

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DE LA FONCTION GALLOYLE DES CATÉCHINES DU THÉ VERT  
SUR LE PHÉNOTYPE MÉTASTATIQUE DU CANCER DE L'OVAIRE

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR  
AUDREY-ANN SICARD

JUILLET 2020

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.10-2015). 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

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes merveilleuses que j'ai eu la chance de côtoyer et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire de maîtrise. Tout d'abord, je voulais remercier particulièrement mon directeur de recherche le Dr Borhane Annabi, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je le remercie pour ses encouragements, ses précieux conseils, sa créativité et son support constant, pour avoir cru en mes capacités et pour avoir guidé mes travaux tout au long de ma maîtrise. Pour la confiance qu'il m'a toujours accordée et de m'avoir permis de réaliser mes projets.

Mes sincères remerciements à mes collègues Narjara Gonzalez Suarez, Marbelis Francisco Fernandez, Souad Djediai, Cyndia Charfi, Natacha Duquette et Jean-Christophe Currie. Pour leur présence, leur amitié et leur aide.

Merci à Tiziana Dao de m'avoir appris les techniques du laboratoire, pour sa patience, ses précieux conseils qui m'ont servis tout au long de mon parcours. Merci à Samaneh Kamyabiazar, pour sa complicité, son support moral et toute l'aide qu'elle m'a apporté pour la réalisation de mes expériences. Merci à Alain Zgheib d'avoir pris le temps de répondre à mes questions, de sa bienveillance et de sa contribution pour la réalisation de mes travaux.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Dr Diana Averill, qui m'a donné accès à certains instruments de son laboratoire, et à Mélanie Grondin qui m'y a accueilli à maintes reprises et pour son expertise technique. Sans vous, la réalisation de ce projet n'aurait pas été possible.

Je remercie également le Dr Denis Flipo qui m'a accueilli dans son laboratoire, pour son hospitalité, pour l'intérêt qu'il a porté envers mes projets et d'avoir pris le temps de discuter et de me partager ses connaissances.

Merci à mon copain, Carl Lalonde-Haman, pour son immense soutien, son support moral et d'avoir toujours cru en mes capacités. Merci à mes parents, ma sœur, mes amis qui m'ont apporté leur écoute, leurs encouragements, leur confiance tout au long de ma maîtrise.

Enfin, j'adresse des remerciements à la Fondation UQÀM et à la Chaire en Prévention et Traitement du Cancer pour le support financier.

REMERCIEMENTS .....	ii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	x
RÉSUMÉ .....	xi
CHAPITRE 1 .....	1
INTRODUCTION .....	1
1.1 Le cancer .....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Épidémiologie .....	2
1.2 Généralités sur les cancers ovariens.....	5
1.2.1 Statistiques.....	5
1.2.2 Stadification AJCC/FIGO .....	6
1.2.3 Classification histologique .....	9
1.2.4 Classification de Kurman et Shih.....	11
1.2.5 Carcinomes ovariens de type 1.....	12
1.2.5.1 Les carcinomes mucineux .....	12
1.2.5.2 Les carcinomes endométrioides et à cellules claires.....	12
1.2.5.3 Les carcinomes séreux de bas grade .....	13
1.2.6 Carcinomes ovariens de type 2.....	13
1.2.6.1 Les carcinomes séreux de haut grade.....	13
1.2.7 Facteurs de risque.....	15

1.2.8 Traitements .....	16
1.2.8.1 Chirurgie .....	17
1.2.8.2 Chimiothérapie .....	17
1.2.9 Défis thérapeutiques .....	19
1.2.9.1 Détection .....	19
1.2.9.2 Chimiorésistance .....	20
1.3 Métastases .....	22
1.3.1 Mécanismes .....	24
1.3.2 La transition épithélio-mésenchymateuse .....	25
1.3.3 Voie de signalisation des Smads .....	28
1.3.3.1 Mécanisme .....	28
1.3.3.2 La cytokine TGF- $\beta$ .....	30
1.3.3.3 Les récepteurs au TGF- $\beta$ .....	31
1.3.3.4 Les cofacteurs Smads .....	32
1.3.3.5 TGF- $\beta$ comme cible thérapeutique .....	33
Une autre stratégie consiste en l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-TGF- $\beta$ . Plusieurs de ces agents sont largement étudiés sur une multitude de types de cancers. Peu de ces études explorent toutefois l'impact de ces agents, spécifiquement sur le cancer de l'ovaire. Une découverte majeure d'un agent potentiel, un fragment de liaison à l'antigène (Fab), obtenu à partir d'une librairie synthétique à partir de TGF- $\beta$ RII, a montré une capacité prometteuse d'inverser le programme de l'EMT et l'invasion chez des modèles de souris xénotransplantées avec un EOC (Newsted <i>et al.</i> , 2018).....	34
1.3.4 La vascularisation et le mimétisme vasculogénique .....	34

1.3.5 Les métalloprotéases matricielles.....	36
1.4 Approche thérapeutique .....	38
1.4.1 La chimioprévention par l'alimentation .....	38
1.4.2 Les catéchines du thé vert .....	39
1.4.3 La fonction galloyle.....	41
CHAPITRE 2 .....	42
PROJET DE RECHERCHE .....	42
2.1 Problématique .....	42
2.2 Objectifs de recherche.....	43
2.3 Hypothèses de travail .....	44
2.4 Modèles cellulaires utilisés .....	44
CHAPITRE 3 .....	46
ARTICLE 1 : Diet-derived gallated catechins prevent TGF- $\beta$ -mediated epithelial- mesenchymal transition, cell migration and vasculogenic mimicry in chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells .....	46
3.1 Résumé.....	48
3.2 Abstract .....	49
3.3 Introduction.....	50
3.4 Materials and Methods.....	53
3.5 Results .....	58
3.6 Discussion .....	62
3.7 References.....	66
3.8 Figures.....	73

CHAPITRE 4 .....	79
ARTICLE 2 : Preventing EMT in ES-2 ovarian cancer cells through the biophysical targeting of TGF- $\beta$ R1 : A role for the galloyl moiety of green tea-derived catechins	79
4.1 Résumé .....	81
4.3 Abstract .....	82
4.4 Introduction .....	83
4.5 Materials and methods .....	86
4.6 Results .....	90
4.7 Discussion .....	95
4.8 Declarations .....	98
4.9 References .....	99
4.10 Figures .....	105
CHAPITRE 5 .....	111
DISCUSSION .....	111
CONCLUSION .....	124
BIBLIOGRAPHIE .....	126

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Taux d'incidence et de mortalité des cancers dans les régions présentant un indice de développement humain (HDI) élevé/très élevé versus faible/moyen.....	4
Figure 1.2 Classification histologique du cancer ovarien .....	10
Figure 1.3 Disparité des gènes les plus fréquemment mutés entre les sous-types histologiques du cancer épithélial de l'ovaire .....	14
Figure 1.4 Les caractéristiques du cancer mettant en avant plan l'invasion et les métastases.....	23
Figure 1.5 Le programme de l'EMT .....	27
Figure 1.6 Mécanisme d'activation de l'EMT .....	29
Figure 1.7 Structure et mécanisme d'activation de TGF- $\beta$ R1/2 .....	32
Figure 1.8 Structures chimiques des huit catéchines du thé vert .....	40
Figure 3.1 Low chemotactic response and inoperative TGF- $\beta$ -mediated phosphorylation of Smad-3 in chemoresistant SKOV-3 ovarian cancer cells.....	73
Figure 3.2 TGF- $\beta$ -mediated induction of phosphorylated signaling intermediates and EMT biomarkers.....	74
Figure 3.3 Structure-to-anti-TGF- $\beta$ signaling function study of diet-derived catechins with ES-2 ovarian cancer cells .....	75
Figure 3.4 Kinetics and characteristics of in vitro 3D capillary-like structure formation assay of ES-2 ovarian cancer cells correlate with EMT biomarkers during vasculogenic mimicry .....	76
Figure 3.5 Catechin alteration of in vitro 3D-capillary-like structure formation by ES-2 ovarian cancer cells .....	77
Figure 3.6 Scheme summarizing the anti-TGF- $\beta$ impact of the gallated catechins. A) Chemical structures of the four gallated catechins which were tested in this study..	78



Figure 4.1	Green tea-derived galloylated catechin EGCG alters TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation .....	105
Figure 4.2	Galloylated molecules alter TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation .. .....	106
Figure 4.3	Galloylated molecules alter TGF- $\beta$ -induced cell migration .....	107
Figure 4.4	The galloyl moiety is sufficient to bind TGF- $\beta$ R1 and inhibit its kinase activity .....	108
Figure 4.5	Dissociation constants for the binding of ungalloylated catechins, galloylated catechins, and galloyl molecules to the TGF- $\beta$ R1 kinase domain .....	109
Figure 4.6	Computational molecular docking analysis reveals how catechins and galloylated compounds bind the TGF- $\beta$ R1 kinase domain.....	110

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Le système de stadification des cancers AJCC et FIGO .....	8
--	---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

C	Catéchine
CAF	Fibroblastes Associés au Cancer
CG	Catéchine Gallate
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
EC	Épicatéchine
ECG	Épicatéchine Gallate
EGC	Épigallocatechine
EGCG	Épigallocatechine Gallate
EMT	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
EOC	Cancer Épithélial de l'Ovaire
GC	Gallocatechine
GCG	Gallocatechine Gallate
HDI	Indice de Développement Humain
HGSOC	Carcinome Ovarien Séreux de Haut-Grade
IL-6	Interleukine-6
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Métalloprotéase Matricielle
PLD	Doxorubicine Liposomale Pégylée
TGF- $\beta$	Facteur de Croissance Transformant Bêta
TGF- $\beta$ R	Récepteur au TGF- $\beta$
VM	Mimétisme Vasculogénique
WHO	<i>World Health Organization</i>

## RÉSUMÉ

Les cancers ovariens représentent les malignités gynécologiques les plus mortelles. La majorité des cas sont diagnostiqués en stades avancés (III/IV), avec une forte dissémination métastatique. On reconnaît à présent l'implication de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans l'acquisition d'un phénotype métastatique par les cellules cancéreuses.

Dans ce mémoire, nous avons tenté d'évaluer la capacité de l'EGCG ainsi que de sept autres catéchines dérivées du thé vert à prévenir l'EMT et l'invasion dans un modèle de carcinome ovarien ES-2. Dans une première étude, nous avons démontré que les catéchines possédant une fonction galloyle (CG, GCG, ECG, EGCG) avaient la capacité de prévenir l'induction de l'EMT chez ES-2, en empêchant la phosphorylation de Smad-3 et la subséquente expression des biomarqueurs de l'EMT : Snail, Slug, Fibronectine, Vimentine et MMP-2. En parallèle, ces catéchines pouvaient prévenir la migration cellulaire et le mimétisme vasculogénique (VM). Dans une deuxième étude, nous avons montré que d'autres antioxydants, composés d'une fonction galloyle, pouvaient démontrer cette même activité inhibitrice sur l'induction de l'EMT. Par résonance plasmonique de surface (SPR), nous avons montré que nos composés pouvaient s'associer directement au TGF- $\beta$  récepteur 1 (TGF- $\beta$ R1), puis empêcher la phosphorylation du substrat Smad-3 dans un essai enzymatique. Finalement, nous avons caractérisé le site de liaison prédictif de nos composés galloylés, par amarrage moléculaire computationnel, au site de liaison de l'ATP du TGF- $\beta$ R1. Ce site de liaison était similaire à celui occupé par l'inhibiteur compétitif de l'ATP de TGF- $\beta$ R1, le Galunisertib.

En sommes, nos résultats proposent donc que les catéchines du thé vert et les molécules galloylées exercent une activité anti-métastatique en liant le domaine kinase de TGF- $\beta$ R1 et empêchant la liaison de l'ATP, antagonisant ainsi la signalisation du TGF- $\beta$  et l'EMT, par un mécanisme d'action similaire au Galunisertib. Nous proposons que la fonction galloyle permet une spécificité de liaison au domaine kinase de TGF- $\beta$ R.

### Mots clés

Cancer épithélial de l'ovaire, Catéchines gallates, Chimiotactisme, Smad-3, TGF- $\beta$ R1, Transition épithélio-mésenchymateuse.

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION

#### 1.1 Le cancer

##### 1.1.1 Généralités

Le cancer, ce fléau pour la santé humaine, a pris des proportions planétaires et représente toujours un défi de taille, malgré l'importance de la recherche et des percées scientifiques réalisées. Selon les estimations du World Health Organization (WHO), le cancer reste la première cause de mort prématurée et représente, à ce jour, la seule barrière majeure à la possibilité d'accroître l'espérance de vie (Bray *et al.*, 2018). Le cancer est un terme généralement employé pour désigner un ensemble de pathologies pouvant toucher n'importe quel tissu de l'organisme. Il existe plus de 200 types de cancers différents (Lodish *et al.*, 2000). La maladie prend place lorsque des cellules d'un tissu en particulier ne répondent plus aux signaux qui régulent la différenciation, la survie, la prolifération et la mort. Conséquemment, ces cellules, insensibles à ces signaux, auront la possibilité de croître de façon incontrôlée, s'accumuler dans les tissus, générer de l'inflammation et des dommages locaux et, dans certains cas, se propager dans l'organisme sous forme de métastases (Lodish *et al.*, 2000). Les métastases sont la cause première de morbidité et de mortalité des cancers : on estime que les métastases sont responsables d'environ 90% des décès liés au cancer (Chaffer et Weinberg, 2011).

### 1.1.2 Épidémiologie

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, responsable de 1 décès sur 6. Il a été estimé qu'en 2018, 18.1 millions de nouvelles personnes se sont vues diagnostiquer un cancer, et 9.6 millions en sont décédées (World Health Organization, 2018). Au Canada, c'est 220 400 personnes qui ont reçu un diagnostic de cancer en 2019, et 82 100 qui en sont décédées (Canadian Cancer Society, 2019; Société Canadienne du Cancer, 2019). Un Canadien au cours de sa vie a une chance sur deux d'être atteint d'un cancer et une chance sur quatre d'en décéder (Société Canadienne du Cancer, 2019). Le cancer du poumon est le cancer le plus diagnostiqué (11,6% des cas) et le plus mortel (18,4% de tous les décès reliés au cancer), suivi de très près par le cancer du sein (11,6%), de la prostate (7,1%) et colorectal (6,1%) pour l'incidence, puis le cancer colorectal (9,2%), de l'estomac (8,2%) et du foie (8,2%) pour la mortalité. Pour les hommes, après le cancer du poumon, les types de cancer les plus fréquents sont le cancer de la prostate, suivi du cancer colorectal et les cancers les plus mortels sont l'estomac et le foie. Chez les femmes, le cancer du sein est le type le plus diagnostiqué et le plus mortel. Il s'en suit le cancer colorectal et du poumon en termes d'incidence et vice-versa pour la mortalité. Le cancer cervical obtient le 4e rang, à la fois pour l'incidence et la mortalité (Bray *et al.*, 2018).

L'incidence et la mortalité du cancer augmentent rapidement à travers le monde et l'on prévoit que ce fardeau continuera de grandir, particulièrement dans les pays moins développés, là où 82% de la population résident. Les causes sont complexes, mais le reflet d'une population à la fois grandissante et vieillissante, ainsi que des changements dans la distribution et la prévalence des facteurs de risques principaux, dont une bonne partie sont associés au développement socio-économique, pourraient être mis en cause (Bray *et al.*, 2018). L'adoption d'habitudes de vie connues pour augmenter le risque de développer un cancer, telles que le tabagisme, une alimentation peu variée, la sédentarité, les changements reproductifs (faible parité et première grossesse en âge

avancé) sont connus pour favoriser grandement l'incidence dans les pays en voie de développement économique (Torre *et al.*, 2015). L'ascension de la maladie au sein des économies émergentes est accompagnée par une transition caractéristique des types de cancers les plus communément retrouvés, notamment une réduction des types de cancers associés à la pauvreté et aux infections (cervical, estomac, foie), par rapport à une plus haute fréquence des types de cancers déjà retrouvés dans les pays les plus développés (sein, prostate, colorectal). Ces types de cancers sont souvent associés à ce que l'on désigne d'une occidentalisation du mode de vie (Bray *et al.*, 2018). La disparité entre les pays à « Indice de Développement Humain » (HDI) bas ou moyen contre ceux à HDI élevé et très élevé est encore omniprésente (Figure 1.1). Alors que l'incidence de tous les types de cancers combinés est près de deux fois plus élevée dans les pays développés, certains types sont jusqu'à 2 à 3 fois plus fréquents. La différence de mortalité entre ces deux régions est toutefois beaucoup moins marquée (Bray *et al.*, 2018). Cette disparité est le reflet des différences dans les pratiques de détection et dans l'accessibilité aux traitements entre les deux régions, entraînant une plus grande fatalité de plusieurs types de cancer chez les pays à HDI plus faible (Bray *et al.*, 2018; Torre *et al.*, 2015).

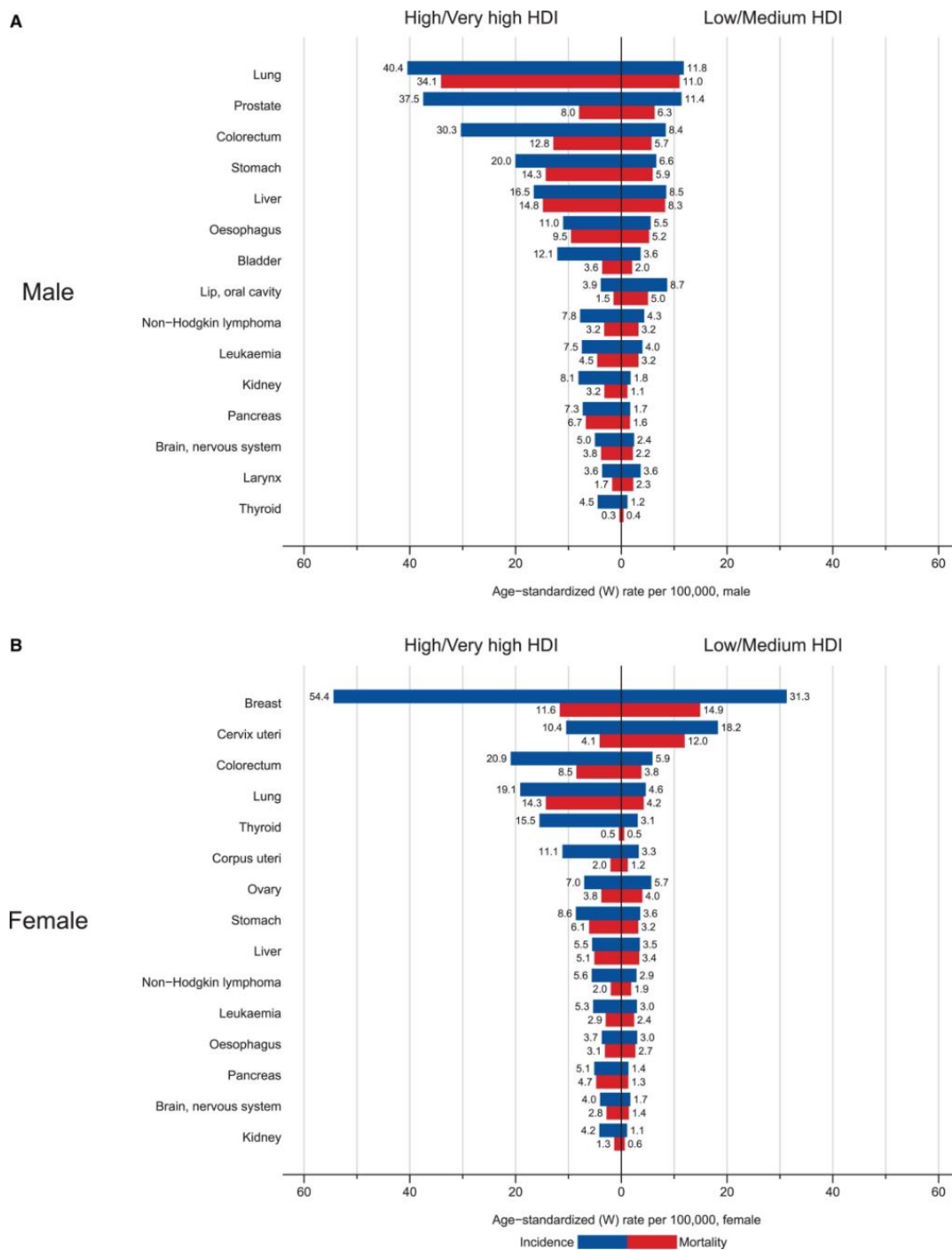


Figure 1.1 Taux d'incidence et de mortalité des cancers dans les régions présentant un indice de développement humain (HDI) élevé/très élevé versus faible/moyen chez les hommes (A) et les femmes (B). Les 15 cancers les plus fréquents en 2018 sont présentés en ordre décroissant d'incidence, standardisé sur l'âge. (Adapté de Bray et al., 2018)



## 1.2 Généralités sur les cancers ovariens

Le cancer épithélial de l’ovaire est une malignité hautement morbide. C’est le cancer gynécologique qui obtient souvent le pire pronostic et offre les moins bonnes chances de survie (Coburn *et al.*, 2017). Malgré la recherche intensive dirigée vers des traitements améliorés et de meilleures méthodes de détection, la majorité des femmes diagnostiquées continuent de succomber à cette maladie (Hunn et Rodriguez, 2012). Les progrès dans la lutte contre le cancer ovarien sont difficiles en raison du diagnostic tardif, souvent en stade avancé, étant donné qu’il est souvent asymptomatique au début de la maladie. L’absence de thérapie hautement efficace et la forte hétérogénéité moléculaire des tumeurs nuisent également grandement aux chances de guérison (American Cancer Society, 2011).

### 1.2.1 Statistiques

Le cancer ovarien, malgré sa faible fréquence, reste la malignité gynécologique la plus mortelle. Chaque année dans le monde, il est estimé que 225 500 cas de cancers ovariens seront diagnostiqués et que 140 200 femmes succomberont à la maladie. Ceci représente la 7<sup>e</sup> forme la plus commune de cancer, et la 8<sup>e</sup> cause majeure de décès relié au cancer chez les femmes dans le monde (Ferlay *et al.*, 2015; Jemal *et al.*, 2011). Chez les nations occidentales, toutefois, cette maladie représente la 5<sup>e</sup> cause de décès par le cancer chez les femmes. Au Canada, la Société Canadienne du Cancer estime que 3,000 femmes auraient été diagnostiquées avec un cancer de l’ovaire en 2019 et que 1,900 en sont mortes (Société Canadienne du Cancer, 2019). Bien que les chances de survie aient considérablement augmenté depuis les 50 dernières années, les probabilités de survie au cancer de l’ovaire sont demeurées relativement faibles. Aux États-Unis, on estime que le taux de survie de plus de 5 ans est d’approximativement 47,7% (SEER, 2018).

### 1.2.2 Stadification AJCC/FIGO

La stadification est une manière de classer un cas de cancer d'après l'étendue de la maladie dans le corps au moment du diagnostic. Le stade est déterminé en fonction de la taille de la tumeur primaire, ainsi que d'après son degré de propagation aux tissus environnants et aux autres parties du corps. Le système TNM (tumeur, nœud, métastase) est une méthode reconnue dans le monde pour classer l'étendue anatomique de la maladie. Le système TNM permet de décrire le stade de la plupart des tumeurs solides, mais il n'est pas utilisé pour déterminer le stade des tumeurs de l'encéphale ou du système nerveux central, des cancers du sang et du système lymphatique (leucémie, myélome multiple) ainsi que de certains cancers infantiles. La lettre T renvoie à la taille de la tumeur primaire ainsi qu'à toute invasion locale. La valeur de T va généralement de 1 (plus faible taille ou volume) à 4 (plus grande taille ou volume). N indique si le cancer a atteint les nœuds (ou ganglions) lymphatiques. La valeur de N peut aller de 0 (aucune atteinte) à 3 (envahissement). M indique si le cancer s'est étendu (métastasé) à une autre partie du corps. La valeur de M est soit de 0 (aucune métastase), soit de 1 (présence de métastases) (American Cancer Society, 2018). Les détails des classifications FIGO et AJCC pour le cancer de l'ovaire sont présentés dans le tableau 1.1.

Stade AJCC/FIGO	Sous-classification TNM	Définition du stade
<b>I</b>	<b>T1,N0,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est limité à l'ovaire (ou les ovaires) ou aux tubes utérins.</li> <li>- Pas de propagation dans les ganglions lymphatiques (N0) ou à un site distal (M0).</li> </ul>
<b>IA</b>	<b>T1a,N0,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est dans un ovaire (ou deux ovaires) et la tumeur est confinée à l'intérieur de cet ovaire; ou bien, le cancer est dans un des tubes utérins.</li> <li>- Il n'y a pas de cancer sur la surface externe de l'ovaire ou du tube utérin.</li> <li>- Aucune cellule cancéreuse n'est retrouvée dans les fluides (ascites) ou les lavages de l'abdomen et du pelvis (T1a).</li> <li>- Pas de propagation dans les ganglions lymphatiques (N0) ou à un site distal (M0).</li> </ul>
<b>IB</b>	<b>T1b,N0,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est présent dans les deux ovaires ou les tubes utérins.</li> <li>- Aucune cellule cancéreuse n'est retrouvée dans les fluides (ascites) ou les lavages de l'abdomen et du pelvis (T1b).</li> <li>- Pas de propagation dans les ganglions lymphatiques (N0) ou à un site distal (M0).</li> </ul>
<b>IC</b>	<b>T1c,N0,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est dans un ovaire (ou deux ovaires) ou dans les tubes utérins et l'une des caractéristiques suivantes est présente : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Le tissu (capsule) entourant la tumeur s'est perforé durant la chirurgie, ce qui a permis aux cellules cancéreuses de se propager dans l'abdomen et le pelvis (déversement chirurgical). Ceci correspond au stade IC1.</li> <li>• Le cancer est sur la surface externe d'au moins une des ovaires ou des tubes utérins ou la capsule (tissu entourant la tumeur) a éclaté avant la chirurgie (ce qui a permis aux cellules cancéreuses de se déverser dans l'abdomen et le pelvis). Ceci correspond au stade IC2.</li> <li>• Les cellules cancéreuses se retrouvent dans les fluides (ascites) ou dans les lavements de l'abdomen et du pelvis. Ceci correspond au stade IC3.</li> </ul> </li> <li>- Pas de propagation dans les ganglions lymphatiques (N0) ou à un site distal (M0).</li> </ul>
<b>II</b>	<b>T2,N0,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est dans un ovaire (ou deux ovaires) ou dans les tubes utérins et s'est propagé dans d'autres organes (tels que l'utérus, la vessie, le côlon sigmoïde ou le rectum) compris dans la région pelvienne ou il y a carcinose péritonéale primitive (T2).</li> <li>- Pas de propagation dans les ganglions lymphatiques (N0) ou à un site distal (M0).</li> </ul>
<b>IIA</b>	<b>T2a,N0,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer s'est propagé dans l'utérus ou les tubes utérins, ou les ovaires.</li> <li>- Pas de propagation dans les ganglions lymphatiques (N0) ou à un site distal (M0).</li> </ul>
<b>IIB</b>	<b>T2b,N0,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est sur la surface externe ou s'est propagé dans d'autres organes compris dans la région pelvienne (tels que la vessie, le côlon sigmoïde ou le rectum) (T2b).</li> <li>- Pas de propagation dans les ganglions lymphatiques (N0) ou à un site distal (M0).</li> </ul>
<b>IIIA1</b>	<b>T1 / T2,N1,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est dans un ovaire (ou deux ovaires) ou les tubes utérins ou il y a carcinose péritonéale primitive (T1), et il y a possibilité que le cancer se soit répandu dans d'autres organes de la région pelvienne (T2).</li> <li>- Le cancer s'est répandu dans les ganglions lymphatiques rétropéritonéaux (pelvien et/ou para-aortique) seulement (T2).</li> <li>- Il n'y a pas de propagation à des sites distaux (M0).</li> </ul>

<b>IIIA2</b>	<b>T3a,N0 / N1,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est dans un ovaire (ou deux ovaires) ou les tubes utérins ou il y a carcinose péritonéale primitive et il y a propagation dans d'autres organes de la région pelvienne.</li> <li>- Durant la chirurgie, aucune tumeur n'est visible à l'œil nu dans l'abdomen (en dehors du pelvis), toutefois des petits dépôts de cancer sont retrouvés sur la paroi de la cavité abdominale après examen en laboratoire (T3a).</li> <li>- Le cancer pourrait s'être propagé dans les ganglions lymphatiques rétropéritonéaux ou pas (N0 ou N1), mais il n'y a pas de propagation à des sites distaux (M0).</li> </ul>
<b>IIIB</b>	<b>T3b,N0 / N1,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est dans un ovaire (ou deux ovaires) ou les tubes utérins, ou il y a carcinose péritonéale primitive ou propagation dans les organes en dehors du pelvis.</li> <li>- Les dépôts cancéreux sont assez larges pour être visibles par le chirurgien, mais pas plus grands que 2 cm de large (T3b).</li> <li>- Le cancer pourrait s'être propagé dans les ganglions lymphatiques rétropéritonéaux ou pas (N0 ou N1), mais il n'y a pas de propagation à des sites distaux (M0).</li> </ul>
<b>IIIC</b>	<b>T3c,N0 / N1,M0</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer est dans un ovaire (ou deux ovaires) ou les tubes utérins, ou il y a carcinose péritonéale primitive et propagation dans les organes en dehors du pelvis.</li> <li>- Les dépôts cancéreux font plus de 2 cm de large et peuvent se retrouver sur l'extérieur de la capsule du foie et de la rate (T3c).</li> <li>- Le cancer pourrait s'être propagé dans les ganglions lymphatiques rétropéritonéaux ou pas (N0 ou N1), mais il n'y a pas de propagation à des sites distaux (M0).</li> </ul>
<b>IVA</b>	<b>T (toutes valeurs) / N (toutes valeurs) / M1a</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les cellules malignes sont retrouvées dans les fluides autour des poumons (Épanchement pleural malin), il n'y a pas de propagation dans le foie, la rate, l'intestin ou les ganglions lymphatiques en dehors de l'abdomen (M1a).</li> </ul>
<b>IVB</b>	<b>T (toutes valeurs) / N (toutes valeurs) / M1b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le cancer s'est propagé à l'intérieur de la rate ou du foie, aux ganglions lymphatiques autres que les ganglions lymphatiques rétropéritonéaux, et/ou aux organes ou tissus en dehors de la cavité péritonéales, dans les poumons ou les os par exemple (M1b).</li> </ul>

Tableau 1.1 Le système de stadification des cancers AJCC et FIGO pour le cancer de l'ovaire. Le stade principal ainsi que la sous-classification TNM et la description médicale qui lui correspond. Adapté de (American Cancer Society, 2018)

### 1.2.3 Classification histologique

Le cancer de l'ovaire est une maladie fortement hétérogène tant au niveau morphologique que moléculaire, une classification histologique est nécessaire et complémente la classification selon l'étendue présentée ci-haut (Blagden, 2015). La classification établie par le WHO classe les tumeurs ovariennes selon le type cellulaire d'origine : cellules épithéliales, cellules germinales ou du mésenchyme (cordon sexuel, stroma) (Kaku *et al.*, 2003).

Les carcinomes (tumeurs épithéliales malignes) représentent, à eux seuls, environ les deux tiers de tous les néoplasmes ovariens et une portion encore plus significative de tous les néoplasmes malins (90%) (McCluggage, 2011). Les carcinomes peuvent être à nouveau classés en plusieurs sous-types histologiques, selon leur morphologie et leur architecture tissulaire : tumeur séreuse, tumeur endométrioïde, tumeur à cellules claires, tumeur mucineuse, tumeur Brenner maligne et tumeur à histologie mixte (Figure 1.2). Parmi les sous-types épithéliaux, près du deux tiers sont classifiés comme séreux (McCluggage, 2011; Meinhold-Heerlein *et al.*, 2016). Bien que l'ensemble de ces sous-types soit associé à la même pathologie, on observe depuis longtemps que la nature histologique de ces tumeurs ne correspond pas nécessairement aux tissus ovariens (Lengyel, 2010). Des études récentes suggèrent une origine extra-ovarienne chez plusieurs tumeurs mucineuses, ainsi que les carcinomes à cellules claires et endométrioïdes : ces dernières seraient en fait respectivement dérivées de tumeurs métastatiques intestinales et de lésions endométriosiques (Lengyel, 2010; Riopel *et al.*, 1999).

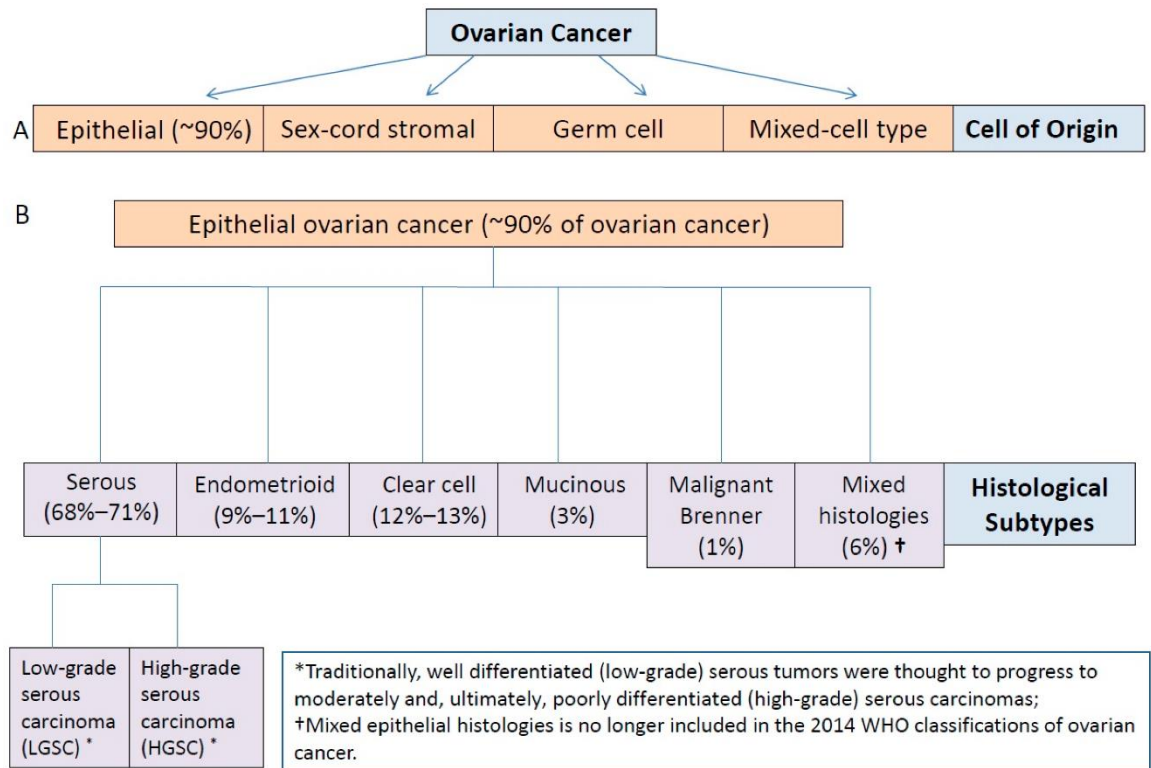


Figure 1.2 Classification histologique du cancer ovarien. Classification et prévalence des sous-types histologiques du cancer épithélial de l’ovaire. (Rojas *et al.*, 2016)

#### 1.2.4 Classification de Kurman et Shih

Les récentes tentatives de caractérisation du cancer épithélial de l'ovaire (EOC), d'une perspective génétique et moléculaire ont mené à une façon alternative de classer la maladie en un modèle dualistique. Ce modèle, initialement introduit par Kurman et Shih en 2004, est maintenant officiellement reconnu par le WHO pour la classification des tumeurs de l'appareil reproducteur féminin (Kurman *et al.*, 2014; Shih et Kurman, 2004). Le modèle sépare l'ensemble des carcinomes ovariens en deux catégories : type 1 ou type 2. Le néoplasme de type 1 se développe en plusieurs étapes à partir de lésions pré-malignes ou « *borderlines* ». D'un point de vue génétique, ces tumeurs présentent fréquemment des altérations des voies de signalisations oncogéniques RAS-MAPK et PI3K-AKT, mais sont, autrement, génétiquement stables et expriment la protéine p53 de façon intacte (Kurman *et al.*, 2014). D'une perspective clinique, ces tumeurs se retrouvent typiquement sous forme de larges néoplasmes kystiques qui croissent de façon indolente, mais ont un excellent pronostic lorsqu'ils sont confinés à l'ovaire (Kurman *et al.*, 2014). Les néoplasmes de type 1 peuvent inclure les sous-types séreux de bas grade, mucineux, à cellules claires et à cellules transitionnelles (Brenner) (Kurman *et al.*, 2014). Par opposition, la catégorie type 2 se démarque par une manifestation largement plus agressive. Contrairement au type 1, on ne retrouve pas de lésions précurseuses, les néoplasmes se développent donc *de novo* à partir du tube utérin ou de l'épithélium de l'ovaire (Koshiyama *et al.*, 2014). Les tumeurs se développent rapidement et sont généralement largement disséminées, menant à un pauvre pronostic (Kurman *et al.*, 2014). Au niveau génétique, ces tumeurs sont caractérisées par leurs mutations du facteur de transcription p53, ainsi que leur forte instabilité génomique, due généralement à des déficiences des voies de signalisation impliquées dans la réparation de l'ADN (Kurman *et al.*, 2014). On croyait traditionnellement que le cancer de type 2 évoluait à partir du type 1. On comprend maintenant qu'il s'agit de deux pathologies distinctes (Kurman, 2013). Cette nouvelle classification facilite grandement le pronostic et donne également des indices sur

l'origine et les mécanismes de formation de ces tumeurs (Kurman et Shih, 2016; McCluggage, 2011).

### 1.2.5 Carcinomes ovariens de type 1

#### 1.2.5.1 Les carcinomes mucineux

Macroscopiquement, ces tumeurs tendent à être les plus volumineuses de toutes les tumeurs ovariennes (Kaku *et al.*, 2003). Les cystoadénomes mucineux, les plus communs, se définissent comme un néoplasme cystique uniloculaire avec une paroi mince, lisse, remplie de fluides mucineux. Les tumeurs « borderlines » présentent souvent des papilles et des zones solides (Kaku *et al.*, 2003). Au niveau microscopique, les tumeurs mucineuses sont caractérisées par des glandes et des kystes accolés à des cellules épithéliales prismatiques contenant une abondance de mucine intracytoplasmique (Kaku *et al.*, 2003). Qu'ils soient bénins, borderlines ou malins, un profil mutagène semble être partagé entre les carcinomes mucineux, qui les distinguent des autres types de cancers épithéliaux de l'ovaire : les mutations de KRAS au codon 12 et 13 semblent être plus fréquentes, tandis que p53 et BRCA sont plus rarement atteints (Brown et Frumovitz, 2014; Gemignani *et al.*, 2003) (Figure 1.3).

#### 1.2.5.2 Les carcinomes endométrioïdes et à cellules claires

Les tumeurs endométrioïdes sont caractérisées par une combinaison d'éléments épithéliaux et stromaux, présentant des similitudes avec l'endomètre (Kaku *et al.*, 2003). Le sous-type à cellules claires, quant à lui, est défini par la présence de cellules d'apparence claire renfermant une forte abondance de glycogène cytoplasmique ainsi que des cellules ayant une morphologie *hobnail* (Kaku *et al.*, 2003). On suspecte que les carcinomes endométrioïdes et à cellules claires se forment à partir de l'endométriose de l'ovaire (Horiuchi *et al.*, 2003). La carcinogenèse associée aux kystes d'origine endométriosique est fortement influencée par le microenvironnement de la tumeur



(Yamaguchi *et al.*, 2008). Ces kystes sont particulièrement assujettis au stress oxydatif et à l'hypoxie et, par conséquent, à des dommages persistant à l'ADN et à la capacité de réparation de ce dernier (Meng *et al.*, 2005). Dans le cas des tumeurs à cellules claires, on retrouve fréquemment des mutations somatiques dans le gène suppresseur de tumeur ARID1A, impliqué dans le remodelage de la chromatine (Abou-Taleb *et al.*, 2016).

#### 1.2.5.3 Les carcinomes séreux de bas grade

Bien que les tumeurs séreuses soient les carcinomes les plus communs, les carcinomes de bas grade de ce type sont très rares (Singer *et al.*, 2005). Les carcinomes séreux de bas grade sont génétiquement stables et présentent peu de mutations, ils progressent lentement et de façon graduelle (Singer *et al.*, 2005). On émet l'hypothèse qu'ils se forment à partir d'inclusions épithéliales ovariennes soumises à de la métaplasie Müllérienne, de résidus embryologiques du canal de Müller proximal ou encore du tube utérin (Dubeau, 2008; Feeley et Wells, 2001; Kurman et Shih, 2011; Lauchlan, 1972).

#### 1.2.6 Carcinomes ovariens de type 2

##### 1.2.6.1 Les carcinomes séreux de haut grade

Les carcinomes séreux sont habituellement larges et souvent bilatéraux. Ils peuvent démontrer une combinaison de kystes, papilles et croissances solides. La tumeur croît sur la surface de l'ovaire et va aussi fréquemment pénétrer la capsule ovarienne. Les cas de nécrose et d'hémorragie sont communs dans les carcinomes séreux (Kaku *et al.*, 2003). Le cancer ovarien séreux de haut grade (HGSOC) est le plus fréquent de tous les cancers ovariens et aussi celui qui présente la propagation la plus agressive et le pire pronostic. À lui seul, il est responsable d'environ 70-80% de tous les décès associés au cancer de l'ovaire (Bowtell *et al.*, 2015; Kurman *et al.*, 2014). Ce type de tumeur se développe *de novo* à partir du tube utérin ou de l'épithélium de la surface de l'ovaire

(Koshiyama *et al.*, 2017). On retrouve des mutations du gène TP53 dans près de 80% des cas (Cho et Shih Ie, 2009). Les réarrangements chromosomiques, reflétant une importante instabilité génétique, sont également très fréquents. L'index de prolifération Ki67 de cellules est élevé (50-75%) (Christie et Oehler, 2006).

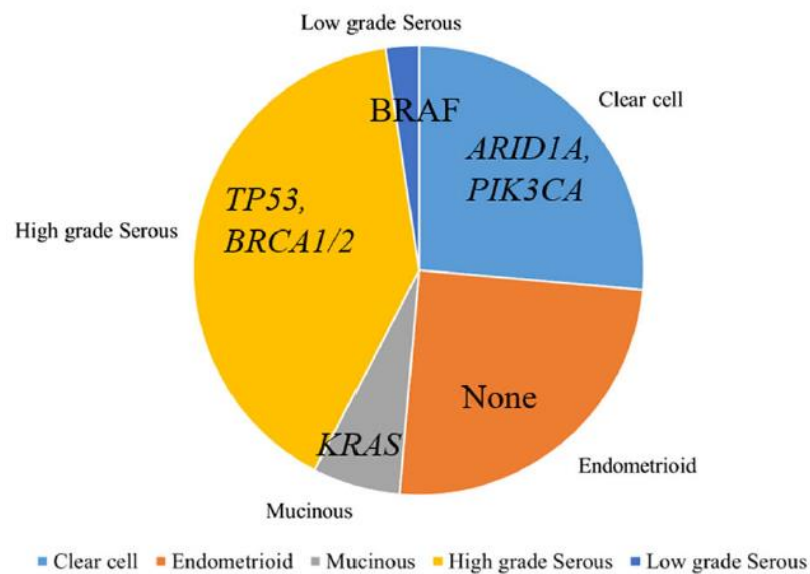


Figure 1.3 Disparité des gènes les plus fréquemment mutés entre les sous-types histologiques du cancer épithélial de l'ovaire. Les mutations de TP53 et BRCA1/2 font partie de la signature génétique habituelle du sous-type séreux de haut grade, les mutations de PIK3CA et KRAS dominent dans les sous-types mucineux et à cellules claires. Le sous-type endométriode présente des similarités histologiques et moléculaires avec le cancer de l'endomètre. Il partage des mutations de PTEN, PIK3CA, ARID1A, KRAS, PPP21 et CTNNB1, dont aucune n'apparaît de façon dominante. La fréquence des mutations diffère également entre les deux pathologies. (Kim *et al.*, 2018)

### 1.2.7 Facteurs de risque

Étant donné que la majorité des cancers de l’ovaire sont détectés en stade avancé, les biomarqueurs précoces associés aux premiers stades du développement de la maladie restent méconnus. L’estimation des facteurs de risque est basée principalement sur les données épidémiologiques (Hunn et Rodriguez, 2012). On observe notamment que l’incidence peut être influencée par l’âge et l’ethnicité. Comme la plupart des cancers épithéliaux, le risque de cancer épithélial ovarien tend à augmenter avec l’âge, celui-ci est particulièrement infrequent chez les femmes préménopausées. Le cancer ovarien de la lignée germinale fait l’exception en se manifestant principalement chez les jeunes femmes (Webb et Jordan, 2017). L’incidence est également plus grande chez les femmes caucasiennes non hispaniques (SEER, 2018). Une part de génétique semble donc favoriser l’apparition de la maladie. En comparaison à la population normale, les porteuses d’une mutation au gène BRCA 1 ont 44% de chance de développer un cancer ovarien avant 70 ans, tandis que le risque est de 27%, pour celles qui ont une mutation de BRCA 2 (Ford *et al.*, 1998). Le type retrouvé chez ces patientes est bien souvent un carcinome séreux de haut grade (Webb et Jordan, 2017). D’autres gènes ont aussi démontré avoir une implication dans l’incidence de la maladie : BRIP1, RAD1C et RAD1D. Des mutations de ces gènes entraînent un risque respectif de développer un cancer de l’ovaire de 5,8%, 5,2% et 12% (Ramus *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015). D’autres variations génétiques des gènes : BARD1, CHEK2, MRE11A, RAD50, PALB2 et ATM, impliqués dans la recombinaison homologue et la réparation de l’ADN, ont également été associés à cette pathologie (Norquist *et al.*, 2016; Ramus *et al.*, 2015).

L’endométriose prédispose certaines femmes à développer un carcinome de l’ovaire, principalement les sous-types endométrioïdes et à cellules claires (Webb et Jordan, 2017). Le risque de développer un cancer de l’ovaire est aussi corrélé au nombre de cycles d’ovulations qu’une femme aurait eu au cours de sa vie (Webb et Jordan, 2017).

Par exemple, une ménarche précoce et une ménopause tardive ont été associées à un risque plus grand d'être atteint (Gong *et al.*, 2013; Wentzensen *et al.*, 2016). La grossesse, l'allaitement, la ligature des trompes et la prise de contraceptifs hormonaux (œstrogène combiné à de la progestérone), qui contribuent à empêcher l'ovulation, diminuent parallèlement de 30% le risque d'être touché par un cancer de l'ovaire (Luan *et al.*, 2013; Wentzensen *et al.*, 2016). Par opposition, le recours à la thérapie hormonale avec de l'œstrogène augmente les chances de contracter la maladie (Wentzensen *et al.*, 2016). Plusieurs études démontrent parallèlement que l'épithélium de l'ovaire répond aux signaux hormonaux. Il a été démontré que la progestine, par exemple, induisait l'apoptose au niveau de l'épithélium de l'ovaire (Hunn et Rodriguez, 2012). Par opposition, il a été avancé que l'œstrogène et les androgènes auraient des effets stimulants et favorisaient le risque de cancer ovarien, tandis que les rétinoïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et la vitamine D auraient plutôt des effets préventifs (Hunn et Rodriguez, 2012). On observe également une incidence amplifiée chez les populations éloignées de l'équateur, où l'exposition lumineuse et, par conséquent, la synthèse de vitamine D est limitée (Salazar-Martinez *et al.*, 2002). D'autres facteurs de risques potentiels tels que l'obésité, une mauvaise alimentation, le diabète, le tabagisme, ainsi que l'usage de talc sur la région périnéale sont soupçonnés. Il a toutefois été difficile de montrer leur réel impact de façon définitive (Hunn et Rodriguez, 2012; Webb et Jordan, 2017).

### 1.2.8 Traitements

Les traitements actuels de première ligne du cancer de l'ovaire consistent en une opération de réduction tumorale suivie de traitements de chimiothérapie à base de platine, habituellement une combinaison de carboplatine et de paclitaxel. Les cancers ovariens sont hautement sensibles à la chimiothérapie, particulièrement celle à base de platines. Bien que la plupart de ces traitements mènent à la rémission complète des patientes, la récurrence de la maladie est aussi fréquente (Gadducci *et al.*, 2019).

### 1.2.8.1 Chirurgie

La chirurgie est déterminante dans le traitement du cancer de l'ovaire. L'objectif de la chirurgie est de réaliser une cytoréduction macroscopique optimale de la tumeur. La chirurgie permet aussi l'analyse des tissus prélevés, pour une confirmation du diagnostic initial, ainsi qu'une classification histologique et une stadification complète de la tumeur (Basta *et al.*, 2016). L'évaluation du stade est effectuée en accord avec les différents degrés chirurgico-pathologiques établis par le système FIGO, avec une inspection des différents organes, une série de lavages de la surface péritonéale et des biopsies (Basta *et al.*, 2016). Le succès de la cytoréduction jouera un rôle crucial dans la survie de la patiente. La cytoréduction optimale ne devrait pas laisser plus de 1 cm<sup>3</sup> de matière cancéreuse résiduelle (Foley *et al.*, 2013). Une chirurgie laissant une quantité supérieure de masse tumorale, occasionne un risque de récurrence estimé à 80-85%, contre 60-70% pour une matière résiduelle de <1 cm<sup>3</sup> (Foley *et al.*, 2013). Cependant, selon les nouvelles recommandations de la Société Européenne d'Oncologie Gynécologique (ESGO), la chirurgie devrait viser une élimination complète de résidus macroscopiques malins (ESGO, 2016). La cytoréduction complète des cas avancés (stades III/IV) est toutefois difficilement réalisable en raison de lésions métastatiques disparates et inopérables (Basta *et al.*, 2016; Jayson *et al.*, 2014). Les techniques chirurgicales pour les cas plus agressifs comprennent l'extraction par bloc de tous les tissus cancéreux visibles, incluant les organes reproductifs, le côlon sigmoïde en passant parfois par une péritonectomie et une omentectomie complète (Lengyel, 2010; Matulonis *et al.*, 2016).

### 1.2.8.2 Chimiothérapie

La chimiothérapie fait partie du traitement standard de première ligne du cancer de l'ovaire. Après la chirurgie, les patientes reçoivent 6 traitements intraveineux de

platines/taxanes tous les 21 jours. Seules les patientes avec des cas de stades 1A/IB avec des tumeurs classées G1/G2 échappent à la chimiothérapie. Les patientes qui ont initialement des tumeurs inopérables reçoivent la chimiothérapie en premier, puis une chirurgie de cytoréduction après 3 cycles de traitement. Bien que la plupart des patientes obtiennent une bonne réponse aux traitements, aboutissant souvent à une rémission complète, la plupart expérimenteront également une résurgence (Hennessy *et al.*, 2009; Jelovac et Armstrong, 2011). Le temps que met la résurgence, suite aux traitements, servira aussi à déterminer la sensibilité de la tumeur aux platines. Une tumeur est catégorisée comme hautement sensible aux platines si la réapparition n'a pas lieu avant 12 mois. Si elle réapparaît entre 6 et 12 mois, elle est partiellement sensible, elle est résistante si elle refait surface avant 6 mois et réfractaire lorsqu'elle continue de progresser durant le traitement (Friedlander *et al.*, 2011). Les patientes qui répondent bien ou partiellement aux platines bénéficieront d'un traitement en combinaison, habituellement avec cisplatine/carboplatine combiné au paclitaxel, doxorubicine liposomale pégylée (PLD) ou gemcitabine, et parfois avec bevacizumab (Lopez-Guerrero *et al.*, 2015). Le pronostic des patientes avec des tumeurs résistantes aux platines est moins positif. On fait généralement une monothérapie avec PLD, topotecan, gemcitabine ou paclitaxel et avec bevacizumab, mais seulement pour les patientes qui répondent bien durant les traitements (Friedlander *et al.*, 2011). Les options de traitements continuent de se multiplier, par des modifications des approches standards, ainsi qu'avec la venue de nouveaux médicaments s'attaquant à des cibles moléculaires précises ou des voies de signalisations indispensables pour la prolifération, la croissance, l'immunosurveillance et les signaux pro-apoptotiques. Notamment, des facteurs anti-angiogéniques, inhibiteurs du récepteur au VEGF (bevacizumab), des inhibiteurs de EGFR et du récepteur folate- $\alpha$ , ainsi que des inhibiteurs de la polymérase polyADP-ribose (PARPis) (Cortez *et al.*, 2018).

### 1.2.9 Défis thérapeutiques

Malgré les importantes réalisations en matière de traitements, les nouvelles cibles thérapeutiques visées, les nouvelles molécules anti-cancéreuses mises à l'essai et les traitements en combinaison, les chances relatives de survie au cancer de l'ovaire ne se sont pas significativement améliorées (Kim *et al.*, 2018). Les raisons principales sont l'incapacité de détecter cette maladie au stade précoce, menant souvent à des diagnostics tardifs avec une cancérogenèse avancée. L'hétérogénéité et la forte dissémination de cette maladie mènent souvent à sa résurgence suite à la thérapie ainsi que l'acquisition de chimiorésistance (Kim *et al.*, 2018).

Alors que la plupart des cancers épithéliaux se propagent en intégrant la circulation, nécessitant parallèlement d'importantes reprogrammations cellulaires, les tumeurs de la surface de l'ovaire ou des tubes utérins une fois détachées, peuvent migrer passivement en suspension dans les fluides péritonéaux (Lengyel, 2010). Il n'y a pas de barrière anatomique pouvant restreindre la propagation des cellules cancéreuses des ovaires aux organes viscéraux. Cette diffusion passive permet une colonisation rapide à plusieurs sites secondaires, pratiquement tous les organes de la cavité péritonéale pouvant être touchés (Bast *et al.*, 2009).

#### 1.2.9.1 Détection

Seulement 13% des cas de carcinomes ovariens séreux sont diagnostiqués au stade I et II et la plupart des diagnostics faisant face à des cas avancés, fortement disséminés (Narod, 2016; SEER, 2018). Étant donné que les symptômes associés au cancer ovarien sont plutôt variables, peu spécifiques ou absents, il est peu probable qu'une patiente se tourne vers l'aide médicale appropriée pour qu'un diagnostic précoce soit fait (Matulonis *et al.*, 2016). Pour cette raison, une approche stratégique initiale serait d'améliorer les méthodes de détection. L'ultrasonographie transvaginale accompagnée

de l'analyse du niveau sanguin de CA125 est la méthode standard de détection du cancer ovarien. Bien que cette méthode ait facilité le pronostic et diagnostic, à des stades plus précoces, plus particulièrement dans le cas où il y avait des pré-lésions, elle demeure inefficace contre les cas de cancer agressifs de type 2 qui apparaissent de façon sporadique (Koshiyama *et al.*, 2017). Des biomarqueurs plus sensibles aux altérations génomiques précoces et plus spécifiques aux différents types, étant donné la nature hétérogène de la maladie, pourraient bénéficier grandement le destin des femmes touchées par cette maladie (Muinao *et al.*, 2018).

#### 1.2.9.2 Chimiorésistance

Le succès de l'expansion des traitements contre le cancer de l'ovaire, avec des thérapies de combinaisons et des agents orientés vers des cibles moléculaire précises, malgré leurs excellentes réponses chez les patientes, est largement limité par la résurgence de la maladie et le développement d'une tolérance éventuelle à la chimiothérapie (Ling *et al.*, 2005). Plusieurs mécanismes peuvent favoriser cette chimiorésistance observée, tels que l'altération dans le transport intracellulaire des médicaments, une surexpression des protéines impliquées dans la détoxification, les dommages à l'ADN, ainsi qu'une altération de la cible thérapeutique (Ling *et al.*, 2005). Par exemple, il a été rapporté que le gène MRP1, codant pour un transporteur ABC, subit un épissage alternatif plus fréquent dans des tumeurs ovariennes. Cet épissage alternatif était également associé à la résistance à la doxorubicine (He *et al.*, 2004).

De récentes études, mettant en perspective l'évolution des tumeurs selon le profilage génomique, suggèrent que l'hétérogénéité intratumorale (ITH) seraient plutôt la cause principale de l'échec des thérapies par l'acquisition de chimiorésistance, y compris dans le cancer de l'ovaire. Le degré d'ITH chez une patiente corrèle avec le degré de récurrence de la maladie. L'ITH permet la résilience de la tumeur face à des microenvironnements incompatibles ou une pression qui seraient imposés, dans ce cas-



ci, par la thérapie. L'ITH permet également une sélection naturelle de lignées résistantes lorsqu'une pression est appliquée permettant ainsi une résistance ultérieure encore plus grande face à cette pression donnée (Kim *et al.*, 2018).

La réactivation des voies développementales, ainsi que l'EMT, qui permettent la réinsertion d'un phénotype de cellules souches ont également été associées à la chimiorésistance (Jung *et al.*, 2016; Wang, J. *et al.*, 2016). Le phénotype des cellules souches cancéreuses (CSCs) permet également le maintien et la repopulation. La génération d'un phénotype de cellules souches par le facteur de transcription-1 de la leucémie à cellules pré-B (PBX1), impliqué dans le maintien de la pluripotence, a été documentée chez le modèle de cancer ovarien SKOV-3 (Jung *et al.*, 2016).

La diversité cellulaire du microenvironnement tumoral participe également à la chimiorésistance. Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC), plus spécialement les fibroblastes associés au cancer (CAF), secrètent l'interleukine-6 (IL-6) et stimule la sécrétion de IL-6 par les cellules cancéreuses, en libérant CCL2 et CCL5 (Pasquier *et al.*, 2018). Le rôle d'IL-6 dans la chimiorésistance au paclitaxel a été exploré dans de nombreuses études, ainsi que les voies de signalisation par lesquelles cette chimiorésistance est induite : PYK2, JAK3/STAT3, RAS/MEK/ERK et PI3K/Akt (Pasquier *et al.*, 2018; Wang, L. *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2010). Le microenvironnement généré par la formation d'ascites, fréquemment retrouvées chez les patientes présentant un stade avancé de cancer épithélial de l'ovaire, procure un environnement pro-inflammatoire favorisant l'hétérogénéité et la chimiorésistance, ce qui permet aux cellules malignes de déjouer la thérapie (Kim *et al.*, 2016; Zaman *et al.*, 1994). Les cellules HGSOc participent à la formation de ces ascites, soit en bloquant le drainage lymphatique ou encore en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques qui favorisent la perméabilité vasculaire (Zaman *et al.*, 1994). Les ascites malignes sont enrichies en IL-6 qui, en retour, augmente la capacité invasive des cellules EOC exprimant le récepteur de l'IL-6 (Kim *et al.*, 2018).

### 1.3 Métastases

Hanahan et Weinberg avaient autrefois introduit les habilités biologiques essentielles acquises par les cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg, 2000, 2011). Aucune de ces caractéristiques n'a toutefois été mise en avant-plan, comme étant l'habileté la plus critique (Meirson *et al.*, 2020). Lazebnik a soulevé que l'ensemble de ces caractéristiques pouvait être retrouvé à la fois chez les tumeurs bénignes que les tumeurs malignes, à l'exception de l'invasion et les métastases (Lazebnik, 2010). La dissémination métastatique est la cause principale de la morbidité associée au cancer et représente donc une importante cible thérapeutique à préconiser. Un nouveau modèle des caractéristiques du cancer, mettant en avant-plan l'invasion et les métastases, fût alors proposé (Figure 1.4). Ces mêmes habilités biologiques, intégrées à la cancérogenèse, sont par ailleurs essentielles pour la formation des métastases (Meirson *et al.*, 2020).

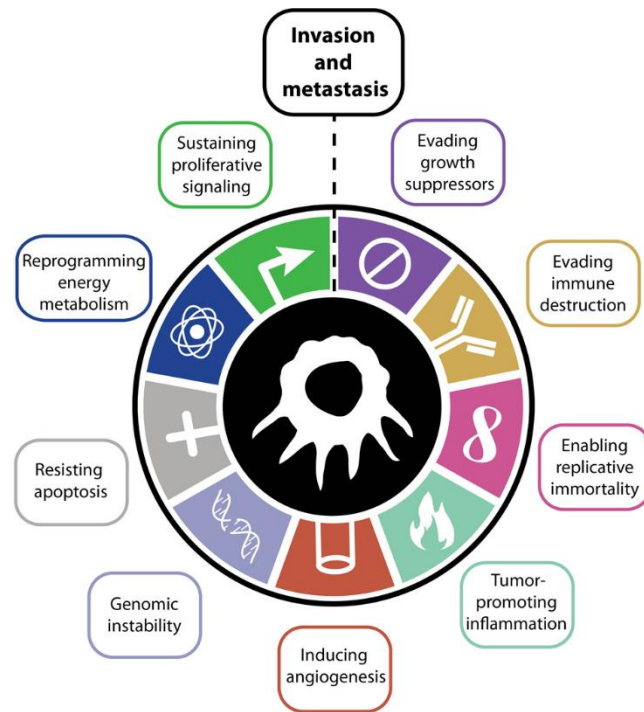


Figure 1.4 Les caractéristiques du cancer mettant en avant plan l'invasion et les métastases. Les habiletés biologiques nécessaires à la cancérogenèse sont également essentielles pour l'invasion et la formation de métastases : maintien du signal prolifératif, résistance à l'apoptose, instabilité génomique, insensibilité aux inhibiteurs de croissances, induction de l'angiogenèse, capacité de réplication infinie, promotion de l'inflammation, évasion de la destruction immunitaire et reprogrammation du métaboliste. (Meirson *et al.*, 2020)

### 1.3.1 Mécanismes

La formation des métastases implique la propagation des cellules cancéreuses dans les tissus environnants, ainsi qu'à d'autres organes distants. La formation de métastases est la cause première de morbidité et de mortalité du cancer. La formation de la métastase est un processus complexe, comprenant une série d'évènements séquentiels (Seyfried et Huysentruyt, 2013). Afin de réaliser ce processus, les cellules cancéreuses doivent donc, entre autres, 1) se détacher de la membrane basale, 2) se dissocier de la tumeur primaire, 3) infiltrer les tissus environnants, 4) s'insérer dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques formés *de novo* ou préexistants (intravasation), 5) se propager dans la circulation, 6) évader la circulation (extravasation), 7) s'établir au site secondaire et, enfin, 8) poursuivre leur croissance et leur propagation en micrométastases, macrométastases/tumeurs secondaires (Chambers *et al.*, 2002; Eccles et Welch, 2007; Fidler, 2003; Gupta et Massague, 2006). La formation des métastases est connue comme un processus largement inefficace, parce que la réalisation de tous ces évènements simultanés, imposant chacun une barrière physiologique à traverser pour les cellules malignes, nécessite une chorégraphie hautement coordonnée (Chambers *et al.*, 2002). L'acquisition de phénotypes métastatiques par les cellules qui leur permettront de réaliser cette migration est rendue possible, en partie, par la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Seyfried et Huysentruyt, 2013).

Au lieu d'agir de façon autonome, les cellules métastatiques s'engagent dans des interactions complexes bidirectionnelles avec un microenvironnement métastatique, composé des structures de la matrice extracellulaire (MEC), de chimiokines, de facteurs de croissances et de métalloprotéases matricielles (MMPs). Ce microenvironnement permet d'altérer à la fois l'immunité antitumorale, l'activité des MMPs et la stabilité génomique, et il favorise alors la résistance à l'apoptose, la chimiorésistance, l'angiogenèse et la prolifération (Guan, 2015; Steeg, 2016). La création d'un microenvironnement favorable au site secondaire, ou niche

prémétastatique, rendue possible par des cellules dérivées de la moelle osseuse, est également essentielle pour que les cellules colonisent ce site (Kaplan *et al.*, 2005).

Cependant, les carcinomes ovariens, contrairement aux autres tumeurs, forment rarement des métastases par la voie du système sanguin. Ceux-ci, généralement, se propagent par extensions directes avec les organes voisins (vessie/côlon) ou en étant transportés de manière passive par les fluides péritonéaux (Lengyel, 2010). Le site d'invasion n'est toutefois pas arbitraire : le mésothélium, comprenant l'omentum et le diaphragme, qui recouvre tous les organes de la cavité péritonéale, constitue le microenvironnement prémétastatique de choix pour ce type de cancer (Lengyel, 2010). Les tumeurs omentales tendent à compresser grandement les viscères ce qui occasionne la douleur et la morbidité associée à cette maladie (Lengyel, 2010). Bien que l'on voit rarement une propagation en dehors de la cavité péritonéale, le pelvis et/ou les ganglions lymphatiques para-aortiques peuvent toutefois être touchés (Eisenkop et Spirtos, 2001). Le carcinome ovarien tend aussi à croître et à se disséminer plus rapidement que la plupart des autres cancers (Lengyel, 2010).

### 1.3.2 La transition épithélio-mésenchymateuse

Une explication possible pour le phénomène de migration, d'invasion et de dissémination, impliqué dans la formation des métastases, se trouve dans le domaine du développement embryonnaire. En effet, l'EMT permet la formation du mésoderme et du mésenchyme à partir de la ligne primitive, ainsi que dans les cellules de la crête neurale. L'EMT est aussi impliquée dans la fibrose des organes, la régénération des tissus et la guérison des blessures (Lim et Thiery, 2012; Roche, 2018). Il a été démontré que les cellules cancéreuses utilisaient également cette reprogrammation pour exécuter la cascade métastatique (Lim et Thiery, 2012).

Dans le cas du cancer, les principaux éléments déclencheurs de l'EMT sont l'hypoxie, les cytokines (notamment le TGF- $\beta$ ), les facteurs de croissance, les échanges avec le stroma (*crossstalk*), les changements métaboliques, la réponse immunitaire adaptative ainsi que les médicaments anti-tumoraux (De Craene et Berx, 2013). Plusieurs voies de signalisations sont impliquées dans la régulation de l'EMT : incluant la voie du TGF- $\beta$ , de la protéine morphogénétique osseuse (BMP), des facteurs de croissance des fibroblastes, de l'épiderme, des hépatocytes, les voies de Wnt/ $\beta$ -caténine et Notch (Said et Williams, 2011). En temps normal, les cellules qui intègrent les tissus épithéliaux de l'organisme sont maintenues ensemble sous forme de feuillets par des jonctions adhérentes, des jonctions serrées et une polarité apico-basale. Ces jonctions sont rendues possibles grâce aux protéines de surface, entre autres, les cadhérines (E-cadhérine) (Figure 1.5) (Kalluri et Weinberg, 2009). Durant l'EMT, les cellules épithéliales subissent une reprogrammation épigénétique, puis cessent d'exprimer les protéines nécessaires à l'adhésion cellule-cellule, au profit de l'acquisition d'un phénotype de cellules souches mésenchymateuses individualisées et motiles (Dongre et Weinberg, 2019). Cette transition implique un remodelage du cytosquelette d'actine, des changements morphologiques et l'expression subséquente des protéines mésenchymateuse : N-cadherine, Vimentine et Fibronectine (Kalluri et Weinberg, 2009). À défaut d'être groupées, les cellules mésenchymateuses ont la capacité d'interagir et de migrer dans la MEC, de se propager dans le corps et de former des métastases (Dongre et Weinberg, 2019).

L'EMT a également été démontrée dans la formation de carcinomes ovariens métastatiques. Dans le cas du EOC, l'EMT permet aux cellules malignes de survivre à un environnement hypoxique, de répondre aux signaux des cellules stromales environnantes et d'adhérer au site secondaire, facilité par l'expression de Fibronectine liant intégrine- $\alpha_5\beta_1$  (Symowicz, 2007; Sawada 2007).

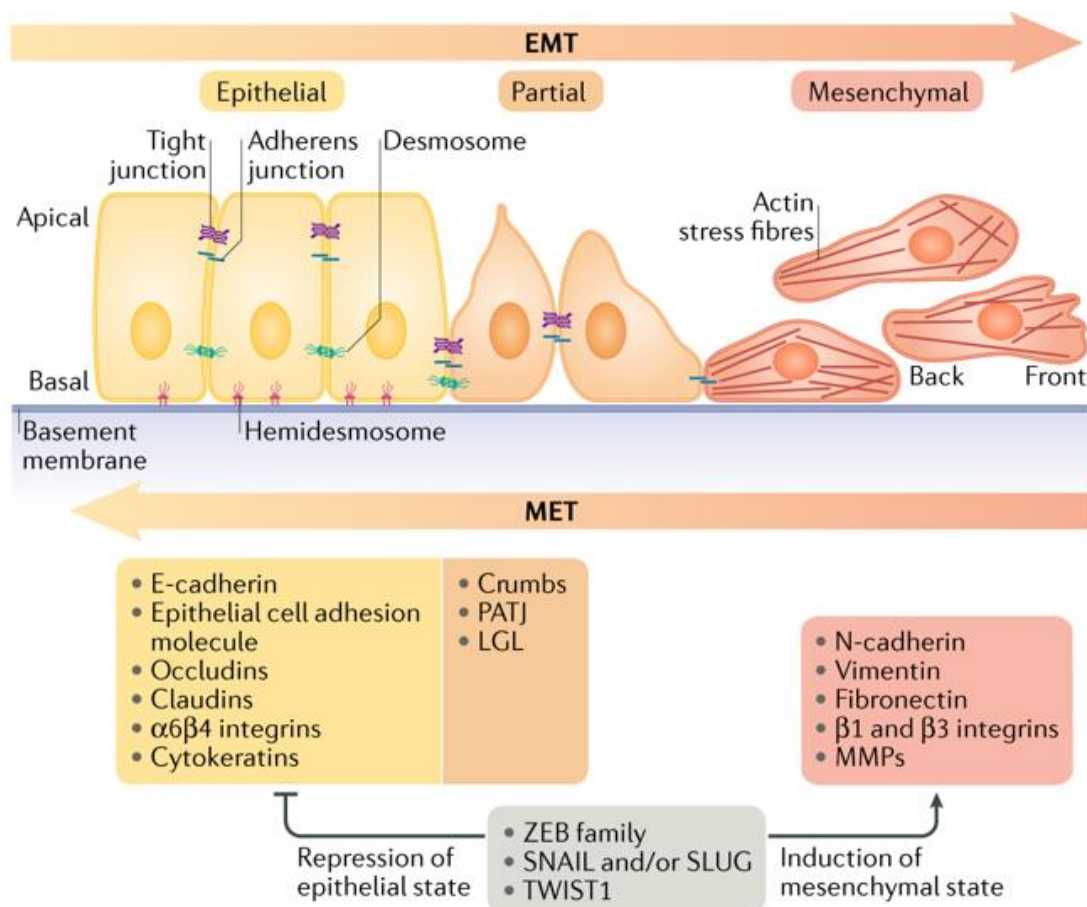


Figure 1.5 Le programme de l'EMT. Les cellules épithéliales démontrent une polarité apico-basale et sont tenues ensemble par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes. Elles sont attachées à la membrane basale par les hémidesmosomes. Ces cellules expriment des protéines qui sont associées au stade épithélial et qui participent au maintien de la polarité (listées dans les boîtes jaunes et oranges, respectivement). La génération de l'EMT entraîne l'expression des facteurs de transcriptions inducteurs de l'EMT (boîte grise) qui inhibent l'expression des gènes épithéliaux et, par concomitance, activent l'expression des gènes associés avec le stade mésenchymal (boîte orange foncé). Cette modification d'expression génique occasionne des changements cellulaires notables incluant le désassemblage des jonctions serrées entre cellules et la dissolution de la polarité apico-basale. Cette perte progressive des caractéristiques épithéliales est accompagnée par l'acquisition partielle de caractéristiques mésenchymales : une polarité avant-arrière (front-to-back), une réorganisation du cytosquelette, une motilité et un potentiel invasif. (Dongre et Weinberg, 2019)

### 1.3.3 Voie de signalisation des Smads

#### 1.3.3.1 Mécanisme

TGF- $\beta$  est un inducteur majeur de l'EMT, aussi considéré comme une cytokine facilitant grandement la formation des métastases. TGF- $\beta$  se lie à deux différents récepteurs TGF- $\beta$ R1 et TGF- $\beta$ R2 et entraîne la dimérisation des récepteurs en un complexe actif (Figure 1.6). La forme active de TGF- $\beta$ R1 phosphoryle ensuite les isoformes R-Smad-2 et R-Smad-3, qui peuvent ensuite s'associer à Smad-4. Le complexe hétérogène est ensuite transloqué au noyau. C'est ainsi que le complexe s'associe à une multitude de facteurs de transcription et entraîne le *switch* transitionnel relatif à l'EMT. Parmi ces gènes, les facteurs de transcription clés des familles Snails, Slug et Twist et leur cible E-cadhérine (Zavadil et Bottinger, 2005).



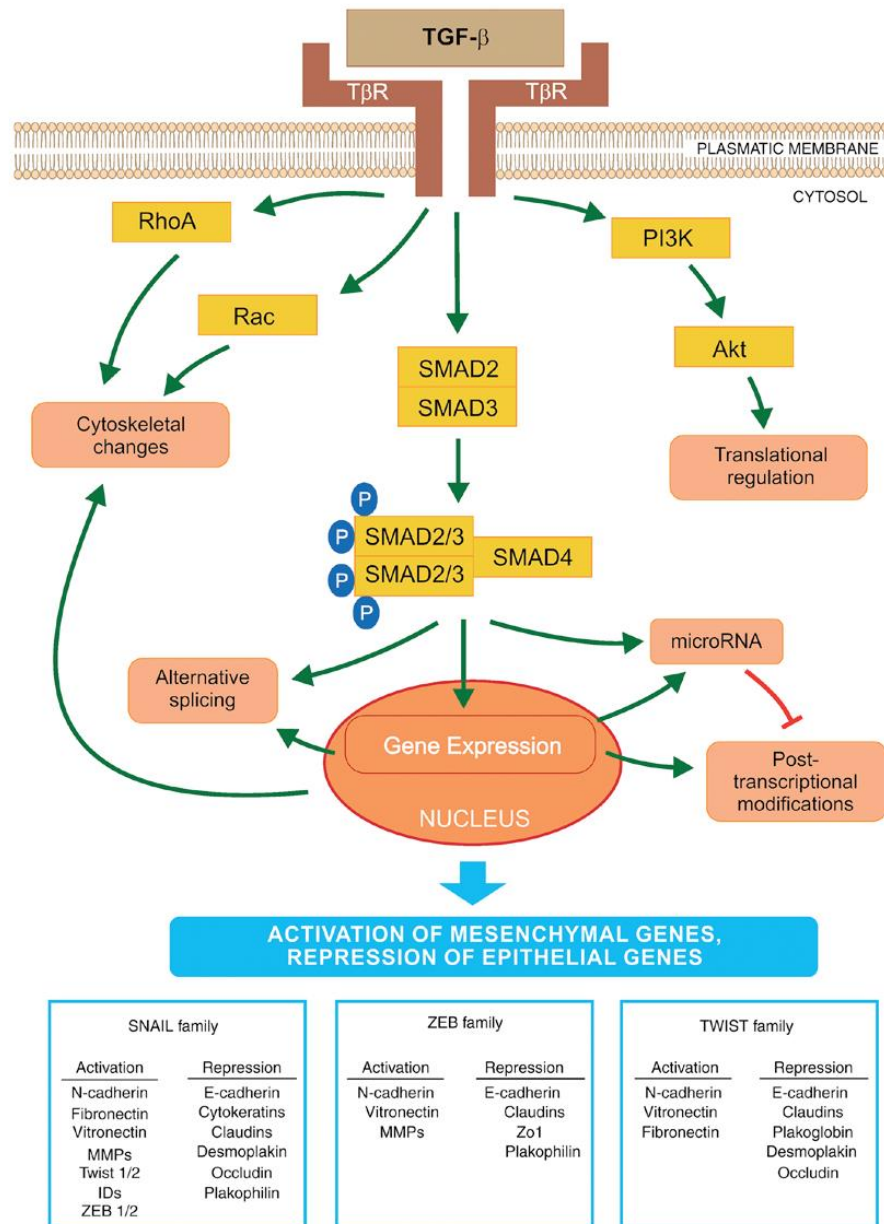


Figure 1.6 Mécanisme d'activation de l'EMT via TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  se lie à deux différents récepteurs, TGF- $\beta$ R1 et TGF- $\beta$ R2, entraînant la dimérisation des récepteurs en un complexe actif. TGF- $\beta$ R1 phosphoryle ensuite Smad2/3, qui peuvent alors s'associer à Smad4. Le complexe Smad est transloqué au noyau et entraîne l'expression des facteurs de transcription clés de l'EMT : Snail, Zeb et Twist. Ces facteurs sont responsables de l'activation et la répression des différents gènes codant pour les protéines impliquées dans la transition. TGF- $\beta$  induit également l'EMT via des voies de signalisations non Smad-dépendants, tel que PI3K-AKT et Rho-GTPase et en activant en parallèle des microARN. (Škovierová *et al.*, 2018)

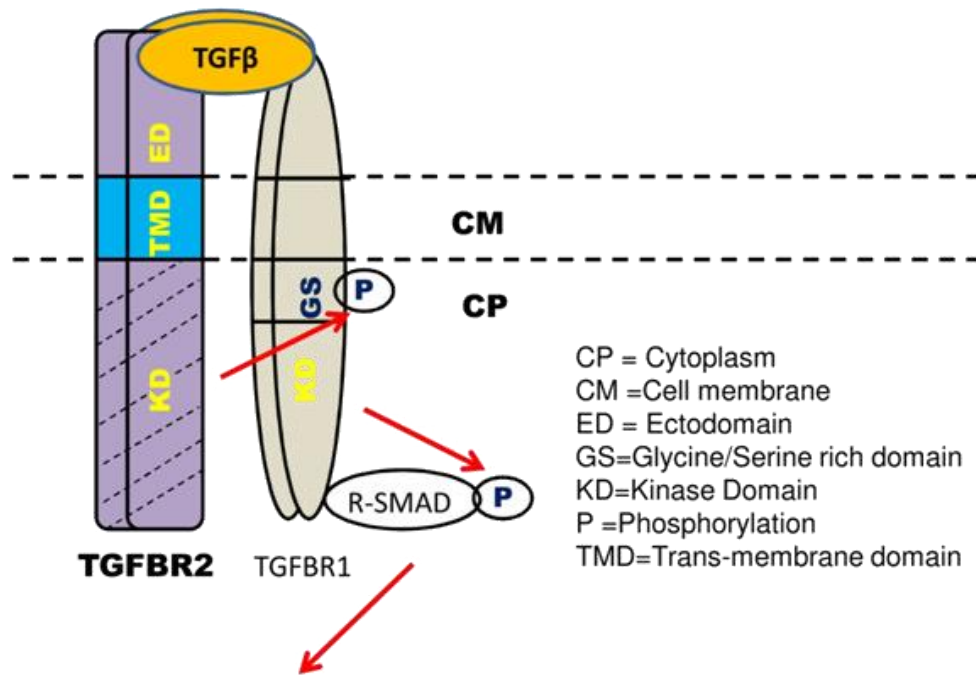
### 1.3.3.2 La cytokine TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  est une cytokine aux fonctions multiples appartenant à la superfamille TGF- $\beta$ , comprenant les activines, les inhibines, les protéines nodales, protéine morphogénétique osseuse (BMPs), hormones anti-müllérienne (AMH) ainsi que des facteurs de croissance et de différenciation (GDFs). Tous ces facteurs sont conservés à travers l'évolution et retrouvés dans l'ensemble des organismes pluricellulaires (Schmierer et Hill, 2007). La signalisation se fait par la liaison d'un de ces facteurs à son récepteur sérine/thréonine kinase, le ligand cause l'oligomérisation du récepteur, suivie par la phosphorylation d'une protéine de signalisation, rôle accompli par Smad2 et Smad3 dans le cas d'un ligand TGF- $\beta$  ou activine (Schmierer et Hill, 2007). Les membres de la famille TGF- $\beta$  sont hautement conservés chez les mammifères (Herpin *et al.*, 2004). Il existe trois isoformes chez l'humain : TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$ 1 est toutefois la forme la plus communément retrouvée (Kingsley, 1994). Le TGF- $\beta$ , comme son récepteur, est exprimé par la quasi-totalité des types cellulaires, initialement sous forme latente. Son activation est une étape clef pour la régulation de son activité (Fleisch *et al.*, 2006). Le précurseur s'associe en homodimère et interagit avec son *latency-associated peptide* (LAP), ainsi qu'une *latent TGF- $\beta$  binding protein* (LTBP). Ensemble, ils forment le *large latent complex* (LLC). L'activation commence par la libération de LLC dans la MEC, suivie par la protéolyse de LAP qui libère le ligand, maintenant disponible aux récepteurs. Les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9, et la thrombospondin 1 (THBS1) sont connues pour cliver le TGF- $\beta$  de sa forme latente (Schultz-Cherry *et al.*, 1994). La forme active de TGF- $\beta$  est un dimère, stabilisé par des interactions hydrophobes et des ponts disulfures, conférée par un motif conservé de 9 résidus cystéines (Shi et Massagué, 2003). Le TGF- $\beta$  peut se lier à trois récepteurs extracellulaires (TGF- $\beta$ R1-III) et agir de façon autocrine, paracrine et endocrine (Fleisch *et al.*, 2006). Il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, tels que l'inhibition de la croissance cellulaire, la migration cellulaire, l'invasion, l'angiogenèse, le remodelage de la MEC, l'EMT, la suppression immunitaire, la

guérison des blessures, l'homéostasie des tissus adultes et le développement de l'embryon (Blobe *et al.*, 2000; Herpin *et al.*, 2004). Le TGF- $\beta$  est fréquemment surexprimé dans plusieurs pathologies, impliquant souvent de la fibrose et de l'inflammation, le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'asthme, l'arthrite rhumatoïde et la sclérose multiple. Son expression excessive mène souvent à la progression de la maladie en favorisant la croissance cellulaire et la migration (Flavell *et al.*, 2010). Pour cette raison, la voie du TGF- $\beta$  est une cible hautement considérée pour le développement thérapeutique, notamment l'inhibition de l'EMT induite par cette dernière (Blobe *et al.*, 2000).

#### 1.3.3.3 Les récepteurs au TGF- $\beta$

Il existe trois récepteurs au TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$ R1 et TGF- $\beta$ R2 sont des complexes transmembranaires sérine/thréonine kinase, tandis que le récepteur TGF- $\beta$ R3 est une protéoglycane associée à la membrane, mais aussi retrouvée sous forme soluble, et qui ne possède pas d'activité kinase. Ce récepteur peut lier deux molécules de TGF- $\beta$  et ainsi augmenter la concentration de TGF- $\beta$  à la surface en plus de maximiser ses interactions du ligand avec TGF- $\beta$ R1 et TGF- $\beta$ R2 (Lopez-Casillas *et al.*, 1993). Bien qu'ils puissent lier les deux récepteurs, les ligands TGF- $\beta$  et activines ont beaucoup plus d'affinité pour les récepteurs de type 2 que de type 1 (Akhurst et Hata, 2012). La signalisation se fait généralement par la liaison de TGF- $\beta$  à TGF- $\beta$ RII qui recrute TGF- $\beta$ R1 et procède à une transphosphorylation de son domaine kinase. TGF- $\beta$ RI à son tour transmet le signal par la phosphorylation des protéines Smads (Akhurst et Hata, 2012) (Figure 1.7).



### Activation/repression of TGF $\beta$ target genes

Figure 1.7 Structure et mécanisme d'activation de TGF- $\beta$ 1/2. TGF- $\beta$ 1/2 sont constitués d'un domaine de liaison au ligand TGF- $\beta$  extracellulaire N-terminal (ED), d'un domaine transmembranaire (TMD) et d'un domaine kinase intracellulaire C-terminal (KD). TGF- $\beta$ 2 forme un complexe hétérotétramérique avec TGF- $\beta$ 1 et favorise l'activité kinase de TGF- $\beta$ 1 en phosphorylant le domaine riche en sérines/glycines (GS). (Peringode Sivadas, 2014)

#### 1.3.3.4 Les cofacteurs Smads

Il existe 8 isoformes des protéines Smad et on les classifie par les *receptor-regulated Smads* (R-Smads; isoformes 1, 2, 3, 5 et 8), le *common-mediator Smad* (Co-Smad; isoforme 4) et les *inhibitory Smads* (I-Smads; isoforms 6 et 7). Le récepteur TGF- $\beta$ RI, un fois activé par son ligand phosphoryle les R-smads 2 et 3, ce qui par facilite la formation d'un complexe avec le co-Smad 4 (Clarke et Liu, 2008). Le complexe Smads actif peut, subséquemment être transloqué au noyau. Bien que le complexe ait une

affinité faible pour l'ADN et une spécificité limitée, il peut coopérer avec une multitude de facteurs de transcription site-spécifiques qui le recruteront ou stabiliseront sa liaison à l'ADN (Hill, 2016). Ces associations entraînent une activation et une répression simultanée de plusieurs gènes, selon le partenaire (Shi et Massagué, 2003). Cette coopération permet d'avoir une réponse adaptée selon le type cellulaire ou aux conditions environnementales (Hill, 2016).

#### 1.3.3.5 TGF- $\beta$ comme cible thérapeutique

Les thérapies ciblant la voie TGF- $\beta$  sont largement considérées pour traiter une large variété de malignités, y compris le cancer de l'ovaire, au sein d'études *in vitro*, sur des modèles précliniques et dans des études cliniques. La suractivation de la voie du TGF- $\beta$  a le potentiel de créer un microenvironnement qui promeut la prolifération, l'angiogenèse, l'évasion immunitaire, l'EMT et la dissémination métastatique, faisant de cette voie une cible thérapeutique à considérer pour limiter la progression de la maladie (Roane *et al.*, 2019). Les thérapies tentent de cibler plusieurs éléments de la voie, par exemple, 1) en empêchant la synthèse du TGF- $\beta$  avec des oligonucléotides antisens, 2) en inhibant la liaison de TGF- $\beta$  à son récepteur, 3) en empêchant l'activité kinase via les protéines Smads, et 4) par des interventions basées sur l'immunité (Fabregat *et al.*, 2014; Haque, S. et Morris, J. C., 2017).

Le Traberdersen est un oligonucleotide antisens dirigé contre TGF- $\beta$ 2, il a été testé sur des modèles de souris xéno greffées avec la lignée de cancer ovarien SKOV-3. Employé seul ou en combinaison avec le Paclitaxel, le Traberdersen diminuerait significativement la masse tumorale et améliorerait la survie (Dcruz *et al.*, 2017). Des études cliniques de phase 1 sur des patients présentant des cas avancés de mélanomes ont aussi montré son efficacité en augmentant le taux de survie des patients ainsi que la sensibilité à l'immunothérapie, lorsque combinés (Hwang *et al.*, 2016). Des vaccins

anti-TGF- $\beta$  sont également en voie de développement. L'objectif de ces vaccins est de transférer un vecteur antisens contre TGF- $\beta$ , directement dans les cellules cancéreuses. Vigil (Gemogenovatucel-T), en phase II, employé conjointement avec Atezolizumab, a montré des effets positifs sur les patientes atteintes de cancer de l'ovaire (Rocconi *et al.*, 2018).

Des petites molécules inhibitrices de l'activité kinase, le long de la voie du TGF- $\beta$ , sont également employées. LY2109761, inhibiteur de l'activité kinase de TGF- $\beta$ R1/2, a démontré une capacité à diminuer la chimiorésistance lorsqu'en combinaison avec la cisplatine sur des modèles de cancers ovariens chez des souris (Connolly *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2015). Galunisertib (LY2157299), ciblant aussi l'activité kinase des TGF- $\beta$ Rs, est présentement en études cliniques. Les résultats précliniques ont démontré son habileté à atténuer la réponse au TGF- $\beta$ , sur des modèles ovariens, en plus de réduire la croissance tumorale et la formation des ascites (Zhang *et al.*, 2018).

Une autre stratégie consiste en l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-TGF- $\beta$ . Plusieurs de ces agents sont largement étudiés sur une multitude de types de cancers. Peu de ces études explorent toutefois l'impact de ces agents, spécifiquement sur le cancer de l'ovaire. Une découverte majeure d'un agent potentiel, un fragment de liaison à l'antigène (Fab), obtenu à partir d'une librairie synthétique à partir de TGF- $\beta$ RII, a montré une capacité prometteuse d'inverser le programme de l'EMT et l'invasion chez des modèles de souris xénotransplantées avec un EOC (Newsted *et al.*, 2018)

#### 1.3.4 La vascularisation et le mimétisme vasculogénique

Les tumeurs solides sont dépendantes de la vascularisation de leur environnement, afin d'obtenir l'apport sanguin, contenant les nutriments et l'oxygène nécessaires à leur

croissance accélérée, leur maintien et leur propagation dans l'organisme. Le phénomène de vascularisation le plus étudié est l'angiogenèse, et il est une cible thérapeutique de choix (Ayala-Dominguez *et al.*, 2019). L'angiogenèse est un processus hautement régulé qui participe à la production de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des cellules endothéliales des vaisseaux préexistants (Carmeliet et Jain, 2011; Tung *et al.*, 2012). Cette formation est générée en réponse à l'hypoxie, l'ischémie, ou lorsque les signaux pro-angiogéniques (tel que VEGF-A) surpassent les signaux anti-angiogéniques (Leung *et al.*, 1989). La physiologie de l'ovaire est caractérisée par une perméabilité sanguine accrue durant le développement folliculaire, l'ovulation, ainsi que la subséquente formation du *corpus luteum*, menant à des altérations cycliques de son réseau vasculaire (formation, différenciation et régression) (Leung *et al.*, 1989). Ces fonctions font de l'ovaire un environnement de néovascularisation intense (Folkman, 2000; Kristensen et Trope, 1997). La versatilité de cette vascularisation pourrait en partie expliquer la nature agressive de la pathologie et le succès limité des thérapies anti-angiogéniques (Tang *et al.*, 2009). Pour faire alternative à l'angiogenèse, les tumeurs ont également la capacité de générer leurs propres structures vasculaires. Ceci est réalisé par la formation de vaisseaux sanguins *de novo* (vasculogénèse), l'attachement des cellules tumorales directement au système sanguin (co-option de vaisseaux) ou encore la réorganisation des cellules tumorales sous forme de structures capillaires similaires aux vaisseaux sanguins : il s'agit du mimétisme vasculogénique (VM) (Maniotis *et al.*, 1999). Le VM permet aux cellules cancéreuses de remplir la fonction des vaisseaux endothéliaux, permettant la perfusion, le transport du plasma et des hématocytes (Ayala-Dominguez *et al.*, 2019). Il a été proposé que le VM soit accompli par des CSCs différenciées en cellules aux propriétés endothéliales (Maniotis *et al.*, 1999). Parallèlement, il a été observé que les cellules impliquées dans le VM avaient un phénotype s'apparentant à l'EMT (Yang, 2015; Fan, 2013). Des formations de réseaux correspondant au VM ont été observées dans environ 30-37 % des cancers ovariens (Sood *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2017). La présence de VM était également corrélée à des classifications histologiques de plus hauts grades

(Gao *et al.*, 2009). Il a aussi été démontré que les formations de type VM étaient favorisées par les traitements anti-angiogéniques avec le bevacizumab, suggérant que le VM pourrait constituer une stratégie efficace pour contrecarrer les thérapies anti-angiogéniques : ceci expliquerait en partie le succès limité de ce médicament (Xu *et al.*, 2012).

### 1.3.5 Les métalloprotéases matricielles

Les métalloprotéases matricielles (MMPs) forment une famille multigénique d'endopeptidases capables de remodeler la membrane basale et la MEC, ce qui leur permet de participer à plusieurs événements (patho)physiologiques tels que : l'inflammation, l'embryogenèse, la guérison des plaies, l'angiogenèse et la cancérogenèse (Loffek *et al.*, 2011). Les MMPs requièrent l'utilisation d'ions calcium-zinc pour leur activité catalytique. Jusqu'à présent, on a identifié 28 MMPs différentes chez les vertébrés dont 24 chez l'humain. À l'exception des MMPs de types membranaires (MT-MMPs), les MMPs sont sécrétées par la cellule dans le microenvironnement où elles sont impliquées dans l'activation et la libération des chimiokines, cytokines, facteurs de croissances, protéines d'adhésion et protéines du cytosquelette (Jackson *et al.*, 2010; Loffek *et al.*, 2011). Plusieurs études avancent que les protéinases impliquées dans le remodelage de la MEC, incluant les MMPs, seraient les principales médiatrices des altérations du microenvironnement observées dans la progression tumorale (Kessenbrock *et al.*, 2010; Page-McCaw *et al.*, 2007). L'activité enzymatique et la surexpression des MMPs ont été directement corrélées avec le degré d'agressivité de la maladie (Gonzalez-Avila *et al.*, 2019). Elles sont connues pour participer activement, tout au long de la cascade métastatique (Gonzalez-Avila *et al.*, 2019). L'activité protéolytique des MMPs est requise pour la dégradation des barrières physiques durant l'expansion locale, l'intravasation et l'extravasation dans le système sanguin, puis l'invasion aux sites secondaires (Giannelli *et al.*, 1997). Plus particulièrement MT1-MMP, MMP-2 et -9, ces MMPs se localisent sur les



invadopodes, structures cellulaires ou la dégradation de la MEC et l'expansion cellulaire est orchestrée (Weaver, 2006). En dégradant la MEC, les MMPs libèrent plusieurs cytokines et facteurs de croissance, tel que VEGF. L'activité des MMPs active également ces facteurs de croissance en libérant les précurseurs de la membrane plasmique, comme EGF et IFG, et en clivant le peptide associé à la latence (LAP) de TGF- $\beta$  (Loechel *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2005). Ces molécules favorisent en retour, l'angiogenèse, l'EMT et la prolifération cellulaire (Giannelli *et al.*, 1997).

Le rôle des MMPs dans la progression du cancer ovarien a également été démontré, principalement dans le détachement initial de la surface de l'ovaire, ainsi que dans l'adhésion au site secondaire. Durant l'EMT, MMP-9 est induite et elle clive l'ectodomaine de E-cadhérine, contribuant ainsi à la perte d'adhésion entre cellules et la dissémination de la tumeur sous forme de cellules individualisées ou de sphéroïdes (Symowicz *et al.*, 2007). Membrane type 1 MMP (MT1-MMP) clive intégrine- $\alpha_3$  et participe aussi au détachement des sphéroïdes de la tumeur primaire (Davidson *et al.*, 2001). Il a été démontré que les structures sphéroïdes maintiennent également un phénotype mésenchymateux en leur centre, accompagné par une expression amplifiée de MMP-2 et proMMP2 (Sawada *et al.*, 2007). Il est fort probable que MMP-2, dans ce cas-ci, favorise la désagrégation rapide du sphéroïde (Ayala-Dominguez *et al.*, 2019). De plus, lorsque les cellules du carcinome ovarien s'attachent au mésothélium, celles-ci se mettent également à surexprimer MMP-2 qui, en retour, clive les protéines de la MEC, Fibronectine et Vitronectine en de plus petits fragments. Les cellules cancéreuses adhèrent ainsi plus facilement à la matrice grâce aux intégrines  $\alpha_5\beta_1$  (Fibronectine) et  $\alpha_v\beta_3$  (Vitronectine) (Ayala-Dominguez *et al.*, 2019; Kenny *et al.*, 2008; Kenny et Lengyel, 2009).

## 1.4 Approche thérapeutique

### 1.4.1 La chimioprévention par l'alimentation

Une analyse approfondie de la signature mutationnelle de plusieurs types de cancers démontre une contribution majoritaire des facteurs extrinsèques pour le type de mutations retrouvées (70-90%), par rapport aux facteurs intrinsèques (10-30%). Ces résultats suggèrent ainsi que les facteurs environnementaux, tels que : les radiations ultraviolettes/ionisantes, les carcinogènes, l'alimentation ou encore l'usage du tabac, jouent un rôle plus grand dans le risque de développer un cancer par rapport à la mutagenèse normale des cellules souches, issue du hasard, autrefois proposée comme la cause principale (Wu *et al.*, 2016). Les données épidémiologiques suggèrent également une relation indissociable entre le mode de vie de certains pays et la prévalence de certains types de cancer, une relation également appuyée par des changements d'incidences spectaculaires observés chez les populations migrantes (Doll et Peto, 1981; Willett, 2000). Ces observations nous indiquent que la majorité des cancers ne sont pas héréditaires ou développés par hasard, mais seraient plutôt influencés par une multitude de facteurs de vie, tels que les habitudes alimentaires (Beliveau et Gingras, 2007).

Les évidences des propriétés chimiopréventives de plusieurs composés issus de l'alimentation ont été largement rapportées à la fois par des données épidémiologiques et par des études en laboratoire sur des modèles cellulaires et animaux (Beliveau et Gingras, 2007). Ces propriétés sont plus particulièrement observées chez les aliments d'origines végétales, attribuables à leur riche concentration en composés phytochimiques. Les études ont démontré que ces molécules avaient la capacité d'interférer directement avec la progression tumorale, en plus de modifier le microenvironnement tumoral et générer des conditions physiologiques défavorables pour la tumeur (Beliveau et Gingras, 2007). Les tumeurs latentes précancéreuses sont chose commune, retrouvées même chez les individus sains. Bloquer le développement

de ces cellules précancéreuses devient donc extrêmement important. La carcinogenèse étant généralement un processus lent, pouvant se dérouler sur plusieurs années, une large fenêtre thérapeutique s'offre ainsi pour une intervention alimentaire (Beliveau et Gingras, 2007).

#### 1.4.2 Les catéchines du thé vert

Le thé vert est l'un des breuvages les plus populaires et répandus à travers le monde. Il est fait à partir des feuilles de la plante *Camellia sinensis*. Ses constituants actifs, plus particulièrement les polyphénols nommés catéchines, ont été sujets de nombreuses études pour leurs remarquables effets antioxydants et anti-cancéreux (Yang *et al.*, 2014) (Figure 1.8). La catéchine la plus abondante et la plus étudiée, l'épigallocatechine gallate (EGCG) a été largement couverte par la littérature scientifique durant les 30 dernières années, à la fois pour ses propriétés préventives et pour son potentiel thérapeutique contre le cancer. Cette molécule a démontré des effets anti-cancéreux prometteurs à la fois dans des modèles cellulaires, animaux, en études cliniques et sur plusieurs types de cancers (Rady *et al.*, 2018). On a montré que l'EGCG était capable d'altérer une multitude de processus oncogéniques tels que : l'inflammation, le stress oxydatif et l'hypoxie, en plus de cibler des éléments du microenvironnement tumoral, par exemple : le phénotype des CSCs, l'EMT, la réponse immunitaire et la vascularisation (Zubair *et al.*, 2017). Pour résumer, ses effets se qualifient généralement d'anti-prolifératifs, pro-apoptotiques, anti-angiogéniques et anti-invasifs (Gan *et al.*, 2018). L'EGCG a la capacité de moduler une immense variété de voies de signalisations oncogéniques, mais son mécanisme d'action n'a cependant pas été complètement élucidé. Il est connu qu'il présente, toutefois, une forte affinité pour le récepteur transmembranaire 67LR, un important régulateur de la prolifération et de l'apoptose, également impliqué dans le phénotype de CSCs (Negri *et al.*, 2018). Bien que l'on soupçonne que l'effet biologique soit en partie médié par ce récepteur, l'on a aussi démontré que EGCG avait la capacité d'interagir avec une multitude

d'autres constituants biologiques, parmi tant d'autres : Pins, TGF- $\beta$ RII, MMP-2 et MMP-9 (Negri *et al.*, 2018). L'activité biologique relative des 7 autres catéchines : catéchine (C), épicatechine (EC), gallocatéchine (GC) catéchine gallate (CG) gallocatéchine gallate (GCG) épicatechine gallate (ECG) et épigallocatéchine (EGC) a toutefois été moins explorée et leur mécanisme reste méconnu (Djerir *et al.*, 2018).

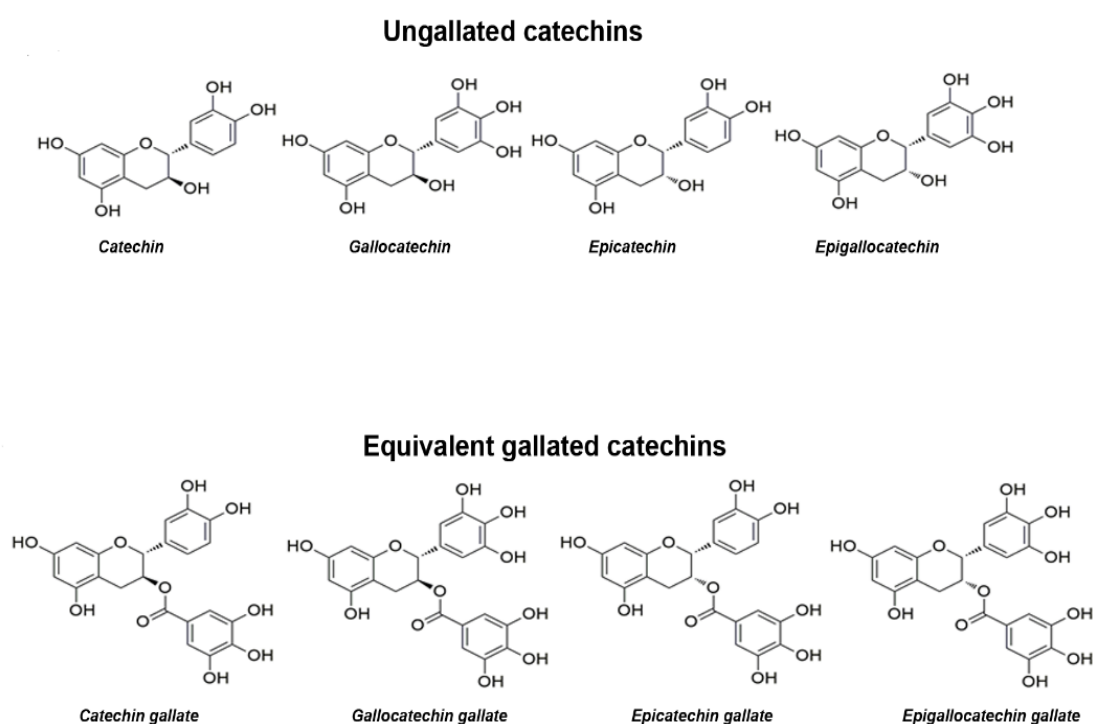


Figure 1.8 Structures chimiques des huit catéchines du thé vert. En haut, catéchines sans fonction galloyle, en bas catéchines avec fonction galloyle. (Djerir *et al.*, 2018)

### 1.4.3 La fonction galloyle

Les études comparatives des différentes catéchines semblent, pour la plupart, rapporter une plus grande activité biologique à EGCG ou aux catéchines comprenant une fonction galloyle (C, CG, GCG, EGCG) (Du *et al.*, 2012). Des analyses par amarrage moléculaire (*computational docking analysis*), ou par cristallographie aux rayons X ont fourni des informations précieuses sur les interactions catéchine-protéine possibles. Plusieurs d'entre elle suggèrent que l'ancrage avec les partenaires biologiques est facilité par la fonction galloyle, via des interactions avec les groupes hydroxyles de la fonction. Cette hypothèse expliquerait l'activité biologique plus grande des catéchines présentant cette fonction (Nakano *et al.*, 2018).

## CHAPITRE 2

### PROJET DE RECHERCHE

#### 2.1 Problématique

Le cancer de l'ovaire est la malignité gynécologique la plus mortelle. Malgré les progrès thérapeutiques réalisés contre le cancer, les chances de survie de plus de 5 ans au cancer de l'ovaire sont restées relativement basses, soit seulement 47% aux États-Unis. L'absence de symptômes, de biomarqueurs et de stratégies efficaces de détection au stade précoce de la maladie contribue aux diagnostics tardifs de la majorité des cas avec présence de métastases (stade III/IV). Les carcinomes séreux de haut grade sont les sous-types histologiques les plus fréquents, responsables d'environ 70-80% des décès. Ces tumeurs se forment *de novo* à partir de l'épithélium de l'ovaire ou du tube utérin et peuvent se disséminer rapidement dans la cavité péritonéale pour former des métastases sans passer par la voie de la circulation.

Désormais, on reconnaît le rôle indéniable du *switch* transcriptionnel de l'EMT dans l'acquisition du phénotype métastatique par les cellules malignes, mécanisme permettant la transition d'une cellule épithéliale fixe à une cellule motile et individualisée. Dans le cas de l'EOC, l'EMT est essentielle pour la dissémination de la tumeur primaire, la survie au microenvironnement hypoxique et la reconnaissance par les cellules stromales, puis l'attachement aux sites secondaires. La libération des MMPs, stimulée par l'EMT, favorise la dissémination de la tumeur primaire et la migration dans la MEC. L'EMT contribue également à la vascularisation essentielle à la croissance de la tumeur par angiogenèse ou la réorganisation de cellules sous forme de VM. De plus, l'EMT génère également un phénotype de cellules CSCs et permet la résistance à la chimiothérapie et la résurgence de la maladie. L'EMT peut être généralement induite par une suractivation de la voie du TGF- $\beta$  : plusieurs

médicaments en voie de développement tentent de cibler la voie du TGF- $\beta$  dans l'optique de stopper l'EMT.

La promotion d'habitudes de vie saines offre une façon alternative de lutter contre le cancer. Plusieurs molécules issues de l'alimentation ont pu démontrer un potentiel remarquable d'altérer plusieurs mécanismes de développement et progression tumorale. L'investigation des mécanismes d'actions précis par lesquels ces composés naturels agissent permet de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. L'activité anti-cancéreuse de la catéchine du thé vert EGCG a été largement documentée. L'EGCG a démontré la capacité d'interagir avec de nombreux constituants biologiques en plus d'altérer une immense variété de voies de signalisations oncogéniques. Ses effets se caractérisent d'anti-prolifératifs, pro-apoptotiques, anti-angiogéniques, et anti-invasifs. On a également montré que l'EGCG avait le potentiel d'altérer des mécanismes impliqués dans le microenvironnement tumoral, notamment en inhibant l'EMT, le phénotype des CSCs, la vascularisation et l'activité des MMPs.

## 2.2 Objectifs de recherche

Bien que l'effet anti-cancéreux de l'EGCG ait été largement exploré, ses effets précis sur le cancer ovarien restent moins connus. Nous souhaitons caractériser l'effet des huit catéchines sur des processus cellulaires associés au phénotype invasif sur un modèle de cancer de l'ovaire. Nos objectifs visent, entre autre, à 1) tenter d'évaluer si les catéchines ont la capacité d'altérer la voie régulant l'EMT, la migration cellulaire, le VM ou l'activité des MMPs. Nous souhaitons également 2) comparer l'effet des 8 catéchines, pour évaluer si certaines structures confèrent une plus grande activité biologique. Nous espérons enfin en apprendre sur 3) le mécanisme d'action et les cibles moléculaires précises de l'EGCG et des autres catéchines.

### 2.3 Hypothèses de travail

Nous émettons l'hypothèse que les effets anti-cancéreux et anti-prolifératifs de l'EGCG puissent aussi être observés dans nos 2 modèles de cancer de l'ovaire. Les sept autres catéchines pourraient également présenter des effets similaires, étant donné leur similarité structurale. Nous pensons que plusieurs voies de signalisation, activées par le TGF- $\beta$  et impliquées dans l'EMT, puissent être altérées en présence de ces catéchines. Dans un cas favorable, d'autres processus cellulaires, associés à la formation de métastases et à l'EMT, tels que la migration cellulaire, le VM et la sécrétion de MMPs, seraient également prévenus par les catéchines. Les catéchines présentant la fonction galloyle devraient, en accord avec la littérature, présenter une plus grande activité biologique que leurs équivalents sans galloyle.

### 2.4 Modèles cellulaires utilisés

Pour nos expériences *in vitro*, nous utilisons deux lignées de cellules cancéreuses ovariennes immortalisées : la lignée ES-2, considérée comme une souche sensible à la chimiothérapie aux platines, et SKOV3, une lignée démontrant une certaine tolérance, notamment à la cisplatine et l'adriamycine (Gonera *et al.*, 2014). Les cellules ES-2 ont été originellement classées comme de sous-type carcinome à cellules claires. Leur origine n'est toutefois pas tout à fait claire, en performant des xénogreffes de ces cellules dans des souris, l'on n'a pas observé le phénotype typique des cellules claires, riche en glycogène cytoplasmique (Anglesio *et al.*, 2013). D'autre part, une comparaison de leur profil génomique les classe comme une lignée possiblement de sous-type HGSOc (Domcke *et al.*, 2013). Par opposition, SKOV3 fut initialement classée comme un modèle de HGSOc. Cependant, dans leur cas, une xénogreffe a généré des cellules d'une morphologie de cellules claires (Anglesio *et al.*, 2013). Le profilage génomique et mutagénique de SKOV3 dans l'Atlas du génome du cancer (TCGA) appuie également une origine histologique de carcinome à cellules claires,



avec des mutations de ARID1A et PI3K (Domcke *et al.*, 2013). L'origine de SKOV3 est toutefois incertaine puisque certaines mutations de p53, normalement caractéristiques des HGSOCS, y furent retrouvées (Beaufort *et al.*, 2014; Elias *et al.*, 2015; Ikediobi *et al.*, 2006; Tudrej *et al.*, 2018).

## CHAPITRE 3

ARTICLE 1 : Diet-derived gallated catechins prevent TGF- $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition, cell migration and vasculogenic mimicry in chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells

L'article a été publié dans le journal « Nutrition and Cancer » sous la forme :

Sicard AA, Dao T, Suarez NG, Annabi B. Diet-Derived Gallated Catechins Prevent TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition, Cell Migration and Vasculogenic Mimicry in Chemosensitive ES-2 Ovarian Cancer Cells. *Nutr Cancer*. 2020 Mar 4;1-12. doi: 10.1080/01635581.2020.1733624

Contributions des co-auteurs :

Audrey-Ann Sicard : Expérimentations et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, conception du projet et rédaction du manuscrit

Tiziana Dao : Expérimentations

Narjara Gonzalez-Suarez : Expérimentations et rédaction du manuscrit

Borhane Annabi : Rédaction du manuscrit, conceptualisation et financement du projet

**Diet-derived gallated catechins prevent TGF- $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition, cell migration and vasculogenic mimicry in chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells**

Audrey-Ann Sicard, Tiziana Dao, Narjara Gonzalez Suarez, and Borhane Annabi\*

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de recherche CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada*

*Running title : Catechin targeting of EMT in ovarian cancer cells*

*\* To whom correspondence and reprint requests should be directed*

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire*

*Université du Québec à Montréal*

*C.P. 8888, Succ. Centre-ville*

*Montréal, Québec*

*CANADA*

*H3C 3P8*

*Phone : (514) 987-3000 ext. 7610*

*E-mail : annabi.borhane@uqam.ca*

*Abbreviations : ECM, Extracellular matrix; EGCG, Epigallocatechin-3-gallate; EMT, Epithelial-mesenchymal transition; EOC, Epithelial ovarian cancer; MMP-2, Matrix metalloproteinase-2; TGF, Transforming growth factor; VM, Vasculogenic mimicry*

### 3.1 Résumé

Le TGF- $\beta$  favorise la formation de métastases dans les cancers, y compris le cancer de l'ovaire, en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Alors que les stratégies de développement de médicaments ciblant la voie de signalisation du TGF- $\beta$  ont été envisagées, les propriétés anti-TGF- $\beta$  des catéchines, molécules anticancéreuses retrouvées dans le thé vert, n'ont jamais été explorées. Dans cette étude, nous évaluons la capacité de huit catéchines à inhiber la migration cellulaire et l'expression de biomarqueurs de la TEM, induit avec TGF- $\beta$ , ainsi que le mimétisme vasculogénique (MV), un processus partiellement associé à la TEM. Nous avons démontré que TGF- $\beta$  induisait la phosphorylation de Smad-3 et p38, accompagné par une augmentation de la migration cellulaire et de l'expression des niveaux protéiques/géniques des marqueurs de la TEM : Snail, Slug, Fibronectine, Vimentine et MMP-2. Cette induction était marquée dans la lignée chimiosensible de cancer ovarien ES-2, la voie du TGF- $\beta$  était cependant inopérante dans la lignée SKOV-3, chimiorésistante à la cisplatine et à l'adriamycine. Le MV chez ES-2 était associé à une augmentation des marqueurs de l'EMT. Nous avons observé que les catéchines possédant une fonction galloyle (CG, ECG, GCG, et EGCG) pouvaient efficacement prévenir la migration cellulaire et la TEM induites par TGF- $\beta$ , ainsi que le MV, en partie par l'inhibition de Snail et de la sécrétion de MMP-2. Nos résultats suggèrent que les catéchines du thé vert possédant la fonction galloyle démontrent leur potentiel anticancéreux en brimant la voie du TGF- $\beta$  qui contribue aux phénotypes métastatiques du cancer de l'ovaire.

### 3.2 Abstract

**Background:** Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  triggers ovarian cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition (EMT). Whereas drug design strategies targeting the TGF- $\beta$  signaling pathway have been envisioned, the anti-TGF structure: function aspect of chemopreventive diet-derived catechins remains unexplored. **Aim:** We assessed the effects of eight catechins on TGF- $\beta$ -mediated cell migration and induction of EMT biomarkers, as well as on in vitro vasculogenic mimicry (VM), a process partly regulated by EMT-related transcription factors. **Results:** TGF- $\beta$ -mediated phosphorylation of Smad-3 and p38 signaling intermediates was more effective in a chemosensitive ES-2 ovarian cancer cell line but was inoperative in cis-platinum- and adriamycin-chemoresistant SKOV-3 ovarian cancer cells. Increases in cell migration and in gene/protein expression of EMT biomarkers Fibronectin, Snail, and Slug were observed in ES-2 cells. When VM was assessed in ES-2 cells, 3D capillary-like structures were formed and increases in EMT biomarkers found. Catechins bearing the galloyl moiety (CG, ECG, GCG, and EGCG) exerted potent inhibition of TGF- $\beta$ -induced cell migration as well as EMT, and inhibited VM, in part through inhibition of Snail and matrix metalloproteinase-2 secretion. **Conclusion:** Our data suggest that diet-derived catechins exhibit chemopreventive properties that circumvent the TGF- $\beta$ -mediated signaling which contributes to the ovarian cancer metastatic phenotype.

### 3.3 Introduction

Ovarian cancer is the gynecological malignancy with the highest mortality rate among women (1), with a 5 year net survival of 47% following diagnosis, in the United States (2), and 44% in Canada (3). High mortality is most likely due to the prevalence of metastatic high-grade serous carcinomas and the absence of early symptoms and early detection strategies (2). Metastasis, being a complex process that arises when cancer cells migrate away from the primary site of tumor (4), has been estimated to be responsible for approximately 90% of cancer deaths (5). In order to successfully detach from their primary site and invade surrounding tissues, cancer cells must orchestrate a number of biological events including loss of cell-cell adhesion, extracellular matrix (ECM) remodeling, and response to chemotactic cell migration (6-8).

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) process recapitulates such a cell-biological program (9, 10). During EMT, epithelial cancer cells lose their cell-to-cell polarity and their usual adhesion repertoire, becoming individual, non-polarized, motile and invasive mesenchymal cells. This transition involves remodeling of the actin cytoskeleton and a characteristic switch in gene expression brought about by, amongst other transcription factors, Snail, Slug, and Twist (11). EMT can be induced by several growth factors including, among the most potent ones, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (9).

TGF- $\beta$  binds to two serine threonine kinase receptors, the TGF- $\beta$  type I and type II receptors (TGF $\beta$ RI, TGF $\beta$ RII) to form active complexes, which then can relay signals through phosphorylation of receptor activated Smad (R-Smad) transcription factors (12). The active TGF- $\beta$ R1 phosphorylates the R-Smad-2 and R-Smad-3 isoforms, which will bind to common-partner Smad complex (co-Smad; Smad-4 in mammals) and translocate to the nucleus (13). This complex can eventually bind with

various transcription factors to induce the EMT transcriptional switch. (13). In addition to correlating with metastases, migration and invasion, expression of EMT biomarkers has been found to be highly up-regulated in tumours forming vascular-like structures (14). This phenomenon, known as vasculogenic mimicry (VM), is a unique alternative route to angiogenesis, providing the blood supply necessary input for cancer development (14).

Green tea, one of the most popular beverages consumed world-wide, is made from the leaves of the plant *Camellia sinensis* (15). Its active constituents have been of interest to many studies, exposing their numerous beneficial health effects including their anti-carcinogenic activity (15). The green tea family of polyphenols, called catechins, has been shown to be powerful antioxidants capable of preventing tumorigenesis and cancer invasion (16). The most abundant and widely studied catechin, (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), has already been shown to affect a huge variety of cancer signaling pathways (15). However, less is known about the remaining seven major catechins present in green tea: epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), and their respective epimers : catechin (C), galocatechin (GC), catechin gallate (CG) and galocatechin gallate (GCG) (17).

In this study, we assessed the relative pharmacological effects of eight different catechins in preventing TGF- $\beta$ -induced EMT with respect to cell migration, VM and the expression of EMT biomarkers in chemosensitive (ES-2) and chemoresistant (SKOV-3) ovarian cancer cell models. Our results demonstrate that EMT was induced by TGF- $\beta$  through Smad-3 phosphorylation in ES-2, followed by increases in the expression of Snail, Slug, Fibronectin and MMP-2. In addition to blocking amplified cell migration and formation of 3D capillary-like structure, we further demonstrate that catechins had the ability to prevent the induction of EMT by TGF- $\beta$ . Our observations led us to conclude that the catechins presenting a galloyl moiety, CG, GCG, ECG and

EGCG, were the most potent for 1) inhibiting TGF- $\beta$  induced phosphorylation of Smad-3, 2) inhibiting the expression of EMT markers and MMP-2, and 3) efficiently preventing VM.



### 3.4 Materials and Methods

**Materials.** Sodium dodecylsulfate (SDS), EGCG, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against phosphorylated Smad-3, phosphorylated p38, TGF- $\beta$  R1, Fibronectin, Vimentin, Snail, and Slug were from Cell Signaling Technology Inc (Danvers, MA, USA). The monoclonal antibody against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

**Cell culture.** Human SKOV-3 ovarian adenocarcinoma cells as well as human ES-2 ovarian clear cell carcinoma cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown as a monolayer with McCoy's 5a Modified Medium for ES-2 cells (Wisent, 317-010-CL), and DMED medium (Wisent, 319-005-CL) for SKOV-3 cells both containing 10% fetal bovine serum (Life Technologies, 12483-020), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Wisent, 450-202-EL). Importantly, SKOV-3 cells have been documented to be resistant to tumor necrosis factor and to several cytotoxic drugs including diphtheria toxin, cisplatin and adriamycin. The role of efflux in drug accumulation was assessed in vitro against four platinum complexes. Decreased drug accumulation resulting from reduced uptake had been reported to be at least partially responsible for acquired resistance to cisplatin (18). All the cells were cultured at 37°C under a humidified 95%-5% (v/v) mixture of air and CO<sub>2</sub>.

***Immunoblotting procedures.*** ES-2 and SKOV-3 ovarian cancer cells were lysed and proteins were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins (30 µg) were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were then blocked for one hour at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST; Bioshop, TWN510-500). Membranes were further washed in TBST and incubated with the appropriate primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich Canada, S2002), followed by a 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG at 1/2,500 dilutions in TBST containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized by ECL.

***Gelatin zymography.*** Gelatin zymography was used to assay the levels of secreted matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) gelatinolytic activity in serum-starved ES-2 ovarian cancer cells as previously described (19). Briefly, an aliquot (20 µl) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin, a substrate that is efficiently hydrolyzed by MMP-2. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H<sub>2</sub>O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hours in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H<sub>2</sub>O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

***Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative PCR.*** Total RNA was extracted from cell monolayers or from cells cultured on Matrigel using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 2 µg of total RNA were reverse-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR.

Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The QuantiTect primer sets were provided by Qiagen (Valencia, CA) : MMP-9 (Hs\_MMP9\_1\_SG, QT00040040), MMP-2 (Hs\_MMP2\_1\_SG, QT0088396), Vimentin (Hs\_VIM\_1\_SG, QT00095795), Snail (Hs\_SNAI1\_1\_SG, QT00010010), Slug (Hs\_SNAI2\_1\_SG, QT00044128), PPIA (Hs\_PPIA\_4\_SG, QT01866137), GAPDH (Hs\_GAPDH\_1\_SG, QT00079247), and  $\beta$ -Actin (Hs\_Actb\_2\_SG, QT01680476). The relative quantities of target gene mRNA compared against two internal controls, GAPDH and  $\beta$ -Actin mRNA, were measured by following a  $\Delta$ CT method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference ( $\Delta$ CT) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of GAPDH and  $\beta$ -Actin mRNAs were calculated by CFX Manager<sup>TM</sup> (Bio-Rad, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as  $2^{-\Delta$ CT.

***Human epithelial to mesenchymal transition PCR array.*** Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays (PAHS-090Z, Qiagen) were used according to the manufacturer's protocol. The detailed list of the EMT key genes assessed can be found on the manufacturer's website (<https://www.qiagen.com/ca/>). Using real-time quantitative PCR, we reliably analyzed expression of a focused panel of genes related to genes regulated during EMT. Relative gene expressions were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta$ CT method, in which CT indicates the fractional cycle number where the fluorescent signal reaches detection threshold. The 'delta-delta' method uses the normalized  $\Delta$ CT value of each sample, calculated using a total of five endogenous control genes (B2M, HPRT1, RPLP0, GAPDH, and ACTB). Fold change values are then presented as average fold change =  $2^{(\text{average } \Delta\Delta\text{CT})}$  for genes in either ES-2 ovarian cancer cells treated with TGF- $\beta$  or cells cultured on top of Matrigel relative to

control cells. Detectable PCR products were obtained and defined as requiring <35 cycles. The resulting raw data were then analyzed using the PCR Array Data Analysis Template (<http://www.qiagen.com/geneglobe>). This integrated web-based software package automatically performs all  $\Delta\Delta\text{CT}$  based fold-change calculations from our uploaded raw threshold cycle data.

***Cell migration assay.*** Cell migration assay experiments were carried out using the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument of the xCELLigence system (Roche Diagnostics). Typsinized ES-2 and SKOV-3 adherent ovarian cancer cells were seeded (20,000 cells/well) onto CIM-Plates 16 (Roche Diagnostics). These migration plates are similar to conventional Transwells (8  $\mu\text{m}$  pore size) but have gold electrode arrays on the bottom side of the membrane to provide real-time measurement of cell migration. Prior to cell seeding, the underside of the wells from the upper chamber were coated with 25  $\mu\text{l}$  of 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 hour at 37°C. Cell migration was monitored for 6 hours. The impedance values were measured by the RTCA DP Instrument software and were expressed in arbitrary units as Normalized Cell Migration Index. Each experiment was performed three times in triplicate.

***Vasculogenic mimicry in vitro assay.*** *In vitro* vasculogenic mimicry (VM) of ES-2 ovarian cancer cells was assessed by Matrigel tube formation as previously described (20). In brief, each well of a 96-well plate was pre-coated with 50  $\mu\text{l}$  of Matrigel. After gel solidification, ES-2 cell suspension in culture media ( $1.8 \times 10^4$  cells/200  $\mu\text{l}$ ) was seeded into the wells. Catechins (30  $\mu\text{M}$ ) were added to the cell culture media and incubated at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator. Photographs were taken overtime using a digital camera attached to a phase-contrast inverted microscope. Loop area, loop perimeter, branching, and tube elongation parameters were quantified using Wimasis Analysis software from Onimagin Technologies (Cordoba, Spain).

***Statistical data analysis.*** Unless otherwise stated, data and error bars were expressed as means  $\pm$  SEM of three or more independent experiments. Statistical analysis of data was performed by one-way ANOVA with Tukey's post-test to establish differences among groups. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures. Sigmapstat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA) was used for all analyses.

### 3.5 Results

***Low chemotactic response and inoperative TGF- $\beta$ -mediated phosphorylation of Smad-3 in chemoresistant SKOV-3 ovarian cancer cells.*** TGF- $\beta$  signaling was reported to promote single-cell migration of mammary tumor cells and to contribute to EMT (21, 22). However, it is unclear whether this chemotactic response applies to a chemoresistant phenotype. We thus first assessed the extent of TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation status in serum-starved chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells, and compared it to that of chemoresistant SKOV-3 ovarian cancer cells (Fig. 3.1A). We found that Smad-3 phosphorylation occurred within the first 20 minutes of TGF- $\beta$  treatment in ES-2 cells, whereas it was undetectable in SKOV-3 cells although TGF- $\beta$ R1 expression was detected in both cell lines (Fig. 3.1B). The chemotactic response was further assessed using exposure to various concentrations of TGF- $\beta$ ; the cytokine was found to significantly trigger ES-2 cell migration, whereas SKOV-3 chemotaxis remained low in response to TGF- $\beta$  (Fig. 3.1C).

***High TGF- $\beta$ -mediated induction of phosphorylated signaling intermediates and EMT biomarkers in chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells.*** TGF- $\beta$  signaling toward EMT is mediated by both Smad-dependent and Smad-independent pathways, including p38 MAP kinase (p38 MAPK) (23). Although the Smad pathway is unique to TGF- $\beta$  signaling, p38 MAPK can also be activated by other pathways including Ras and Wnt, which cooperate with TGF- $\beta$  to induce EMT (24). The EMT response downstream of TGF- $\beta$  signaling was next examined using various concentrations of TGF- $\beta$  and immunoblotting (Fig. 3.2A). Densitometric quantification of representative immunoblots was performed and protein expression normalised with respect to GAPDH. These results show that the lower responsiveness to TGF- $\beta$ 1 in SKOV-3 ovarian cancer cells as compared to ES-2 was reflected by the inability of SKOV-3 to exhibit increased expression of the EMT biomarkers Fibronectin, Vimentin, Snail and

Slug, or in phosphorylation of Smad-3 and p38 signalling intermediates (Fig. 3.2B). The high response to TGF- $\beta$  in ES-2 cells combined with the lack of TGF- $\beta$ -mediated responsiveness in SKOV-3 cells suggests that strategic pharmacological intervention may possibly be more efficient in preventing the transition towards a more invasive phenotype in response to TGF- $\beta$ .

***Structure: function study of TGF- $\beta$  signal blocking by diet-derived catechins with ES-2 ovarian cancer cells.*** Tumor cells undergoing TGF- $\beta$ -mediated EMT acquire the capacity to detach and migrate away from the primary tumor (25). The anti-TGF- $\beta$  signaling of diet-derived catechins was next tested in order to assess their abilities to alter downstream phosphorylation of signaling intermediates and EMT biomarkers expression, along with the cell chemotactic response to TGF. Serum-starved ES-2 ovarian cancer cells were cultured as described in the Methods section, and then treated for 48 hours with 10 ng/ml TGF- $\beta$  in the presence or absence of 30  $\mu$ M of a specific catechin. Cell lysates were analysed by Western blotting. Immunodetection demonstrated changes in the levels of TGF- $\beta$ -induced Smad-3 phosphorylation, Fibronectin, Snail, and Slug expression when galloyl moieties were present on the catechins tested. More specifically, catechin gallate (CG), gallicocatechin gallate (GCG), epicatechin gallate (ECG), and epigallocatechin gallate (EGCG) all reduced expression of the TGF- $\beta$ -induced EMT biomarkers tested Fibronectin, Snail, and Slug, as well as of Smad-3 phosphorylation (Fig. 3.3A). When the functional impact of the catechins was tested on the TGF- $\beta$ -induced ES-2 ovarian cancer cell migration, again CG, GCG, ECG, and EGCG but also EC were found to significantly reduce chemotacticism (Fig. 3.3B). To gain insight into the potential molecular mechanisms of action that regulate ECM degradation and cell migration, conditioned media were harvested following the above-described catechin treatments and gelatin zymography was performed in order to assess the extent of secreted MMP-2 levels. All of the gallated catechins specifically inhibited the TGF- $\beta$ -induced MMP-2 levels (Fig. 3.3C). Aside from EC, this observation may in part link the reduced acquisition of

EMT-associated phenotype to specific targeting of the migratory potential in ES-2 ovarian cancer cells.

***Kinetics and characteristics of in vitro 3D-capillary-like structure formation assay of ES-2 ovarian cancer cells correlate with EMT biomarkers during vasculogenic mimicry.*** Vasculogenic mimicry (VM) is associated with cancer cell migration and invasion (26), and has been reported to occur in ovarian cancer cells (27, 28). Here, we first tested whether ES-2 ovarian cancer cell monolayers cultured on Matrigel generated 3D capillary-like structures. VM kinetics were assessed and pictures taken over 24 hours (Fig. 3.4A). Then, 3D capillary-like structure characteristics were analyzed as described in the Methods section for loop area, loop perimeter, branching, and tube elongation (Fig. 3.4B). The deduced VM kinetic parameters indicated that the rapid (<5 hours) initiation phase was characterized by high levels of loop area and perimeter (Fig. 3.4B, open circle) and by branching and tube elongation (Fig. 3.4B, closed circle). A decrease in branching and tube length was associated with the maturation phase of in vitro VM. In order to assess whether any common EMT biomarkers' regulation linked TGF- $\beta$  response to VM, total RNA was isolated from ES-2 cell monolayers cultured on plastic either from control or from TGF- $\beta$ -treated cells, or from ES-2 cells cultured for 24 hours on Matrigel (Fig. 3.4C). Gene expression was first screened using a human PCR array for 86 EMT biomarkers as described in the Methods section. Eight of the genes induced by either TGF- $\beta$  or upon cultures on top of Matrigel were further confirmed by RT-qPCR (Fig. 3.4C). In addition to MMP-9, WNT5A, WNT11, and PDGFRB, these included EMT biomarkers Fibronectin (FN), Slug, Snail, and MMP-2. These observations and the similar transcriptional regulation of some crucial EMT biomarkers confirm that EMT triggered upon TGF- $\beta$  or VM cues appear to share some common regulatory mechanisms in our ES-2 ovarian cancer cell model (27).



***Catechin alteration of in vitro 3D capillary-like structure formation by ES-2 ovarian cancer cells.*** Having established the effects of the diverse catechins shown above against the acquisition of EMT phenotype and increased cell migration, we next sought to assess their effects on in vitro VM. ES-2 cells were seeded onto Matrigel and left to generate capillary-like structures (Fig. 3.5A). When in vitro VM was tested in the presence of 30  $\mu$ M catechins (Fig. 3.5B), CG, GCG, and ECG were found to effectively inhibit the formation of 3D capillary-like structures (Fig. 3.5C). Intriguingly, although EGCG inhibited TGF- $\beta$ -mediated EMT biomarkers expression, cell migration, and MMP-2 secretion, it was ineffective at inhibiting VM (Fig. 3.5C). Extraction of total RNA was further performed from cells involved in VM in the presence or not of the catechins, and RT-qPCR performed to assess the levels of Slug (Fig. 3.5D) and Snail (Fig. 3.5E) gene expression. We found that only GCG was able to downregulate both Slug and Snail expression, whereas CG, ECG, and EGCG were able to only downregulate Snail gene expression. These observations prompt for differential regulation of Snail and Slug by catechins, and for Snail as being the key transcription factor involved in VM regulation by several of the catechins tested.

### 3.6 Discussion

In this study, we assessed the structure-to-chemopreventive function relationship of eight diet-derived catechins against TGF- $\beta$ -mediated EMT, as well as considered their effects against ovarian cancer cell migration and in vitro vasculogenic mimicry. The latter phenomena represent two crucial hallmarks induced by TGF- $\beta$ , and both account for chemoresistance which remains a major complication in ovarian cancer treatments. In fact, EMT is a latent developmental process that is re-activated during cancer progression (29) and, as such, plays a crucial role in the aggressiveness of epithelial ovarian cancer (EOC) through increased invasion ability. Not surprisingly, strong evidence links chemoresistance to EMT, and discovery of novel therapeutic opportunities that target EMT in EOC should improve the clinical outcome of patients suffering from such lethal gynecologic malignancies (30).

We first demonstrated that EMT was significantly induced in ES-2 ovarian cancer cells, as a model of EOC, through high TGF- $\beta$ -mediated phosphorylation of Smad3, and was reflected by downstream increased expression of several mesenchymal biomarkers such as Snail, Slug, Vimentin and Fibronectin. Such increases in EMT biomarker expression also correlated with their induced mRNA transcript levels, along with phosphorylation of p38. The increased expression of Snail, Slug and Fibronectin upon TGF- $\beta$  treatment was previously reported to directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer (31), radioresistance in ovarian cancer stem cells (32), and to occur in grade-IV-derived U87-MG glioblastoma multiforme cells (33). Our observations further show that the SKOV-3 chemoresistant ovarian cancer cell model only modestly responded to TGF- $\beta$  with consequently lower induction in EMT biomarkers. Such a varying expression pattern of EMT markers, between chemosensitive and chemoresistant ovarian cancer cell models, could be due to the non-dichotomous nature of EMT itself. It is now recognized that rather than a

linear transition from an epithelial to mesenchymal phenotype, EMT could rather be viewed as a spectrum of different pseudo-EMT or EMT subtypes at given stages in the cell aggressiveness phenotype. Accordingly, aberrations in TGF- $\beta$  signaling pathways are not uncommon in tumorigenesis. In fact, TGF- $\beta$  has paradoxical roles in cancer development as, in the early stages; an activation of the TGF- $\beta$  pathway is generally associated with oncosuppression (34). On the other hand, when proceeding towards more advanced stages of aggressiveness, TGF- $\beta$  promotes metastasis, angiogenesis, and immunosuppression through EMT (35, 36).

Here, in contrast to ES-2 cells, we hypothesized that the highly adaptive chemoresistant and aggressive phenotype of SKOV-3 cells precludes their need for cytokine-induced EMT. Interestingly, both reduced expression and decreased binding of the protein Smad4, required for nuclear translocation of TGF- $\beta$ , are been found with a higher frequency in advanced stage ovarian cancer as compared to normal ovarian tissue (37, 38). The loss of Smad4 protein is further believed to correlate with a more aggressive phenotype (39). Whether such alterations explain part of SKOV-3's lack of responsiveness to TGF- $\beta$  remains to be confirmed. Chemopreventive pharmacological targeting of upstream TGF- $\beta$ -mediated EMT in chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells therefore represents a logical therapeutic window of opportunity that we wished to exploit further with the use of diet-derived catechins.

Among the eight catechins we tested, EGCG is undoubtedly the best-studied because of its pleiotropic cellular effects, in part through its ability to interact with numerous biological constituents (16). Among EGCG's interactors, the transmembrane 67 kDa Laminin Receptor (67LR) has been proposed as its primary cell surface receptor (40). In a study using human ovarian carcinoma tissues, increased expression of 67LR was observed and which correlated with the clinicopathological features of advanced ovarian cancer (41, 42) as well as with poor prognosis in EOC (43). Along with the direct interactions of gallated catechins with MMP-2, MMP-9, MMP-14,

LRP1, TIMP-2, and MTCBP1 (19, 44), EGCG has also been found to bind directly to the TGF $\beta$ RII (45). It is safe to hypothesize that a direct effect on the TGF- $\beta$  receptor may therefore, in part, explain the ability of EGCG, and of other gallated catechins, to prevent TGF- $\beta$ -mediated EMT (46), cell migration and VM. Whether these effects are a consequence of structure-specific direct competition of the gallated catechins with TGF- $\beta$  docking within its receptor, or a downstream intracellular effect once transported into the cell through the 67LR remains to be determined. Nevertheless, downstream inhibition of TGF- $\beta$ 1 signaling by EGCG has been reported in human lung cancer cells (47) and in non-small cell lung cancer cells (48), and agrees with the inhibitory effects we have observed here on intracellular transduction cascades involving Smad3 and p38 phosphorylation.

In fact, our experiments further exhibit the ability of gallated catechins to inhibit both the formation of in vitro 3D capillary-like structures as well as vasculogenic mimicry (VM) as part of the EMT process. It is acknowledged that EMT contributes to VM since some cancer cells can adopt an endothelium-like phenotype through up-regulation of EMT biomarkers (14). To our knowledge, our study is the first to report the effects of catechins on ovarian cancer cell VM, and to establish Snail as the key transcription factor in the regulation by catechins of VM and of TGF- $\beta$ -induced EMT and cell migration. Inhibition of TGF- $\beta$ -induced MMP-2 (Fig. 3.3C) may, in part, explain this effect because a decrease in the ECM components proteolysis leads to lower cancer invasiveness. EGCG is well-known to inhibit MMP activity (49), and treatment of aggressive melanoma cells with an MMP inhibitor resulted in the inhibition of vasculogenic mimicry-associated genes (50). Whereas, such catechin-sensitive mechanism has been tested in only one chemosensitive ovarian cancer cell line (ES-2) herein, the ubiquity of this mechanism will require to be tested in ovarian cancer cell lines isolated from patients with ovarian cancer, in various stages of cancer development and aggressiveness.

Given catechin-protein interaction studies have been reported previously (19), one can legitimately design future studies that combine computational docking analysis and X-ray crystallographic analysis in order to reveal more comprehensive details on catechin-protein interactions involving molecular dynamics simulations with TGF- $\beta$  receptors and with the 67LR structures. Accordingly, biophysical testing will also be required to provide solid structure-based testing of that hypothesis. Our preliminary studies confirm that the galloyl moiety may anchor gallated catechins to proteins through interactions with their hydroxyl groups (51). Whether such catechin-protein interaction competes with the TGF- $\beta$  binding domain within the TGF $\beta$ R, alters TGF $\beta$ R oligomerization dynamics, inhibits their kinase activity, or interacts upstream of the TGF- $\beta$  signaling through the 67LR remains to be confirmed (Summarized in Fig. 3.6). Altogether, this should inspire more efficient drug designs exploiting the galloyl moiety in order to significantly target or circumvent processes involved in chemoresistance or metastasis.

### 3.7 References

1. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, and Ledermann JA: Ovarian cancer. *Lancet*, 384(9951), 1376-1388, 2014.
2. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, et al: Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 284-296, 2018.
3. Canadian Cancer Society. (2019). Survival statistics for ovarian cancer. Retrieved from : <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/ovarian/prognosis-and-survival/survival-statistics/?region=on>
4. Karlsson MC, Gonzalez SF, Welin J, and Fuxe J. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Molecular oncology*, 11(7), 781-791, 2017.
5. Chaffer CL, and Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1, 559-564, 2011.
6. Grunert S, Jechlinger M, and Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 657-665, 2003.
7. Martin TA, and Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 872-891, 2009.
8. Thierry JP, and Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-142, 2006.

9. Tsuji T, Ibaragi S, and Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Research*, 69(18), 7135-7139, 2009.
10. Valastyan S, and Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292, 2011.
11. Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers*, 10(2), 52, 2018.
12. Clarke DC, and Liu X. Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling. *Trends in Cell Biology*, 18(9), 430-442, 2008.
13. Miyazono K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. Proceedings of the Japan Academy. Series B, *Physical and biological sciences*, 85(8), 314-323, 2009.
14. Liu Q, Qiao L, Liang N, Xie J, Zhang J, et al. The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(9), 1761-1769, 2016.
15. Yang CS, Wang H, Chen JX, and Zhang J. Effects of tea catechins on cancer signaling pathways. *The Enzymes*, 36, 195-221, 2014.
16. Negri A, Naponelli V, Rizzi F, and Bettuzzi S. Molecular Targets of Epigallocatechin-Gallate (EGCG): A Special Focus on Signal Transduction and Cancer. *Nutrients*, 10(12), 1936, 2018.
17. Rady I, Mohamed H, Rady M, and Siddiqui IA, and Mukhtar H. Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 1-23, 2017.

18. Hills CA, Kelland LR, Abel G, Siracky J, Wilson AP, et al. Biological properties of ten human ovarian carcinoma cell lines: calibration in vitro against four platinum complexes. *Br J Cancer*, 59(4), 527-534, 1989.
19. Djerir D, Iddir M, Bourgault S, Lamy S, and Annabi B. Biophysical evidence for differential gallated green tea catechins binding to membrane type-1 matrix metalloproteinase and its interactors. *Biophys Chem*, 234, 34-41, 2018.
20. Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, et al. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells*, 21(3), 337-347, 2003.
21. Giampieri S, Manning C, Hooper S, Jones L, Hill CS, et al. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol*, 11, 1287-1296, 2009.
22. Xu J, Lamouille S, and Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*, 19, 156-172, 2009.
23. Fuxe J, Vincent T, and Garcia de Herreros A. Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle*, 9, 2363-2374, 2010.
24. Najafi M, Ahmadi A, and Mortezaee K. Extracellular-signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling as a target for cancer therapy: An updated review. *Cell Biol Int*. 2019. (in press)



25. Ahmadi A, Najafi M, Farhood B, and Mortezaee K. Transforming growth factor- $\beta$  signaling: Tumorigenesis and targeting for cancer therapy. *J Cell Physiol*, 234(8), 12173-12187, 2019.
26. Zhang J, Qiao L, Liang N, Xie J, Luo H, et al. Vasculogenic mimicry and tumor metastasis. *JBUON*, 21(3), 533-541, 2016.
27. Liu W, Lv C, Zhang B, Zhou Q, and Cao Z. MicroRNA-27b functions as a new inhibitor of ovarian cancer-mediated vasculogenic mimicry through suppression of VE-cadherin expression. *RNA*. 23(7), 1019-1027, 2017.
28. Wang Y, Liu P, Wang X, and Mao H. Role of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 in vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Mol Med Rep*, 16(1), 325-330, 2017.
29. van Staalduinen J, Baker D, Ten Dijke P, and van Dam H. Epithelial-mesenchymal-transition-inducing transcription factors: new targets for tackling chemoresistance in cancer? *Oncogene*, 2018. (in press)
30. Huang RY, Chung VY, and Thierry JP. Targeting pathways contributing to epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial ovarian cancer. *Curr Drug Targets*, 13(13), 1649-1653, 2012.
31. Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, Nuin P, Evans K, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 12, 91, 2012.
32. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, et al. Snail and Slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-

- mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *STEM CELLS*, 27, 2059-2068, 2009.
33. Ouanouki A, Lamy S, and Annabi B. Anthocyanidins inhibit epithelial-mesenchymal transition through a TGF $\beta$ /Smad2 signaling pathway in glioblastoma cells. *Molecular Carcinogenesis*, 56(3), 1088-1099, 2016.
  34. Ikushima H, and Miyazono K. TGF $\beta$  signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 10, 415-424, 2010.
  35. Drabsch Y, and Dijke P. TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 31, 553-568, 2012.
  36. Pickup M, Novitskiy S, and Moses HL. The roles of TGF $\beta$  in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 13, 788-799, 2013.
  37. Anthony ML, Nair R, Sebastian P, and Karunagaran D. Changes in expression, and/or mutations in TGF-beta receptors (TGF-beta RI and TGF-beta RII) and Smad 4 in human ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136, 351-361, 2010.
  38. Xi L, Hu W, Meng L, Zhou J, Lu Y, et al. Dysregulation of the TGF- $\beta$  postreceptor signaling pathway in cell lines derived from primary or metastatic ovarian cancer. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* 24, 62-65, 2004.
  39. Levy L, and Hill CS. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor-beta target genes and distinguishes TGF-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol*, 25, 8108-8125, 2005.

40. Tachibana H. Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG. *Forum Nutr*, 61, 156-169, 2009.
41. van den Brûle FA, Berchuck A, Bast RC, Liu FT, Gillet C, et al. Differential expression of the 67-kD laminin receptor and 31-kD human laminin-binding protein in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer*, 30A(8), 1096-1099, 1994.
42. van den Brûle FA, Castronovo V, Ménard S, Giavazzi R, Marzola M, et al. Expression of the 67 kD laminin receptor in human ovarian carcinomas as defined by a monoclonal antibody, MLuC5. *Eur J Cancer*, 32A(9), 1598-1602, 1996.
43. Song T, Choi CH, Cho YJ, Sung CO, Song SY, et al. Expression of 67-kDa laminin receptor was associated with tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 125(2), 427-432, 2012.
44. Kuzuhara T, Suganuma M, and Fujiki H. Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention. *Cancer Lett*, 261(1), 12-20. 2008.
45. Tabuchi M, Hayakawa S, Honda E, Ooshima K, Itoh T, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses transforming growth factor-beta signaling by interacting with the transforming growth factor-beta type II receptor. *World J Exp Med*, 3(4), 100-107, 2013.
46. Huang SF, Horng CT, Hsieh YS, Hsieh YH, Chu SC, et al. Epicatechin-3-gallate reverses TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits cell invasion and protease activities in human lung cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 94:1-10, 2016.

47. Ko H, So Y, Jeon H, Jeong MH, Choi HK, et al. TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition and acetylation of Smad2 and Smad3 are negatively regulated by EGCG in human A549 lung cancer cells. *Cancer Lett*, 335(1), 205-213, 2013.
48. Liu LC, Tsao TC, Hsu SR, Wang HC, Tsai TC, et al. EGCG inhibits transforming growth factor- $\beta$ -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via the inhibition of Smad2 and Erk1/2 signaling pathways in nonsmall cell lung cancer cells. *J Agric Food Chem*, 60(39), 9863-9873, 2012.
49. Annabi B, Lachambre MP, Bousquet-Gagnon N, Page M, Gingras D, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1542(1-3), 209-220, 2002.
50. Hendrix MJ, Seftor EA, Kirschmann DA, Quaranta V, and Seftor RE. Remodeling of the microenvironment by aggressive melanoma tumor cells. *Ann N Y Acad Sci*, 995, 151-161, 2003.
51. Nakano S, Megro SI, Hase T, Suzuki T, Isemura M, et al. Computational molecular docking and X-ray crystallographic studies of catechins in new drug design strategies. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(8), 2020, 2018.

## 3.8 Figures

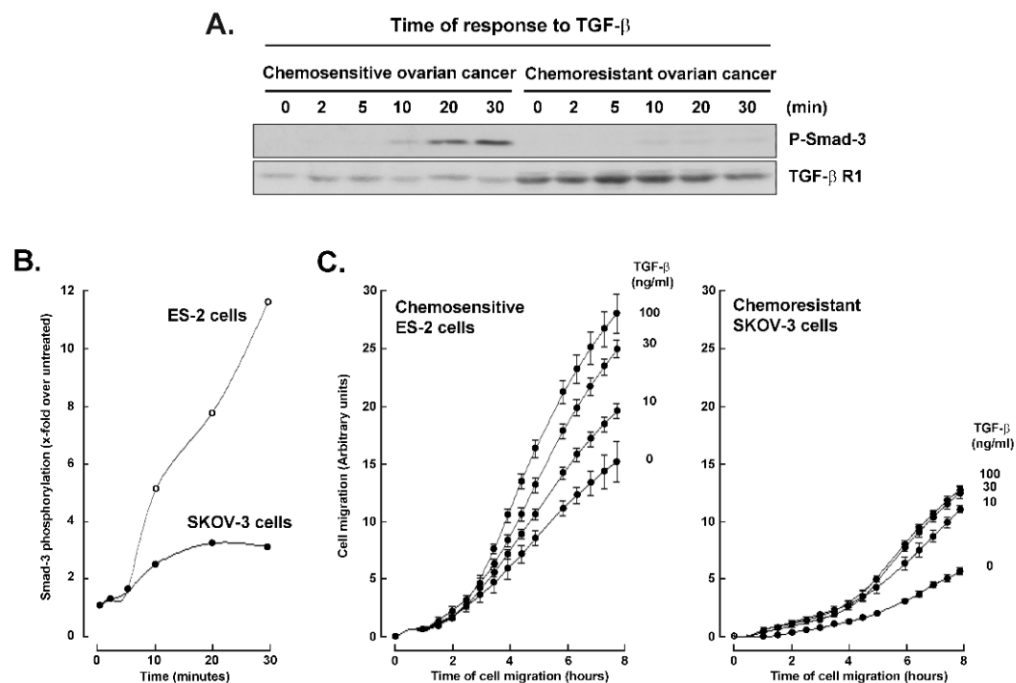


Figure 3.1 Low chemotactic response and inoperative TGF- $\beta$ -mediated phosphorylation of Smad-3 in chemoresistant SKOV-3 ovarian cancer cells. A) Serum-starved chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells and chemoresistant SKOV-3 ovarian cancer cells were cultured as described in the Methods section, and then treated for the indicated time with 100 ng/ml TGF- $\beta$ . Cell lysates were analysed for protein content by Western blotting and immunodetection performed as described in the Methods section in order to detect the extent of P-Smad-3 and TGF- $\beta$ R1 expression. B) Densitometric quantification of a representative P-Smad-3 induction is presented and was normalised on TGF- $\beta$ R1. C) Chemotactic response to various TGF- $\beta$  concentrations was assessed. Real-time ES-2 (left panel) and SKOV-3 (right panel) cell migration was performed using the xCELLigence system as described in the Methods section.

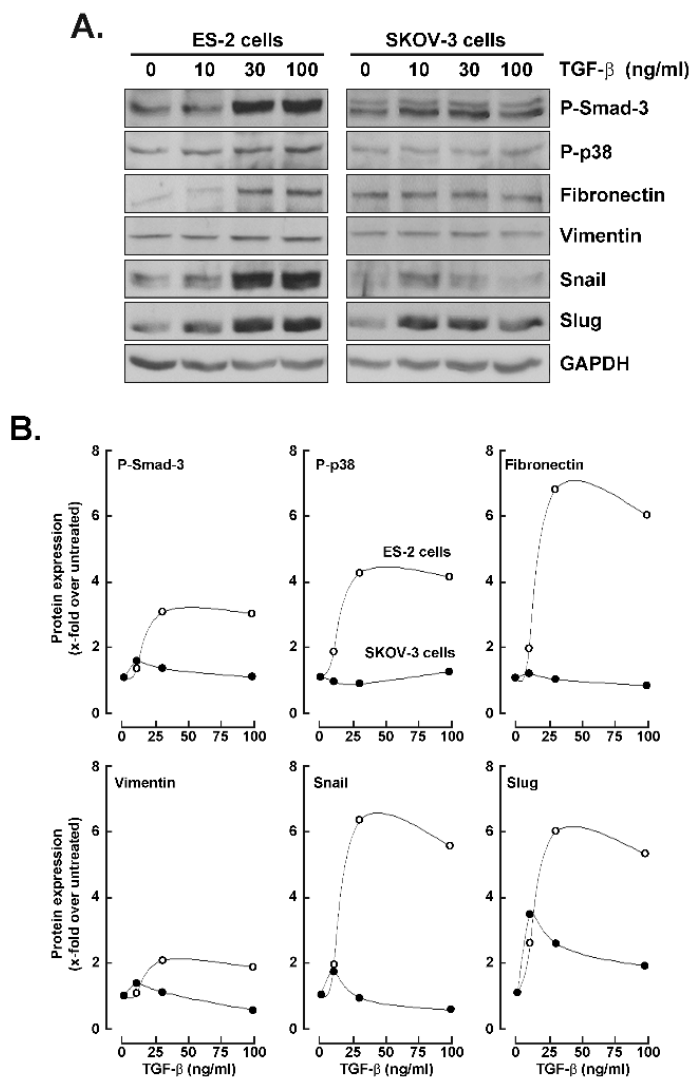


Figure 3.2 TGF- $\beta$ -mediated induction of phosphorylated signaling intermediates and EMT biomarkers. A) Serum-starved chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells and chemoresistant SKOV-3 ovarian cancer cells were cultured as described in the Methods section, and then treated for 18 hours with the indicated TGF- $\beta$  concentrations. Cell lysates were analysed for protein content by Western blotting and immunodetection performed as described in the Methods section in order to detect P-Smad-3, P-p38, Fibronectin, Vimentin, Snail, Slug, and GAPDH expression. B) Densitometric quantification of representative immunoblots is presented where protein expression was normalised to GAPDH.

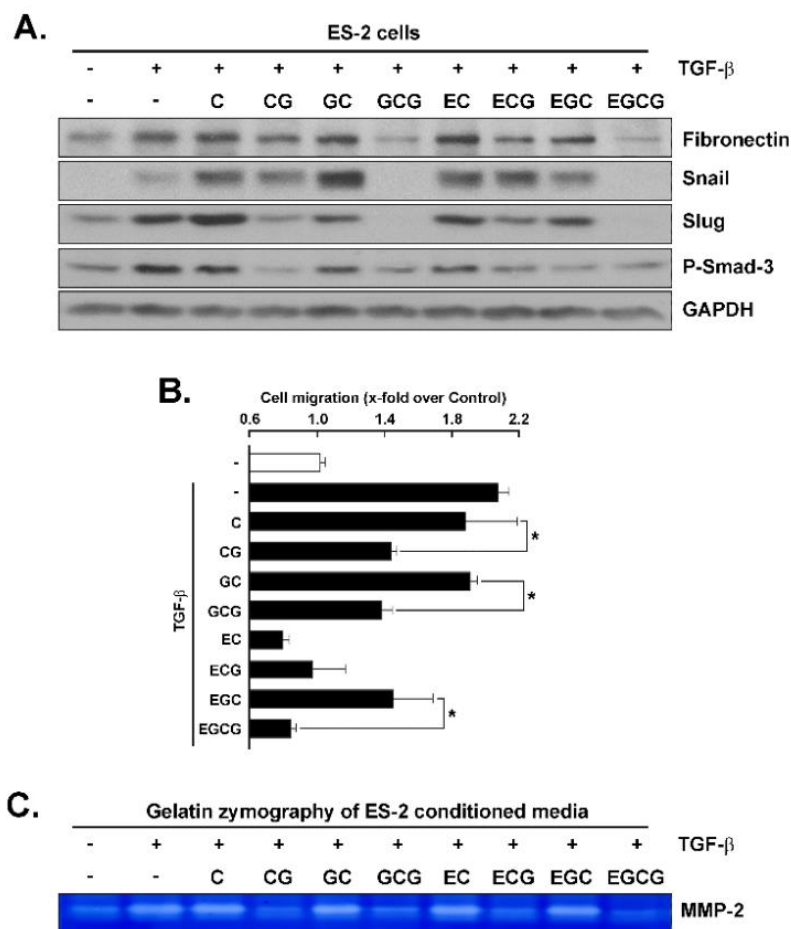


Figure 3.3 Structure-to-anti-TGF- $\beta$  signaling function study of diet-derived catechins with ES-2 ovarian cancer cells. A) Serum starved chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells were cultured as described in the Methods section, and then treated for 18 hours with 100 ng/ml TGF- $\beta$  in the presence or absence of the indicated 30  $\mu$ M catechins. Cell lysates were analysed for protein content by Western blotting and immunodetection performed as described in the Methods section in order to detect P-Smad-3, Fibronectin, Snail, Slug, and GAPDH expression. B) Impact of the catechins on TGF- $\beta$  chemotactic cell migratory response was assessed using the xCELLigence system as described in the Methods section. C) Conditioned media were harvested following treatment and gelatin zymography performed as described in the Methods section to assess secreted MMP-2 levels. Significance: \*  $p < 0.05$  vs non-gallated catechin moiety.

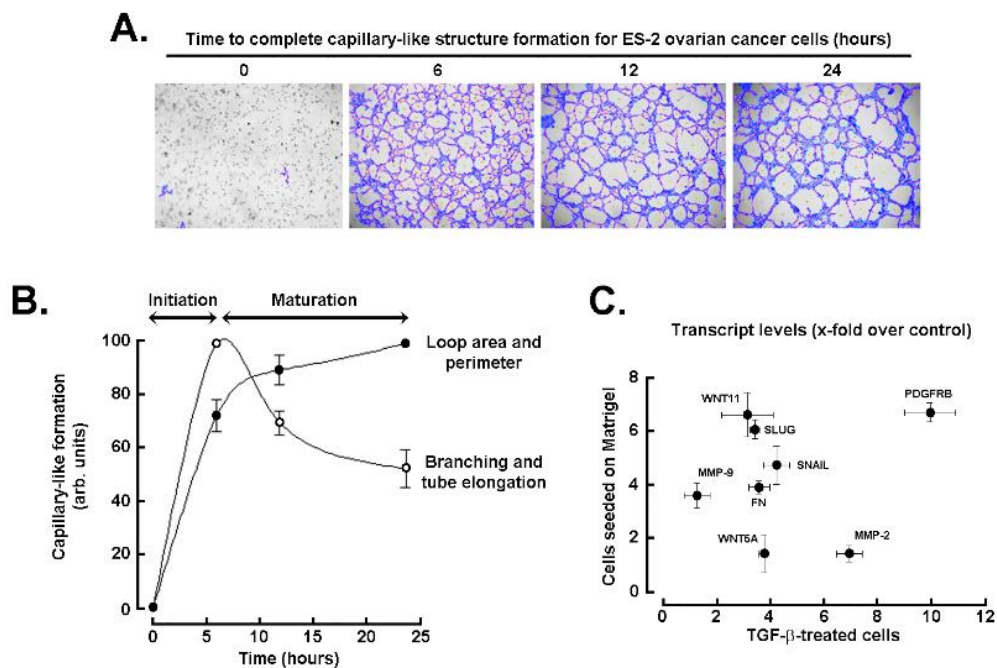


Figure 3.4 Kinetics and characteristics of in vitro 3D capillary-like structure formation assay of ES-2 ovarian cancer cells correlate with EMT biomarkers during vasculogenic mimicry. ES-2 ovarian cancer cell monolayers were cultured as described in the Methods section. A) Cells were then trypsinized and seeded on top of Matrigel for up to 24 hours and representative pictures were taken. B) 3D capillary-like structure formation characteristics (loop area, loop perimeter, branching, and tube elongation) were analyzed using the Wimasis analysis software. C) Total RNA was isolated from ES-2 cell monolayers cultured on plastic from control (Vehicle) or TGF- $\beta$ -treated cells (TGF- $\beta$ ), or from ES-2 cells cultured for 24 hours on Matrigel (Matrigel). Gene expression was then first screened using a PCR array for EMT biomarkers expression as described in the Methods section. Only those genes that were significantly induced (WNT11, WNT5B, PDGFRB, Fibronectin (FN), Slug, Snail, MMP-2 and MMP-9) were further confirmed by RT-qPCR as described in the Methods section.



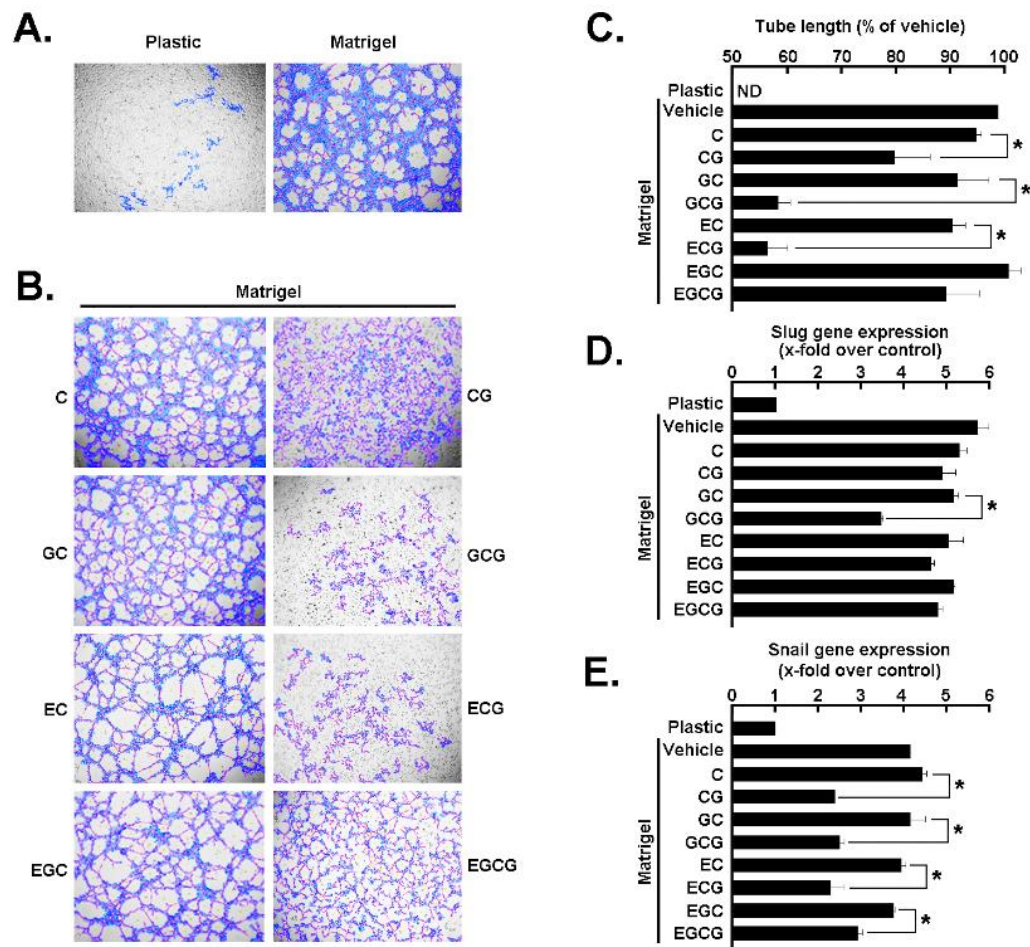


Figure 3.5 Catechin alteration of in vitro 3D-capillary-like structure formation by ES-2 ovarian cancer cells. A) ES-2 ovarian cancer cells were seeded either on plastic or Matrigel and cultured for 24 hours as described in the Methods section. B) 3D-capillary-like structure formation on Matrigel was assessed in the presence of tested catechins (30  $\mu$ M) and representative pictures were taken after 24 hours treatment. C) Capillary-like structure tube length was measured using the Wimasis analysis software for each catechin and expressed as a percentage of tube length for vehicle-treated cells. Total RNA was isolated from ES-2 cells cultured for 24 hours on Matrigel in the presence or not of the indicated catechins. Gene expression was then assessed for D) Slug, and E) Snail by RT-qPCR as described in the Methods section. Significance: \*  $p < 0.05$  vs non-gallated catechin moiety.

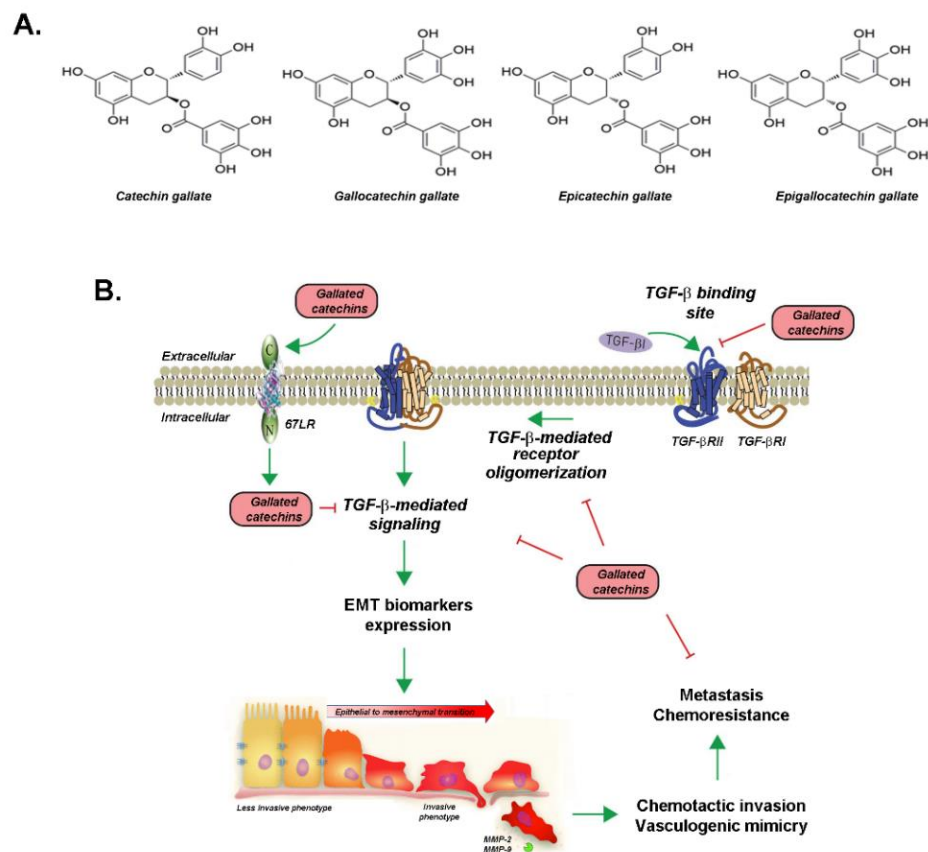


Figure 3.6 Scheme summarizing the anti-TGF- $\beta$  impact of the gallated catechins. A) Chemical structures of the four gallated catechins which were tested in this study. B) We postulate that the gallated catechins efficiently alter TGF- $\beta$ -mediated events by either competing with TGF- $\beta$  at the TGF- $\beta$  receptor binding site, by inhibiting TGF- $\beta$  receptor oligomerization, or by inhibiting the serine-threonine kinase activity associated to TGF- $\beta$  receptor. Alternatively, gallated catechins could interact, to some extent, with the 67LR in order to translocate within the cell and alter TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$ R signal transduction. Collectively, this can alter downstream signaling cascades (phosphorylation of Smad3 or p38, among others) and induction of EMT. The acquisition of a less invasive to a more invasive phenotype leads to increased cell chemotactic migration and vasculogenic mimicry, which require the activity of matrix metalloproteinases to degrade the ECM components. These events are reflected by the metastatic and chemoresistant phenotype that can ultimately be prevented by the gallated catechins.

## CHAPITRE 4

ARTICLE 2 : Preventing EMT in ES-2 ovarian cancer cells through the biophysical targeting of TGF- $\beta$ R1 : A role for the galloyl moiety of green tea-derived catechins

Le manuscrit a été soumis à la revue scientifique *The Journal of Nutritional Biochemistry*

Contributions des co-auteurs :

Audrey-Ann Sicard : Expérimentations et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, conception du projet et rédaction du manuscrit

Borhane Annabi : Rédaction du manuscrit, conceptualisation et financement du projet

**Preventing EMT in ES-2 ovarian cancer cells through the biophysical targeting  
of TGF- $\beta$ R1 : A role for the galloyl moiety of green tea-derived catechins**

Audrey-Ann Sicard<sup>1</sup> and Borhane Annabi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, and <sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie Analytique et Structurale, Centre de recherche CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Canada*

*Running title : Galloyl targeting of TGF- $\beta$  receptor kinase activity*

*\* To whom correspondence and reprint requests should be directed*

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire*

*Université du Québec à Montréal*

*C.P. 8888, Succ. Centre-ville*

*Montréal, Québec*

*CANADA*

*H3C 3P8*

*Phone : (514) 987-3000 ext. 7610*

*E-mail : annabi.borhane@uqam.ca*

*Abbreviations : CMDA, Computational molecular docking analysis; ECM, Extracellular matrix; EGCG, Epigallocatechin-3-gallate; EGFR, Epidermal growth factor receptor; EMT, Epithelial-mesenchymal transition; EOC, Epithelial ovarian cancer; MMP, Matrix metalloproteinase; RTKs, Receptor tyrosine kinases; SPR, Surface plasmon resonance; TGF- $\beta$ , Transforming growth factor beta; TGF- $\beta$ R, TGF- $\beta$  receptor*

*Key words: Ovarian cancer, transforming growth factor, epithelial-mesenchymal transition, green tea, catechins*

#### 4.1 Résumé

La fonction chimique galloyle est une particularité structurale qui dicte, en partie, les propriétés chimiopréventives des catéchines du thé vert. Chez une lignée de cancer ovarien, les catéchines galloylées ont antérieurement démontré la capacité de cibler la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) médiée par le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ). L'effet précis de la fonction galloyle en aval de cette voie de signalisation reste toutefois méconnu. Dans cette étude, nous nous sommes demandé si la fonction galloyle, à elle seule, pouvait interagir avec les récepteurs du TGF- $\beta$  de sorte à altérer la transduction des signaux et la réponse chimiotactique d'un modèle de carcinome ovarien séreux, ES-2. De concert avec les valeurs LogP et LogS des molécules testées, nous avons découvert que la phosphorylation de Smad-3, induite par le TGF- $\beta$ , était inhibée de façon optimale lorsque la chaîne aliphatique de la fonction galloyle atteignait 8 à 10 carbones. L'inhibition fonctionnelle de l'activité kinase de TGF- $\beta$ R1 a été mise en évidence par une interaction physique directe détectée par résonance plasmonique de surface. Les analyses par amarrage moléculaire *in silico* ont prédit un modèle où les catéchines galloylées se positionnaient dans la poche de liaison de l'ATP, un site analogue à celui du Galunisertib, inhibiteur compétitif de TGF- $\beta$ R1. Nos résultats suggèrent que la fonction galloyle des catéchines du thé vert permet une spécificité de liaison et de positionnement de ces molécules au sein du domaine kinase du TGF- $\beta$ R1 ayant pour effet d'antagoniser la signalisation médiée par TGF- $\beta$  requise à l'invasion du cancer de l'ovaire et la formation de métastases.

### 4.3 Abstract

**Background:** The galloyl moiety is a specific structural feature which dictates, in part, the chemopreventive properties of diet-derived catechins. In ovarian cancer cells, galloylated catechins were recently demonstrated to target the transforming growth factor (TGF)- $\beta$ -mediated control of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. The specific impact of the galloyl moiety upstream of such signaling however remains poorly understood. **Aim:** Here, we questioned whether the sole galloyl moiety interacted with and altered TGF- $\beta$ -receptor roles in signal transduction and chemotactic migratory response in a ES-2 serous carcinoma-derived ovarian cancer cell model. **Results:** In line with the LogP and LogS values of the tested molecules, we found that TGF- $\beta$ -induced Smad-3 phosphorylation and cell migration were optimally inhibited, provided that the lateral aliphatic chain of the galloyl moiety reached 8 to 10 carbons. Functional inhibition of the TGF-  $\beta$ R1 kinase activity was evidenced through direct physical interaction with the galloyl moiety as assessed by surface plasmon resonance. *In silico* molecular docking analyses predicted a model where galloylated catechins may bind TGF- $\beta$ R1 within its ATP binding cleft in a site analogous to that of Galunisertib, a competitive inhibitor of TGF-  $\beta$ R1. **Conclusion :** Our data suggest that the galloyl moiety of the diet-derived catechins provides specificity and positioning of these molecules within the kinase domain of the TGF-  $\beta$ R1 in order to antagonize TGF- $\beta$ -mediated signaling required for ovarian cancer cell invasion and metastasis.

#### 4.4 Introduction

Ovarian cancer remains the gynecological malignancy with the highest mortality rate among women (1, 2). As such, much effort has not only been devoted to search for new therapeutic strategies but also towards diet-derived chemopreventive interventions (3, 4). As such, significant associations between green tea intake, decreased ovarian cancer occurrence and better prognosis have arisen from observational studies (5, 6). Complementary evidence from systematic reviews and meta-analysis observational epidemiologic studies further concluded that ovarian cancer risk decreased as the consumption levels of total, rather than isolated specific phytochemicals, non-herbal tea increased (7). More importantly, evidence further points out for concerted actions of a group of molecules such as polyphenols, likely in combination with other phytochemicals or micronutrients, which have been shown to efficiently target the multiple molecular processes involved in cancer development and progression (8).

Ovarian cancer aggressiveness is in addition likely due to the prevalence of metastatic high-grade serous carcinomas and the absence of early symptoms and early detection strategies (9). Metastasis, which combines complex molecular processes involving, in part, cancer cell migration away from the primary site of tumor (10), has been thought to be targeted by green tea components (8, 11), and the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process inferred in such a cell-biological program (12, 13). The need to further characterize the functional properties associated to a group of phytochemicals has since increased our understanding of the pleiotropic targeting of mechanisms underlying the epithelial ovarian cancer (EOC) growth-inhibitory effects of green tea-derived polyphenols (14). However, the relationship between the structure and biological actions of several green tea catechins against EMT remains to be addressed.

EMT can be induced by several growth factors including, among the most potent ones, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (12). Incidentally, the relative pharmacological effects of green tea-derived catechins in preventing TGF- $\beta$ -induced EMT was recently found to inhibit cell migration and the expression of EMT biomarkers in ES-2 cells derived from a serous carcinoma ovarian cancer (11, 15). More importantly, it was inferred that those catechins presenting a galloyl moiety, namely (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG), catechin gallate (CG), and gallocatechin gallate (GCG), were the most potent to inhibit TGF- $\beta$ -induced phosphorylation of Smad-3. This suggests that specificity of action may be dictated through a yet to be evaluated contribution of the galloyl moiety against the kinase activity of TGF- $\beta$  receptor 1 (TGF- $\beta$ R1) (11).

TGF- $\beta$ R1 is a member of the TGF- $\beta$  receptor subfamily and a Ser/Thr protein kinase. It forms a heteromeric complex with type II TGF- $\beta$  receptors when bound to TGF- $\beta$  to transduce the TGF- $\beta$  signal from the cell surface to the cytoplasm (16). Inhibition of TGF- $\beta$ -mediated signaling by diet-derived catechins, a group of flavonoids that have been proven consistently to have positive traits, has recently been shown in ovarian cancer cells (11), anaplastic thyroid carcinoma cells (17), and human lung carcinoma (18). Whereas computational molecular docking analysis (CMDA) of catechins helped explain their health benefits (19) and potential in drug design strategies (20), there is a lack of understanding in the mechanism behind the galloyl moiety in the anti-TGF- $\beta$ -mediated signaling that controls EMT and metastasis.

Cancer chemoprevention with green tea catechins has recently been inferred to target receptor tyrosine kinases (RTKs) (21). EGCG, in particular, has been shown to block the activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family of RTKs, the activation of insulin-like growth factor-1 receptor and of vascular endothelial



growth factor receptor-2 (22). Whereas some of the suppressive effects of EGCG on EGFR were shown in part to occur by altering membrane lipid organization and subsequent inhibition of dimerization processes, direct assessment of any biophysical interaction with kinase domains of the above-mentioned RTKs remains to be investigated. Here, we investigated the mechanism of action and biophysical interaction by which galloylated catechins are able to affect the TGF- $\beta$ R1 kinase activity.

#### 4.5 Materials and methods

**Materials.** Sodium dodecylsulfate (SDS) and Galunisertib (LY2157299) were from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ) and all catechins, galloylated compounds, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were purchased from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against Smad-3 and phosphorylated Smad-3 were obtained from Cell Signaling Technology Inc (Danvers, MA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

**Cell culture.** Human serous carcinoma-derived ES-2 ovarian cancer cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Cells were grown as a monolayer with McCoy's 5a Modified Medium for ES-2 cells (317-010-CL, Wisent, St-Bruno, QC) containing 10% fetal bovine serum (12483-020, Life Technologies, Carlsbad, CA), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (450-202-EL, Wisent, St-Bruno, QC). Cells were cultured at 37°C under a humidified 95%-5% (v/v) mixture of air and CO<sub>2</sub>.

**Immunoblotting procedures.** ES-2 ovarian cancer cells were lysed and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins (30 µg) were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were then blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST; Bioshop, TWN510-500). Membranes were further washed in TBST

and incubated with the appropriate primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich Canada, S2002), followed by a 1 h incubation with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG at 1/2,500 dilutions in TBST containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized by ECL.

***TGF- $\beta$ R1 kinase assay.*** The activity of the TGF- $\beta$ R1 kinase was assessed using the ADP-Glo™ Kinase Assay kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Briefly, this luminescent kinase assay is based on measures of the ADP formed from a kinase reaction. The ATP remaining after completion of the kinase reaction is depleted prior to an ADP to ATP conversion step and quantitation of the newly synthesized ATP converted into light by Ultra-Glo™ Luciferase. Linearity of the ADP-Glo Kinase Assay was performed by generating an ATP-to-ADP conversion curve prepared at 50  $\mu$ M ATP+ADP concentration range. We found that the reaction was linear up to 100 ng of enzyme used (Fig. 4.4A). Within the linear range, we decided to use 40 ng of the TGF- $\beta$ R1 kinase domain to test all of the catechins as well as our different galloylated molecules.

***Cell migration assay.*** Cell migration assays were carried out using the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument of the xCELLigence system (Roche Diagnostics). Adherent ES-2 ovarian cancer cells were trypsinized and seeded (20,000 cells/well) onto CIM-Plates 16 (Roche Diagnostics). These migration plates are similar to conventional Transwells (8  $\mu$ m pore size) but have gold electrode arrays on the bottom side of the membrane to provide real-time measurement of cell migration. Prior to cell seeding, the underside of the wells from the upper chamber were coated with 25  $\mu$ L of 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 h at 37°C. Cell migration was monitored for 8 h in the presence or absence of TGF- $\beta$  and the indicated galloylated molecules. The impedance values were measured by the RTCA DP Instrument

software and were expressed in arbitrary units as Normalized Cell Migration Index. Each experiment was performed three times in triplicate.

***Surface plasmon resonance (SPR) analysis.*** SPR analyses were performed using a Biacore T200 instrument (GE Healthcare). The running buffer was PBS supplemented with 0.05% Tween-20 and the temperature was set to 25°C. The recombinant kinase domain of TGF- $\beta$ R1 protein (TGF- $\beta$ R1-1495H Human, Creative BioMart, Shirley, NY) was immobilized on a carboxymethylated dextran CM7 sensor chip (GE Healthcare) following the amine coupling kit protocol (GE Healthcare). After surface activation, TGF- $\beta$ R1 protein (25  $\mu$ g/mL in 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.5) was injected at a flow rate of 10  $\mu$ L/min to reach a level of immobilization of 23,000 RU. The surface was then deactivated by the injection of an ethanolamine solution. The same procedure was used without TGF- $\beta$ R1 protein to create a reference channel. Steady-state bindings of catechins or galloylated molecules over the immobilized recombinant protein sensor chip were evaluated at increasing concentrations (5 nM to 5  $\mu$ M) at a flow rate of 30  $\mu$ L/min. The sensor chip was regenerated after each cycle by injecting a 10 mM glycine solution, pH 3.0, for 30 seconds. Binding sensorgrams were obtained by subtraction of the reference flow cell (without protein). Data analysis was performed using the BIAevaluation software package (GE Healthcare) and fitted to a one-site Langmuir binding model.

***Computational molecular docking analysis.*** Molecular docking analysis of catechins and galloylated molecules to the TGF- $\beta$ R1 kinase domain (PDB ID: 5e8s) was performed using AutoDock Vina software (Scripps Research Institute, USA) (23) and the following compounds : Catechin (C, ChEMBL206452), Catechin gallate (CG, ChEMBL483083), Gallocatechin (GC, ChEMBL125743), Gallocatechin gallate (GCG, ChEMBL264938), Epicatechin (EC, ChEMBL583912), Epicatechin gallate (ECG, ChEMBL36327), Epigallocatechin (EGC, ChEMBL47386), Epigallocatechin

gallate (EGCG, CHEMBL297453), Ethyl gallate (CHEMBL453196), Propyl gallate (CHEMBL7983), Butyl gallate (CHEMBL494005), Dodecyl gallate (CHEMBL16121) and Galunisertib (CHEMBL 2364611). Prior to molecular docking simulations, the structure of TGF- $\beta$ R1 was prepared by removing water molecules, bound ligands and by adding hydrogen atoms. Visualisation and overlays were performed in PyMOL (24). Molecular interactions between the catalytic domain of TGF- $\beta$ R1 and docked ligands were analyzed using PyMOL and Discovery Studio Visualizer (25).

***Statistical data analysis.*** Unless otherwise stated, data and error bars were expressed as means  $\pm$  SEM of three or more independent experiments. Statistical analysis of data was performed by one-way ANOVA with Tukey's post-test to establish differences among groups. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures. Sigmastat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA) was used for all analyses.

## 4.6 Results

***The galloyl moiety of green tea-derived catechins alter TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation.*** The initial requirement of the galloyl moiety was first assessed by comparing the effects of epigallocatechin (EGC) or epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the TGF- $\beta$ -mediated phosphorylation of Smad-3 in ES-2 ovarian cancer cells. Protein lysates were obtained from cells which were pretreated with vehicle (0,1% BSA aqueous solution), EGC, or EGCG for 18 h, then stimulated with TGF- $\beta$  for up to 2 h, and separated using SDS-PAGE. The extent of Smad-3 phosphorylation was assessed by immunoblotting (Fig. 4.1A), and found to peak at 30 minutes (Fig. 4.1B). Whereas EGC had no effect on TGF- $\beta$ -induced Smad-3 phosphorylation, EGCG was found to virtually inhibit completely such signalling (Fig. 4.1B). The galloyl requirement for Smad-3 pathway inhibition was further investigated with other members from the catechin family, and we found that catechin (C), gallocatechin (GC), and epicatechin (EC) did not inhibit Smad-3 phosphorylation while catechin gallate (CG), gallocatechine-gallate (GCG), and epicatechin-gallate (ECG) did (Fig. 4.1C). This suggests that the galloyl moiety plays a critical role in the inhibition of TGF- $\beta$  receptor (TGF- $\beta$ R) kinase activity.

***The galloyl moiety contributes to the inhibition of the Smad-3 phosphorylation pathway.*** Given that the galloyl moiety appeared to potentiate the action of several of the catechins tested, we assessed the sole impact of six different galloylated molecules including Sodium (Na) gallate, Ethyl gallate, Propyl gallate, Butyl gallate, Octyl gallate, and Dodecyl gallate (Fig. 4.2A). When ES-2 cells were pretreated with the indicated galloylated molecules, a pharmacological inhibition of TGF- $\beta$ -induced Smad-3 phosphorylation was observed for all gallates (Fig. 4.2B), with both Octyl gallate and Dodecyl gallate being able to strongly inhibit Smad-3 phosphorylation (Fig. 4.2C). Interestingly, the inhibition observed with gallate

derivatives mimicked that of Galunisertib (LY2157299) (Fig. 4.2C), an orally available small molecule antagonist of TGF- $\beta$ R1, currently in clinical trials against glioma, ovarian, uterine, breast and pancreatic cancers (26, 27). This suggests that the galloyl moiety alters the overall kinase activity possibly by competing for the TGF- $\beta$ R1 ATP binding site.

***The galloyl moiety antagonizes TGF- $\beta$ -induced cell migration.*** Given the above-altered Smad-3 phosphorylation upon galloylated molecules treatment, the ES-2 ovarian cancer cell chemotactic response to TGF- $\beta$  was next assessed. TGF- $\beta$  was found to trigger ES-2 cell migration (Fig. 4.3A, control), whereas the extent of such chemotactic response diminished progressively with the length of the aliphatic chain of the galloyl moieties tested. The efficient chemotactic decrease in response to TGF- $\beta$  was observed in cells treated with Butyl-, Octyl-, and Dodecyl-gallate, and found to be as effectively decreased as in cells treated with Galunisertib (Fig. 4.3B).

***The galloyl moiety likely competes with the ATP binding site of the TGF- $\beta$ R1 kinase domain.*** We next assessed the capacity of the galloylated molecules to modulate the phosphorylation activity of the purified kinase domain of TGF- $\beta$ R1 using an ADP detection assay. Interestingly, all of the molecules tested through this acellular assay were found to alter, to some extent, the *in vitro* TGF- $\beta$ R1 kinase activity possibly due to the lack of any hindrance effect that would be found with a cellular assay. In coherence with the above cellular assays performed, we still confirmed that CG, GCG, and EGCG were significantly more potent than their respective C, GC, and EGC ungalloylated counterparts to inhibit the TGF- $\beta$ R1 kinase activity (Fig. 4.4B). No significant difference could be observed between ECG and EC, although ECG tended to exhibit a slightly higher inhibition than EC. When the sole galloylated molecules were tested (Fig. 4.4C), Ethyl gallate and Propyl gallate were found ineffective in inhibiting TGF- $\beta$ R1 kinase activity, whereas all the others displayed robust inhibition

with Dodecyl gallate being the most potent one (Fig. 4.4B). The fact that Ethyl gallate and Propyl gallate were unable to alter kinase activity, but still able to inhibit TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation, raises the possibility that these two molecules may inhibit TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation through an independent mechanism.

***Galloylated catechins directly interact with TGF- $\beta$ R1.*** We next assessed the potential biophysical interaction capacity of the recombinant TGF- $\beta$ R1 kinase domain with either the galloylated catechins, the ungalloylated catechins, or the galloylated molecules through SPR biosensor technology. CG, ECG, GCG, and EGCG were found to strongly interact with the TGF- $\beta$ R1 kinase domain whereas ungalloylated catechins demonstrated significant lower interaction. Indeed, whereas dissociation constants (KD) were 2-3  $\mu$ M for ungalloylated catechins, they were  $\sim$ 3-times lower for galloylated catechins with dissociation constants of 0.7-0.9  $\mu$ M (Fig. 4.5A). Galloylated molecules were found to have the highest affinity for the TGF- $\beta$ R1 kinase domain. Particularly, Octyl gallate and Dodecyl gallate interacted with TGF- $\beta$ R1 kinase domain with dissociation constants of 0.26 and 0.02  $\mu$ M, respectively. Interestingly, the dissociation constants measured for galloylated molecules were similar to that of Galunisertib (0.7  $\mu$ M) (Fig. 4.5A). An important distinction must be made here between the cellular and acellular inhibitory activities of the tested compounds assayed in order to account for their capacity to access the TGF- $\beta$ R1 kinase domain. As limitations in permeability and, ultimately, bioavailability, of a given catechin can substantially alter its capacity to target membrane bound proteins or intracellular transducing events, we computed the LogP and LogS values (28) to help address their respective partitioning within the plasma membrane bilayer which may result in a differential cellular uptake (29). Catechin gallate derivatives appeared to exhibit potential higher capacity to cross the plasma membrane than their ungalloylated parent compound (Fig. 4.5B) as was previously suggested (30). This is in agreement



with the galloylated compounds tested, as cellular uptake may likewise be low for poorly hydrophobic compounds with low LogP and high LogS features (Fig. 4.5C).

***Computational molecular docking analyses illustrate how the galloyl moiety could inhibit kinase activity by competing with ATP for the binding of TGF- $\beta$ R1.*** *In vitro* experimentations performed thus far suggest that the galloyl moiety hinders TGF- $\beta$ R1 kinase activity, possibly by interfering with ATP binding and hydrolysis. To determine whether galloylated compounds could effectively localize at the ATP binding site and compete with ATP, we performed *in silico* CMDA on the TGF- $\beta$ R1 kinase domain. To validate our docking protocol, we started by docking Galunisertib to the kinase domain of TGF- $\beta$ R1. Consistent with previous docking results (31) and the co-crystal structure (32), Galunisertib effectively localized to the ATP binding cleft of TGF- $\beta$ R1. We then used the same protocol to dock ungalloylated and galloylated catechins to the kinase domain of TGF- $\beta$ R1. Superimposition of the docked ligands revealed similar receptor binding modes with catechins localizing to the ATP binding site of TGF- $\beta$ R1 within the same general vicinity as Galunisertib (Fig. 4.6A). For galloylated catechins, the galloyl moiety was bound in a relatively similar manner, although subtle repositioning, by less than 1 Å, was noticed for EGCG and ECG (Fig. 4.6B). Interestingly, although every docking resulted in the positioning of catechins in the ATP binding cleft of TGF- $\beta$ R1, galloylated catechins displayed stronger binding affinity towards the TGF- $\beta$ R1 kinase domain than their ungalloylated counterparts (Fig. 4.6C). Within the catalytic domain, specific interactions with Lys-213, Gly-214 and Lys-331 were predicted for CG, GCG, ECG and EGCG (Fig. 4.6D). Galloyl moieties further appear to involve interactions with Ser-280, a residue that has been associated with the specificity of inhibitors toward TGF- $\beta$ R (32, 33). Overall, these results suggest that the ability of the galloylated compounds to inhibit TGF- $\beta$ -mediated signaling could be achieved by binding the ATP-binding pocket and by acting as an ATP competitive

inhibitor, thereby preventing intracellular phosphorylation of Smad2/3 and downstream signalling cascade in a manner similar to that of Galunisertib (33).

## 4.7 Discussion

EMT is a latent developmental process that is re-activated during cancer progression and, as such, plays a crucial role in the aggressiveness of EOC through increased invasion ability and resistance to therapy (34). Not surprisingly, strong evidence links chemoresistance to EMT, and discovery of novel therapeutic modalities that target EMT in EOC should improve the clinical outcome of patients suffering from such lethal gynecologic malignancies (35). In a previous study, we analyzed the structure-to-chemopreventive function relationship of eight catechins against TGF- $\beta$ -mediated EMT in ES-2 ovarian cancer cells, demonstrating inhibitory effects mainly for the catechins carrying a galloyl moiety (11). Here, we expanded on these observations by showing the importance of the galloyl moiety of green tea-derived catechins for the biophysical interaction with TGF- $\beta$ R1 kinase, as well as for inhibition of TGF- $\beta$ -mediated signaling and cell migration.

Our study suggests that the chemopreventive activities of galloylated catechins and gallate molecules may be accomplished through direct interaction with the TGF- $\beta$ R1 kinase domain. This interaction would further prevent phosphorylation of TGF- $\beta$ -induced Smad-3 and cell migration, likely by competing with the ATP binding site, similar to the TGF- $\beta$ R1 inhibitor Galunisertib. Although we have focused our attention on the signaling pathway transduced by TGF- $\beta$ R1, it is important to note that other routes may also result in the inhibition of TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation and cell migration. This is in accordance with our observation that Ethyl gallate and Propyl gallate were unable to alter kinase activity yet were still able to inhibit TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation.

Emphasis was also put on characterizing and clarifying the relevance of the galloyl moiety. We hereby demonstrated that gallate derivatives are sufficient to trigger

TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation as well as TGF- $\beta$ -induced cell migration, provided that their esterified aliphatic chains are of sufficient length. Results from direct biophysical interactions, as assessed using SPR, indeed revealed that gallate derivatives bind the TGF- $\beta$ R1 kinase domain with high affinity and in a chain length dependent manner. Indeed, while dissociation constants of Sodium gallate to Butyl gallate for TGF- $\beta$ R1 were in the 1-2  $\mu$ M range, those for Octyl gallate and Dodecyl gallate were 10 to 100-times lower respectively (Fig. 4.5A). Consistent with these biochemical data, CMDA indicated that the galloylated moiety is sufficient to promote the localization of the molecules to the ATP binding site of the TGF- $\beta$ R1 kinase domain (Fig. 4.6B). For its part, the dependence of affinity on chain length could be explained by the fact the aliphatic carbon chains esterified to the galloyl moiety are unlikely to provide specific interactions yet they can increase the overall binding affinity by interacting with greasy surfaces on TGF- $\beta$ R1. In that sense, these aliphatic chains can act as a proxy for catechins and other chemical groups that are found in association with galloyl groups in green tea.

Other groups have reported the binding of gallated catechins to a number of protein targets including protein kinases (36). Our own biophysical and CMDA analyses are in general agreement with CMDA of EGCG to ribosomal S6 kinase (RSK2), another Ser/Thr kinase, where EGCG prevents ATP recognition by binding the kinase between the N- and C-lobes (37, 38). Multiple co-crystal structures as well as CMDA have demonstrated how kinases can accommodate a structurally diverse set of molecules. In the case of TGF- $\beta$ R1, CMDA showed that the site that we identified for gallate binding can also bind Luteolin, a structure-related flavonoid, through the formation of hydrogen bonds with Glu-245, Lys-232, Asp-351, Ser-280, Ser-287, and Ala-230 of TGF- $\beta$ R1 (39).

Overall our observations strengthen mounting evidence that the galloyl moiety plays a critical role in a crucial signaling pathway regulating EMT, and that targeting kinase activity was of particular importance. Our study further reinforces other recent structure-function studies where a role for the galloyl moiety in both direct and indirect interactions of green tea catechins was demonstrated with fatty acid synthase (40), or with MT1-MMP interactor-mediated oncogenic processes (41). Inhibition of MMP-9 and RNA binding protein : Hu protein R (HuR) expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells was also shown to require the presence of the galloyl moiety (42). In conclusion, the gallate moiety would thus be a good candidate to include in the future design of pharmacological molecules targeting metastatic molecular processes.

## 4.8 Declarations

### **Disclosure statement**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This study was funded by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA.

### **Acknowledgments**

BA holds an Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment. We thank Alain Zgheib (cell migration) and Guillaume Charron (surface plasmon resonance) for helpful technical assistance.

#### 4.9 References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7–30.
2. Canadian Cancer Society. 2019. Survival statistics for ovarian cancer. Retrieved from: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/ovarian/prognosis-and-survival/survival-statistics/?region=on>
3. Moody R, Wilson K, Jaworowski A, Plebanski M. Natural Compounds with Potential to Modulate Cancer Therapies and Self-Reactive Immune Cells. *Cancers (Basel).* 2020;12(3):E673. 2020 (in press)
4. Lee AH, Fraser ML, Binns CW. Possible role for green tea in ovarian cancer prevention. *Future Oncol.* 2005;1(6):771-777.
5. Johnson R, Bryant S, Huntley AL. Green tea and green tea catechin extracts: an overview of the clinical evidence. *Maturitas.* 2012;73(4):280–287.
6. Trudel D, Labbé DP, Bairati I, Fradet V, Bazinet L, Têtu B. Green tea for ovarian cancer prevention and treatment: a systematic review of the in vitro, in vivo and epidemiological studies. *Gynecol Oncol.* 2012;126(3):491–498.
7. Zhang D, Kaushiva A, Xi Y, Wang T, Li N. Non-herbal tea consumption and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of observational epidemiologic studies with indirect comparison and dose-response analysis. *Carcinogenesis.* 2018;39(6):808–818.

8. Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients*. 2016;8(9):552.
9. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, et al: Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, 284-296, 2018.
10. Karlsson MC, Gonzalez SF, Welin J, and Fuxe J. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Molecular oncology*, 11(7), 781-791, 2017.
11. Sicard AA, Dao T, Suarez NG, Annabi B. Diet-Derived Gallated Catechins Prevent TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition, Cell Migration and Vasculogenic Mimicry in Chemosensitive ES-2 Ovarian Cancer Cells (2020) *Nutr Cancer*. (in press)
12. Tsuji T, Ibaragi S, and Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Research*, 69(18), 7135-7139, 2009.
13. Valastyan S, and Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292, 2011.
14. Braicu C, Ladomery MR, Chedea VS, Irimie A, Berindan-Neagoe I. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chem*. 2013;141(3):3282–3289.
15. Kwok AL, Wong OG, Wong ES, Tsun OK, Chan KK, Cheung AN. Caution over use of ES2 as a model of ovarian clear cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2014;67(10):921–922.



16. Larsson, J. et.al: Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor deficient mice. *EMBO J.* 20: 1663-1673, 2001.
17. Li T, Zhao N, Lu J, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses epithelial-Mesenchymal transition (EMT) and invasion in anaplastic thyroid carcinoma cells through blocking of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathways. *Bioengineered.* 2019;10(1):282–291.
18. Huang SF, Horng CT, Hsieh YS, Hsieh YH, Chu SC, Chen PN. Epicatechin-3-gallate reverses TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits cell invasion and protease activities in human lung cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2016;94:1–10.
19. Saeki K, Hayakawa S, Nakano S, et al. In Vitro and In Silico Studies of the Molecular Interactions of Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) with Proteins That Explain the Health Benefits of Green Tea. *Molecules.* 2018;23(6):1295.
20. Nakano S, Megro SI, Hase T, et al. Computational Molecular Docking and X-ray Crystallographic Studies of Catechins in New Drug Design Strategies. *Molecules.* 2018;23(8):2020.
21. Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(12):2821–2831.
22. Shimizu M, Adachi S, Masuda M, Kozawa O, Moriwaki H. Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(6):832–843.

23. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455–461.
24. Martinez X, Krone M, Alharbi N, et al. Molecular Graphics: Bridging Structural Biologists and Computer Scientists. *Structure.* 2019;27(11):1617–1623.
25. Biovia, Discovery Studio Visualizer, Version 19.1.0.18287 Software; 2019. Available from: <http://www.3dsbiovia.com/>
26. Wick A, Desjardins A, Suarez C, et al. Phase 1b/2a study of galunisertib, a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta receptor I, in combination with standard temozolomide-based radiochemotherapy in patients with newly diagnosed malignant glioma. *Invest New Drugs.* 2020 (in press).
27. Clinical Trials Using Galunisertib. NIH – National Cancer Institutes. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/intervention/galunisertib> (searched on March 27th, 2020)
28. Bennion BJ, Be NA, McNerney MW, et al. Predicting a Drug's Membrane Permeability: A Computational Model Validated With in Vitro Permeability Assay Data. *J Phys Chem B.* 2017;121(20):5228–5237.
29. Jungil Hong, Hong Lu, Xiaofeng Meng, Jae-Ha Ryu, Yukihiko Hara and Chung S. Yang. Stability, Cellular Uptake, Biotransformation, and Efflux of Tea Polyphenol (–) Epigallocatechin-3-Gallate in HT-29 Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res* December 15 2002 (62) (24) 7241-7246;

30. Cheng MC, Lu YC, Wu J, Ma YH. Gallate-induced nanoparticle uptake by tumor cells: Structure-activity relationships. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;179:28–36.
31. Kumar R, Saran S. Structure, molecular dynamics simulation, and docking studies of Dictyostelium discoideum and human STRAPs. *J Cell Biochem*. 2018;119(9):7177–7191.
32. Yingling JM, McMillen WT, Yan L, et al. Preclinical assessment of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a first-in-class transforming growth factor- $\beta$  receptor type I inhibitor. *Oncotarget*. 2017;9(6):6659–6677.
33. Ogunjimi AA, Zeqiraj E, Ceccarelli DF, Sicheri F, Wrana JL, David L. Structural basis for specificity of TGF $\beta$  family receptor small molecule inhibitors. *Cell Signal*. 2012; 24: 476-483.
34. van Staalduinen J, Baker D, Ten Dijke P, and van Dam H. Epithelial-mesenchymal-transition-inducing transcription factors: new targets for tackling chemoresistance in cancer? *Oncogene*, 2018. (in press)
35. Huang RY, Chung VY, and Thierry JP. Targeting pathways contributing to epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial ovarian cancer. *Curr Drug Targets*, 13(13), 1649-1653, 2012.
36. Larsen CA, Dashwood RH, Bisson WH. Tea catechins as inhibitors of receptor tyrosine kinases: mechanistic insights and human relevance. *Pharmacol Res*. 2010;62(6):457–464.

37. Chen H., Yao K., Chang X., Shim J.H., Kim H.G., Malakhova M., Kim D.J., Bode A.M., Dong Z. Computational and Biochemical Discovery of RSK2 as a Novel Target for Epigallocatechin Gallate (EGCG) PLoS ONE. 2015;10:e0130049.
38. Abdulrahman N., Jaballah M., Poomakkoth N., Riaz S., Abdelaziz S., Issa A., Mraiche F. Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase attenuates cell migration and proliferation of the human lung adenocarcinoma through phospho-GSK-3beta and osteopontin. Mol. Cell. Biochem. 2016;418:21–29.
39. Wu, Y. T., Chen, L., Tan, Z. B., Fan, H. J., Xie, L. P., Zhang, W. T., Chen, H. M., Li, J., Liu, B., & Zhou, Y. C. (2018). Luteolin Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Inhibiting TGFBR1 Signaling. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1059.
40. Wang X, Song KS, Guo QX, Tian WX. The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(10):2039–2047.
41. Djerir D, Iddir M, Bourgault S, Lamy S, Annabi B. Biophysical evidence for differential gallated green tea catechins binding to membrane type-1 matrix metalloproteinase and its interactors. *Biophys Chem.* 2018;234:34–41.
42. Annabi B, Currie JC, Moghrabi A, Béliveau R. Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg. *Leuk Res.* 2007;31(9):1277–1284.

## 4.10 Figures

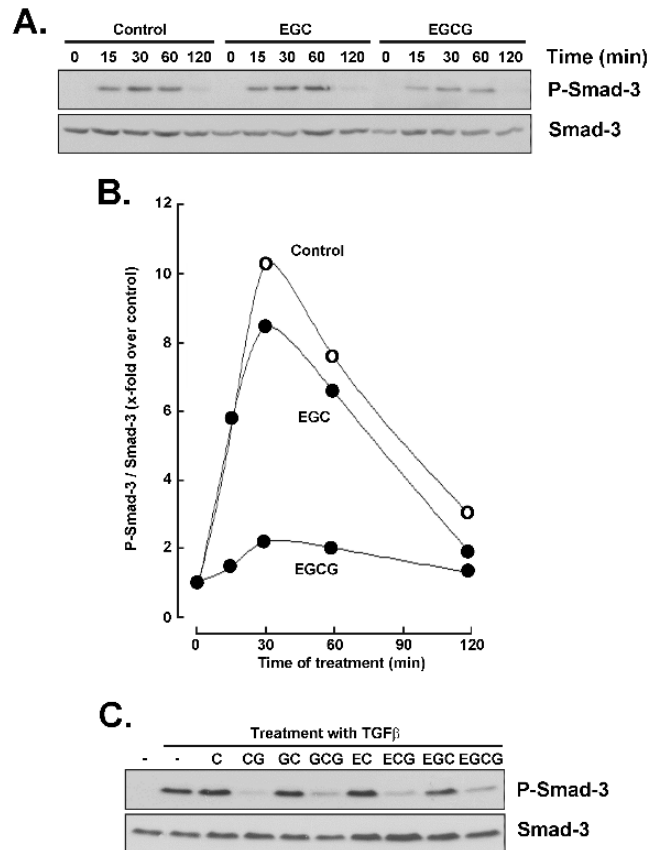


Figure 4.1 Green tea-derived galloylated catechin EGCG alters TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation. A) Serum-starved ES-2 ovarian cancer cells were treated for 18 h with either vehicle, 30  $\mu$ M EGC, or 30  $\mu$ M EGCG. TGF- $\beta$  (100 ng/ml) treatment was then performed for the indicated time and cell lysates collected for immunoblotting. B) Densitometric quantification of the extent of Smad-3 phosphorylation on total Smad-3 from a representative experiment. C) Serum-starved ES-2 cells were treated with the indicated catechins and immunodetection performed as in A).

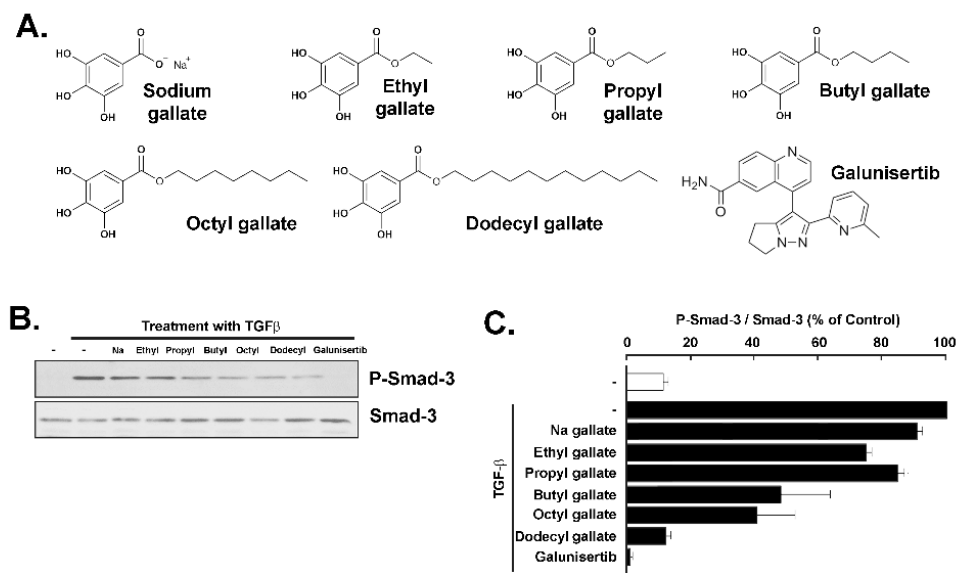


Figure 4.2 Galloylated molecules alter TGF- $\beta$ -mediated Smad-3 phosphorylation. A) Molecular structures of 6 galloylated molecules and of Galunisertib. B) Smad-3 and phosphor-Smad-3 immunoblotting of serum-starved ES-2 ovarian cancer cells that were pretreated for 18 h with either vehicle or 10  $\mu$ M of the indicated galloylated molecules or Galunisertib, and then with TGF- $\beta$  (100 ng/ml) for 30 min. C) Densitometric quantification of the extent of Smad-3 phosphorylation on total Smad-3 from 3 independent experiments.

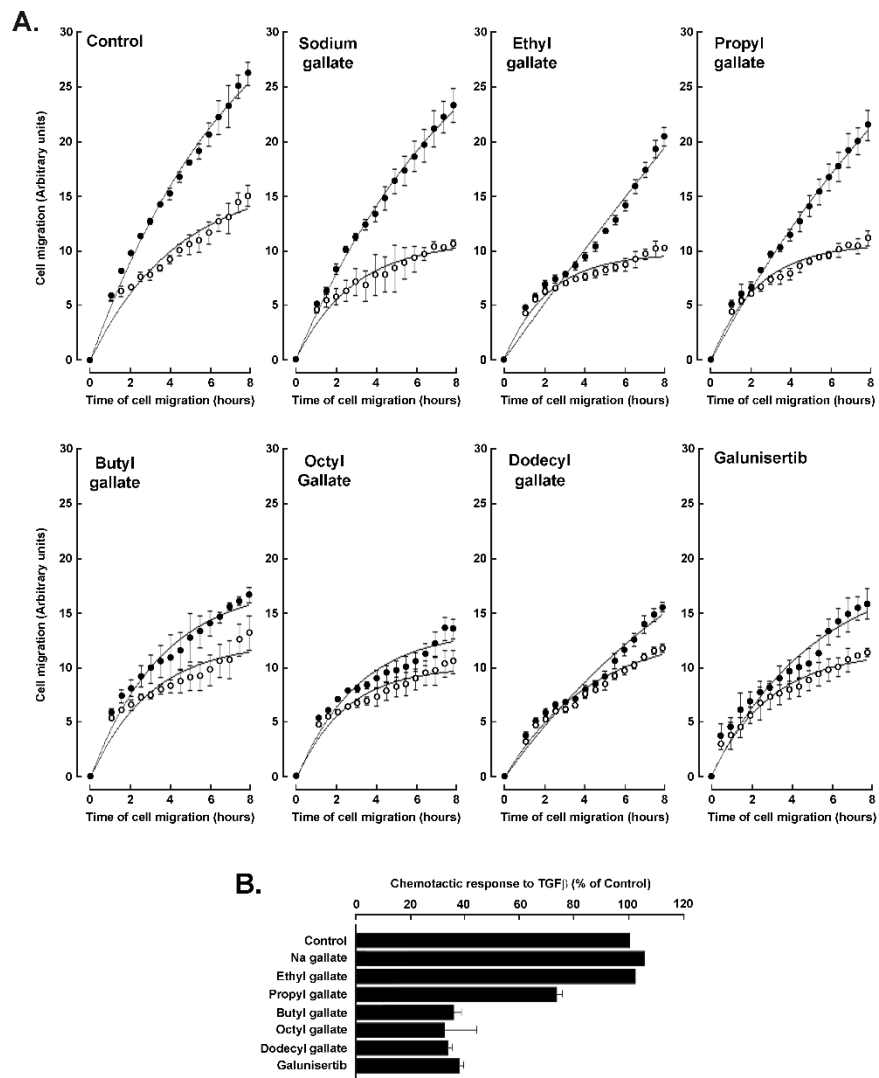


Figure 4.3 Galloylated molecules alter TGF- $\beta$ -induced cell migration. A) Serum-starved cells were treated with 10  $\mu$ M of the indicated galloylated molecules for 18 h. Then, real-time ES-2 ovarian cancer cell migration was performed in the presence (closed circles) or absence (open circles) of 100 ng/ml TGF- $\beta$  for up to 8 h. B) Relative chemotactic responses to TGF- $\beta$  are represented for each of the conditions tested.

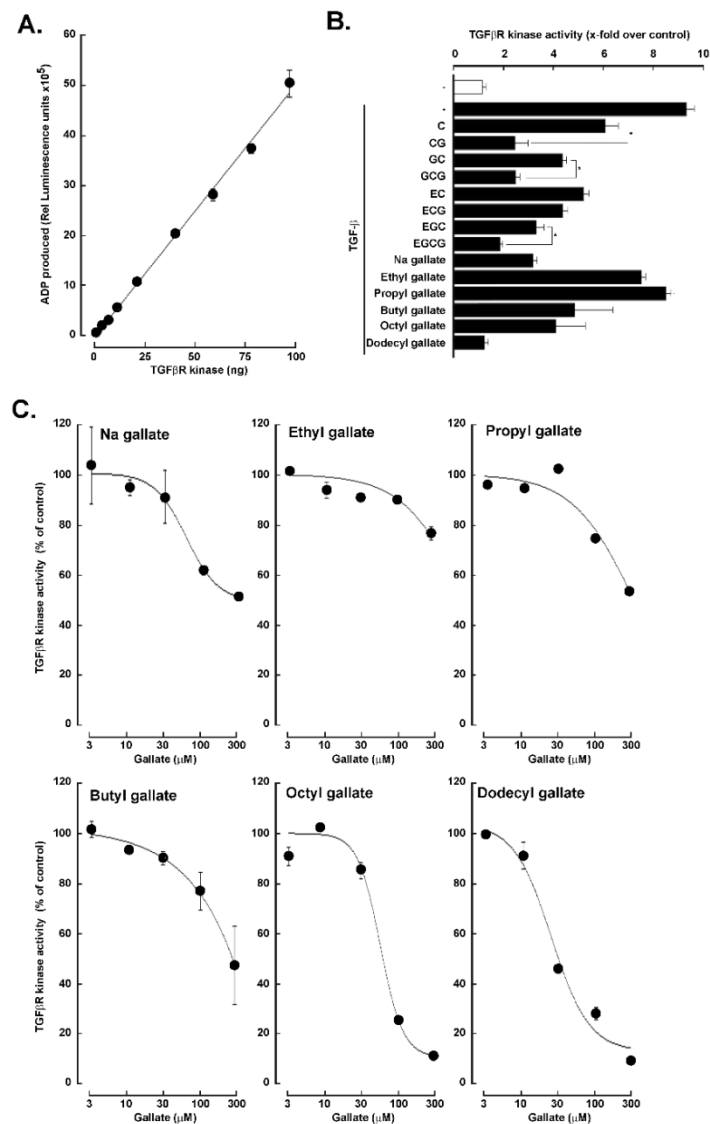


Figure 4.4 The galloyl moiety is sufficient to bind TGF- $\beta$ 1R and inhibit its kinase activity. A) ADP production measurement by a purified kinase domain of the TGF- $\beta$ 1R kinase domain incubated with a phosphate donor substrate. Signal linearity of the phosphorylation reaction, as catalyzed by increasing concentrations of the TGF- $\beta$ 1R kinase domain. B) Kinase activity of 50 ng of the TGF- $\beta$ 1R kinase domain tested in the presence or not of the catechins (30  $\mu$ M), as well as of the different galloylated molecules (10  $\mu$ M). C) IC<sub>50</sub> values extracted from dose-response curves for all galloylated molecules tested.



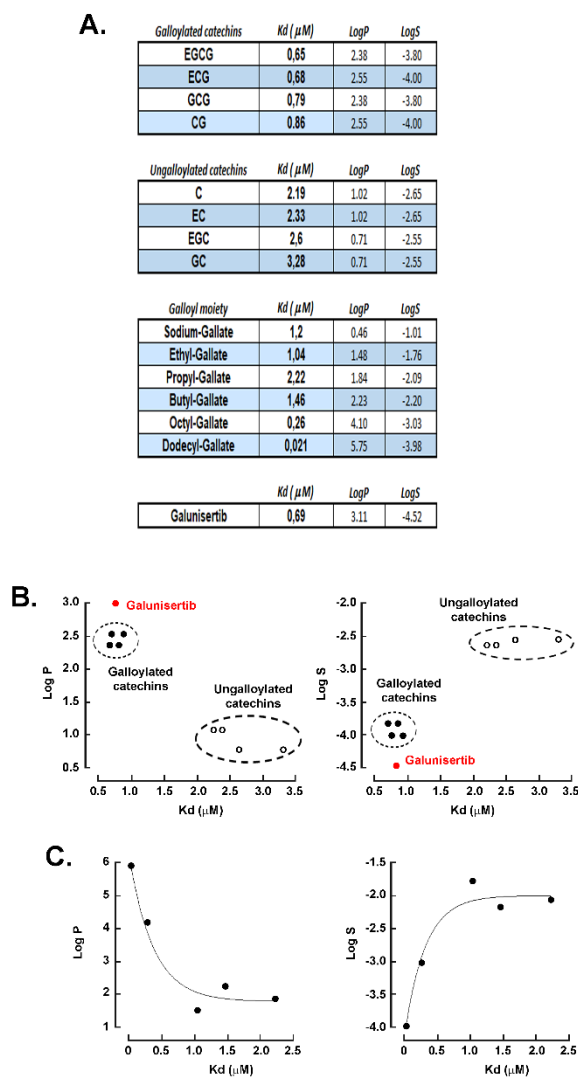


Figure 4.5 Dissociation constants for the binding of ungalloylated catechins, galloylated catechins, and galloyl molecules to the TGF- $\beta$ R1 kinase domain. The kinase domain of TGF- $\beta$ R1 was immobilized on CM5 sensor chips and increasing amounts (0-100  $\mu\text{M}$ ) of different catechins and galloyl molecules were assayed for interaction by SPR. A) Dissociation constants derived from representative sensograms (not shown), and plotted against LogP and LogS for the B) galloylated and ungalloylated catechins, or C) galloyl moieties.

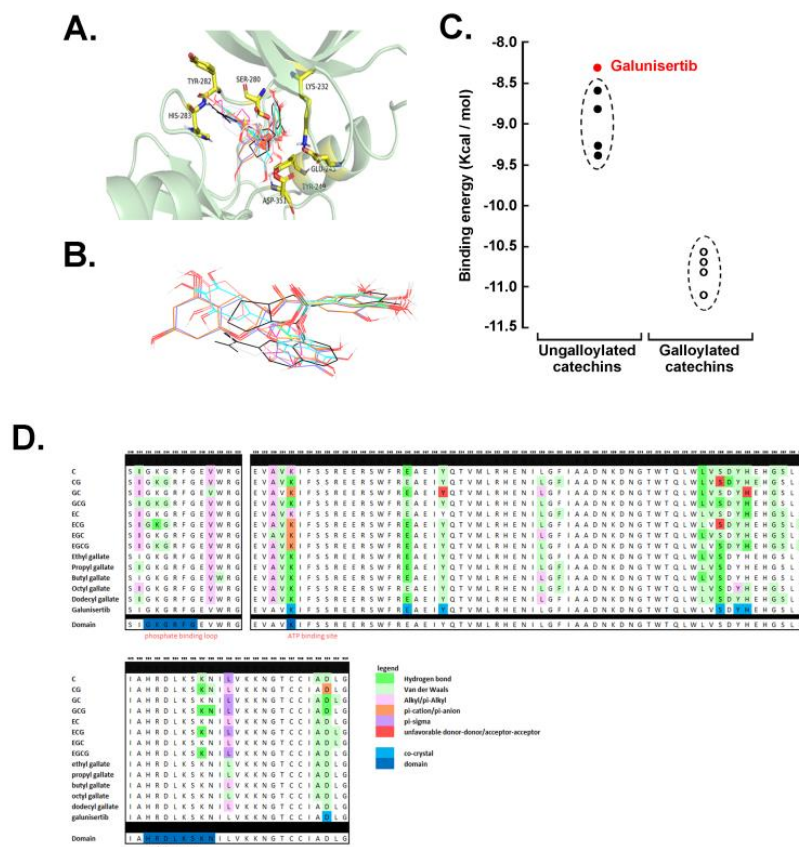


Figure 4.6 Computational molecular docking analysis reveals how catechins and galloylated compounds bind the TGF- $\beta$ R1 kinase domain. A) Overlays of the docked ligands within the TGF- $\beta$ R1 kinase domain, also matching the binding site of inhibitor Galunisertib, with labelled residues corresponding to those interacting with Galunisertib X-ray co-crystallization. Visualization was performed on PyMOL. B) Conformational overlays of the positioning of galloylated moieties within the TGF- $\beta$ R1 kinase domain corresponding to ligands ECG (green), EGCG (blue), and Galunisertib (black). Other colors correspond to CG, GCG, Ethyl gallate, Propyl gallate, Butyl gallate, Octyl gallate, Dodecyl gallate. Visualization was performed on PyMOL. C) Binding affinity scored for each tested molecule using AutoDock Vina. D) Primary amino acid sequence alignment of TGF- $\beta$ R1 catalytic domain residues predicted to interact with docked ligands and compared with those obtained from Galunisertib co-crystallization. Calculations were performed with Discovery Studio Visualizer.

## CHAPITRE 5

### DISCUSSION

Le cancer de l’ovaire est la malignité gynécologique la plus mortelle, soit la 5<sup>e</sup> cause de décès chez les femmes dans le monde, avec des chances de survie de plus de 5 ans de seulement 47.7% (Bray *et al.*, 2018). Le pronostic sombre de cette maladie est dû à la prévalence des stades avancés, avec une forte dissémination de la tumeur dans la cavité péritonéale (Bast *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2018). Plusieurs facteurs entravent les chances de survie au cancer de l’ovaire, principalement l’absence de symptômes aux premiers stades de développement, l’absence de stratégies de détections précoces, le tout allié à une majorité de sous-types agressifs HGSOc se développant *de novo* et étant très invasifs (American Cancer Society, 2018; Bowtell *et al.*, 2015; Koshiyama *et al.*, 2017). Malgré l’efficacité des traitements et les nouvelles cibles thérapeutiques, le cancer de l’ovaire tend aussi à resurgir en adoptant un phénotype de résistance à la thérapie. Les études actuelles tendent à suggérer que l’ITH élevée serait la cause principale d’acquisition de chimiorésistance et d’échec des thérapies (Kim *et al.*, 2018). Dans cette optique, l’invasion et la métastase seraient une cible thérapeutique à préconiser pour le traitement du cancer de l’ovaire. Empêcher l’invasion n’affecte pas directement la survie cellulaire et, ainsi, n’impose une pression sélective vers de nouvelles lignées résistantes (Meirson *et al.*, 2020). Il a été démontré que l’EMT des cellules cancéreuses était aussi fondamentale pour l’acquisition d’un phénotype métastatique (Lim et Thiery, 2012). La surexpression de TGF- $\beta$  et la dérégulation de la voie de signalisation semblent majoritairement être l’origine du phénotype mésenchymateux (Roane *et al.*, 2019). La compréhension de ces altérations signalétiques, impliquées dans la progression cancéreuse, permet la venue de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles (Cortez *et al.*, 2018).

Au-delà des interventions médicales, la chimioprévention par la diète offre une façon alternative de lutter contre le cancer. En effet, le lien entre la diminution de l'incidence de certains cancers et l'alimentation a été maintes fois rapporté. Plusieurs composés phytochimiques retrouvés dans les produits végétaux seraient à l'origine de cet effet chimioprotecteur, incluant les catéchines telles l'EGCG, capable en outre d'activité anti-invasive. Dans ce mémoire, nous évaluons le caractère anti-invasif des polyphénols dérivés du thé vert, les catéchines, plus spécifiquement sur le cancer ovarien. Ces travaux ont été effectués en deux volets, sous la forme de deux publications scientifiques distinctes. Dans le premier volet, nous avons comparé le potentiel relatif des catéchines à antagoniser les voies de signalisation régulant l'EMT, ainsi que les processus cellulaires impliqués dans l'invasion des cellules ES-2. Nous avons mis de l'avant que le potentiel anti-invasif des catéchines était exclusif aux catéchines portant la fonction galloyle. Dans le deuxième volet, nous avons cherché plus en détail par quel mécanisme ces catéchines entravent la voie du TGF- $\beta$  et quel rôle y joue la fonction galloyle avec les gallates, des antioxydants dérivées des catéchines dont la structure est composée exclusivement d'une fonction galloyle estérifiée à une chaîne aliphatique. Certaines de ces molécules font partie des métabolites des plantes et peuvent donc également être ingérées dans le régime alimentaire : Ethyl gallate (fruit), Propyl gallate (maïs) et Octyl Gallate. Les composés Propyl gallate, Butyl gallate, Octyl gallate et Dodecyl gallate sont alternativement utilisés comme additif alimentaire. Quant à Sodium gallate, c'est un sous-produit généré lors du métabolisme des médicaments (Chemical Entities of Biological Interest, 2020a, 2020b, 2020c; National Center for Biotechnology Information. PubChem Database, 2020a, 2020b, 2020c). En somme, en testant ces produits, nous avons démontré par une approche alternative que l'inhibition du programme de l'EMT et de la migration cellulaire, via Smad3, par des molécules galloylées était possible. Par conséquent, l'activité biologique accrue était possiblement attribuable à cette fonction.

*Les catéchines à la fonction galloyle préviennent l'EMT, la migration cellulaire et le VM dans des cellules de cancer ovarien ES-2*

Dans notre premier article de recherche, nous avons confirmé que l'activation du programme de l'EMT avait lieu par l'entremise de la phosphorylation de Smad3, suite au traitement au TGF- $\beta$ , dans la lignée ES-2, accompagné par une surexpression des facteurs de transcriptions associés à l'EMT. La réponse moins marquée au TGF- $\beta$  chez les cellules SKOV3 suggère que la voie de signalisation de la lignée chimiorésistante est probablement inopérante. Les dérégulations de la voie du TGF- $\beta$  ont effectivement été associées avec la carcinogenèse ovarienne (Roane *et al.*, 2019). Dans les tissus ovariens normaux, TGF- $\beta$  agit en supprimant la croissance cellulaire et en promouvant la différenciation : c'est plutôt la perte de fonction de la voie canonique ou bien son hyperactivation qui mène aux phénotypes de l'EMT et à l'invasion (Marth *et al.*, 1990; Roane *et al.*, 2019; Zhou et Leung, 1992). Ce changement de fonction de TGF- $\beta$  semble être relié, entre autre, à une altération de gènes régulateurs, codant pour des partenaires transcriptionnels de smad2/3. Ces altérations suppriment l'expression de gènes antiprolifératifs au profit de gènes de l'EMT et de la cancérogenèse, par exemple, les gènes régulateurs DACH1 and EV11 qui sont souvent surexprimés dans le cancer ovarien (Izutsu *et al.*, 2001; Kurokawa *et al.*, 2000; Roane *et al.*, 2019). Une résistance de la signalisation TGF- $\beta$ , au niveau du récepteur, a été retrouvée dans plusieurs types de cancer, y compris le cancer ovarien. Cette résistance peut être causée par des mutations du gène TGF- $\beta$ R1 ou encore une expression réduite de TGF- $\beta$ R2 (Alsina-Sanchis *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2001). La perte d'expression ou d'habileté de liaison de Smad4 est également associée à un phénotype agressif qui entraîne la perte de la fonction suppressive de TGF- $\beta$ , alors que l'activation de l'EMT est préservée (Levy et Hill, 2005). Une théorie alternative pour expliquer l'insensibilité de SKOV3 au TGF- $\beta$  serait que cette lignée exprime déjà un phénotype mésenchymateux. SKOV3 est connu pour avoir un fort potentiel métastatique. Il a été démontré que le *knock-down* de l'oncoprotéine *Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1* (SND1)

permettait à des SKOV3 de récupérer un phénotype davantage épithélial, suggérant que ces cellules peuvent présenter certaines caractéristiques mésenchymateuses (Xin *et al.*, 2018). L'EMT étant intrinsèquement liée à l'apparition de chimiorésistance, cette hypothèse expliquerait parallèlement pourquoi la lignée SKOV3 exhibe de la résistance au traitement aux cisplatines et à l'adriamycine (Gonera *et al.*, 2014; Wang, J. *et al.*, 2016). Il est désormais reconnu que L'EMT n'est pas une transformation binaire entre deux états. L'EMT engendre plutôt une variété d'états intermédiaires où les cellules peuvent exprimer à la fois des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. Cette diversité de phénotypes contribue à l'ITH et d'autres phénomènes comme la migration collective, requérant à la fois des propriétés épithéliales et mésenchymales (Kim *et al.*, 2018).

Bien que la perte de sensibilité aux effets suppresseurs du TGF- $\beta$  puisse jouer un rôle critique dans la cancérogenèse, étant donné la fonction dualistique du TGF- $\beta$ , une hyperactivation de cette voie peut également favoriser un phénotype agressif, en promouvant l'EMT, l'invasion, l'angiogenèse et l'évasion immunitaire (Haque, Sulsal et Morris, John C., 2017). Dans les cas avancés de cancer ovarien, TGF- $\beta$  est sécrété en abondance dans le microenvironnement tumoral par les CAFs (Drabsch et ten Dijke, 2012; Yeung *et al.*, 2013). L'analyse du profil génomique de 1525 cancers ovariens a démontré que la surexpression de TGF- $\beta$ 2 était implicitement corrélée avec une chirurgie cytoréductrice sous-optimale ainsi qu'un pronostic moins positif pour la patiente (Riester *et al.*, 2014). Des niveaux de phosphorylation plus élevés de Smad2/3 ont également été détectés par immunohistochimie chez ces chirurgies sous-optimales, suggérant que la signalisation TGF- $\beta$  augmente la dissémination et occasionne de moins bons résultats de cytoréduction (Riester *et al.*, 2014).

En parallèle à l'activation de la voie des Smads, le TGF- $\beta$  favorisait la migration chez ES-2, tandis que la réponse chimiotactique restait plutôt faible chez SKOV3. L'activation de l'EMT devrait logiquement conférer une meilleure capacité migratoire

aux cellules. Cette capacité de migration est rendue possible par des caractéristiques associées aux cellules mésenchymateuses, telles qu'une polarité planaire, une forme arrondie et irrégulière, une grande quantité de filipodes et lamellipodes, ainsi que la capacité de faire des contacts transitoires (Campbell et Casanova, 2016). Aucune de ces caractéristiques n'est, toutefois, exclusive aux cellules mésenchymateuses. Le spectre de l'EMT permet aux cellules de présenter différents amalgames de caractéristiques à la fois épithéliales et mésenchymateuses (Campbell et Casanova, 2016). Ceci expliquerait comment SKOV3 pourrait à la fois présenter un phénotype partiellement mésenchymateux, tout en ayant une capacité migratoire moins grande que ES-2. D'autres études démontrent également que les cellules épithéliales possèdent un certain potentiel migratoire et que l'EMT n'occasionne pas nécessairement une plus grande capacité de migration (Schaeffer *et al.*, 2014).

*TGF- $\beta$  entraîne l'activation d'intermédiaires de la signalisation phosphorylés et l'expression de biomarqueurs de l'EMT chez la lignée chimiosensible ES-2*

En plus d'augmenter les niveaux de p-Smad3, TGF- $\beta$  a également entraîné une élévation des niveaux de p38 phosphorylés chez ES-2. Les TGF- $\beta$ Rs activent d'autres voies signalisation, de façon indépendante aux Smads, par interaction directe ou phosphorylation de celles-ci (Zhang, 2009). Ces voies de signalisation peuvent présenter des mutations oncogéniques qui agissent en parallèle ou en collaboration avec la voie des Smads pour favoriser l'agressivité de la tumeur (Sundqvist *et al.*, 2012). Une fois activés, les TGF- $\beta$ Rs interagissent avec TRAF6 et entraînent la formation de la chaîne polyubiquitine. TRAF6 polyubiquitiné recrute ensuite TAK1 qui active la voie de p38 et JNK, via les MAP kinases kinases. Les voies JNK et p38 agissent conjointement avec les Smads, en régulant divers facteurs de transcription en aval qui réguleront l'apoptose et l'EMT (Zhang, 2009).

L'instauration de l'EMT chez ES-2, suivant l'activation de la voie de TGF- $\beta$ , est confirmée par la surexpression marquée des différents biomarqueurs de l'EMT : Snail, Slug, Vimentine et Fibronectine. Snail et Slug font partie des facteurs de transcription précoces impliqués dans l'éventuelle sous-expression des gènes épithéliaux contre la surexpression des gènes mésenchymateux (Dongre et Weinberg, 2019; Loret *et al.*, 2019). Ils sont également impliqués dans la chimiorésistance et le phénotype de CSCs du cancer ovarien, en inhibant l'apoptose médiée par p53 (Kurrey *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015). Une étude de cas par immunohistochimie montre également qu'une expression élevée de Snail est associée à la présence de métastases dans la cavité péritonéale (Takai *et al.*, 2014). Une expression élevée de la Fibronectine, une glycoprotéine de la MEC, permet l'adhésion et la migration des cellules dans la MEC (Ou *et al.*, 2013). La Vimentine, quant à elle, est impliquée dans le maintien de la morphologie cellulaire mésenchymateuse, l'intégrité du cytoplasme et la stabilisation des interactions du cytosquelette (Ogrodnik *et al.*, 2014). Une expression plus élevée des niveaux géniques et protéiques de Snail, Slug et Vimentine a été documentée dans la lignée résistante au cisplatine A2780-cis par rapport à la même lignée chimiosensible (Davidson *et al.*, 2015).

#### *Étude structurelle de l'effet anti-TGF- $\beta$ des catéchines du thé vert*

En comparant l'effet inhibiteur des différentes catéchines sur l'expression des biomarqueurs de l'EMT, MMP-2 et la phosphorylation de Smad3 chez ES-2, il était évident que les catéchines possédant une fonction galloyle, soit CG, GCG, ECG et EGCG, avaient un plus grand potentiel anti-TGF- $\beta$ . Bien que la fonction galloyle semble également permettre un plus grand potentiel anti-migratoire par rapport aux molécules sans galloyle, les formes épimériques des catéchines (EC, ECG, EGC, EGCG) semblaient également avoir un avantage contre la migration. Il a été avancé que l'EMT et la migration cellulaire n'étaient pas toujours couplées. Une étude



notamment a démontré que des cellules épithéliales du cancer du sein et de la prostate pré-EMT avaient une plus grande capacité migratoire que leur équivalent post-EMT (Shimizu *et al.*, 2008). L'étude a supposé que ce phénomène était probablement dû au récepteur EGFR, connu pour moduler la migration, qui était, dans ce cas-ci, surexprimé par les lignées épithéliales pré-EMT. Il est possible que les catéchines puissent également inhiber le chimiotactisme des cellules ES-2 par d'autres voies, alternatives au TGF- $\beta$ , où, dans ce cas-ci, les structures des épimères présenteraient une plus grande activité biologique. D'autant plus, l'effet antagoniste d'EGCG sur l'activation d'EGFR a déjà été démontré (Shimizu *et al.*, 2008).

#### *L'EMT est impliquée dans le VM*

La croissance des cellules ES-2 sur un support de Matrigel a suffi à induire l'expression génique des biomarqueurs de l'EMT : Snail, Slug, Fibronectine et MMP2, accompagnée par le réarrangement des cellules sous forme de réseau vasculaire de type VM, suggérant que l'EMT soit également impliquée dans ce phénomène de vascularisation. Bien que l'induction de l'EMT par des facteurs solubles, comme le TGF- $\beta$ , soit la mieux couverte par la littérature, de plus en plus d'études reconnaissent désormais le rôle de la composition de la MEC et de ses propriétés physiques dans la génération de l'EMT (Puls *et al.*, 2017). L'activation de l'EMT dans les cellules entraîne, en retour, des modifications de la MEC et permet ainsi une rétroaction positive vers une plus grande capacité métastatique (Scott *et al.*, 2019). Par exemple, la présence de Fibronectine dans la MEC, favorisée par l'EMT, est essentielle pour l'induction de l'EMT par TGF- $\beta$ , d'une part par sa liaison à l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ , mais aussi grâce à sa capacité de localiser le TGF- $\beta$  latent (Griggs *et al.*, 2017; Park et Schwarzbauer, 2014).

En outre, considérant que pour permettre le VM, les cellules cancéreuses doivent nécessairement se transdifférencier en cellules de type endothéliale qui sont également

mésenchymateuses, il va de soi que l'EMT est un processus très important pour le VM (Liu *et al.*, 2016). Dans la littérature, une induction de l'expression des biomarqueurs de l'EMT a été observée chez les cellules qui sont impliquées dans la formation de ses structures (Ayala-Dominguez *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015). L'expression de MMP-2 et MT1-MMP est également corrélée avec le faible succès clinique dans le cancer ovarien en plus d'être associée avec la formation des structures VM (Davidson *et al.*, 1999; Sood *et al.*, 2004). MT1-MMP convertit pro-MMP-2 en sa forme active, ces MMPs participent au clivage de Laminine5 $\gamma$ 2 en deux fragments prométastatiques (Giannelli *et al.*, 1997). Il est avancé que la voie VE-cadhérine/EphA2/MT1-MMP/MMP-2/laminine5 $\gamma$ 2, impliquée dans l'adhésion des cellules endothéliales, serait aussi celle qui régule principalement la VM (Ayala-Dominguez *et al.*, 2019). En plus des marqueurs mésenchymateux, les gènes Wnt5a et Wnt11 étaient également surexprimés par les cellules sur Matrigel et traitées au TGF- $\beta$ . Les membres de la famille Wnt sont connus pour être impliqués dans la différenciation des cancers épithéliaux et le VM (Dejana et Kühl, 2010; Qi *et al.*, 2014). L'activation de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine contribue au VM en favorisant l'expression de VEGFR-2 et VE-cadhérine (Qi *et al.*, 2015; Sood *et al.*, 2004; Wang, H. *et al.*, 2016). La surexpression de Wnt5a dans les tumeurs a également été associée à la formation de VM, ainsi que l'induction de l'EMT et l'invasion chez SKOV3 (Qi *et al.*, 2014). Le gène PDGFR, quant à lui, participe au recrutement des péricytes qui supportent la maturation et la stabilité des réseaux vasculaires (Ayala-Dominguez *et al.*, 2019). La formation de VM et l'expression génique de Snail pouvaient parallèlement être empêchées par les catéchines à la fonction galloyle. Ceci suggère que leurs effets inhibiteurs sur la signalisation TGF- $\beta$  et de l'EMT suffiraient à empêcher le VM. D'autre part, la dérégulation de MMP-2 médiée par ces catéchines pourrait également contribuer à prévenir le VM, en interférant avec la voie VE-cadhérine/EphA2/MMP-2/laminine5 $\gamma$ 2. L'implication de MT1-MMP dans la voie suggère que l'activité de ce dernier pourrait être également altérée par les catéchines.

*Les composés avec une fonction galloyle agissent comme inhibiteurs compétitifs au site de liaison de l'ATP du TGF- $\beta$ R1*

Le deuxième article a permis d'élucider plus en détail le mécanisme d'action anti-TGF- $\beta$  des catéchines à la fonction galloyle, et de montrer que leur fonction pouvait s'apparenter à celle d'un agent pharmacologique, le Galunisertib. Bien que l'importance du groupe galloyle pour l'activité biologique des catéchines a été soulevée dans la littérature (Du *et al.*, 2012), peu d'études ont exploré les effets biologiques de ces antioxydants galloylés. Certaines études ont toutefois rapporté la capacité de l'acide gallique de prévenir l'EMT, l'expression des biomarqueurs puis la fibrose cardiaque qui y est associée, notamment chez des cellules du cancer du poumon et des modèles *in vivo* (Jin *et al.*, 2017; Ryu *et al.*, 2016).

L'essai kinase démontra que presque toutes les molécules testées avaient une certaine capacité d'antagoniser l'activité kinase de TGF- $\beta$ R1 sur le substrat Smad3, avec, tel qu'attendu, une activité supérieure chez les catéchines à la fonction galloyle et Octyl et Dodecyl gallate. Cette capacité d'inhiber la kinase par des composés qui, par opposition, ne démontrent pas d'effet dans les essais cellulaires, est peut-être simplement attribuable à une moins grande capacité des composés à être internalisés par la cellule. En pharmacologie, le coefficient de partage eau/octanol (LogP) démontre le caractère lipophile de chaque composé. Une valeur LogP élevée corrèle avec une meilleure capacité de pénétrer la membrane plasmique et être internalisé de façon passive (Refsgaard *et al.*, 2005). Ce qui expliquerait pourquoi Sodium gallate, le composé le moins lipophile, puisse démontrer un certain potentiel inhibiteur sur TGF- $\beta$ R1 tout en présentant une activité presque nulle sur la migration et les niveaux de Smad-3 phosphorylé via TGF- $\beta$ .

Les analyses par amarrage moléculaire confirment que la fonction gallate a une affinité pour une position spécifique au sein du site de liaison de l'ATP du domaine kinase. Le criblage de plusieurs autres inhibiteurs potentiels pour ce site, par modélisation comparative à des pharmacophores et relation quantitative structure à activité (QSAR), a également démontré que des interactions biophysiques similaires étaient favorisées. Chez sept inhibiteurs potentiels sélectionnés, tous présentaient des interactions de types ponts-H avec les acides aminés His283 et Lys232, qui étaient aussi observées lors de la modélisation de nos composés (Ajay Kumar *et al.*, 2018). Par ailleurs, ces inhibiteurs avaient un logP compris entre 2 et 3,6 (Kumar *et al.*, 2017), il en va de même pour nos composés les plus actifs, les catéchines avec galloyles, Butyl, Octyl et Dodecyl gallate, mais pas les autres composés. La lipophilicité semble donc importante, non seulement pour la diffusion au travers de la membrane plasmique de la cellule, mais aussi pour le positionnement dans le récepteur.

En somme, nos résultats proposent un nouveau mécanisme d'action pour EGCG et les catéchines du thé vert, par lequel ces composés exerceraient leurs activités chimiopréventives et anti-invasives. D'autres études ont également mis en évidence que EGCG pouvait agir comme inhibiteur compétitif au site de liaison de l'ATP sur plusieurs récepteurs à activité sérine/thréonine kinase, tel qu'EGFR, Her-2, IGF-R1, Met, PDGF-R et VEGF-R1 (Larsen *et al.*, 2010). Ce mode d'action n'a toutefois jamais été démontré chez les TGF- $\beta$ Rs. Il semblerait que la structure d'EGCG mime celle de l'adénine (Teillet *et al.*, 2008). D'autres molécules issues des végétaux de types flavonoïdes, tels que la lutéoline et la quercétine, semblent aussi démontrer cette capacité à occuper le site de l'adénine sur les kinases cycline-dépendantes (Teillet *et al.*, 2008). L'on croyait classiquement que l'activité biologique des polyphénols de notre alimentation était attribuable uniquement grâce à leur activité antioxydante. Une accumulation d'évidences suggèrent que les flavonoïdes et les polyphénols inhibent l'activité kinase et la signalisation, dérégulées dans la cancérogenèse, en favorisant des

interactions directes avec les protéines kinases (Bhullar *et al.*, 2018; Hou et Kumamoto, 2010).

### *TGF- $\beta$ R1 comme cible thérapeutique*

La voie de signalisation du TGF- $\beta$  est une cible thérapeutique à favoriser du fait que son hyperactivation est impliquée dans divers processus essentiels à la progression cancéreuse, notamment l'EMT, l'angiogenèse et l'évasion immunitaire (Connolly *et al.*, 2011). Plusieurs inhibiteurs de l'activité kinase du TGF- $\beta$ R1 sont développés, le récepteur représente une bonne cible pharmacologique de par sa grande *drugability*, beaucoup de petites molécules peuvent démontrer de l'affinité pour la poche de liaison de l'ATP. De plus, malgré la redondance structurale de la famille des récepteurs TGF- $\beta$  de types 1, les inhibiteurs de TGF- $\beta$ R1 confèrent une bonne spécificité, contrairement aux autres inhibiteurs de kinases (Ling et Lee, 2011). En effet, bien qu'une certaine homologie existe, notamment entre la poche de liaison des inhibiteurs de p38 et TGF- $\beta$ R1, le résidu ser280, défini comme le *gatekeeper* du récepteur, permet de conférer une spécificité de liaison au site du TGF- $\beta$ R1 (Zuccotto *et al.*, 2010). Les ponts-H favorisés entre la fonction galloyle et ser280, montrent que ces molécules possèdent un certain potentiel pharmacologique et une spécificité d'action exploitable, qu'il s'agisse de combiner ces antioxydants aux thérapies du cancer ou encore pour la création de nouveaux agents pharmacologiques inspirés par ces structures.

### *Perspectives thérapeutiques des galloyles*

La combinaison d'agents thérapeutiques déjà existants permet d'innover plus rapidement qu'en passant par le développement long et fastidieux de nouveaux composés. Ces combinaisons peuvent permettre d'augmenter la spécificité et l'efficacité des traitements, tout en pouvant potentiellement limiter les effets néfastes.

Les polyphénols ainsi que les catéchines et les gallates, déjà présentes dans la diète, représentent des outils thérapeutiques accessibles et sécuritaires pour le développement de nouveaux traitements. Plusieurs études cherchent à identifier des applications intéressantes pour EGCG, seul ou en combinaison, non seulement pour traiter le cancer, mais aussi diverses infections, maladies métaboliques ou neurodégénératives (Chakrawarti *et al.*, 2016).

Parmi les études explorant la portée thérapeutique d'EGCG ou des catéchines, le facteur le plus limitant semble être lié à leur biodisponibilité, EGCG étant plutôt instable dans des conditions neutres ou alcalines (Chakrawarti *et al.*, 2016). Les niveaux plasmatiques chez l'humain après consommation de deux à trois tasses de thé atteignent seulement 0,2-0,3  $\mu\text{M}$  et jusqu'à 7,5  $\mu\text{M}$  lorsque qu'une forte dose est administrée oralement, des niveaux sous l'intervalle thérapeutique observé *in vitro* (Yang *et al.*, 2008). Toutefois, des thérapies novatrices emploient plusieurs solutions pour pallier à la disponibilité et la spécificité d'EGCG. Par exemple, la prodrogue d'EGCG (pro-EGCG) est un dérivé d'EGCG, obtenue par acétylation des groupes hydroxyles. Ce nouvel agent permet d'augmenter la disponibilité et les effets biologiques de EGCG, notamment son effet anti-angiogénique *in vivo*, chez des modèles xénogreffés au cancer de l'endomètre (Wang, J. *et al.*, 2018). La nanoencapsulation d'EGCG, avec des nanoparticules d'or permet également de transporter efficacement EGCG spécifiquement dans les cellules cancéreuses, permettant ainsi une apoptose et une cytotoxicité spécifique aux cellules malignes (Chavva *et al.*, 2019).

De plus, il a été démontré qu'il pouvait être avantageux de combiner EGCG avec le cisplatine pour traiter le cancer de l'ovaire. EGCG permettait à la fois d'augmenter l'efficacité du cisplatine, via la surexpression du récepteur membrane CTR1 (Wang *et al.*, 2015), capable d'internaliser le médicament, tout en conférant alternativement un effet protecteur contre la toxicité et les dommages oxydatifs du cisplatine (El-Mowafy

*et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2015; Sahin *et al.*, 2010). Les nanocomplexes micellaires acide hyaluronique-catéchines du thé vert, sont une autre innovation prometteuse pour le traitement du cancer de l'ovaire qui permet également d'augmenter l'efficacité de la cisplatine tout en limitant ses effets néfastes. Lorsque le conjugué EGCG-acide hyaluronique est combiné avec le cisplatine, un assemblage spontané des produits en complexes micellaires se produit. L'acide hyaluronique permet un transport efficace des micelles par endocytose chez les cellules cancéreuses surexprimant CD44 (Bae *et al.*, 2017).

Considérant que l'EMT et la signalisation du TGF- $\beta$  sont également impliqués dans l'évasion immunitaire, il pourrait être avantageux de combiner les molécules galloylées à l'immunothérapie. Certaines études ont également avancé qu'EGCG représentait potentiellement une alternative aux inhibiteurs de checkpoint immunitaire, étant donné qu'il diminuait l'expression de PD-L1 chez une lignée de cancer du poumon (Rawangkan, 2018). Une autre étude a également montré l'avantage de combiner EGCG et l'immunothérapie avec un vaccin à ADN encodant Sig/E7/LAMP-1. Cette étude chez des souris a démontré qu'EGCG agissait synergiquement avec le vaccin et augmentait réponse antitumorale des cellules CD8<sup>+</sup>T (Kang *et al.*, 2007).

Bien que nos autres composés naturels aient fait l'objet de peu d'études, les expériences faites avec EGCG fournissent aussi des pistes d'applications pour les autres composés galloylés. L'affinité supérieure de Octyl et Lauryl gallate pour TGF- $\beta$ R1 par rapport à EGCG montre que ces molécules représentent des inhibiteurs avec un grand potentiel. En parallèle, ces deux molécules ont déjà démontré une certaine activité anticancéreuse, en ayant la capacité d'induire l'apoptose par les voies des caspases chez plusieurs lignées malignes (Chen *et al.*, 2001; Cordova *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018). Aucune autre étude ne semble avoir exploré l'activité anti-EMT de Dodecyl ou Octyl gallate à ce jour.

## CONCLUSION

L'étude réalisée dans le cadre du présent mémoire avait, dans un premier temps, pour but de mieux caractériser l'action anti-métastatique et anti-invasive des catéchines du thé vert dans le cancer ovarien, en plus de faire une étude comparative des différentes molécules pour y valuer une possible association structure-fonction. Puis, dans un deuxième volet, nous avons tenté de comprendre plus en détail le mécanisme d'action précis de ces composés sur la voie de signalisation TGF- $\beta$  et quel rôle y avait la fonction galloyle.

Nous rapportons la nécessité de la fonction galloyle pour l'activité inhibitrice des catéchines CG, GCG, ECG et EGCG sur la signalisation TGF- $\beta$  par la phosphorylation de Smad3, l'expression de biomarqueurs mésenchymateux, le VM et la capacité migratoire de la lignée de carcinome ovarien ES-2. Nous démontrons ultérieurement que d'autres composés antioxydants, possédant une fonction galloyl, Butyl gallate, Octyl gallate et Dodecyl gallate, peuvent également antagoniser la voie de TGF- $\beta$ , via la phosphorylation de Smad3 et la migration cellulaire, suggérant que l'activité inhibitrice de TGF- $\beta$  soit exclusive à cette fonction. Nous établissons qu'une inhibition de la phosphorylation de Smad3 par le domaine kinase de TGF- $\beta$ R1 dans un essai *in vitro* par nos composés est possible, puis qu'une association directe entre le TGF- $\beta$ R1 et les catéchines et composés gallates a lieu. Enfin, nous caractérisons le site de liaison des composés par amarrage moléculaire computationnel et déterminons que celui-ci correspond également au site de liaison de l'ATP requis pour l'activité kinase. L'amarrage montre une spécificité de positionnement de la fonction galloyle au sein du récepteur chez toutes les molécules testées et le positionnement s'apparente conjointement à la position de l'inhibiteur pharmacologique de TGF- $\beta$ R1, le Galunisertib, proposant ainsi un mécanisme d'action similaire partagé par nos composés. Nous constatons encore une fois une affinité et une activité supérieures à la fois chez les expériences cellulaires que les essais *in vitro*, chez les catéchines portant



le groupe galloyle, ainsi que les gallates possédant une plus longue chaîne aliphatique, Octyl gallate et Dodecyl gallate. Nous en sommes donc venus à la conclusion que, en plus de la fonction galloyle, une certaine lipophilicité des molécules s'avérait également essentielle, à la fois pour la diffusion passive dans la cellule que pour la liaison et l'affinité de TGF- $\beta$ R1.

Pour conclure, cette étude montre une association structure-fonction intrinsèque à ces composés naturels, en plus de proposer un mécanisme d'action potentiel pour ces composés, jamais exploré auparavant. La voie de signalisation du TGF- $\beta$  et ses récepteurs constituent une importante cible thérapeutique, alors qu'ils sont impliqués à la fois dans l'évasion immunitaire et la dissipation métastatique du cancer ovarien et aussi dans la majorité des tumeurs solides. L'importante affinité de ces structures pour le site de liaison de l'ATP du TGF- $\beta$ RI, déjà ciblé par plusieurs inhibiteurs thérapeutiques, fournit d'importantes pistes pour le développement pharmacologique et la possibilité de générer des traitements novateurs.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Taleb, H., Yamaguchi, K., Matsumura, N., Murakami, R., Nakai, H., Higasa, K., . . . Mandai, M. (2016, Aug 23). Comprehensive assessment of the expression of the SWI/SNF complex defines two distinct prognostic subtypes of ovarian clear cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(34), 54758-54770. doi: 10.18632/oncotarget.10181
- Ajay Kumar, T. V., Athavan, A. A. S., Loganathan, C., Saravanan, K., Kabilan, S. et Parthasarathy, V. (2018, 2018/10/01/). Design, 3D QSAR modeling and docking of TGF- $\beta$  type I inhibitors to target cancer. *Computational Biology and Chemistry*, 76, 232-244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.07.011>
- Akhurst, R. J. et Hata, A. (2012, Oct). Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*, 11(10), 790-811. doi: 10.1038/nrd3810
- Alsina-Sanchis, E., Figueras, A., Lahiguera, Á., Vidal, A., Casanovas, O., Graupera, M., . . . Viñals, F. (2016, 2016/10/15). The TGF $\beta$  pathway stimulates ovarian cancer cell proliferation by increasing IGF1R levels. *International Journal of Cancer*, 139(8), 1894-1903. doi: 10.1002/ijc.30233
- American Cancer Society. (2011). *Cancer Facts & Figures 2011*. Récupéré de file:///C:/Users/Audrey-Ann/Downloads/cancer-facts-and-figures-2011.pdf
- American Cancer Society. (2018). *Ovarian Cancer Stages*. Récupéré de <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>
- Anglesio, M. S., Wiegand, K. C., Melnyk, N., Chow, C., Salamanca, C., Prentice, L. M., . . . Huntsman, D. G. (2013). Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PloS one*, 8(9), e72162-e72162. doi: 10.1371/journal.pone.0072162
- Ayala-Dominguez, L., Olmedo-Nieva, L., Munoz-Bello, J. O., Contreras-Paredes, A., Manzo-Merino, J., Martinez-Ramirez, I. et Lizano, M. (2019). Mechanisms of

- Vasculogenic Mimicry in Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 9, 998. doi: 10.3389/fonc.2019.00998
- Bae, K. H., Tan, S., Yamashita, A., Ang, W. X., Gao, S. J., Wang, S., . . . Kurisawa, M. (2017, 2017/12/01/). Hyaluronic acid-green tea catechin micellar nanocomplexes: Fail-safe cisplatin nanomedicine for the treatment of ovarian cancer without off-target toxicity. *Biomaterials*, 148, 41-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.027>
- Bast, R. C., Jr., Hennessy, B. et Mills, G. B. (2009, Jun). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 415-428. doi: 10.1038/nrc2644
- Basta, A., Bidziński, M., Bieńkiewicz, A., Blecharz, P., Bodnar, L., Jach, R., . . . Madry, R. (2016, 02/17). Recommendation of the Polish Society of Oncological Gynaecology on the diagnosis and treatment of epithelial ovarian cancer. *Oncol Clin Pract, Oncol Clin Pract 2015;11(5):233-243.*, 233-243.
- Beaufort, C. M., Helmijr, J. C. A., Piskorz, A. M., Hoogstraat, M., Ruigrok-Ritstier, K., Besselink, N., . . . Helleman, J. (2014). Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS one*, 9(9), e103988-e103988. doi: 10.1371/journal.pone.0103988
- Beliveau, R. et Gingras, D. (2007, Nov). Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician*, 53(11), 1905-1911.
- Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P. et Rupasinghe, H. P. V. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular cancer*, 17(1), 48-48. doi: 10.1186/s12943-018-0804-2
- Blagden, S. P. (2015). Harnessing Pandemonium: The Clinical Implications of Tumor Heterogeneity in Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 5, 149. doi: 10.3389/fonc.2015.00149
- Blobe, G. C., Schiemann, W. P. et Lodish, H. F. (2000, May 4). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, 342(18), 1350-1358. doi: 10.1056/NEJM200005043421807
- Bowtell, D. D., Bohm, S., Ahmed, A. A., Aspuria, P. J., Bast, R. C., Jr., Beral, V., . . . Balkwill, F. R. (2015, Nov). Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(11), 668-679. doi: 10.1038/nrc4019

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. et Jemal, A. (2018, Nov). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi: 10.3322/caac.21492
- Brown, J. et Frumovitz, M. (2014, Jun). Mucinous tumors of the ovary: current thoughts on diagnosis and management. *Curr Oncol Rep*, 16(6), 389. doi: 10.1007/s11912-014-0389-x
- Campbell, K. et Casanova, J. (2016). A common framework for EMT and collective cell migration. *Development*, 143(23), 4291-4300. doi: 10.1242/dev.139071
- Canadian Cancer Society. (2019). *Statistiques canadiennes sur le cancer*. Récupéré de <https://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/publications/Canadian%20Cancer%20Statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2019-FR.pdf>
- Carmeliet, P. et Jain, R. K. (2011, May 19). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi: 10.1038/nature10144
- Chaffer, C. L. et Weinberg, R. A. (2011, Mar 25). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559-1564. doi: 10.1126/science.1203543
- Chakrawarti, L., Agrawal, R., Dang, S., Gupta, S. et Gabrani, R. (2016, 2016/08/02). Therapeutic effects of EGCG: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(8), 907-916. doi: 10.1080/13543776.2016.1203419
- Chambers, A. F., Groom, A. C. et MacDonald, I. C. (2002, Aug). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2(8), 563-572. doi: 10.1038/nrc865
- Chavva, S. R., Deshmukh, S. K., Kanchanapally, R., Tyagi, N., Coym, J. W., Singh, A. P. et Singh, S. (2019). Epigallocatechin Gallate-Gold Nanoparticles Exhibit Superior Antitumor Activity Compared to Conventional Gold Nanoparticles: Potential Synergistic Interactions. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(3), 396. doi: 10.3390/nano9030396
- Chemical Entities of Biological Interest. (2020a). Récupéré de <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:83631>
- Chemical Entities of Biological Interest. (2020b). Récupéré de <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:87247>

- Chemical Entities of Biological Interest. (2020c). Récupéré de <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:115197>
- Chen, T., Triplett, J., Dehner, B., Hurst, B., Colligan, B., Pemberton, J., . . . Carter, J. H. (2001, Jun 15). Transforming growth factor-beta receptor type I gene is frequently mutated in ovarian carcinomas. *Cancer Res*, *61*(12), 4679-4682.
- Cho, K. R. et Shih Ie, M. (2009). Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, *4*, 287-313. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246
- Christie, M. et Oehler, M. K. (2006, Jun). Molecular pathology of epithelial ovarian cancer. *J Br Menopause Soc*, *12*(2), 57-63. doi: 10.1258/136218006777525794
- Clarke, D. C. et Liu, X. (2008, Sep). Decoding the quantitative nature of TGF-beta/Smad signaling. *Trends Cell Biol*, *18*(9), 430-442. doi: 10.1016/j.tcb.2008.06.006
- Coburn, S. B., Bray, F., Sherman, M. E. et Trabert, B. (2017, Jun 1). International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype. *Int J Cancer*, *140*(11), 2451-2460. doi: 10.1002/ijc.30676
- Connolly, E. C., Saunier, E. F., Quigley, D., Luu, M. T., De Sapio, A., Hann, B., . . . Akhurst, R. J. (2011). Outgrowth of drug-resistant carcinomas expressing markers of tumor aggression after long-term T $\beta$ RI/II kinase inhibition with LY2109761. *Cancer research*, *71*(6), 2339-2349. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2941
- Cordova, C. A. S. d., Locatelli, C., Assunção, L. S., Mattei, B., Mascarello, A., Winter, E., . . . Creczynski-Pasa, T. B. (2011, 2011/12/01). Octyl and dodecyl gallates induce oxidative stress and apoptosis in a melanoma cell line. *Toxicology in Vitro*, *25*(8), 2025-2034. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.08.003>
- Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A. et Lisowska, K. M. (2018, Jan). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, *81*(1), 17-38. doi: 10.1007/s00280-017-3501-8
- Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., Nesland, J. M., Givant-Horwitz, V., Bryne, M., . . . Reich, R. (2001, Apr). Expression of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases messenger RNA in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *Am J Clin Pathol*, *115*(4), 517-524. doi: 10.1309/B1YX-L8DB-TGY1-7905

- Davidson, B., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Ben-Baruch, G., Nesland, J. M., . . . Reich, R. (1999, 1999/10/01). High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis*, 17(10), 799-808. doi: 10.1023/A:1006723011835
- Davidson, B., Holth, A., Hellesylt, E., Tan, T. Z., Huang, R. Y.-J., Tropé, C., . . . Thiery, J. P. (2015, 2015/01/01). The clinical role of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions. *Human Pathology*, 46(1), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.10.004>
- Dacruz, O., Lee, C., Trieu, V. et Hwang, L. (2017, 09/01). 1662PSynergistic antitumor effects of OT-101 (trabedersen), a transforming growth factor-beta 2 (TGF- $\beta$ 2) antisense oligonucleotide (ASO) and chemotherapy in preclinical tumor models. *Annals of Oncology*, 28. doi: 10.1093/annonc/mdx390.034
- De Craene, B. et Berx, G. (2013, Feb). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*, 13(2), 97-110. doi: 10.1038/nrc3447
- Dejana, E. et Kühl, M. (2010). The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis. *Circulation Research*, 107(8), 943-952. doi: doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223750
- Djerir, D., Iddir, M., Bourgault, S., Lamy, S. et Annabi, B. (2018, Mar). Biophysical evidence for differential gallated green tea catechins binding to membrane type-1 matrix metalloproteinase and its interactors. *Biophys Chem*, 234, 34-41. doi: 10.1016/j.bpc.2018.01.002
- Doll, R. et Peto, R. (1981, Jun). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 66(6), 1191-1308.
- Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C. et Schultz, N. (2013, 2013/07/09). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature Communications*, 4(1), 2126. doi: 10.1038/ncomms3126
- Dongre, A. et Weinberg, R. A. (2019, Feb). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(2), 69-84. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4

- Drabsch, Y. et ten Dijke, P. (2012, 2012/12/01). TGF- $\beta$  signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3), 553-568. doi: 10.1007/s10555-012-9375-7
- Du, G.-J., Zhang, Z., Wen, X.-D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C.-S. et Wang, C.-Z. (2012). Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*, 4(11), 1679-1691. doi: 10.3390/nu4111679
- Dubeau, L. (2008, Dec). The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol*, 9(12), 1191-1197. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70308-5
- Eccles, S. A. et Welch, D. R. (2007, May 19). Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet*, 369(9574), 1742-1757. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60781-8
- Eisenkop, S. M. et Spirtos, N. M. (2001, Jul). The clinical significance of occult macroscopically positive retroperitoneal nodes in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 82(1), 143-149. doi: 10.1006/gyno.2001.6232
- El-Mowafy, A. M., Al-Gayyar, M. M., Salem, H. A., El-Mesery, M. E. et Darweish, M. M. (2010, 2010/12/01/). Novel chemotherapeutic and renal protective effects for the green tea (EGCG): Role of oxidative stress and inflammatory-cytokine signaling. *Phytomedicine*, 17(14), 1067-1075. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.08.004>
- Elias, K. M., Emori, M. M., Papp, E., MacDuffie, E., Konecny, G. E., Velculescu, V. E. et Drapkin, R. (2015). Beyond genomics: critical evaluation of cell line utility for ovarian cancer research. *Gynecologic oncology*, 139(1), 97-103. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.08.017
- Fabregat, I., Fernando, J., Mainez, J. et Sancho, P. (2014). TGF-beta signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des*, 20(17), 2934-2947. doi: 10.2174/13816128113199990591
- Fan, Y. L., Zheng, M., Tang, Y. L. et Liang, X. H. (2013, Nov). A new perspective of vasculogenic mimicry: EMT and cancer stem cells (Review). *Oncol Lett*, 6(5), 1174-1180. doi: 10.3892/ol.2013.1555
- Feeley, K. M. et Wells, M. (2001, Feb). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*, 38(2), 87-95. doi: 10.1046/j.1365-2559.2001.01042.x

- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., . . . Bray, F. (2015, Mar 1). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, *136*(5), E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210
- Fidler, I. J. (2003, Jun). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, *3*(6), 453-458. doi: 10.1038/nrc1098
- Flavell, R. A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S. H. et Licona-Limon, P. (2010, Aug). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol*, *10*(8), 554-567. doi: 10.1038/nri2808
- Fleisch, M. C., Maxwell, C. A. et Barcellos-Hoff, M. H. (2006, Jun). The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocr Relat Cancer*, *13*(2), 379-400. doi: 10.1677/erc.1.01112
- Foley, O. W., Rauh-Hain, J. A. et del Carmen, M. G. (2013, Apr). Recurrent epithelial ovarian cancer: an update on treatment. *Oncology (Williston Park)*, *27*(4), 288-294, 298.
- Folkman, J. (2000, Jan 19). Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*, *92*(2), 94-95. doi: 10.1093/jnci/92.2.94
- Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., . . . et al. (1998, Mar). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, *62*(3), 676-689. doi: 10.1086/301749
- Friedlander, M., Trimble, E., Tinker, A., Alberts, D., Avall-Lundqvist, E., Brady, M., . . . Gynecologic Cancer, I. (2011, May). Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, *21*(4), 771-775. doi: 10.1097/IGC.0b013e31821bb8aa
- Gadducci, A., Guarneri, V., Peccatori, F. A., Ronzino, G., Scandurra, G., Zamagni, C., . . . Salutari, V. (2019, Jan 28). Current strategies for the targeted treatment of high-grade serous epithelial ovarian cancer and relevance of BRCA mutational status. *J Ovarian Res*, *12*(1), 9. doi: 10.1186/s13048-019-0484-6
- Gan, R. Y., Li, H. B., Sui, Z. Q. et Corke, H. (2018, Apr 13). Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *58*(6), 924-941. doi: 10.1080/10408398.2016.1231168



- Gao, Y., Shan, N., Zhao, C., Wang, Y., Xu, F., Li, J., . . . Yi, Z. (2015). LY2109761 enhances cisplatin antitumor activity in ovarian cancer cells. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(5), 4923-4932.
- Gao, Y., Zhao, X. L., Gu, Q., Wang, J. Y., Zhang, S. W., Zhang, D. F., . . . Sun, B. C. (2009, Sep). [Correlation of vasculogenic mimicry with clinicopathologic features and prognosis of ovarian carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 38(9), 585-589.
- Gemignani, M. L., Schlaerth, A. C., Bogomolny, F., Barakat, R. R., Lin, O., Soslow, R., . . . Boyd, J. (2003, Aug). Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 90(2), 378-381. doi: 10.1016/s0090-8258(03)00264-6
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G. et Quaranta, V. (1997). Induction of Cell Migration by Matrix Metalloprotease-2 Cleavage of Laminin-5. *Science*, 277(5323), 225. doi: 10.1126/science.277.5323.225
- Gonera, A., Wawryka, J., Sobkowicz, A., Biezunska-Kusiak, K., Dubinska-Magiera, M., Krajewski, A. et Choromanska, A. (2014). SKOV-3 and Me45 cell response to cisplatin-based chemotherapy: an in vitro study. *Folia Biol (Praha)*, 60(5), 213-219.
- Gong, T. T., Wu, Q. J., Vogtmann, E., Lin, B. et Wang, Y. L. (2013, Jun 15). Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*, 132(12), 2894-2900. doi: 10.1002/ijc.27952
- Gonzalez-Avila, G., Sommer, B., Mendoza-Posada, D. A., Ramos, C., Garcia-Hernandez, A. A. et Falfan-Valencia, R. (2019, May). Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 137, 57-83. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.02.010
- Griggs, L. A., Hassan, N. T., Malik, R. S., Griffin, B. P., Martinez, B. A., Elmore, L. W. et Lemmon, C. A. (2017). Fibronectin fibrils regulate TGF- $\beta$ 1-induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 60-61, 157-175. doi: 10.1016/j.matbio.2017.01.001
- Guan, X. (2015, Sep). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B*, 5(5), 402-418. doi: 10.1016/j.apsb.2015.07.005

- Gupta, G. P. et Massague, J. (2006, Nov 17). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127(4), 679-695. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.001
- Hanahan, D. et Weinberg, R. A. (2000, Jan 7). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
- Hanahan, D. et Weinberg, R. A. (2011, Mar 4). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Haque, S. et Morris, J. C. (2017, Aug 3). Transforming growth factor-beta: A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother*, 13(8), 1741-1750. doi: 10.1080/21645515.2017.1327107
- Haque, S. et Morris, J. C. (2017, 2017/08/03). Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(8), 1741-1750. doi: 10.1080/21645515.2017.1327107
- He, X., Ee, P. L., Coon, J. S. et Beck, W. T. (2004, Jul 15). Alternative splicing of the multidrug resistance protein 1/ATP binding cassette transporter subfamily gene in ovarian cancer creates functional splice variants and is associated with increased expression of the splicing factors PTB and SRp20. *Clin Cancer Res*, 10(14), 4652-4660. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0439
- Hennessy, B. T., Coleman, R. L. et Markman, M. (2009, Oct 17). Ovarian cancer. *Lancet*, 374(9698), 1371-1382. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61338-6
- Herpin, A., Lelong, C. et Favrel, P. (2004, May 3). Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol*, 28(5), 461-485. doi: 10.1016/j.dci.2003.09.007
- Hill, C. S. (2016). Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(10), a022079. doi: 10.1101/cshperspect.a022079
- Horiuchi, A., Itoh, K., Shimizu, M., Nakai, I., Yamazaki, T., Kimura, K., . . . Konishi, I. (2003, Mar). Toward understanding the natural history of ovarian carcinoma development: a clinicopathological approach. *Gynecol Oncol*, 88(3), 309-317. doi: 10.1016/s0090-8258(02)00104-x
- Hou, D.-X. et Kumamoto, T. (2010, 2010/09/01). Flavonoids as Protein Kinase Inhibitors for Cancer Chemoprevention: Direct Binding and Molecular Modeling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(5), 691-719. doi: 10.1089/ars.2009.2816

- Hunn, J. et Rodriguez, G. C. (2012, Mar). Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol*, 55(1), 3-23. doi: 10.1097/GRF.0b013e31824b4611
- Hwang, L., Ng, K., Wang, W. et Trieu, V. N. (2016, 2016/05/20). OT-101: An anti-TGF-beta-2 antisense- primed tumors to subsequent chemotherapies. *Journal of Clinical Oncology*, 34(15\_suppl), e15727-e15727. doi: 10.1200/JCO.2016.34.15\_suppl.e15727
- Ikediodi, O. N., Davies, H., Bignell, G., Edkins, S., Stevens, C., O'Meara, S., . . . Wooster, R. (2006). Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Molecular cancer therapeutics*, 5(11), 2606-2612. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0433
- Izutsu, K., Kurokawa, M., Imai, Y., Maki, K., Mitani, K. et Hirai, H. (2001). The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor  $\beta$  signaling. *Blood*, 97(9), 2815-2822. doi: 10.1182/blood.V97.9.2815
- Jackson, B. C., Nebert, D. W. et Vasiliou, V. (2010, Feb). Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics*, 4(3), 194-201. doi: 10.1186/1479-7364-4-3-194
- Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C. et Ledermann, J. A. (2014, Oct 11). Ovarian cancer. *Lancet*, 384(9951), 1376-1388. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62146-7
- Jelovac, D. et Armstrong, D. K. (2011, May-Jun). Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA Cancer J Clin*, 61(3), 183-203. doi: 10.3322/caac.20113
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. et Forman, D. (2011, Mar-Apr). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2), 69-90. doi: 10.3322/caac.20107
- Jin, L., Piao, Z. H., Sun, S., Liu, B., Ryu, Y., Choi, S. Y., . . . Jeong, M. H. (2017, 2017/12/01/). Gallic acid attenuates pulmonary fibrosis in a mouse model of transverse aortic contraction-induced heart failure. *Vascular Pharmacology*, 99, 74-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.10.007>
- Jung, J.-G., Shih, I.-M., Park, J. T., Gerry, E., Kim, T. H., Ayhan, A., . . . Wang, T.-L. (2016). Ovarian Cancer Chemoresistance Relies on the Stem Cell

- Reprogramming Factor PBX1. *Cancer Research*, 76(21), 6351. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0980
- Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T. et Nakano, H. (2003, Mar). Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc*, 36(1), 9-17. doi: 10.1007/s007950300002
- Kalluri, R. et Weinberg, R. A. (2009, Jun). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428. doi: 10.1172/JCI39104
- Kang, T. H., Lee, J. H., Song, C. K., Han, H. D., Shin, B. C., Pai, S. I., . . . Wu, T. C. (2007). Epigallocatechin-3-gallate enhances CD8+ T cell-mediated antitumor immunity induced by DNA vaccination. *Cancer research*, 67(2), 802-811. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2638
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., . . . Lyden, D. (2005, Dec 8). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820-827. doi: 10.1038/nature04186
- Kenny, H. A., Kaur, S., Coussens, L. M. et Lengyel, E. (2008, Apr). The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest*, 118(4), 1367-1379. doi: 10.1172/JCI33775
- Kenny, H. A. et Lengyel, E. (2009, Mar 1). MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell Cycle*, 8(5), 683-688. doi: 10.4161/cc.8.5.7703
- Kessenbrock, K., Plaks, V. et Werb, Z. (2010, Apr 2). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015
- Kim, S., Gwak, H., Kim, H. S., Kim, B., Dhanasekaran, D. N. et Song, Y. S. (2016, Dec 13). Malignant ascites enhances migratory and invasive properties of ovarian cancer cells with membrane bound IL-6R in vitro. *Oncotarget*, 7(50), 83148-83159. doi: 10.18632/oncotarget.13074
- Kim, S., Han, Y., Kim, S. I., Kim, H. S., Kim, S. J. et Song, Y. S. (2018). Tumor evolution and chemoresistance in ovarian cancer. *NPJ Precis Oncol*, 2, 20. doi: 10.1038/s41698-018-0063-0

- Kingsley, D. M. (1994, Jan). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, 8(2), 133-146. doi: 10.1101/gad.8.2.133
- Koshiyama, M., Matsumura, N. et Konishi, I. (2014). Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int*, 2014, 934261. doi: 10.1155/2014/934261
- Koshiyama, M., Matsumura, N. et Konishi, I. (2017, Mar 2). Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics (Basel)*, 7(1). doi: 10.3390/diagnostics7010012
- Kristensen, G. B. et Trope, C. (1997, Jan 11). Epithelial ovarian carcinoma. *Lancet*, 349(9045), 113-117. doi: 10.1016/S0140-6736(96)06071-0
- Kumar, A., Kabilan, S. et Parthasarathy, V. (2017, 10/10). Screening and Toxicity Risk Assessment of Selected Compounds to Target Cancer using QSAR and Pharmacophore Modelling. *International Journal of PharmTech Research*, 10, 219-224. doi: 10.20902/IJPTR.2017.10428
- Kurman, R. J. (2013, Dec). Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol*, 24 Suppl 10, x16-21. doi: 10.1093/annonc/mdt463
- Kurman, R. J., International Agency for Research on Cancer. et World Health Organization. (2014). *WHO classification of tumours of female reproductive organs* (4th éd.). Numéro 18323211. Lyon : International Agency for Research on Cancer.
- Kurman, R. J. et Shih, I. M. (2011, Jul). Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*, 42(7), 918-931. doi: 10.1016/j.humpath.2011.03.003
- Kurman, R. J. et Shih, I. M. (2016, Apr). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol*, 186(4), 733-747. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.11.011
- Kurokawa, M., Mitani, K., Yamagata, T., Takahashi, T., Izutsu, K., Ogawa, S., . . . Hirai, H. (2000, 2000/06/15). The Evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death. *The EMBO Journal*, 19(12), 2958-2968. doi: 10.1093/emboj/19.12.2958

- Kurrey, N. K., Jalgaonkar, S. P., Joglekar, A. V., Ghanate, A. D., Chaskar, P. D., Doiphode, R. Y. et Bapat, S. A. (2009, 2009/09/01). Snail and Slug Mediate Radioresistance and Chemoresistance by Antagonizing p53-Mediated Apoptosis and Acquiring a Stem-Like Phenotype in Ovarian Cancer Cells. *STEM CELLS*, 27(9), 2059-2068. doi: 10.1002/stem.154
- Larsen, C. A., Dashwood, R. H. et Bisson, W. H. (2010). Tea catechins as inhibitors of receptor tyrosine kinases: mechanistic insights and human relevance. *Pharmacological research*, 62(6), 457-464. doi: 10.1016/j.phrs.2010.07.010
- Lauchlan, S. C. (1972, Mar). The secondary Mullerian system. *Obstet Gynecol Surv*, 27(3), 133-146. doi: 10.1097/00006254-197203000-00001
- Lazebnik, Y. (2010, Apr). What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer*, 10(4), 232-233. doi: 10.1038/nrc2827
- Lengyel, E. (2010, Sep). Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*, 177(3), 1053-1064. doi: 10.2353/ajpath.2010.100105
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. et Ferrara, N. (1989, Dec 8). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935), 1306-1309. doi: 10.1126/science.2479986
- Levy, L. et Hill, C. S. (2005). Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Target Genes and Distinguishes TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), 8108-8125. doi: 10.1128/mcb.25.18.8108-8125.2005
- Lim, J. et Thiery, J. P. (2012, Oct). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, 139(19), 3471-3486. doi: 10.1242/dev.071209
- Ling, K.-S., Chen, G.-D., Tsai, H.-J., Lee, M.-S., Wang, P.-H. et Liu, F.-S. (2005, 2005/09/01/). Mechanisms Involved in Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 44(3), 209-217. doi: [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(09\)60143-1](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60143-1)
- Ling, L. et Lee, W.-C. (2011, 05/27). TGF-Beta Type I Receptor (Alk5) Kinase Inhibitors in Oncology. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12, 2190-2202. doi: 10.2174/138920111798808257
- Liu, C.-C., Lin, W.-W., Wu, C.-C., Hsu, S.-L., Wang, C.-Y., Chung, J.-G. et Chiang, C.-S. (2018, Sep-Oct). Lauryl Gallate Induces Apoptotic Cell Death through

- Caspase-dependent Pathway in U87 Human Glioblastoma Cells In Vitro. *In vivo (Athens, Greece)*, 32(5), 1119-1127. doi: 10.21873/invivo.11354
- Liu, G., Yang, D., Rupaimoole, R., Pecot, C. V., Sun, Y., Mangala, L. S., . . . Zhang, W. (2015). Augmentation of response to chemotherapy by microRNA-506 through regulation of RAD51 in serous ovarian cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv108. doi: 10.1093/jnci/djv108
- Liu, Q., Qiao, L., Liang, N., Xie, J., Zhang, J., Deng, G., . . . Zhang, J. (2016). The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(9), 1761-1769. doi: 10.1111/jcmm.12851
- Lodish, H., Berk, A. et Zipursky, S. (2000). Tumor Cells and the Onset of Cancer. Dans W. H. Freeman (dir.), *Molecular Cell Biology* (4th edition éd., chap. Section 24.1). New York :
- Loechel, F., Fox, J. W., Murphy, G., Albrechtsen, R. et Wewer, U. M. (2000, Nov 30). ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 278(3), 511-515. doi: 10.1006/bbrc.2000.3835
- Loffek, S., Schilling, O. et Franzke, C. W. (2011, Jul). Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*, 38(1), 191-208. doi: 10.1183/09031936.00146510
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L. et Massague, J. (1993, Jul 2). Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell*, 73(7), 1435-1444. doi: 10.1016/0092-8674(93)90368-z
- Lopez-Guerrero, J. A., Romero, I. et Poveda, A. (2015, Jan). Trabectedin therapy as an emerging treatment strategy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *Chin J Cancer*, 34(1), 41-49. doi: 10.5732/cjc.014.10278
- Loret, N., Denys, H., Tummers, P. et Berx, G. (2019). The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers*, 11(6), 838. doi: 10.3390/cancers11060838
- Luan, N. N., Wu, Q. J., Gong, T. T., Vogtmann, E., Wang, Y. L. et Lin, B. (2013, Oct). Breastfeeding and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*, 98(4), 1020-1031. doi: 10.3945/ajcn.113.062794

- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., . . . Hendrix, M. J. (1999, Sep). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*, 155(3), 739-752. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5
- Marth, C., Lang, T., Koza, A., Mayer, I. et Daxenbichler, G. (1990, 1990/06/15/). Transforming growth factor-beta and ovarian carcinoma cells: regulation of proliferation and surface antigen expression. *Cancer Letters*, 51(3), 221-225. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(90\)90106-8](https://doi.org/10.1016/0304-3835(90)90106-8)
- Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J. et Karlan, B. Y. (2016, Aug 25). Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16061. doi: 10.1038/nrdp.2016.61
- McCluggage, W. G. (2011, Aug). Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology*, 43(5), 420-432. doi: 10.1097/PAT.0b013e328348a6e7
- Meinhold-Heerlein, I., Fotopoulou, C., Harter, P., Kurzeder, C., Mustea, A., Wimberger, P., . . . Sehouli, J. (2016, Apr). The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet*, 293(4), 695-700. doi: 10.1007/s00404-016-4035-8
- Meirson, T., Gil-Henn, H. et Samson, A. O. (2020, Feb). Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. *Oncogene*, 39(9), 2024-2026. doi: 10.1038/s41388-019-1110-1
- Meng, A. X., Jalali, F., Cuddihy, A., Chan, N., Bindra, R. S., Glazer, P. M. et Bristow, R. G. (2005, Aug). Hypoxia down-regulates DNA double strand break repair gene expression in prostate cancer cells. *Radiother Oncol*, 76(2), 168-176. doi: 10.1016/j.radonc.2005.06.025
- Muinao, T., Deka Boruah, H. P. et Pal, M. (2018, Jan 1). Diagnostic and Prognostic Biomarkers in ovarian cancer and the potential roles of cancer stem cells - An updated review. *Exp Cell Res*, 362(1), 1-10. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.018
- Nakamura, M., Miyamoto, S., Maeda, H., Ishii, G., Hasebe, T., Chiba, T., . . . Ochiai, A. (2005, Aug 5). Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(3), 1011-1016. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.010



- Nakano, S., Megro, S.-I., Hase, T., Suzuki, T., Isemura, M., Nakamura, Y. et Ito, S. (2018). Computational Molecular Docking and X-ray Crystallographic Studies of Catechins in New Drug Design Strategies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(8), 2020. doi: 10.3390/molecules23082020
- Narod, S. (2016, Apr). Can advanced-stage ovarian cancer be cured? *Nat Rev Clin Oncol*, 13(4), 255-261. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.224
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. (2020a). Récupéré de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butyl-gallate#section=GHS-Classification>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. (2020b). Récupéré de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dodecyl-gallate>
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. (2020c). Récupéré de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propyl-gallate>
- Negri, A., Naponelli, V., Rizzi, F. et Bettuzzi, S. (2018). Molecular Targets of Epigallocatechin-Gallate (EGCG): A Special Focus on Signal Transduction and Cancer. *Nutrients*, 10(12), 1936. doi: 10.3390/nu10121936
- Newsted, D., Banerjee, S., Watt, K., Nersesian, S., Truesdell, P., Blazer, L. L., . . . Craig, A. W. (2018). Blockade of TGF- $\beta$  signaling with novel synthetic antibodies limits immune exclusion and improves chemotherapy response in metastatic ovarian cancer models. *Oncoimmunology*, 8(2), e1539613-e1539613. doi: 10.1080/2162402X.2018.1539613
- Norquist, B. M., Harrell, M. I., Brady, M. F., Walsh, T., Lee, M. K., Gulsuner, S., . . . Birrer, M. J. (2016, Apr). Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol*, 2(4), 482-490. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5495
- Ogrodnik, M., Salmonowicz, H., Brown, R., Turkowska, J., Średniawa, W., Pattabiraman, S., . . . Kaganovich, D. (2014). Dynamic JUNQ inclusion bodies are asymmetrically inherited in mammalian cell lines through the asymmetric partitioning of vimentin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8049-8054. doi: 10.1073/pnas.1324035111
- Ou, J., Deng, J., Wei, X., Xie, G., Zhou, R., Yu, L. et Liang, H. (2013). Fibronectin extra domain A (EDA) sustains CD133(+)/CD44(+) subpopulation of colorectal cancer cells. *Stem cell research*, 11(2), 820-833. doi: 10.1016/j.scr.2013.05.009

- Page-McCaw, A., Ewald, A. J. et Werb, Z. (2007, Mar). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3), 221-233. doi: 10.1038/nrm2125
- Pan, H., Chen, J., Shen, K., Wang, X., Wang, P., Fu, G., . . . Jin, B. (2015). Mitochondrial modulation by Epigallocatechin 3-Gallate ameliorates cisplatin induced renal injury through decreasing oxidative/nitrative stress, inflammation and NF- $\kappa$ B in mice. *PloS one*, 10(4), e0124775-e0124775. doi: 10.1371/journal.pone.0124775
- Park, J. et Schwarzbauer, J. E. (2014). Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 33(13), 1649-1657. doi: 10.1038/onc.2013.118
- Pasquier, J., Gosset, M., Geyl, C., Hoarau-Vechot, J., Chevrot, A., Pocard, M., . . . Touboul, C. (2018, Feb 19). CCL2/CCL5 secreted by the stroma induce IL-6/PYK2 dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Mol Cancer*, 17(1), 47. doi: 10.1186/s12943-018-0787-z
- Peringode Sivadas, V. (2014). *TGFBR2 (Transforming Growth Factor, Beta Receptor II (70/80kDa))*. Récupéré de <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TGFBR2ID372ch3p24.html>
- Puls, T. J., Tan, X., Whittington, C. F. et Voytik-Harbin, S. L. (2017). 3D collagen fibrillar microstructure guides pancreatic cancer cell phenotype and serves as a critical design parameter for phenotypic models of EMT. *PloS one*, 12(11), e0188870-e0188870. doi: 10.1371/journal.pone.0188870
- Qi, H., Sun, B., Zhao, X., Du, J., Gu, Q., Liu, Y., . . . Dong, X. (2014, Aug). Wnt5a promotes vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition via protein kinase Calpha in epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep*, 32(2), 771-779. doi: 10.3892/or.2014.3229
- Qi, L., Song, W., Liu, Z., Zhao, X., Cao, W. et Sun, B. (2015). Wnt3a Promotes the Vasculogenic Mimicry Formation of Colon Cancer via Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 18564-18579. doi: 10.3390/ijms160818564
- Rady, I., Mohamed, H., Rady, M., Siddiqui, I. A. et Mukhtar, H. (2018, 2018/03/01/). Cancer preventive and therapeutic effects of EGCG, the major polyphenol in green tea. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 1-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2017.12.001>

- Ramus, S. J., Song, H., Dicks, E., Tyrer, J. P., Rosenthal, A. N., Intermaggio, M. P., . . . Gayther, S. A. (2015, Nov). Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst*, *107*(11). doi: 10.1093/jnci/djv214
- Refsgaard, H. H. F., Jensen, B. F., Brockhoff, P. B., Padkjær, S. B., Guldbrandt, M. et Christensen, M. S. (2005, 2005/02/01). In Silico Prediction of Membrane Permeability from Calculated Molecular Parameters. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(3), 805-811. doi: 10.1021/jm049661n
- Riester, M., Wei, W., Waldron, L., Culhane, A. C., Trippa, L., Oliva, E., . . . Birrer, M. J. (2014). Risk Prediction for Late-Stage Ovarian Cancer by Meta-analysis of 1525 Patient Samples. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *106*(5). doi: 10.1093/jnci/dju048
- Riopel, M. A., Ronnett, B. M. et Kurman, R. J. (1999, Jun). Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal-type mucinous tumors: atypical proliferative (borderline) tumors and intraepithelial, microinvasive, invasive, and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol*, *23*(6), 617-635. doi: 10.1097/00000478-199906000-00001
- Roane, B. M., Arend, R. C. et Birrer, M. J. (2019, May 14). Review: Targeting the Transforming Growth Factor-Beta Pathway in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*, *11*(5). doi: 10.3390/cancers11050668
- Rocconi, R., Scalici, J., Barve, M., Manning, L., Wallraven, G., Senzer, N. et Nemunaitis, J. (2018, 06/01). Phase I trial of Vigil® personalized engineered autologous tumor cells (EATC) in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, *149*, 40-41. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.04.089
- Roche, J. (2018, Feb 16). The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel)*, *10*(2). doi: 10.3390/cancers10020052
- Rojas, V., Hirshfield, K. M., Ganesan, S. et Rodriguez-Rodriguez, L. (2016, Dec 15). Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci*, *17*(12). doi: 10.3390/ijms17122113
- Ryu, Y., Jin, L., Kee, H. J., Piao, Z. H., Cho, J. Y., Kim, G. R., . . . Jeong, M. H. (2016). Gallic acid prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through regulation of JNK2 signaling and Smad3 binding activity. *Scientific reports*, *6*, 34790-34790. doi: 10.1038/srep34790

- Sahin, K., Tuzcu, M., Gencoglu, H., Dogukan, A., Timurkan, M., Sahin, N., . . . Kucuk, O. (2010, 2010/08/14/). Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sciences*, 87(7), 240-245. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.06.014>
- Said, N. A. et Williams, E. D. (2011). Growth factors in induction of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cells Tissues Organs*, 193(1-2), 85-97. doi: 10.1159/000320360
- Salazar-Martinez, E., Lazcano-Ponce, E. C., Gonzalez Lira-Lira, G., Escudero-De los Rios, P. et Hernandez-Avila, M. (2002). Nutritional determinants of epithelial ovarian cancer risk: a case-control study in Mexico. *Oncology*, 63(2), 151-157. doi: 10.1159/000063814
- Sawada, K., Radjabi, A. R., Shinomiya, N., Kistner, E., Kenny, H., Becker, A. R., . . . Lengyel, E. (2007, Feb 15). c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion. *Cancer Res*, 67(4), 1670-1679. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1147
- Schaeffer, D., Somarelli, J. A., Hanna, G., Palmer, G. M. et Garcia-Blanco, M. A. (2014). Cellular migration and invasion uncoupled: increased migration is not an inexorable consequence of epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular and cellular biology*, 34(18), 3486-3499. doi: 10.1128/MCB.00694-14
- Schmierer, B. et Hill, C. S. (2007, Dec). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(12), 970-982. doi: 10.1038/nrm2297
- Schultz-Cherry, S., Ribeiro, S., Gentry, L. et Murphy-Ullrich, J. E. (1994, Oct 28). Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. *J Biol Chem*, 269(43), 26775-26782.
- Scott, L. E., Weinberg, S. H. et Lemmon, C. A. (2019). Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 135-135. doi: 10.3389/fcell.2019.00135
- SEER. (2018). *Ovarian Cancer*. Récupéré de <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>
- Seyfried, T. N. et Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*, 18(1-2), 43-73. doi: 10.1615/critrevoncog.v18.i1-2.40

- Shi, Y. et Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- $\beta$ ; Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*, 113(6), 685-700. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00432-X
- Shih Ie, M. et Kurman, R. J. (2004, May). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*, 164(5), 1511-1518. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63708-x
- Shimizu, M., Shirakami, Y. et Moriwaki, H. (2008). Targeting receptor tyrosine kinases for chemoprevention by green tea catechin, EGCG. *International journal of molecular sciences*, 9(6), 1034-1049. doi: 10.3390/ijms9061034
- Singer, G., Stohr, R., Cope, L., Dehari, R., Hartmann, A., Cao, D. F., . . . Shih Ie, M. (2005, Feb). Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol*, 29(2), 218-224. doi: 10.1097/01.pas.0000146025.91953.8d
- Škovierová, H., Okajčková, T., Strnádel, J., Vidomanová, E. et Halašová, E. (2018). Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review). *International journal of molecular medicine*, 41(3), 1187-1200. doi: 10.3892/ijmm.2017.3320
- Société Canadienne du Cancer. (2019). *Vue d'ensemble des statistiques sur le cancer*. Récupéré de <https://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/cancer-statistics-at-a-glance/?region=bc>
- Song, H., Dicks, E., Ramus, S. J., Tyrer, J. P., Intermaggio, M. P., Hayward, J., . . . Pharoah, P. D. (2015, Sep 10). Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J Clin Oncol*, 33(26), 2901-2907. doi: 10.1200/JCO.2015.61.2408
- Sood, A. K., Fletcher, M. S., Coffin, J. E., Yang, M., Seftor, E. A., Gruman, L. M., . . . Hendrix, M. J. (2004, Apr). Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *Am J Obstet Gynecol*, 190(4), 899-909. doi: 10.1016/j.ajog.2004.02.011
- Steeg, P. S. (2016, Apr). Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 16(4), 201-218. doi: 10.1038/nrc.2016.25

- Sundqvist, A., ten Dijke, P. et van Dam, H. (2012, 2012/02/08). Key signaling nodes in mammary gland development and cancer: Smad signal integration in epithelial cell plasticity. *Breast Cancer Research*, 14(1), 204. doi: 10.1186/bcr3066
- Symowicz, J., Adley, B. P., Gleason, K. J., Johnson, J. J., Ghosh, S., Fishman, D. A., . . . Stack, M. S. (2007, Mar 1). Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 67(5), 2030-2039. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2808
- Takai, M., Terai, Y., Kawaguchi, H., Ashihara, K., Fujiwara, S., Tanaka, T., . . . Ohmichi, M. (2014). The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *Journal of ovarian research*, 7, 76-76. doi: 10.1186/1757-2215-7-76
- Tang, H. S., Feng, Y. J. et Yao, L. Q. (2009, May). Angiogenesis, vasculogenesis, and vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 19(4), 605-610. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181a389e6
- Teillet, F., Boumendjel, A., Boutonnat, J. et Ronot, X. (2008, 2008/09/01). Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 28(5), 715-745. doi: 10.1002/med.20122
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. et Jemal, A. (2015, Mar). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2), 87-108. doi: 10.3322/caac.21262
- Tudrej, P., Olbryt, M., Zembala-Nożyńska, E., Kujawa, K. A., Cortez, A. J., Fiszer-Kierzkowska, A., . . . Lisowska, K. M. (2018). Establishment and Characterization of the Novel High-Grade Serous Ovarian Cancer Cell Line OVPA8. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2080. doi: 10.3390/ijms19072080
- Tung, J. J., Tattersall, I. W. et Kitajewski, J. (2012, Feb). Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(2), a006601. doi: 10.1101/cshperspect.a006601
- Wang, H., Fu, J., Xu, D., Xu, W., Wang, S., Zhang, L. et Xiang, Y. (2016). Downregulation of Pygopus 2 inhibits vascular mimicry in glioma U251 cells

- by suppressing the canonical Wnt signaling pathway. *Oncology letters*, 11(1), 678-684. doi: 10.3892/ol.2015.3917
- Wang, J., Man, G. C. W., Chan, T. H., Kwong, J. et Wang, C. C. (2018, 2018/01/01/). A prodrug of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) serves as a novel angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Letters*, 412, 10-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.054>
- Wang, J., Wei, Q., Wang, X., Tang, S., Liu, H., Zhang, F., . . . Luu, H. H. (2016, 2016/03/01/). Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance. *Genes & Diseases*, 3(1), 3-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.01.002>
- Wang, L., Zhang, F., Cui, J. Y., Chen, L., Chen, Y. T. et Liu, B. W. (2018, May). CAFs enhance paclitaxel resistance by inducing EMT through the IL6/JAK2/STAT3 pathway. *Oncol Rep*, 39(5), 2081-2090. doi: 10.3892/or.2018.6311
- Wang, X., Jiang, P., Wang, P., Yang, C. S., Wang, X. et Feng, Q. (2015). EGCG Enhances Cisplatin Sensitivity by Regulating Expression of the Copper and Cisplatin Influx Transporter CTR1 in Ovary Cancer. *PloS one*, 10(4), e0125402-e0125402. doi: 10.1371/journal.pone.0125402
- Wang, Y., Liu, P., Wang, X. et Mao, H. (2017, Jul). Role of Xlinked inhibitor of apoptosisassociated factor1 in vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Mol Med Rep*, 16(1), 325-330. doi: 10.3892/mmr.2017.6597
- Wang, Y., Niu, X. L., Qu, Y., Wu, J., Zhu, Y. Q., Sun, W. J. et Li, L. Z. (2010, Sep 1). Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*, 295(1), 110-123. doi: 10.1016/j.canlet.2010.02.019
- Weaver, A. M. (2006, 2006/04/01). Invadopodia: Specialized Cell Structures for Cancer Invasion. *Clinical & Experimental Metastasis*, 23(2), 97-105. doi: 10.1007/s10585-006-9014-1
- Webb, P. M. et Jordan, S. J. (2017, May). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 41, 3-14. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006
- Wentzensen, N., Poole, E. M., Trabert, B., White, E., Arslan, A. A., Patel, A. V., . . . Tworoger, S. S. (2016, Aug 20). Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *J Clin Oncol*, 34(24), 2888-2898. doi: 10.1200/JCO.2016.66.8178

- Willett, W. C. (2000). Diet and cancer. *Oncologist*, 5(5), 393-404. doi: 10.1634/theoncologist.5-5-393
- World Health Organization. (2018, 6 June 2018). *World health statistics : monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. World Health Organization. Récupéré de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272596/9789241565585-eng.pdf>
- Wu, S., Powers, S., Zhu, W. et Hannun, Y. A. (2016, Jan 7). Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 529(7584), 43-47. doi: 10.1038/nature16166
- Xin, L., Zhao, R., Lei, J., Song, J., Yu, L., Gao, R., . . . Yang, J. (2018, 2019/03/01). SND1 acts upstream of SLUG to regulate the epithelial–mesenchymal transition (EMT) in SKOV3 cells. *The FASEB Journal*, 33(3), 3795-3806. doi: 10.1096/fj.201801728R
- Xu, Y., Li, Q., Li, X. Y., Yang, Q. Y., Xu, W. W. et Liu, G. L. (2012, Feb 23). Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 16. doi: 10.1186/1756-9966-31-16
- Yamaguchi, K., Mandai, M., Toyokuni, S., Hamanishi, J., Higuchi, T., Takakura, K. et Fujii, S. (2008, Jan 1). Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res*, 14(1), 32-40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1614
- Yang, C. S., Sang, S., Lambert, J. D. et Lee, M.-J. (2008, 2008/06/01). Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(S1), S139-S151. doi: 10.1002/mnfr.200700234
- Yang, C. S., Wang, H., Chen, J. X. et Zhang, J. (2014). Effects of Tea Catechins on Cancer Signaling Pathways. *Enzymes*, 36, 195-221. doi: 10.1016/B978-0-12-802215-3.00010-0
- Yang, Z., Sun, B., Li, Y., Zhao, X., Zhao, X., Gu, Q., . . . Wang, Y. (2015, Jun). ZEB2 promotes vasculogenic mimicry by TGF-beta1 induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*, 98(3), 352-359. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.03.030



- Yeung, T.-L., Leung, C. S., Wong, K.-K., Samimi, G., Thompson, M. S., Liu, J., . . . Mok, S. C. (2013). TGF- $\beta$  Modulates Ovarian Cancer Invasion by Upregulating CAF-Derived Versican in the Tumor Microenvironment. *Cancer Research*, 73(16), 5016-5028. doi: 10.1158/0008-5472.Can-13-0023
- Zaman, G. J., Flens, M. J., van Leusden, M. R., de Haas, M., Mulder, H. S., Lankelma, J., . . . et al. (1994, Sep 13). The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19), 8822-8826. doi: 10.1073/pnas.91.19.8822
- Zavadil, J. et Bottinger, E. P. (2005, Aug 29). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, 24(37), 5764-5774. doi: 10.1038/sj.onc.1208927
- Zhang, Q., Hou, X., Evans, B. J., VanBlaricom, J. L., Weroha, S. J. et Cliby, W. A. (2018). LY2157299 Monohydrate, a TGF- $\beta$ R1 Inhibitor, Suppresses Tumor Growth and Ascites Development in Ovarian Cancer. *Cancers*, 10(8), 260. doi: 10.3390/cancers10080260
- Zhang, Y. E. (2009, 2009/01/01). Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Research*, 19(1), 128-139. doi: 10.1038/cr.2008.328
- Zhou, L. et Leung, B. S. (1992, 1992/12/10/). Growth regulation of ovarian cancer cells by epidermal growth factor and transforming growth factors  $\alpha$  and  $\beta$ 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1180(2), 130-136. doi: [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(92\)90061-Q](https://doi.org/10.1016/0925-4439(92)90061-Q)
- Zubair, H., Azim, S., Ahmad, A., Khan, M. A., Patel, G. K., Singh, S. et Singh, A. P. (2017, Mar 3). Cancer Chemoprevention by Phytochemicals: Nature's Healing Touch. *Molecules*, 22(3). doi: 10.3390/molecules22030395
- Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E. et Angiolini, M. (2010, 2010/04/08). Through the "Gatekeeper Door": Exploiting the Active Kinase Conformation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(7), 2681-2694. doi: 10.1021/jm901443h