1094. doi:10.1016/j.joen.2013.11.023
- Kinugasa, H., Whelan, K. A., Tanaka, K., Natsuzaka, M., Long, A., Guo, A., Chang, S., Kagawa, S., Srinivasan, S., Guha, M., Yamamoto, K., et al. (2015). Mitochondrial SOD2 regulates epithelial-mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene*, 34(41), 5229-5239. doi:10.1038/onc.2014.449
- Kurman, R. J. (2014). *WHO classification of tumours of the Female Reproductive Organs. World Health Organization, 4edn.*
- Kurrey, N. K., K, A., et alBapat, S. A. (2005). Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecol Oncol*, 97(1), 155-165. doi:10.1016/j.ygyno.2004.12.043
- Lamallice, L., Le Boeuf, F., et alHuot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 100(6), 782-794. doi:10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e
- Latifi, A., Abubaker, K., Castrechini, N., Ward, A. C., Liongue, C., Dobill, F., Kumar, J., Thompson, E. W., Quinn, M. A., Findlay, J. K., et alAhmed, N. (2011). Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. *J Cell Biochem*, 112(10), 2850-2864. doi:10.1002/jcb.23199

- Le, A., Lane, A. N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., Tsukamoto, T., Rojas, C. J., Slusher, B. S., Zhang, H., Zimmerman, L. J., *et al.* (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab*, 15(1), 110-121. doi:10.1016/j.cmet.2011.12.009
- Lee, H., Oh, E. T., Choi, B. H., Park, M. T., Lee, J. K., Lee, J. S., *et al.* Park, H. J. (2015). NQO1-induced activation of AMPK contributes to cancer cell death by oxygen-glucose deprivation. *Sci Rep*, 5, 7769. doi:10.1038/srep07769
- Lee, K. S., Kim, H. K., Moon, H. S., Hong, Y. S., Kang, J. H., Kim, D. J., *et al.* Park, J. G. (1992). Effects of buthionine sulfoximine treatment on cellular glutathione levels and cytotoxicities of cisplatin, carboplatin and radiation in human stomach and ovarian cancer cell lines. *Korean J Intern Med*, 7(2), 111-117.
- Lee, S. Y., Jeon, H. M., Ju, M. K., Jeong, E. K., Kim, C. H., Park, H. G., Han, S. I., *et al.* Kang, H. S. (2016). Dlx-2 and glutaminase upregulate epithelial-mesenchymal transition and glycolytic switch. *Oncotarget*, 7(7), 7925-7939. doi:10.18632/oncotarget.6879
- Lim, J. H., Luo, C., Vazquez, F., *et al.* Puigserver, P. (2014). Targeting mitochondrial oxidative metabolism in melanoma causes metabolic compensation through glucose and glutamine utilization. *Cancer Res*, 74(13), 3535-3545. doi:10.1158/0008-5472.can-13-2893-t
- Lippitz, B. E. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol*, 14(6), e218-228. doi:10.1016/s1470-2045(12)70582-x
- Liu, M. X., Jin, L., Sun, S. J., Liu, P., Feng, X., Cheng, Z. L., Liu, W. R., Guan, K. L., Shi, Y. H., Yuan, H. X., *et al.* Xiong, Y. (2018). Metabolic reprogramming by PCK1 promotes TCA cataplerosis, oxidative stress and apoptosis in liver cancer cells and suppresses hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 37(12), 1637-1653. doi:10.1038/s41388-017-0070-6
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., *et al.* Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 73(17), 3221-3247. doi:10.1007/s00018-016-2223-0
- Lu, Q., Wang, W. W., Zhang, M. Z., Ma, Z. X., Qiu, X. R., Shen, M., *et al.* Yin, X. X. (2019). ROS induces epithelial-mesenchymal transition via the TGF-beta1/PI3K/Akt/mTOR pathway in diabetic nephropathy. *Exp Ther Med*, 17(1), 835-846. doi:10.3892/etm.2018.7014

- Mansouri, A., Ridgway, L. D., Korapati, A. L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z. H., Mills, G. B., et al Claret, F. X. (2003). Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, 278(21), 19245-19256. doi:10.1074/jbc.M208134200
- Marchini, S., Fruscio, R., Clivio, L., Beltrame, L., Porcu, L., Fuso Nerini, I., Cavalieri, D., Chiorino, G., Cattoretti, G., Mangioni, C., Milani, R., et al. (2013). Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer*, 49(2), 520-530. doi:10.1016/j.ejca.2012.06.026
- Martin, T. A., Goyal, A., Watkins, G., et al Jiang, W. G. (2005). Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 12(6), 488-496. doi:10.1245/aso.2005.04.010
- Marzano, C., Gandin, V., Folda, A., Scutari, G., Bindoli, A., et al Rigobello, M. P. (2007). Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med*, 42(6), 872-881. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.021
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Bertrand, F. E., Davis, N. M., Sokolosky, M., Abrams, S. L., Montalto, G., D'Assoro, A. B., Libra, M., Nicoletti, F., Maestro, R., et al. (2014). GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*, 5(10), 2881-2911. doi:10.18632/oncotarget.2037
- McGuire, W. P., 3rd, et al Markman, M. (2003). Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. *Br J Cancer*, 89 Suppl 3, S3-8. doi:10.1038/sj.bjc.6601494
- Miao, L., et al St Clair, D. K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*, 47(4), 344-356. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018
- Mistry, P., Loh, S. Y., Kelland, L. R., et al Harrap, K. R. (1993). Effect of buthionine sulfoximine on PtII and PtIV drug accumulation and the formation of glutathione conjugates in human ovarian-carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 55(5), 848-856.
- Miyazono, K. (2009). Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(8), 314-323.

- Montal, E. D., Dewi, R., Bhalla, K., Ou, L., Hwang, B. J., Ropell, A. E., Gordon, C., Liu, W. J., DeBerardinis, R. J., Sudderth, J., Twaddell, W., *et al.* (2015). PEPCK Coordinates the Regulation of Central Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. *Mol Cell*, 60(4), 571-583. doi:10.1016/j.molcel.2015.09.025
- Morandi, A., Taddei, M. L., Chiarugi, P., et alGiannoni, E. (2017). Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Front Oncol*, 7, 40. doi:10.3389/fonc.2017.00040
- Nagase, H., Visse, R., et alMurphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573. doi:10.1016/j.cardiores.2005.12.002
- Nicolini, A., Carpi, A., et alRossi, G. (2006). Cytokines in breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(5), 325-337. doi:10.1016/j.cytogfr.2006.07.002
- Nishikawa, M. (2008). Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett*, 266(1), 53-59. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.031
- Niture, S. K., Jain, A. K., Shelton, P. M., et alJaiswal, A. K. (2017). Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *J Biol Chem*, 292(5), 2048. doi:10.1074/jbc.A117.255042
- Nuti, S. V., Mor, G., Li, P., et alYin, G. (2014). TWIST and ovarian cancer stem cells: implications for chemoresistance and metastasis. *Oncotarget*, 5(17), 7260-7271. doi:10.18632/oncotarget.2428
- OMS. (2017). Organisation Mondiale De La Santé (2018) Cancer. Consulté le mars 20, 2019 sur la site.
- Ozaktay, A. C., Kallakuri, S., Takebayashi, T., Cavanaugh, J. M., Asik, I., DeLeo, J. A., et alWeinstein, J. N. (2006). Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. *Eur Spine J*, 15(10), 1529-1537. doi:10.1007/s00586-005-0058-8
- Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci*, 96(9), 2181-2196. doi:10.1002/jps.20874

- Ozols, R. F. (2003). Maintenance therapy in advanced ovarian cancer: progression-free survival and clinical benefit. *J Clin Oncol*, 21(13), 2451-2453. doi:10.1200/jco.2003.03.039
- Pepper, M. S., Baetens, D., Mandriota, S. J., Di Sanza, C., Oikemus, S., Lane, T. F., Soriano, J. V., Montesano, R., et al Iruela-Arispe, M. L. (2000). Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Dev Dyn*, 218(3), 507-524. doi:10.1002/1097-0177(200007)218:3<507::aid-dvdy1012>3.0.co;2-5
- Pratheeshkumar, P., Sreekala, C., Zhang, Z., Budhரா, A., Ding, S., Son, Y. O., Wang, X., Hitron, A., Hyun-Jung, K., Wang, L., Lee, J. C., et al Shi, X. (2012). Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. *Anticancer Agents Med Chem*, 12(10), 1159-1184.
- Reichard, J. F., Motz, G. T., et al Puga, A. (2007). Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Res*, 35(21), 7074-7086. doi:10.1093/nar/gkm638
- Reid, B. M., Permuth, J. B., et al Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*, 14(1), 9-32. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084
- Rhyu, D. Y., Yang, Y., Ha, H., Lee, G. T., Song, J. S., Uh, S. T., et al Lee, H. B. (2005). Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 16(3), 667-675. doi:10.1681/asn.2004050425
- Ricciardi, M., Zanotto, M., Malpeli, G., Bassi, G., Perbellini, O., Chilosi, M., Bifari, F., et al Krampera, M. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immune-modulatory properties in cancer cells. *Br J Cancer*, 112(6), 1067-1075. doi:10.1038/bjc.2015.29
- Rochman, Y., Spolski, R., et al Leonard, W. J. (2009). New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*, 9(7), 480-490. doi:10.1038/nri2580
- Sanchez, Y., Amran, D., de Blas, E., et al Aller, P. (2009). Regulation of genistein-induced differentiation in human acute myeloid leukaemia cells (HL60, NB4) Protein kinase modulation and reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol*, 77(3), 384-396. doi:10.1016/j.bcp.2008.10.035

- See, H. T., Kavanagh, J. J., Hu, W., et al Bast, R. C. (2003). Targeted therapy for epithelial ovarian cancer: current status and future prospects. *Int J Gynecol Cancer*, 13(6), 701-734.
- Shao, T., Song, P., Hua, H., Zhang, H., Sun, X., Kong, Q., Wang, J., Luo, T., et al Jiang, Y. (2018). Gamma synuclein is a novel Twist1 target that promotes TGF-beta-induced cancer cell migration and invasion. *Cell Death Dis*, 9(6), 625. doi:10.1038/s41419-018-0657-z
- Siegel, D., et al Ross, D. (2000). Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in human tissues. *Free Radic Biol Med*, 29(3-4), 246-253.
- Siomek, A., Tujakowski, J., Gackowski, D., Rozalski, R., Foksinski, M., Dziaman, T., Roszkowski, K., et al Olinski, R. (2006). Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. *Int J Cancer*, 119(9), 2228-2230. doi:10.1002/ijc.22088
- Takebe, N., Warren, R. Q., et al Ivy, S. P. (2011). Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res*, 13(3), 211. doi:10.1186/bcr2876
- Tato, C. M., et al Cua, D. J. (2008). SnapShot: Cytokines I. *Cell*, 132(2), 324, 324.e321. doi:10.1016/j.cell.2008.01.001
- Tulpin, L., Akerman, G., Morel, O., Desfeux, P., Malartic, C., et al Barranger, E. (2008). [Management of borderline tumors of the ovary]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 37 Spec No 2, F69-76.
- Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A., et al Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 37(6), 375-536. doi:10.1080/10409230290771546
- van der Wijst, M. G., Brown, R., et al Rots, M. G. (2014). Nrf2, the master redox switch: the Achilles' heel of ovarian cancer? *Biochim Biophys Acta*, 1846(2), 494-509. doi:10.1016/j.bbcan.2014.09.004
- van der Wijst, M. G., Huisman, C., Mposhi, A., Roelfes, G., et al Rots, M. G. (2015). Targeting Nrf2 in healthy and malignant ovarian epithelial cells: Protection versus promotion. *Mol Oncol*, 9(7), 1259-1273. doi:10.1016/j.molonc.2015.03.003

- Vasey, P. A. (2003). Resistance to chemotherapy in advanced ovarian cancer: mechanisms and current strategies. *Br J Cancer*, 89 Suppl 3, S23-28. doi:10.1038/sj.bjc.6601497
- Visser, J. E., Smith, D. W., Moy, S. S., Breese, G. R., Friedmann, T., Rothstein, J. D., et al Jinnah, H. A. (2002). Oxidative stress and dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *Brain Res Dev Brain Res*, 133(2), 127-139.
- Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wakefield, L. M., McCartney-Francis, N., Wahl, L. M., Roberts, A. B., et al Sporn, M. B. (1987). Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(16), 5788-5792.
- Wang, Shi, J., Chai, K., Ying, X., et al Zhou, B. P. (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, 13(9), 963-972.
- Wang, J., et al Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*, 7(12), 1875-1884.
- Wang, L., Chen, Y., Sternberg, P., et al Cai, J. (2008). Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(4), 1671-1678. doi:10.1167/iovs.07-1099
- Wang, Z., Li, Y., et al Sarkar, F. H. (2010). Signaling mechanism(s) of reactive oxygen species in Epithelial-Mesenchymal Transition reminiscent of cancer stem cells in tumor progression. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5(1), 74-80.
- Xu, J., Acharya, S., Sahin, O., Zhang, Q., Saito, Y., Yao, J., Wang, H., Li, P., Zhang, L., Lowery, F. J., Kuo, W. L., et al. (2015). 14-3-3zeta turns TGF-beta's function from tumor suppressor to metastasis promoter in breast cancer by contextual changes of Smad partners from p53 to Gli2. *Cancer Cell*, 27(2), 177-192. doi:10.1016/j.ccell.2014.11.025
- Yu, L., Hebert, M. C., et al Zhang, Y. E. (2002). TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *Embo j*, 21(14), 3749-3759. doi:10.1093/emboj/cdf366
- Yuan, L., Sheng, X., Willson, A. K., Roque, D. R., Stine, J. E., Guo, H., Jones, H. M., Zhou, C., et al Bae-Jump, V. L. (2015). Glutamine promotes ovarian cancer cell proliferation through the mTOR/S6 pathway. *Endocr Relat Cancer*, 22(4), 577-591. doi:10.1530/erc-15-0192

- Zeller, W. J., Fruhauf, S., Chen, G., Keppler, B. K., Frei, E., et alKaufmann, M. (1991). Chemoresistance in rat ovarian tumours. *Eur J Cancer*, 27(1), 62-67.
- Zelova, H., et alHosek, J. (2013). TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res*, 62(7), 641-651. doi:10.1007/s00011-013-0633-0
- Zhang, J. M., et alAn, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45(2), 27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
- Zhang, Y., Alexander, P. B., et alWang, X. F. (2017). TGF-beta Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(4). doi:10.1101/cshperspect.a022145
- Zheng, H. C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*, 8(35), 59950-59964. doi:10.18632/oncotarget.19048
- Zhu, H. J., et alBurgess, A. W. (2001). Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol Cell Biol Res Commun*, 4(6), 321-330. doi:10.1006/mcbr.2001.0301