



HAL
open science

Relation entre Mitochondries et Microtubules dans la résistance au Taxol®: l'implication de la Syntabuline

Morgane Doussaint

► **To cite this version:**

Morgane Doussaint. Relation entre Mitochondries et Microtubules dans la résistance au Taxol®: l'implication de la Syntabuline. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03554503

HAL Id: dumas-03554503

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03554503v1>

Submitted on 3 Feb 2022

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

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

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année : 2021

Thèse n°134

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par Morgane DOUSSAINT

Née le 14/06/1996 à Talence (33)

Le : 09 Décembre 2021

**Relation entre Mitochondries et Microtubules
dans la résistance au Taxol® : L'implication de la
Syntabuline**

Sous la direction de Isabelle PASSAGNE

Membres du jury :

Mr. Arnaud COURTOIS

Mme. Isabelle PASSAGNE

Mr. Daniel PERDIZ

Président

Examineur

Examineur

Remerciements :

Je remercie tout d'abord le Docteur Isabelle PASSAGNE pour avoir accepté d'être ma Directrice de thèse et pour m'avoir aiguillée lors de l'écriture de celle-ci.

Je remercie également le Docteur Arnaud COURTOIS pour avoir accepté d'être le Président du jury pour ma thèse.

Je remercie le Docteur Daniel PERDIZ pour m'avoir encadrée, formée et guidée tout au long de mon stage et pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Je remercie le Docteur Christian POÛS, le directeur de l'équipe « Mécanismes cellulaires et moléculaires d'adaptation aux stress et cancérogenèse » de m'avoir accueillie et permis de travailler au sein de son laboratoire.

Je remercie également tous les membres de l'équipe et les stagiaires avec qui j'ai passé de très bons moments pour m'avoir si bien accueillie et pour avoir répondu à toutes mes interrogations.

Pour finir, je tiens également à remercier le Docteur Clara NAHMIAS et toute son équipe pour m'avoir acceptée sur ce projet et pour avoir toujours été à l'écoute de nos interrogations et nos demandes.

Sommaire :

.....	
Remerciements :	3
Sommaire :	5
Table des figures :	7
Liste des abréviations :	9
Introduction.....	13
Partie I : Contexte Scientifique.....	15
I- Le cancer de l’ovaire :.....	15
1) L’ovaire	16
2) Facteurs de risques.....	17
3) Classification du cancer de l’ovaire	18
4) Schéma thérapeutique	27
II - Cas particulier du Taxol® : un agent stabilisant des microtubules.....	33
1) Les microtubules	33
2) Mitochondrie.....	37
3) Mécanismes d’action du Taxol®	43
4) Mécanismes de résistance au Taxol®	43
Partie II : Etude <i>in vitro</i> de l’Impact de la syntabuline dans résistance au Taxol® des cellules cancéreuses ovariennes	51
Introduction.....	51
Matériel et Méthodes	51
I- Lignée cellulaire.....	51
II- Test de viabilité cellulaire.....	53
III- Dosage de l’ATP	53
IV- Immunofluorescence.....	55
V- Dynamique des MTs	59
VI- Extraction et dosage des protéines	59
VII- Western Blot.....	61
VIII- Statistiques	63
Résultats et discussion	65

I-	Sensibilité au Taxol® des lignées COV318 wt, COV318 shCT et COV318 shSYBU	65
II-	Etude de la production d'ATP dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU	65
III-	Dynamique des mitochondries.....	67
IV-	Etude de la distribution des mitochondries par la technique du micropattern.....	67
V-	Dynamique des MTs	69
VI-	Autophagie	71
VII-	Apoptose	73
VIII-	Surexpression de la syntabuline	73
	Conclusion	75
	Bibliographie :.....	81
	Indexation des sites internet :.....	89
	Annexe :.....	91
	Serment de Galien :.....	95

Table des figures :

Figure 1 : Structure de l'ovaire (CNGOF (2)).....	16
Figure 2 : A. Types histologiques de cancer de l'ovaire ; B. Sous-types histologiques de tumeurs épithéliales communes de l'ovaire (Rojas et al, 2016).....	21
Figure 3 : Caractéristiques des principales tumeurs épithéliales communes de l'ovaire (Prat et al, 2018).....	23
Figure 4 : Images histologiques des 5 principales tumeurs épithéliales de l'ovaire (coloration Hématoxyline-éosine) ; A. Tumeur épithéliale de haut grade séreux ; B. Tumeur épithéliale de bas grade séreux ; C. Tumeur mucineuse ; D. Tumeur endométrioïde ; E. Tumeur à cellules claires (Prat et al, 2018).....	24
Figure 5 : Schéma thérapeutique des Tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire (Oncologik (7)).....	28
Figure 6 : Cibles moléculaires des traitements du cancer de l'ovaire (Rojas et al, 2016).....	29
Figure 7: Le microtubule : Structure (A) et dynamique (B) (Zwetsloot et al, 2018).....	33
Figure 8 : Colocalisation de la syntabuline et des mitochondries dans des neurones de l'Hippocampe ; (A-C) Immunomarquage avec des anticorps spécifiques du cytochrome c mitochondriale (rouge, B) et de la syntabuline (vert, C) et une superposition du marquage (A) ; (A'-C') Zoom sur la région encadrée dans les images A-C (Cai et al, 2005).....	36
Figure 9 : Transport des mitochondries le long des MTs (Rousseau, 2012).....	37
Figure 10 : Structure de la mitochondrie (Khan academy (8)).....	38
Figure 11 : La phosphorylation oxydative (Researchgate (9)).....	42
Figure 12 : Mécanismes de résistance au Taxol® (Das et al, 2021).....	44
Figure 13 : Mécanisme de résistance impliquant la pompe d'efflux P-gp (Das et al, 2021).....	45
Figure 14 : Mode d'action du Taxol® et mécanismes de résistance impliquant la β -tubuline (Das et al, 2021).....	46
Figure 15 : Diagramme en diamant présentant les différents paramètres de la dynamique des MTs amplifiés dans des cellules résistantes ou non au Taxol® (Froidevaux-Klipfel et al, 2015). Ts : cellules témoin sensibles au Taxol® ; Tr : cellules résistantes au Taxol®	48
Figure 16 : Méthode de fabrication des micropattern (Grossier, Goud and Schauer, 2014)	54
Figure 17 : a) Pourcentage de viabilité cellulaire des cellules COV318 wt, COV318 shCT et COV318 shSYBU sur 24h en présence de Taxol® (shSYBU versus shCT) ; b) Proportion de micronoyaux dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol® 5nM (n= 3)	64

Figure 18 : Rapport des concentration (ng/ μ L) d'ATP dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées au Taxol [®] 5 nM pendant 24h sur les concentrations (ng/ μ L) d'ATP dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU non traitées	64
Figure 19 : a) Marquage par Immunofluorescence de TOM-20 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol [®] (5 nM) ; b) Taille (μ m) des mitochondries, rapportés à la taille de la cellule, 300 mitochondries	66
Figure 20 : a) Marquage des micropattern par Immunofluorescence de TOM-20 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol [®] (5 nM) ; b) Pourcentage de surface occupée par les mitochondries rapportée à la taille de la cellule.....	66
Figure 21 : a) Proportion (pourcentage) de temps passé en pause par l'ensemble de la population des MTs ; b) Diagramme en diamant des paramètres de dynamique des MTs ; c) Kymographe de MT d'une cellule de COV318 shCT (gauche) et COV318 shSYBU traitées	68
Figure 22 : a) Marquage sur micropattern par Immunofluorescence de LC3 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol [®] (5 nM) ; b) Nombre de Dots par cellule,; c) Western blot de LC3 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol [®] (5 nM) avec l'actine en témoin de charge (n=2) ; d) Western blot de LC3 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées avec de la Bafilomycine A1 pendant 1h et/ou avec pp242 pendant 2h avec l'actine en témoin de charge et rapport du signal de LC3 II/ LC3 I (n=3)	70
Figure 23 : Werstern Blot de la forme clivée de PARP1 avec l'actine en témoin de charge (n=3)	72
Figure 24 : Marquage par Immunofluorescence de GFP, TOM 20 et α -Tubuline dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU avec une image composite (n=2).....	72

Liste des abréviations :

ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénine Diphosphate

AFP : Alpha-Foeto-Protéine

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

Akt : Protein kinase B

Atg : Autophagy related genes

ATP : Adénine Triphosphate

Bak : Bcl2 Antagonist/Killer

Bax : Bcl2 associated protein X

BCA : Acide bicinchoninique

Bcl2 : B-cell lymphoma 2

BRCA : Breast Cancer

BRIP1 : BRCA1 Interacting Helicase 1

BSA : Sérum albumine de veau

CA-125 : Cancer Antigen 125

CLIP 170 HI : Cytoplasmic Linker Protein of 170kDa domaine H1

CO₂ : Dioxyde de carbone

CTLA4 : Cytotoxic Tumor Lymphocyte Antigen 4

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : diméthylsulfoxyde

Drp1 : Dynamin related protein 1

ECL : Electrochimiluminescence

ErbB : Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide réduite

FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

Fis1 : Fission protein 1

GFP : Green fluorescent protein

GTP : Guanosine Triphosphate

GTPasique : Guanosine Triphosphasique

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HGCS : Cancers de haut grade séreux

Hsp90 : Protéine Chaperonne 90

HRP : Horth Raddish Peroxydase

INCa : Institut National du Cancer

KIF5B : Kinesin-I heavy chain

LC3 : Light Chain3

MDR1 : Multridrug resistance 1

MEK : Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase

Mff : Mitochondrial fission factor

MiD49/59 : Mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa

Mfn1 et 2 : Mitofusin-1 et 2

MTs : Microtubules

mtADN : Acide Désoxyribonucléique mitochondriale

mTORC1 : mammalian Target of Rapamycin complex 1

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduite

NaF : Fluoride de Sodium

NaOV : Orthovanadate de Sodium

NBD : Nucleotide Binding Domains

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPA1 : Optic atrophy type 1

OPTN : Optineurin

p62 : Sequestosome-1

PARP1 : Poly (AND-ribose) polymerase 1

PBS : Phosphate Buffer Saline

PD-1 : Programmed Cell Death-1

PD-L1 : Programmed Cell Death Receptor-Ligand 1

PFA : Paraformaldéhyde

P-gp : P-glycoprotéine

PMSF : Fluorure de Phénylméthylsulfonyl

RIPA : Radioimmunoprecipitation

Ser616 : Sérine 616

Ser637 : Sérine 637

shCT : short airpin contrôle

shSYBU : short airpin SYBU

siARN : small interfering ARN

SVF : Sérum foetal de veau

TBS : Tampon Buffer Saline

TE : Tampon d'extraction

TP53 : Tumor Suppressor p53

Tr : Cellules résistantes au Taxol®

Ts : Cellules sensibles au Taxol®

HRP : Péroxydase

+TIPS : Plus-end microtubule binding proteins

TOM-20 : Translocase of outer membrane 20

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

wt : wild type

Introduction

Si le cancer de l'ovaire est un cancer féminin avec une faible prévalence dans la population générale, il représente néanmoins la première cause de décès par cancer gynécologique. Dans 80-90 % des cas, il s'agit de tumeurs au niveau des cellules épithéliales et dans 75 % des cas des tumeurs de haut grade. Les tumeurs de bas grade se développent plus lentement et sont moins agressives. Celles de haut grade sont à croissance rapide, avec malheureusement un risque élevé de dissémination. Le cancer de l'ovaire est diagnostiqué souvent tardivement avec un diagnostic à un stade avancé dans 75 % des cas, expliquant du coup la mortalité importante de ce type de cancer. De plus, contrairement au cancer du sein, il n'existe pas de politique de dépistage précoce de la maladie qui permettrait d'améliorer le pronostic de ce cancer. Une des problématiques est qu'au stade précoce de la maladie, aucun signe particulier n'est observé ; seulement des symptômes atypiques peuvent être présents, comme une sensation de pesanteur au niveau de l'abdomen, des ballonnements ou une augmentation de sa circonférence. L'échec en termes de développement de stratégies de dépistage efficaces, fait qu'à l'heure actuelle, la stratégie thérapeutique doit être la plus efficace possible. Le traitement actuellement inclut la résection chirurgicale et une polychimiothérapie, à base de sels de platine ou de taxanes. Les facteurs pronostiques sont le stade et le grade histologiques. A un stade très avancé de la maladie (stade IV), la chimiothérapie sera réalisée sans chirurgie car non opérable. Le but est alors de ralentir la croissance des cellules cancéreuses. Malgré ces thérapeutiques agressives, la survie à cinq ans est seulement d'environ 30% pour les stades III ou IV. Le cisplatine en association avec d'autres cytostatiques fait partie du traitement de première intention. Néanmoins, 20 à 30 % des tumeurs présente déjà une résistance primaire au cisplatine, intrinsèque aux caractéristiques de la tumeur. Les autres deviendront résistantes au fil des cures de chimiothérapie. C'est un phénomène de résistance acquise. La chimiorésistance est donc un problème majeur conduisant à une diminution de l'efficacité thérapeutique. Concernant le Taxol[®], bien que son utilisation soit plus récente, des mécanismes de résistance ont été également décrits. Des modifications qualitatives ou quantitatives au niveau tubuline induisent une résistance. En effet, le taux de tubuline polymérisée est de 40% dans une cellule saine alors que dans les cellules résistantes au Taxol[®],

ce taux est seulement d'environ 25%. C'est notamment le cas lors de mutations au niveau des gènes de la tubuline. D'un point de vue mécanistique, le Taxol® a pour action thérapeutique de stimuler la polymérisation de la tubuline et d'empêcher la dépolymérisation. À faible concentration, le Taxol® supprime la dynamique des microtubules et empêche ainsi la formation du fuseau mitotique conduisant à l'apoptose. La syntabuline est une protéine surexprimée dans certains cancers de l'ovaire résistants au Taxol®. Cette protéine permet notamment la distribution des mitochondries dans la cellule. Les mitochondries sont des organites majeurs impliqués dans la synthèse d'ATP, une source d'énergie utilisés par les microtubules (MTs) sous forme de GTP. Or, la dynamique des microtubules est augmentée au cours de la résistance au Taxol®. Les microtubules sont en effet des polymères dynamiques qui oscillent entre des cycles de polymérisation et de dépolymérisation. L'énergie issue de l'hydrolyse du GTP n'est pas essentielle pour la polymérisation mais par contre, elle est nécessaire pour permettre la dépolymérisation. Une des hypothèses expliquant une résistance, est donc que la surexpression de la syntabuline dans les cellules résistantes au Taxol®, permettrait de fournir un apport d'énergie plus important aux microtubules, favorisant ainsi leur dynamique et induiraient ainsi une résistance des cellules cancéreuses au Taxol®.

Ce travail de thèse présenté ici, est dans la continuité de mon stage de Master 2, stage effectué au sein de l'UMR-S 1193 (Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Inserm) sous la direction du Dr. Daniel PERDIZ. Le projet a été réalisé en partenariat avec l'équipe du Dr. Clara NAHMIAS (Institut Gustave Roussy, Inserm U981) qui explore les modulations d'expression de gènes associés à la résistance des cancers. Parmi l'ensemble des gènes explorés, la surexpression du gène SYBU codant pour la syntabuline a été étudiée dans des cancers de l'ovaire résistants au Taxol®.

Cette thèse s'articulera en deux parties : une partie portant sur le contexte scientifique et l'autre plus expérimentale, dont l'objectif principal est de mieux comprendre l'implication de cette protéine dans cette résistance.

Partie I : Contexte Scientifique

Dans cette première partie, nous aborderons les différents facteurs de risques impliqués dans la survenue de cancer de l'ovaire. Pour établir un diagnostic précis, des classifications clinique et histologique ont été mis au point pour permettre une prise en charge thérapeutique optimale.

I- Le cancer de l'ovaire :

Le cancer de l'ovaire est un des cancers les plus fatals chez les femmes (Stewart *et al*, 2019). En général, il n'est pas diagnostiqué avant les phases avancées de la maladie, ce qui en rend le traitement curatif délicat. Ce type de cancer est la 8^{ème} cause de cancer chez la femme. Le nombre de nouveaux cas diagnostiqués, chaque année est proche de 5000 cas par an. Il existe différents types de cancer de l'ovaire, dont le plus répandu est l'épithélial. Il s'agit d'une tumeur solide, kystique touchant la partie en surface de l'ovaire. L'atteinte au niveau de l'ovaire est le plus souvent bilatérale avec des atteintes extra-ovariens au niveau du péritoine. Ces adénocarcinomes représentent 90 % des cancers ovariens. Dans cette classe, on retrouve les cancers de haut grade séreux (HGCS) qui en représente la majeure partie (70% à 80%). Ces HGCS sont des cancers de mauvais pronostic avec 85% des femmes présentant un stade avancé de la maladie et 70% de mortalité à 10 ans (Fujiwara *et al*, 2019). En France, le cancer de l'ovaire est la 4^{ème} cause de mortalité par cancer avec 3479 décès en 2018.

Il ne faut pas oublier que l'ovaire est constitué de différents tissus que sont l'épithélium recouvrant les ovaires, les cellules germinales situées à l'intérieur de l'ovule et le stroma (tissu conjonctif de l'intérieur de l'ovaire) constituant à la fois le corps de l'ovaire et le tissu de soutien des cordons sexuels. Même s'il s'agit de tumeurs plus rares, on peut observer des cancers, au niveau de ces deux tissus dernièrement cités, avec des tumeurs à cellules germinales et des tumeurs du mésenchyme des cordons sexuels.

Les cancers de l'ovaire constituent un groupe très hétérogène, en lien avec les types cellulaires constituant l'ovaire et ses fonctions. La survenue du cancer de l'ovaire est influencée par des

facteurs de risques. Pour établir un diagnostic précis, des classifications clinique et histologique ont été mis au point pour permettre une prise en charge thérapeutique optimale.

1) L'ovaire

L'ovaire est le lieu où se produit l'ovogénèse (The Histology Guide (1), CNGOF (2)). Cet organe a également une fonction exocrine avec la production et la libération d'œstrogènes et de progestérones. Il s'agit d'une structure assez petite, en forme d'amande entouré d'un mésothélium squameux appelé l'épithélium ovarien et qui est remplis d'un tissu conjonctif appelé le stroma (Figure 1). Il est composé d'une zone corticale dans laquelle on retrouve les follicules ovariens entourant les ovocytes et d'une zone médullaire hautement vascularisée.

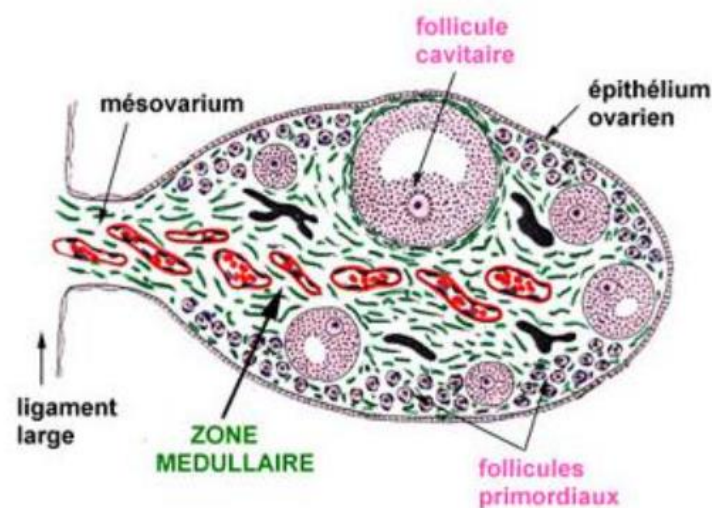


Figure 1 : Structure de l'ovaire (CNGOF (2))

Dans l'ovaire, l'ovocyte et le follicule qui l'entoure vont subir une maturation durant laquelle l'ovocyte va principalement augmenter de taille et les cellules folliculaires vont, entre autres, se diviser et former des couches de cellules qui deviendront la granulosa. Au cours de l'ovulation, lorsque l'ovocyte et le follicule sont matures, l'ovocyte est expulsé et passe dans les trompes de Fallope. Le follicule devient alors le corps jaune et produit des œstrogènes tandis que la granulosa produit de la progestérone. Sans fécondation, le corps jaune dégénère en corps albicans ce qui laisse une petite cicatrice dans l'ovaire.

2) Facteurs de risques

La présence d'une anomalie génétique héréditaire notamment au niveau des gènes *Breast Cancer* (BRCA, BRCA 1 ou 2), est fortement impliqué dans le risque de survenue d'un cancer de l'ovaire. Ces gènes BRCA seraient responsables de 15 à 20 % des cancers de l'ovaire de haut grade. Les gènes BRCA 1 et BRCA 2 jouent un rôle dans la réparation des lésions de l'ADN et la présence d'une mutation est associée à une perturbation de la fonction de réparation. Ainsi, la présence d'une mutation sur ces gènes augmente le risque de cancer de l'ovaire.

D'une manière générale, la gravité du cancer de l'ovaire ainsi que son incidence, sont dépendants de divers facteurs de risques (Stewart *et al*, 2019 ; Momenimovahed *et al*, 2019). Il faut tout d'abord considérer les facteurs génétiques tels que les mutations sur les gènes BRCA 1 et 2, mais également les antécédents familiaux, c'est-à-dire si une ou plusieurs femmes de la famille ont développé ce même cancer. Donc, même si aucune mutation génétique n'a été identifiée au niveau d'une famille, la présence de plusieurs cancers de l'ovaire au sein d'une même famille, représente aussi un facteur de risque. Près 10 % des cancers de l'ovaire se manifestent dans un contexte de prédisposition génétique. Les mutations de ce gène entraînent une probabilité plus importante de développer un cancer de l'ovaire, avec une probabilité supérieure lors de mutations de BRCA 1 par rapport à celles de BRCA 2. L'association de ces mutations de BRCA avec d'autres pathologies telles que le Syndrome de Lynch due également à des mutations de gènes entraîne un risque élevé plus de développer un cancer de l'ovaire tandis que l'association avec d'autres mutations de gènes telles que les gènes *BRCA1 Interacting Helicase 1* (BRIP1) et RAD51 entraîne un risque plus modéré.

Il y a également des facteurs non-génétiques qui entrent en jeu dans ce type de cancer, avec par exemple les antécédents hormonaux ou reproductifs comme l'âge des premières menstruations ou de la ménopause ou les grossesses, et l'utilisation d'hormones exogènes telles que les pilules contraceptives ou les hormones de la ménopause. Le cancer de l'ovaire épithélial, le plus répandu touche majoritairement d'ailleurs des femmes ménopausées. En 2015, 31 nouveaux cas de cancer de l'ovaire en France, auraient été reliés à l'utilisation de traitement hormonaux pour la ménopause. C'est pourquoi actuellement la prescription de ce type de traitement est limitée à 5 ans, incluant une réévaluation annuelle de son intérêt pour

la patiente. L'historique médicale avec les maladies ou interventions concernant les organes reproducteurs ainsi que l'utilisation de certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens ou le diabète sont à prendre en compte.

Selon l'INCa (Institut National du Cancer), l'âge est, comme dans de nombreux cancers, un facteur de risque du cancer ovarien avec un risque maximal entre 75-79 ans.

Enfin, le mode de vie a également un impact dans le développement de ce type de cancer comme la consommation d'alcool et de tabac, l'activité sportive et l'alimentation. Concernant le tabac, il a été montré un lien causal entre le tabagisme actif et un certain type de cancer de l'ovaire, l'adénocarcinome mucineux. Les femmes fumeuses sont 1,5 fois plus à risque de développer ce cancer que les femmes non fumeuses.

3) Classification du cancer de l'ovaire

Si les facteurs de risques ont une incidence sur la gravité de la tumeur, il est important de diagnostiquer exactement le type de tumeur et son avancement. Cela est d'autant plus important qu'en raison d'un diagnostic trop souvent tardif, le pronostic du cancer de l'ovaire est peu favorable. En effet, il est diagnostiqué dans trois quarts des cas, à un stade avancé (stades IIIB à IV). Les circonstances amenant le médecin à diagnostiquer un stade avancé, sont que la patiente se plaint de douleurs abdominales ou pelviennes, d'irrégularités menstruelles, d'une lourdeur abdominale ou suite à la présence d'une masse abdominale, d'une augmentation progressive du volume abdominal avec présence d'une ascite. La découverte peut être fortuite notamment après un toucher pelvien ou lors de consultation pour des troubles digestifs, pollakiurie, perte de poids. Il faut souligner que cette démarche diagnostic doit être réalisée afin de confirmer qu'il s'agit bien d'un carcinome avec une origine ovarienne ou gynécologique. Le diagnostic doit être discriminant avec un carcinome d'origine non gynécologique, secondaire à un cancer autre (pancréas, poumon ...). Pour ce faire différents marqueurs immunohistochimiques peuvent être utilisés en complément.

Pour établir le diagnostic, on utilisera la classification clinique décrite ci-dessous et la classification histologique.

a. Classification clinique

Lors du diagnostic d'un cancer, établir sa localisation précise et son étendu est essentiel. Cela permet de définir le stade de la maladie (Référentiel OncoBN (3) ; Docteur Eric Seban (4)), ce qui permettra de « classer » la tumeur en précoce ou avancée. En effet, il est important de savoir s'il y a eu une extension pelvienne ou locorégionale avec un envahissement des cellules cancéreuses au niveau d'autres zones du petit bassin (pelvis) comme l'utérus, la vessie, le rectum... Dans un stade plus avancé, les cellules cancéreuses peuvent atteindre le péritoine ou les ganglions lymphatiques situés derrière le péritoine. Ce cancer peut envahir des organes plus éloignés comme le foie ou les poumons, avec formation de métastases.

Concernant le cancer de l'ovaire, on utilise la classification de la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) qui en 1994 a défini les différents stades de ce cancer, avec une mise à jour de cette classification en 2014 (Annexe 1).

Il existe 4 stades de la maladie numérotés de I à IV, et représentant l'étendue de la maladie dans le corps :

- Stade I : cancers limités aux ovaires (un ou les deux)
- Stade II : cancers ayant atteint d'autres organes du pelvis (utérus, vessie, rectum...)
- Stade III : cancers qui se sont diffusés en dehors du pelvis, au péritoine ou aux ganglions lymphatiques derrière le péritoine
- Stade IV : métastases à distance (foie, rate et organes situés en dehors de l'abdomen)

Dans cette classification, des sous-catégories exprimées de A à C permettent de préciser l'envahissement des cellules tumorales. Par exemple, le stade IIB correspond à une « tumeur impliquant un ou deux ovaires ou une ou deux trompes de Fallope avec extension pelvienne (au-dessous du rebord pelvien) ou cancer péritonéal primitif » (stade II) avec des « extension et/ou des implants à d'autres tissus pelviens intrapéritonéaux » (stade IIB).

Le stade du cancer est établi, suite à différents examens comme de l'imagerie pour trouver les zones atteintes de l'organe, les éventuelles propagations des cellules tumorales au-delà des zones initiales et la taille de la tumeur.

Le premier examen généralement effectué sont des ultrasons transvaginaux (Shetty, 2019). L'imagerie par ultrasons permet de mettre en avant des motifs spécifiques de groupes de

tumeurs définies. Pour les tumeurs de l’ovaire, on retrouve 5 groupes distincts : les tumeurs à kystes uniloculaires, à kystes solides uniloculaires, à kystes multiloculaires, à kystes solides multiloculaires et les tumeurs solides. Le degré de malignité est ensuite estimé suite à l’aspect morphologique de la tumeur sur l’image donnée par les ultrasons.

Ensuite, il est également possible de réaliser de l’imagerie par contraste abdominale (Sadhev, 2016). Cette technique nécessite l’utilisation d’un moyen de contraste oral qui permet d’opacifier le petit intestin et donc de différencier les lésions luminales des dépôts séreux ou mésentériques. L’acquisition des images se fait pendant 70s après l’injection du moyen de contraste sur une zone de la poitrine à la région inguinale. Cette technique permet également d’observer la dissémination de métastases.

En addition de ces techniques d’imagerie, on utilise le dosage du *Cancer Antigen 125 (CA-125)* qui est un antigène localisé sur la surface de nombreuses tumeurs épithéliales (S.Chi *et al*, 2000). La quantité de cette protéine est augmentée principalement dans les cancers de stade avancé. Il sert à évaluer le pronostic et est le marqueur le plus intéressant dans le suivi du cancer de l’ovaire séreux. Il existe d’autres marqueurs comme l’*Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE)*, qui augmente dans les tumeurs mucineuses ou comme l’*Alpha-Foeto-protéine (AFP)*, qui s’élève dans les tumeurs à cellules germinales. Il faut souligner que leur spécificité est plus ou moins bonne.

Enfin, le diagnostic du stade doit également prendre en compte les résultats histocytologiques (Kemppainen *et al*, 2014). Pour cela, on utilise des échantillons histologiques provenant d’une chirurgie ou de prélèvements guidés par imagerie.

b. Classification histologique

Il est également important de définir le type histologique de la tumeur (Figure 2A) ainsi que le grade pour l’administration d’un traitement par chimiothérapie, cela est réalisé par un examen anatomopathologique (Référentiel OncoBN (3)). Les différents types histologiques font l’objet d’une classification par l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) depuis 2003 qui a été modifiée en 2014 (Annexe Ibis). Elle comprend par exemple les tumeurs épithéliales

communes de type séreux ou sero-papillaire, le type histologique le plus rencontré représentant environ 40 % des tumeurs épithéliales. Les autres sous--types sont : adénocarcinome mucineux, endométrioïde, à cellules claires, à cellules transitionnelles.

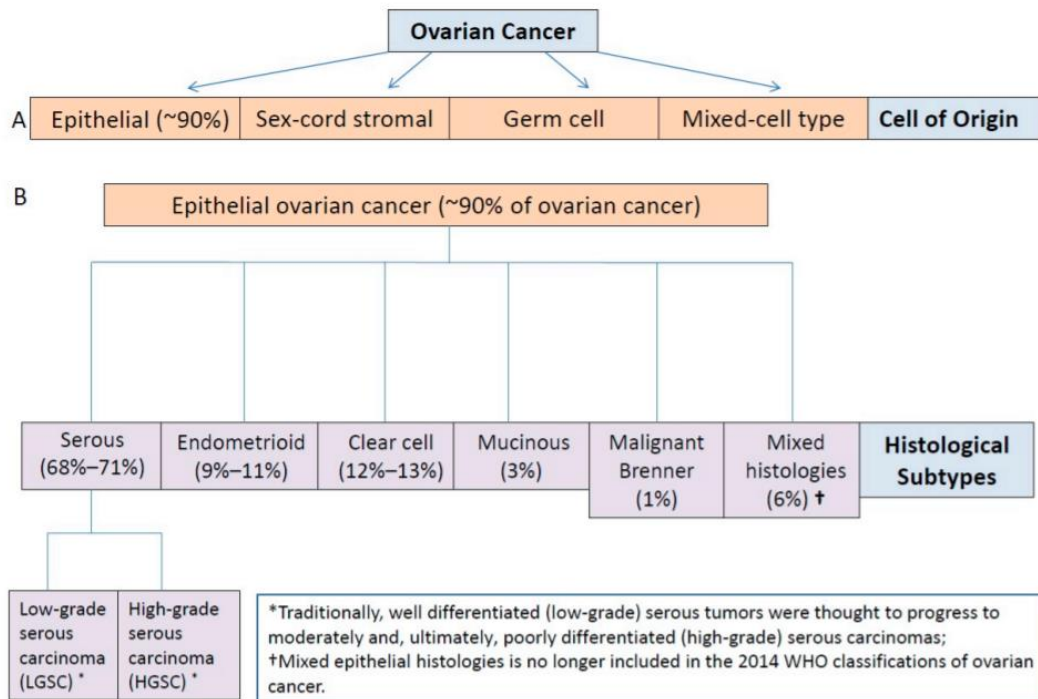


Figure 2 : A. Types histologiques de cancer de l'ovaire ; B. Sous-types histologiques de tumeurs épithéliales communes de l'ovaire (Rojas et al, 2016)

L'examen anatomopathologique se fera donc en déterminant obligatoirement le type histologique selon la classification OMS en vigueur, le grade (degré de différenciation), mais il évalue également la présence ou non d'embolies vasculaires, d'extension tumorale. L'examen se réalise sur des prélèvements tissulaires lors d'une biopsie ou sur des pièces retirés lors d'une chirurgie, sachant que la biopsie n'est pas forcément recommandée sauf si la patiente n'est pas candidate à la chirurgie. Pour la biopsie, il est recommandé de réaliser des prélèvements multiples, à différents points de localisation afin d'avoir un prélèvement représentatif de l'hétérogénéité de la tumeur. Le fait de récupérer un gros volume permettra parallèlement de réaliser une étude exhaustive des marqueurs immunohistochimiques ou génétiques. En effet, cet examen peut être compléter dans certains cas, par une analyse génétique avec recherche d'une mutation des gènes BRCA 1 et 2.

Le grade tient compte de l'apparence des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines et de leur vitesse de développement (Société canadienne du cancer (5)). Cette comparaison est établie suite à l'observation d'un prélèvement de tissu de la tumeur. Elle prend en compte l'état de différenciation des cellules : des cellules bien différenciées similaires aux cellules saines sont des cellules cancéreuses de bas grade. Ces cellules à l'aspect presque normal ont un développement lent et ont moins tendance à se propager. Alors que des cellules cancéreuses de haut grade sont des cellules peu différenciées par rapport à des cellules saines. Contrairement aux cellules de bas grade, ces cellules se développent plus rapidement et ont plus tendance à se propager. Ces dernières représentent le type de cancer de l'ovaire le plus souvent retrouvé avec environ 80% d'incidence et les patients sont souvent diagnostiqués à un stade avancé de la maladie (Prat *et al*, 2018). Dans deux tiers des cas, ces tumeurs sont bilatérales et dans moins de 10% seulement elles restent limitées aux ovaires.

Dans un grand nombre de cas, la gravité est un facteur pronostique avec une valeur prédictive importante en termes de survie ou le risque de rechute et ceci pour les stades précoces. En effet, sa valeur prédictive diminue dans les stades avancés. Pour exemple, le taux de survie à 5 ans est entre 100% à 60% en fonction que la tumeur est bien ou peu différenciée dans les stades IA et IB.

Voyons maintenant les différences histologiques existantes entre ces différents cancers de l'ovaire. D'un point de vue histologique, les tumeurs de l'ovaire peuvent être divisées en 2 groupes : les tumeurs épithéliales communes de l'ovaire et les tumeurs non-épithéliales.

a) Tumeurs épithéliales communes

Comme dit précédemment, les tumeurs épithéliales représentent la majorité des cancers de l'ovaire avec 75 à 80% des cas (Prat *et al*, 2018). Ces tumeurs représentent un groupe hétérogène et sont classées en fonction du type cellulaire impliqué : séreuses, mucineuses, endométrioides, à cellules claires, transitionnelles et squameuses. Il est possible de mettre en avant dans ce groupe 5 types de tumeurs représentant la majorité des cancers épithéliaux de l'ovaire : les tumeurs de haut grade et de bas grade séreux, les tumeurs mucineuses, les tumeurs endométrioides, et les tumeurs à cellules claires (Figure 2B, Figure 3). Ces tumeurs peuvent être divisées en 2 groupes selon leur grade et leur morphologie (Leary *et al*, 2012).

D'abord les tumeurs de Type I qui regroupent les tumeurs de bas grade séreuse, les tumeurs mucineuses, les tumeurs endométrioides, les tumeurs à cellules claires et les tumeurs à cellules transitionnelles. Dans les tumeurs de Type I, on retrouve les HGSC, les carcinosarcomes et les carcinomes indifférenciés.

	High-grade serous	Low-grade serous	Mucinous	Endometrioid	Clear cell
Usual stage at diagnosis	Advanced	Early or advanced	Early	Early	Early
Presumed tissue of origin/precursor lesion	Fallopian tube or tubal neometaplasia in inclusions of ovarian surface epithelium	Serous borderline tumor	Adenoma–borderline–carcinoma sequence; teratoma	Endometriosis, adenofibroma	Endometriosis, adenofibroma
Genetic risk	<i>BRCA1/2</i>	?	?	HNPCC	?
Significant molecular abnormalities	<i>TP53</i> and <i>BRCA</i>	<i>B-RAF</i> or <i>K-RAS</i>	<i>K-RAS</i> and <i>ERBB2</i>	<i>PTEN</i> , <i>CTNBI</i> , <i>ARID1A</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>K-RAS</i> , MI	<i>HNF-1β</i> , <i>ARID1A</i> , <i>PTEN</i> , <i>PIK3CA</i>
Proliferation	High	Low	Intermediate	Low	Low
Response to primary chemotherapy	80%	26%–28%	15%	?	15%
Prognosis	Poor	Favorable	Favorable	Favorable	Intermediate

Figure 3 : Caractéristiques des principales tumeurs épithéliales communes de l'ovaire (Prat et al, 2018)

i. Tumeurs séreuses ou séro-papillaires

Les tumeurs séreuses ou séro-papillaires représentent la majorité des tumeurs épithéliales (Prat et al, 2018). Elles peuvent être divisées entre les tumeurs de bas grade séreux et les tumeurs de haut grade séreux. La taille de ces tumeurs est plus petite que les autres cancers de l'ovaire, en revanche ce type de tumeurs présente une quantité plus importante de maladie extra-ovarie. D'un point de vue histologique, les HGSC sont hétérogènes mais le type classique présente une croissance papillaire et solide avec une fente semblable à un lumen glandulaire (Figure 4A). Les cellules sont de taille intermédiaire et entre elles sont disséminées des cellules géantes mononucléaire avec un noyau proéminent.

De manière moins fréquente, on peut retrouver des tumeurs qui présentent des masses de cellules solides simulant des carcinomes endométrioides ou à cellules transitionnelles. Ces tumeurs ont un nombre plus important de lymphocytes infiltrants la tumeur et un index mitotique plus important.

Les tumeurs de bas grade séreux sont beaucoup moins fréquentes et ne représentent que 5% des carcinomes ovariens (Prat *et al*, 2018). Elles comportent souvent un composant non-invasif de tumeurs séreuses limitées et généralement elles sont une progression de ces tumeurs. Cela dit, la progression d'une tumeur séreuse limitée à une tumeur de bas grade séreux n'est pas fréquente, seulement 6 à 7%. Les tumeurs de bas grade séreux présentent des petites papilles de cellules tumorales avec un petit noyau uniforme dans une quantité variable de stroma variable de stroma hyalin (Figure 4B).

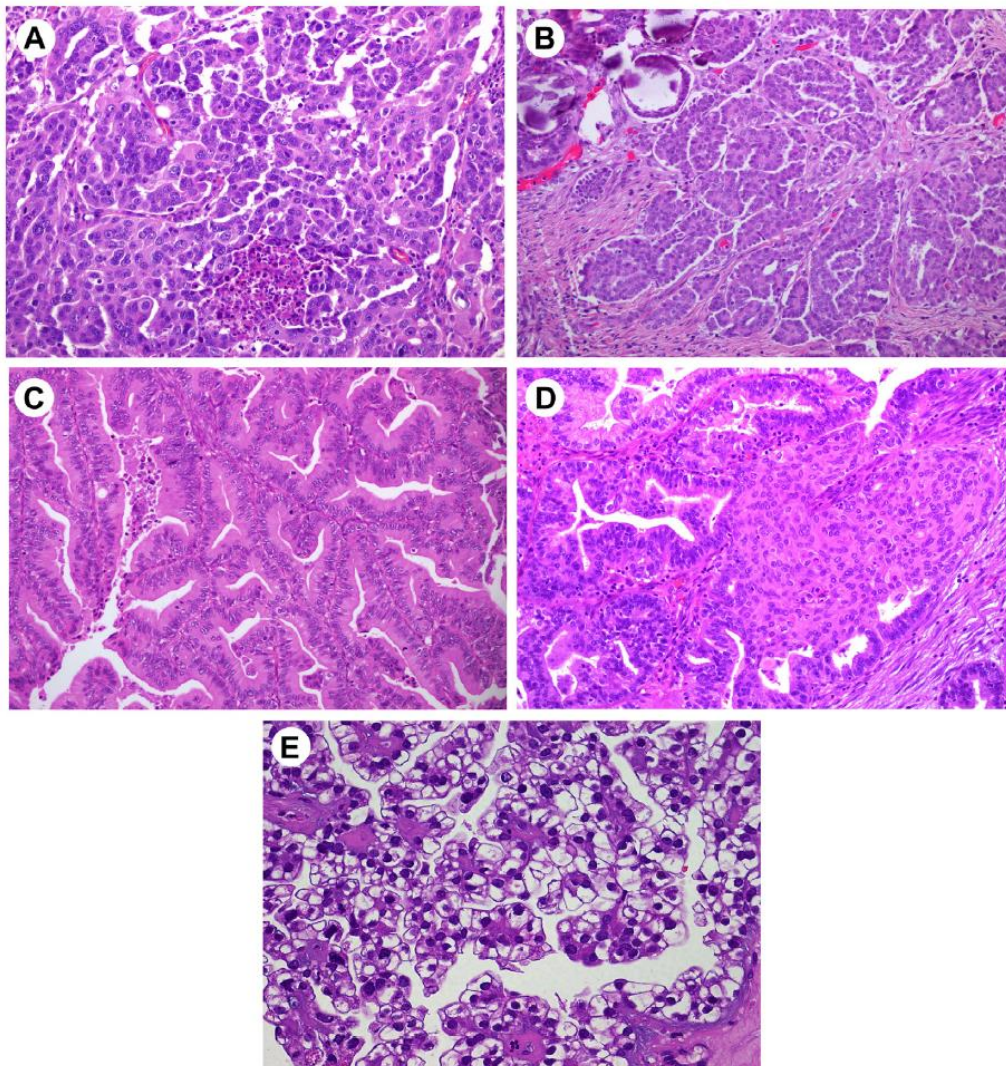


Figure 4 : Images histologiques des 5 principales tumeurs épithéliales de l'ovaire (coloration Hématoxyline-éosine) ; A. Tumeur épithéliale de haut grade séreux ; B. Tumeur épithéliale de bas grade séreux ; C. Tumeur mucineuse ; D. Tumeur endométrioïde ; E. Tumeur à cellules claires (Prat et al, 2018)

ii. Tumeurs mucineuses

Parmi les tumeurs épithéliales, on retrouve également les tumeurs mucineuses (Prat *et al*, 2018). Il s'agit d'un type de cancer de l'ovaire assez rare car il représente 3% à 4% de l'incidence des tumeurs ovariennes. En majorité, les cellules de ces tumeurs ont un aspect semblable aux cellules différenciées de l'estomac ou de la partie supérieure de l'intestin. Ces tumeurs sont généralement confinées à l'ovaire sans implication au niveau de la surface de l'ovaire. En fonction de leur croissance, on retrouve 2 types de tumeurs mucineuses. Tout d'abord, un type expansif sans forcément d'invasion stromale mais montrant des glandes malignes avec peu ou sans intervention stromale (Figure 4C). Et un type infiltratif qui met en avant une invasion stromale évidente par des glandes ou des cellules de manière désordonnée et souvent associée à une réaction stromale desmoplastique.

iii. Tumeurs endométrioïdes

Les tumeurs endométrioïdes, elles comptent pour 10% des cancers de l'ovaire, elles apparaissent plus fréquemment chez les femmes péri-ménopausées et sont diagnostiquées à un stade précoce de la maladie (Prat *et al*, 2018). Ces tumeurs peuvent être bilatérales et/ou associées avec un cancer de l'endomètre. Elles contiennent souvent des zones avec des endométrioses, des adénofibromes endométrioïdes et tumeurs endométrioïdes limitées. Ces dernières sont des adénofibromes avec des métaplasies squameuses et des nécroses centrales (Figure 4D). Une endométriose atypique pourra être le précurseur d'une tumeur endométrioïde.

iv. Tumeurs à cellules claires

Ensuite, les tumeurs de l'ovaire à cellules claires représentent 10% des cancers de l'ovaire (Prat *et al*, 2018). Ces tumeurs sont rarement bilatérales, et tout comme les tumeurs endométrioïdes, elles sont en lien étroit avec l'endométriose. Elles sont principalement des néoplasmes adénofibromateux qui ont un épithélium glandulaire atypique mais sans invasion stromale. Les kystes et les glandes sont bordés de cellules cuboïdales et applaties avec un cytoplasme clair ou éosinophile (Figure 4E). La présence seule de cellules claires ne permet pas le diagnostic histologique de tumeurs à cellules claires, il faut également des papilles

complexes multiples, une membrane basale hyaline au niveau du noyau de la papille, et un corps hyalin.

b) Tumeurs non épithéliales

De manière générale, les tumeurs non-épithéliales de l'ovaire dérivent de types cellulaires spécifiques à l'ovaire comme les cellules germinales, les cellules de la granulosa ou les fibroblastes du stroma (Ray-Coquart *et al*, 2018). Dans ce groupe de tumeurs, on retrouve majoritairement les tumeurs du mésenchyme des cordons sexuels et les tumeurs des cellules germinales mais aussi des cancers d'incidence plus rare comme les tumeurs à petites cellules.

i. Tumeurs des cellules germinales

Les tumeurs des cellules germinales elles apparaissent principalement chez les femmes jeunes et représentent 5% de tous les cancers de l'ovaire et 80% des tumeurs de l'ovaire maligne chez les préadolescents (Gatta *et al*, 2011). Les tumeurs des cellules germinales concernent tout le processus de développement, des cellules germinales indifférenciées aux tissus adultes (Ray-Coquart *et al*, 2018). Par exemple, les tératomes sont les tumeurs des cellules germinales les plus répandus. Elles sont majoritairement composées de tissus matures et sont bénignes.

ii. Tumeurs du mésenchyme des cordons sexuels

Les tumeurs du mésenchyme des cordons sexuels apparaissent majoritairement chez les femmes d'âge moyen et post-ménopausées, et représentent 3 à 5% des tumeurs malignes de l'ovaire et la majorité des tumeurs ovariennes avec des manifestations endocrines (Gatta *et al*, 2011). Ces tumeurs sont très hétérogènes et varient dans leurs capacités à produire des hormones stéroïdes (Ray-Coquart *et al*, 2018). Par exemple les tumeurs des cellules de la granulosa sont oestrogéniques et sont à l'origine de symptômes cliniques très variés en fonction de l'âge de la patiente.

iii. Tumeurs à petites cellules

Les tumeurs de l'ovaire à petites cellules se développent habituellement chez les jeunes femmes et les enfants avec une très faible incidence <1% (Gatta *et al*, 2011). Dans ces tumeurs, on retrouve les tumeurs de l'ovaire à petites cellules de type hypercalcémique qui sont unilatérales. Bien que leur histologie ne soit pas connue, des études suggèrent que ces tumeurs soient des tumeurs rhabdoïdes malignes (Foulkes *et al*, 2014).

4) Schéma thérapeutique

La définition du stade et du grade de la tumeur, va permettre ensuite d'adapter la prise en charge thérapeutique, cela dans le but de traiter au mieux la tumeur.

a. *Traitement de première ligne*

La première étape de la prise en charge thérapeutique standard est une chirurgie de la tumeur (HAS (6)). L'importance de la chirurgie et la technique employée dépend du stade de la tumeur et des projets (grossesse) de la patiente (Figure 5). Dans le cas de désir de grossesse, une chirurgie conservatrice peut être proposée afin de conserver l'ovaire non atteint, la trompe de Fallope et l'utérus. Avec cette intervention chirurgicale, la grossesse est en théorie possible mais il ne faut pas oublier que lors d'un traitement complémentaire par chimiothérapie, la fonction ovarienne peut-être altérée. Dans tous les cas chirurgie aura pour but d'essayer d'éliminer la totalité des cellules cancéreuses afin d'éviter qu'elles migrent vers les organes voisins. Pour les stades IV, l'intérêt de la chirurgie sera discuté selon la taille et l'extension de la tumeur ainsi que la présence de métastases. La chirurgie est en générale suivie d'un traitement chimiothérapeutique sauf pour le stade I mais elle pourra dans certains cas être envisagée. Elle consistera en une association du Paclitaxel (ou Taxol®) à 175mg/m² et du carboplatine à 6AUC, avec une administration toutes les 3 semaines pendant 6 cycles (Fujiwara *et al*, 2019). Le Taxol® est une molécule de la famille des Taxanes (Yang et Horwitz, 2017). Il agit comme poison du fuseau et bloque la mitose et la migration cellulaire. Les concentrations retrouvées dans le sang circulant lors du traitement par Paclitaxel correspondent à environ 50 nM (Liebmann *et al*, 1993). Le carboplatine quant à lui est un

analogue du platine (Ho et al, 2016). Il agit en se liant à la molécule d'ADN ce qui interrompt les activités liées à l'ADN et entraîne la cellule vers l'apoptose. La décision de la chimiothérapie est en accord avec la stadification de la tumeur.

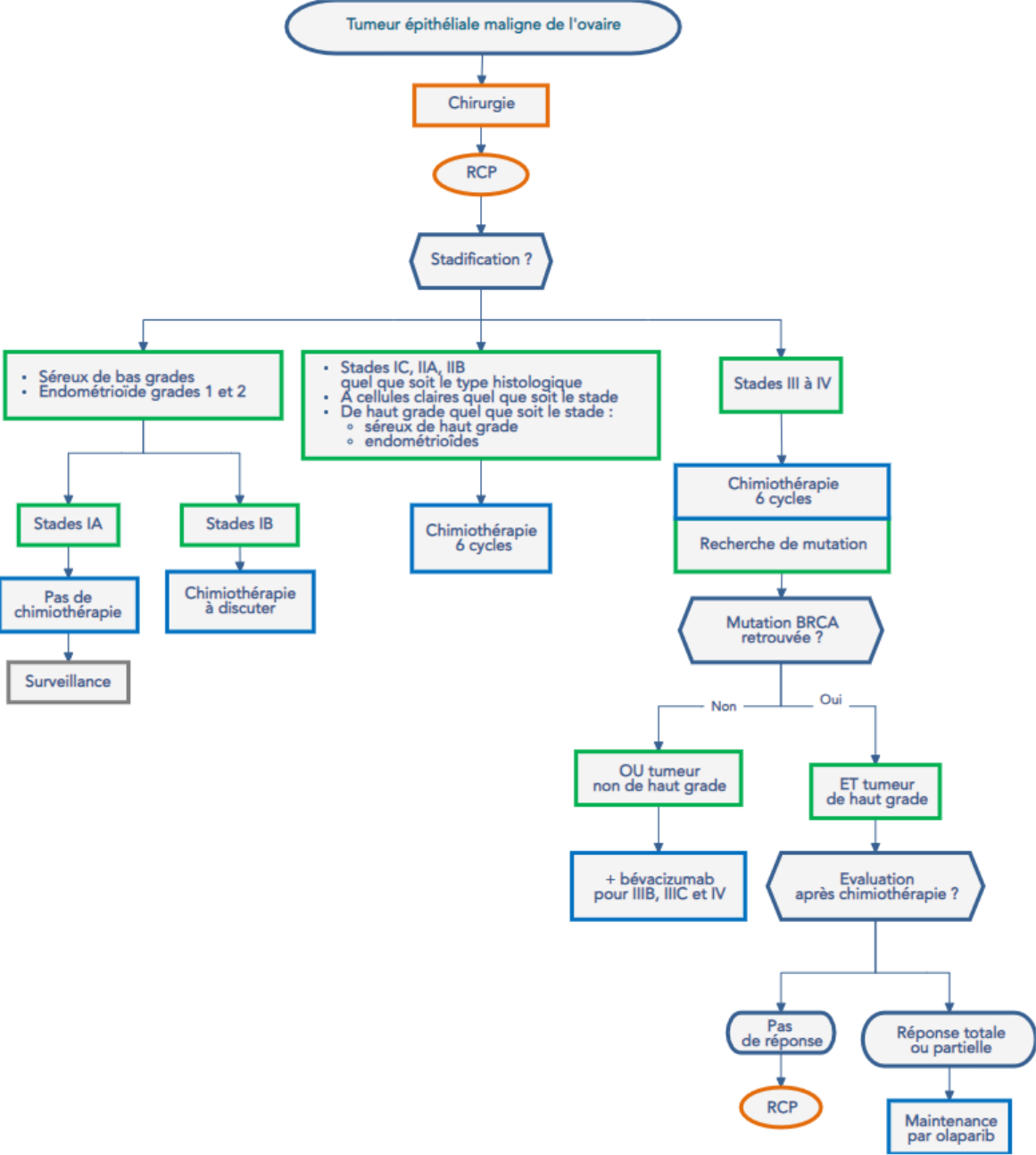


Figure 5 : Schéma thérapeutique des Tumeurs épithéliales malignes de l'ovaire (Oncologik (7))

En cas de non réponse au traitement de première ligne ou de tumeurs de stade avancé, il peut y avoir des associations avec d'autres molécules. Ces molécules vont cibler des voies de signalisation, les gènes ou les molécules impliquées ou perturbées lors d'un cancer (Figure 6).

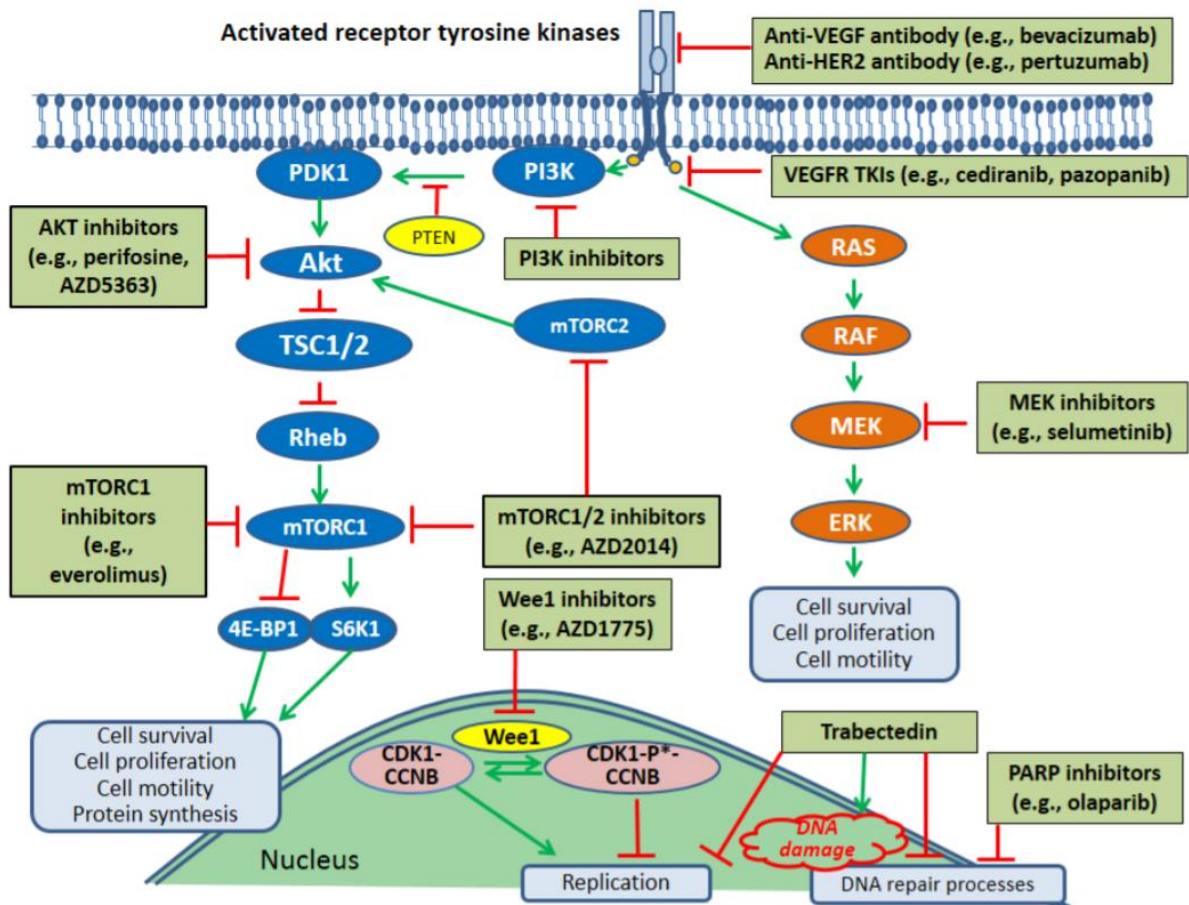


Figure 6 : Cibles moléculaires des traitements du cancer de l'ovaire (Rojas et al, 2016)

b. Molécules associées

i. La voie de l'angiogénèse

L'angiogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Rojas *et al*, 2016 ; Mamhood *et al*, 2020). Ce phénomène est amplifié et détourné dans les tumeurs pour qu'elles puissent obtenir leurs nutriments essentiels. L'angiogénèse est sous la régulation du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) qui est augmenté dans les cancers de l'ovaire et notamment

ceux résistants aux chimiothérapies. Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal anti-VEGF qui inhibe l'action de cette protéine. L'association de cet anticorps avec les traitements de première ligne a montré une augmentation de la réponse du patient au traitement. Le bévaccizumab est indiqué dans les stades avancés (stades III et IV). Après avoir été prescrit en association avec la chimiothérapie classique, il peut être utilisé en monothérapie seul pendant 15 mois maximum. Son utilisation est indépendante du statut positif de la déficience en recombinaison homologue (HRD), défini par une mutation des gènes BRCA1/2 (figure 5).

ii. La voie des PARP

Les *Poly (AND-ribose) polymerase* (PARP) sont une famille de 17 enzymes qui interviennent dans la réparation de l'ADN et la mort cellulaire (Gupta *et al*, 20149 ; Rojas *et al*, 2016). Les inhibiteurs de PARP tel que l'Olaparib, ont montré qu'ils entraînaient une accumulation des cassures de l'ADN et donc la mort cellulaire, ce qui est plus effectif dans les tumeurs où les gènes BRCA1 et BRCA2 sont mutés. En effet, cette inhibition des PARPs entraînent un déficit en recombinaison homologue et donc une mutation sur deux ou plus de gènes avec pour effet final la mort cellulaire. Des données ont montré que l'association de l'Olaparib avec un dérivé du platine aurait un effet synergique pour une meilleure efficacité du traitement. Dans le cas d'une mutation BRCA 1/2, l'Olaparib est un traitement d'entretien actuellement, dans le cancer épithélial avancé (stades FIGO III et IV) de haut grade (figure 5).

iii. Les mutations de TP53

Le *tumor suppressor p53* (TP53) est impliqué dans les réponses au stress telles qu'un déficit en oxygène, l'activation d'oncogènes, ou des réparations de l'ADN (Rojas *et al*, 2016). Cette dernière activité tient compte de son implication dans les voies de mort cellulaire programmée et d'arrêt du cycle cellulaire. Le fort taux de mutation de cette protéine dans les HGSC rendent cette cible particulièrement attractive pour une cible de stratégie thérapeutique. La molécule AZD1775 (Adavosertib) qui est un inhibiteur de Wee1, une kinase du checkpoint du cycle cellulaire en phase G2, et le Kévetrine qui est un activateur de p53, sont actuellement en essais cliniques pour leurs efficacités dans le traitement des tumeurs

solides de l'ovaire, seuls ou en association. Il est également possible de cibler les mutations de TP53 par l'intermédiaire de la protéine chaperonne 90 (Hsp90) qui forme un complexe stable avec la forme mutée de p53. Pour cela, le Ganetespib qui est un inhibiteur de Hsp90 est étudié seul ou en association avec le Paclitaxel.

iv. La voie de PI3K/Atk /mTOR

L'altération de gènes impliqués dans la voie de survie de la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/ *Protein kinase B* (Atk)/*mammalian Target of Rifampycin* (mTOR) a été observée dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire (Rojas *et al*, 2016). L'utilisation de molécules dirigées contre les composants de cette voie peut donc interrompre ce signal de survie. Par exemple, l'utilisation du Temsirolimus un inhibiteur de mTOR a montré une efficacité modérée contre les tumeurs épithéliales de l'ovaire. L'association de cette molécule avec d'autres thérapeutiques pourrait augmenter son efficacité. De plus, PI3K et Atk agissant en amont de mTOR, ils pourraient être une solution plus optimale pour bloquer cette voie dans le traitement des cancers de l'ovaire. Des essais cliniques sur la Périfosine et AZD5363 (Capivasertib) qui sont des inhibiteurs de Atk sont actuellement en cours, en association respectivement avec le docétaxel, un Taxane, et l'Olaparib.

v. La voie de RAS/RAF/MEK/ERK

Le ciblage des composants de la voie de signalisation de RAS/RAF/ *Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase* (MEK)/ *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) n'a pas encore été beaucoup exploré (Rojas *et al*, 2016). Cependant, cela pourrait montrer une utilité vu le nombre important de mutations de KRAS et BRAF dans les tumeurs de type I. Des essais cliniques sont actuellement en cours sur des inhibiteurs de MEK tels que le Binimetinib, le Selumetinib et le Trametinib sur leur efficacité dans le traitement des tumeurs épithéliales de bas grade séreux.

vi. La voie des récepteurs de la tyrosine kinase HER2

Le récepteur de la tyrosine kinase *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) est un récepteur de la famille *Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog* (ErbB). L'augmentation de l'expression de ce récepteur a été détectée dans de nombreuses tumeurs solides comme celles du cancer de l'ovaire (Teplinsky et Muggia, 2014). Il y a des anticorps monoclonaux dirigés contre ce récepteur comme le Trastuzumab ou le Pertuzumab ou des molécules inhibitrices de son action comme le Lapatinib. Les résultats de l'utilisation du Pertuzumab n'ont pas montré dans les essais cliniques de résultats probants en association avec le Paclitaxel et le Carboplatine dans les cancers sensibles au traitement (Rojas *et al*, 2016). Cependant, son association avec la Gemtamicine dans les cancers résistants aux dérivés du platine a montré des résultats intéressants.

vii. Les microARNs

Les microARNs sont de petites séquences d'ARNs codant qui régulent l'expression de gènes comme ceux impliqués dans la croissance des tumeurs (Rojas *et al*, 2016). L'observation de l'expression de ces microARNs dans les tumeurs, comme les cancers de l'ovaire, comparée aux tissus sains laisse à penser qu'ils seraient impliqués dans la croissance des tumeurs. Bien qu'il n'y ait actuellement pas d'essais cliniques sur le sujet, des stratégies thérapeutiques qui utilisent le remplacement ou la suppression de ces microARNs sont étudiées pour améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux.

viii. La voie immunitaire

Le système immunitaire a comme fonction de reconnaître et de détruire les cellules aberrantes prolifératives (Roja *et al*, 2016). Cela est modulé par l'intermédiaire de checkpoints immunitaires localisés sur les lymphocytes T. Dans le cas des cellules tumorales, il y a une augmentation de l'expression d'inhibiteurs de ces checkpoints dans l'environnement de ces tumeurs, ce qui leur permet d'échapper au système immunitaire et de continuer leur développement. Des études sur l'utilisation d'anticorps contre ces checkpoints, sont en cours, comme le nivolumab qui est dirigé contre le *Programmed Cell Death-1* (PD-1) (Rojas *et al*,

2016 ; Ledermann, 2017). L'interaction de ce ligand avec son récepteur le *Programmed Cell Death Receptor-Ligand 1* (PD-L1) qui est surexprimé à la surface des cellules tumorales empêche l'activation des lymphocytes T. D'autres anticorps contre les checkpoints sont en cours d'étude, par exemple ceux contre le *Cytotoxic Tumor Lymphocyte Antigen 4* (CTLA4).

Des approches alternatives dérivées du système immunitaire sont également en cours d'étude dans le traitement du cancer de l'ovaire comme des vaccins, les cytokines, et des thérapies incluant les lymphocytes (Rojas *et al*, 2016).

II - Cas particulier du Taxol® : un agent stabilisant des microtubules

Le Paclitaxel ou Taxol® est une molécule anticancéreuse dont la cible principale sont les microtubules.

1) Les microtubules

Les MTs sont des filaments du cytosquelette qui résultent de l'assemblage de 13 protofilaments pour former une structure cylindrique creuse.

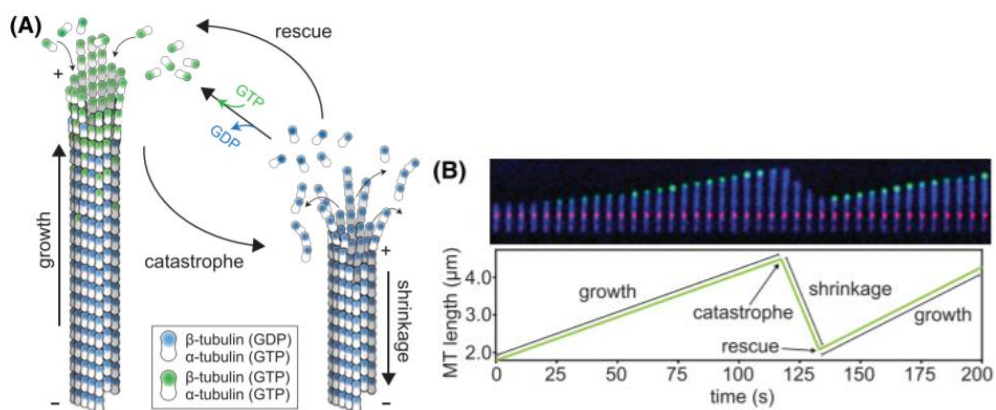


Figure 7: Le microtubule : Structure (A) et dynamique (B) (Zwetsloot et al, 2018)

Chaque protofilament est lui-même formé de dimères de tubuline. Chaque dimère étant formé de l'association d'une sous-unité d' α -tubuline et d'une sous-unité β tubuline (Figure 7A) (Luduena et al, 1977). Les tubulines sont disposées de façon parallèle dans les protofilaments et forment des contacts latéraux, avec les tubulines des protofilaments voisins, assurant ainsi la cohésion des MTs. Les hétérodimères de tubulines possèdent une activité GTPasique et chaque sous-unité possède un domaine fonctionnel, un site de liaison du GTP. La tubuline présente également en partie C-terminale libre, un domaine pouvant être le siège de modifications post traductionnelles et un site entre les deux, impliquée aussi dans la polymérisation des MTs. Ces modifications de la tubuline sont associées à des états dynamiques particuliers. Au cours de la polymérisation des MTs, on assiste à l'hydrolyse du GTP en GDP, situé dans la région N-terminale de la tubuline β . La molécule de GTP au niveau de l' α -tubuline étant non hydrolysable. Cette hydrolyse conduit à un changement de conformation de la tubuline β et ainsi à la dissociation des protofilaments.

Les MTs sont impliqués dans la formation du fuseau mitotique et donc au bon déroulement de la mitose mais aussi dans l'architecture de la cellule ou encore dans de nombreuses de voies de signalisation (Valiron et al, 2001).

a. La dynamique des microtubules

Les MTs sont pourvues d'une dynamique qui est caractérisée par des phases de croissance (*growth*) et des phases de dépolymérisation (*catastrophe* ou *shrinking*) (Figure 7B) (Mitchison and Kirschner, 1984). Lorsqu'un microtubule se dépolymérise, il peut reprendre une dynamique de polymérisation selon un mécanisme de sauvetage (*rescue*). Chaque phase de polymérisation ou de dépolymérisation peut être entrecoupée de pauses suivies soit d'une polymérisation ou d'une dépolymérisation (Zwetsloot *et al*, 2018).

La dynamique de polymérisation nécessite de l'énergie sous forme de Guanosine Triphosphate (GTP) (Mitchison and Kirschner, 1984). Enfin, les MTs sont des filaments polarisés, c'est-à-dire que l'extrémité + en croissance du MT s'oriente depuis son centre nucléateur proche du centre de la cellule vers la périphérie (Akhamanova et Hoogenraad, 2014).

Des molécules ciblant les microtubules et interférant avec cette dynamique ont été développées (Fanale *et al*, 2015). On peut les classer en 2 groupes : les agents stabilisateurs des MTs et les agents déstabilisateurs. Parmi les agents stabilisateurs, on retrouve les Taxanes

comme le Paclitaxel et le Docétaxel, et les Epothilones comme l'Ixabepilone. Ils agissent en se fixant au MTs et en stabilisant la polymérisation ce qui interfère avec la mitose et entraîne la mort cellulaire. Parmi les agents déstabilisateurs des MTs on retrouve la Colchicine et les Vinca alcaloïdes tels que la Vinblastine et la Vincristine. Ils agissent en se fixant également au MTs entraînant ainsi la dépolymérisation du MTs ce qui amène un arrêt du cycle cellulaire et donc la mort cellulaire.

b. Les protéines motrices associées aux microtubules

Il existe des protéines qui sont capables d'interagir avec la tubuline et moduler les propriétés dynamiques des MTs. Certaines peuvent stimuler la vitesse de polymérisation ou renforcent les liaisons entre les tubulines conduisant à la stabilisation des MTs. On les appelle les protéines associées aux microtubules. Ce groupe est très hétérogène. Ces protéines ont pour localisation toute la longueur du MT ou préférentiellement l'extrémité "+" ou l'extrémité "-". Parmi ces protéines, certaines les protéines motrices permettent d'acheminer, des mitochondries, des organites ou des vésicules, le long du microtubule.

a) Généralités

Les MTs permettent donc le transport et la distribution d'organelles telles que les mitochondries dans la cellule *via* des protéines motrices associées aux MTs. Les deux familles de protéines motrices sont la famille des Kinésines et la famille des Dynéines. Les premières sont plus régulièrement impliquées dans le transport vers l'extrémité en croissance du MT donc en périphérie cellulaire tandis que les Dynéines effectuent préférentiellement un transport rétrograde vers le centre de la cellule (Sweeney et Holzbaur, 2018). Les Kinésines KIF1B et KIF5B sont préférentiellement impliquées dans le transport des mitochondries. Cette interaction entre mitochondries et protéines motrices, se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices.

b) La syntabuline

La syntabuline est, dans les cellules neuronales, une protéine adaptatrice impliquée dans le transport de vésicules le long des MTs (Su *et al*, 2004) et également de mitochondries (Cai *et al*, 2005). En effet, les neurones, cellules excitables, nécessitent de grande quantité d'énergie sous forme d'ATP fourni par les mitochondries, afin de maintenir l'homéostasie calcique et le potentiel d'action. Comme le montre la figure 8, le marquage avec des anticorps de la syntabuline et du cytochrome c, une protéine mitochondriale, montre une colocalisation de ces deux protéines. Cela indique une relation entre cette organelle et la syntabuline.

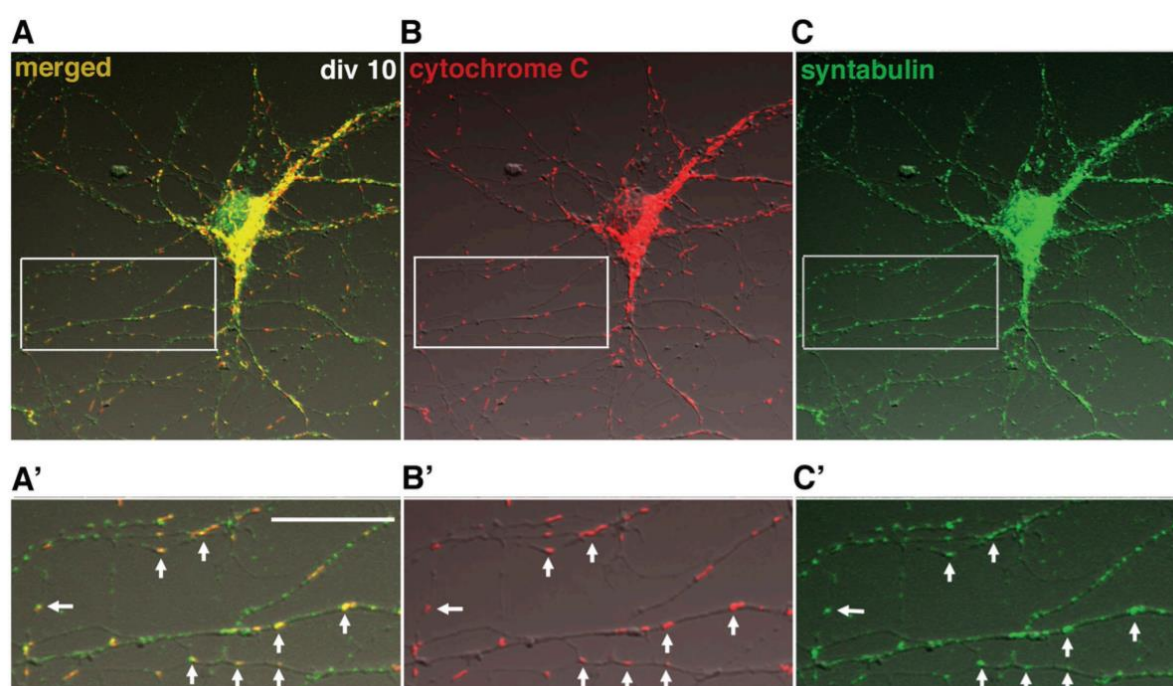


Figure 8 : Colocalisation de la syntabuline et des mitochondries dans des neurones de l'Hippocampe ; (A-C) Immunomarquage avec des anticorps spécifiques du cytochrome c mitochondriale (rouge, B) et de la syntabuline (vert, C) et une superposition du marquage (A) ; (A'-C') Zoom sur la région encadrée dans les images A-C (Cai *et al*, 2005)

De plus, le déplacement des mitochondries par l'intermédiaire de cette protéine se ferait vers l'extrémité en croissance des MTs (Cai *et al*, 2005). Pour cela, la syntabuline assure un lien entre une kinésine, la *Kinesin-I heavy chain* (KIF5B) (Figure 9) et la mitochondrie, en s'associant à sa membrane externe par son extrémité Carboxyl terminale. La répression de l'expression de la syntabuline avec un siARN dans des neurones de l'hippocampe a également mis en avant

une diminution de distribution des mitochondries le long des axones (Cai *et al*, 2005). L'inhibition de l'expression de la syntabuline perturbe le transport mitochondrial antérograde.

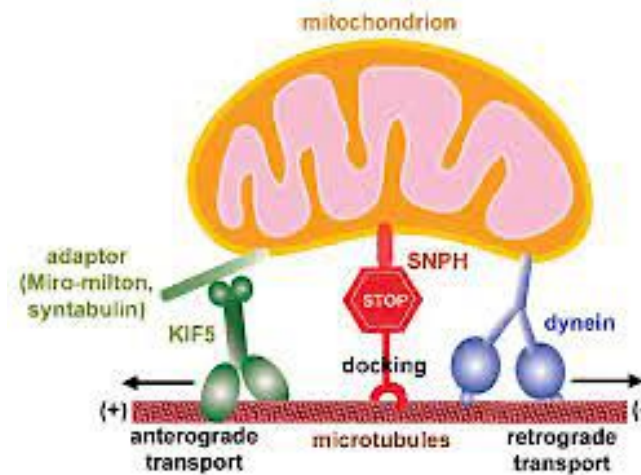


Figure 9 : Transport des mitochondries le long des MTs (Rousseau, 2012)

2) Mitochondrie

La localisation subcellulaire mitochondriale est importante pour le maintien de la polarité, de la morphologie et de l'homéostasie cellulaires. Des altérations du mouvement mitochondrial sont associées à un dysfonctionnement mitochondrial et aux altérations métaboliques observées dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Charcot, le diabète mais également dans le cancer. La dynamique mitochondriale est donc impliquée dans la plasticité métabolique, permettant aux cellules cancéreuses de s'adapter aux conditions environnementales défavorables. La dynamique mitochondriale comprend la biogenèse, la fusion, la fission, le trafic intracellulaire et la mitophagie. Mieux comprendre l'implication de la mitochondrie et de son transport, pourrait permettre d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Intéressons-nous donc aux fonctions de la mitochondrie dans la cellule.

Les mitochondries sont des organites qui possèdent leur propre génome, et sont localisées dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Detmer et Chan, 2007). Elles sont constituées

d'une membrane externe rendue poreuse par des porines qui permettent le passage de molécules, et d'une membrane interne (Figure 10). Les mitochondries sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires comme la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie sous forme d'Adénine Triphosphate (ATP), l'apoptose ou l'autophagie (Nunnari et Suomalainen, 2012). Dans les cellules eucaryotes, les mitochondries se localisent préférentiellement dans des régions de la cellule où le besoin en énergie est important (Detmer et Chan, 2007).

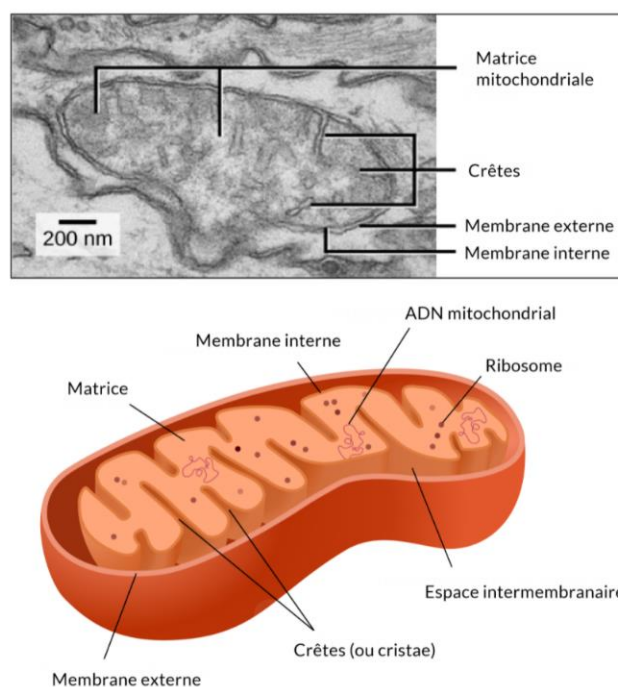


Figure 10 : Structure de la mitochondrie (Khan academy (8))

a. Biogénèse et homéostasie des mitochondries

a) Biogénèse

Pour maintenir son homéostasie, la mitochondrie possède un mécanisme de régulation partiellement indépendant du reste de la cellule. La biogénèse de la mitochondrie permet notamment la production de protéines mitochondriales, à partir de son propre Acide Désoxyribonucléique (ADN) (Meyer *et al*, 2018). Il s'agit de mécanismes coordonnés qui nécessitent une régulation importante stimulée par des facteurs comme l'alimentation, le

stress ou le sport (Meyer *et al*, 2018). En cas de stress par exemple, il y a une augmentation de la biogénèse pour compenser l'activité des mitochondries qui auront été endommagées ou pour augmenter les fonctions mitochondriales plus généralement (Meyer *et al*, 2018). Les mitochondries sont des structures dynamiques qui maintiennent leur homéostasie selon des mécanismes de fragmentation (fission) et de fusion (Karbowsky et Youle, 2003). Leur nombre et leur morphologie changent donc au cours du développement cellulaire, du cycle cellulaire mais aussi à la suite de l'action de toxiques ou de stress.

b) Fission

La fission des mitochondries favorise leur distribution dans le cytoplasme et permet également de faciliter le relargage du cytochrome C et donc d'entraîner l'apoptose (Mishra et Chan, 2014 ; Meyer *et al*, 2018). Les cellules avec un niveau de fission élevé présenteront des mitochondries petites et sphériques, qui sont nommées mitochondries fragmentées. La fission mitochondriale fait intervenir la protéine à activité Guanosine Triphosphatique (GTPasique) *Dynamain related protein 1* (Drp1) et des récepteurs situés sur la membrane externe de la mitochondrie tels que la *Fission protein 1* (Fis1), la Mitochondrial fission factor (Mff), et la *Mitochondrial dynamics proteins of 49 and 51 kDa* (MiD49/59) (Xie *et al*, 2018). L'activation ou l'inhibition de Drp1 peut être notamment modulée par phosphorylation notamment sur deux sites précis, au niveau de la sérine 616 (Ser616) et de la sérine 637 (Ser637). La phosphorylation de la Ser616 entraîne l'activation de Drp1 tandis que la phosphorylation de Ser637 provoque l'effet inverse (Xie *et al*, 2018).

c) Fusion

La fusion des mitochondries permet une production plus efficace d'ATP de sorte à compenser les effets délétères d'un ADN mitochondrial (mtADN) endommagé ou muté par l'apport d'un mtADN fonctionnel venant d'une autre mitochondrie (Meyer *et al*, 2018). Les cellules qui ont un niveau de fusion plus élevé que la fission présentent peu de mitochondries (Xie *et al*, 2018). Celles-ci sont plus longues et interconnectées pour maintenir les fonctions mitochondriales. Ce phénomène de fusion fait intervenir trois protéines à activités GTPasique, l'*Optic atrophy type 1* (OPA 1), et les *Mitofusin-1* et 2 (Mfn1 et 2) (Xie *et al*, 2018 ; Song *et al*, 2009).

b. Autophagie et mitophagie

L'autophagie est un mécanisme physiologique de dégradation des organelles et autres composants cellulaires en les intégrant aux lysosomes (Ashrafi et Schwarz, 2012). Il s'agit d'une voie de survie où en cas de nécessité (par exemple une carence nutritionnelle), la cellule va digérer des composants cellulaires pour en extraire l'énergie nécessaire aux fonctions cellulaires, ou pour dégrader des éléments cellulaires endommagés (Levine et Kroemer, 2008). Il existe trois classes d'autophagies : la microautophagie qui consiste en une invagination de la membrane du lysosome entourant ainsi des portions de cytoplasme, l'autophagie médiée par des chaperonnes qui ont pour spécificité de prendre en charge un substrat au motif spécifique de sorte à le lier au lysosome pour permettre ainsi sa dégradation. Enfin, la troisième classe d'autophagie est la macroautophagie qui est le mécanisme majoritaire. Elle est régulée par des protéines *Autophagy related genes* (Atg) (Glick *et al*, 2010). Une membrane nommée phagophore entoure une portion de cytoplasme ou une organelle formant une structure à double membrane nommée autophagosome. Un des mécanismes de formation de ce dernier fait intervenir la protéine associée au microtubule *Light Chain 3* (LC3B) dont la forme clivée conjuguée à la phosphatidyl-éthanolamine LC3-II est intégrée à la membrane du phagophore. L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome formant un autophagolysosome entraînant la dégradation de son contenu. Contrairement à la forme clivée non conjuguée LC3-I, la forme conjuguée à la phosphatidyl-éthanolamine LC3-II est donc augmentée durant l'autophagie.

La voie de l'autophagie est soumise à une régulation, notamment par l'intermédiaire de la mammalian Target of Rapamycin complex 1 (mTORC1), une sérine/thréonine kinase dont l'activation va inhiber l'induction de l'autophagie (Kim et Guan, 2015). L'induction de l'autophagie à la dégradation des autophagosomes constitue un flux qu'on appelle flux autophagique (Klionsky *et al*. 2008). Il est possible d'influer expérimentalement sur ce flux à l'aide de molécules telles que la Torkinib (pp242) qui est un inhibiteur de mTORC1 et qui induit donc l'autophagie (Hoang *et al*, 2010), ou avec la Bafilomycine A1 qui bloque la dégradation des autophagosomes (Mauvezin et Neufeld, 2015).

La mitophagie est une autophagie sélective de dégradation des mitochondries, c'est-à-dire que l'autophagosome va cibler spécifiquement les mitochondries (Yoo S et Jung Y, 2018). La protéine LC3 est impliquée dans cette sélectivité soit par interaction directe de LC3 avec des récepteurs situés sur les mitochondries provoquant le recrutement de la mitochondrie dans l'autophagosome, soit indirectement par l'intermédiaire d'adaptateurs de LC3 tels que le *Sequestosome-1* (p62) ou encore l'*Optineurin* (OPTN). Ce processus de mitophagie intervient principalement pour réguler la qualité de l'ensemble de la population des mitochondries en éliminant les mitochondries endommagées (Youle et Narendra, 2011).

c. *Production d'ATP*

La production d'énergie sous forme d'Adénine Triphosphate (ATP) est issue du catabolisme des acides gras, des protéines, des amino-acides et des carbohydrates (Nolfi-Donagan et al, 2020). Les produits de ce catabolisme sont utilisés dans le cycle de l'acide tricarboxylique situé au niveau de la matrice mitochondriale. Ce cycle fait intervenir des substrats tels que la Nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH) et la Flavine adénine dinucléotide réduite (FADH₂) qui vont finalement s'engager dans la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 11). Cette chaîne se présente sous la forme de cinq complexes dans lesquels circulent des électrons depuis le Complexe I jusqu'au Complexe IV. En parallèle, des protons sont libérés et accumulés dans l'espace intermembranaire, au dépend de la matrice, créant ainsi un potentiel de membrane mitochondrial. Certains de ces protons réintègrent la matrice mitochondriale via le Complexe V qui est l'ATP Synthase. Ce déplacement de protons va permettre l'addition d'un groupement phosphate à l'adénine diphosphate (ADP) pour former de l'ATP au niveau de ce complexe. Ce mécanisme de production de l'ATP dans la mitochondrie s'appelle la phosphorylation oxydative.

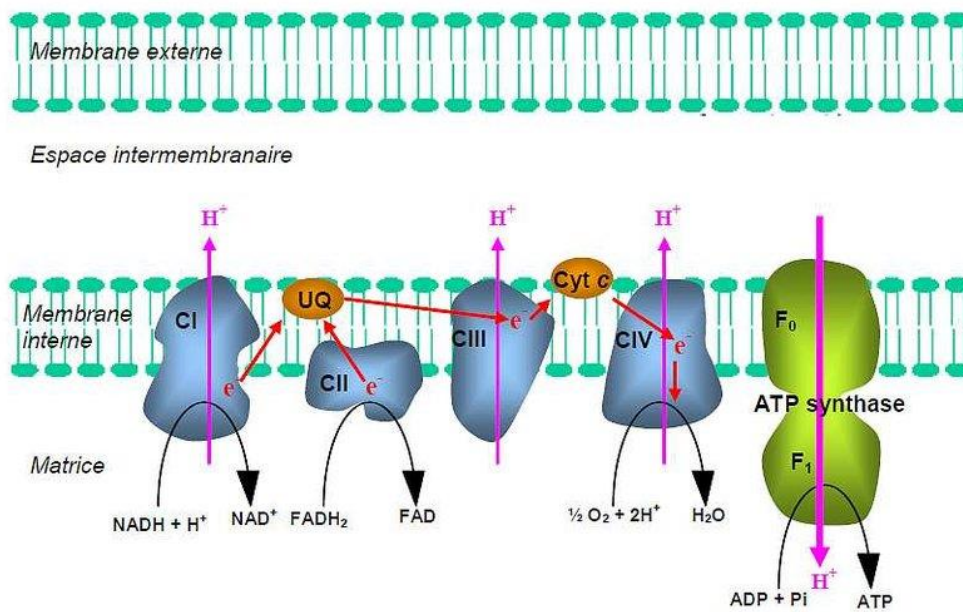


Figure 11 : La phosphorylation oxydative (Researchgate (9))

d. Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée de la cellule (Jeong SY et Seol DW, 2008) qui fait intervenir une famille de protéases, les caspases. L'activation de ces caspases s'effectue selon deux voies : la voie extrinsèque qui met en jeu des récepteurs de mort cellulaire localisés sur la membrane cytoplasmique et la voie intrinsèque dépendante des mitochondries. La mitochondrie est un facteur déterminant dans l'activation de l'apoptose. En effet, des mitochondries endommagées ou un mtADN fragmenté entraîne la cellule vers l'apoptose. L'implication des mitochondries dans l'apoptose est modulée par les membres de la famille *B-cell lymphoma 2* (Bcl2) qui sont des facteurs pro et anti-apoptotiques (Jeong SY et Seol DW, 2008). A l'origine, la protéine pro-apoptotique *Bcl2 associated protein X* (Bax) transloque sur la membrane externe de la mitochondrie et colocalise avec la protéine *Bcl2 Antagonist/Killer* (Bak), une autre protéine pro-apoptotique. Cette colocalisation permet de perméabiliser la membrane externe mitochondriale et d'entraîner le relargage de différentes molécules pro-apoptotiques de la mitochondrie telles que le cytochrome C. Ces molécules vont contribuer à l'activation des caspases et donc au mécanisme de l'apoptose.

Parmi les autres protéines impliquées dans la réponse apoptotique, citons la *Poly (AND-ribose) polymerase 1* (PARP1). L'activation de cette protéine intervient dans la réparation de cassures de l'ADN induites au cours d'un stress. (Soldani et Scovassi, 2002). Cette protéine peut être clivée par la caspase 3 la rendant alors inactive (Kaufmann *et al*, 1993 ; Soldani et Scovassi, 2002). La forme clivée de la protéine PARP-1 est donc un marqueur de l'activation de l'apoptose.

3) Mécanismes d'action du Taxol®

Le Taxol® ou Paclitaxel est un médicament antitumoral utilisé dans le traitement des cancers solides, notamment des cancers du sein et de l'ovaire (Yang et Horwitz, 2017). Cette molécule est classée parmi les agents stabilisants des MTs (Schiff et Horwitz, 1980). En effet, le Taxol® se fixe de manière covalente à la sous-unité β de la tubuline du MT en croissance pour empêcher sa dépolymérisation (Roa *et al*, 1992). Cette stabilisation du réseau de MTs bloque la cellule dans son cycle (particulièrement la phase G2/M) entraînant la formation de cellules polynuclées et la mort de la cellule (Figure 6) (Yang et Horwitz, 2017).

4) Mécanismes de résistance au Taxol®

Normalement en se liant à la β -tubuline, le Taxol® stabilise les MTs et entraîne un blocage en mitose qui va ensuite conduire à la mort de la cellule par apoptose. Comme avec de nombreux agents anticancéreux, la résistance au Taxol® reste un problème important lors de son utilisation clinique. Sa résistance peut être primaire, notamment lié à l'environnement tumorale, mais également acquise au cours du traitement.

Il existe de nombreux mécanismes induisant la chimiorésistance des cellules cancéreuses (Figure 12) (Das *et al*, 2021) :

- Altération du transport cellulaire (influx-efflux)
- Altération du métabolisme du médicament
- Altération quantitative ou qualitative de la cible

- Altération des systèmes de réparation de l'ADN
- Altération de la réponse thérapeutique (altération de l'apoptose, activation de voies survie, altération des « checkpoints » cellulaires ...)

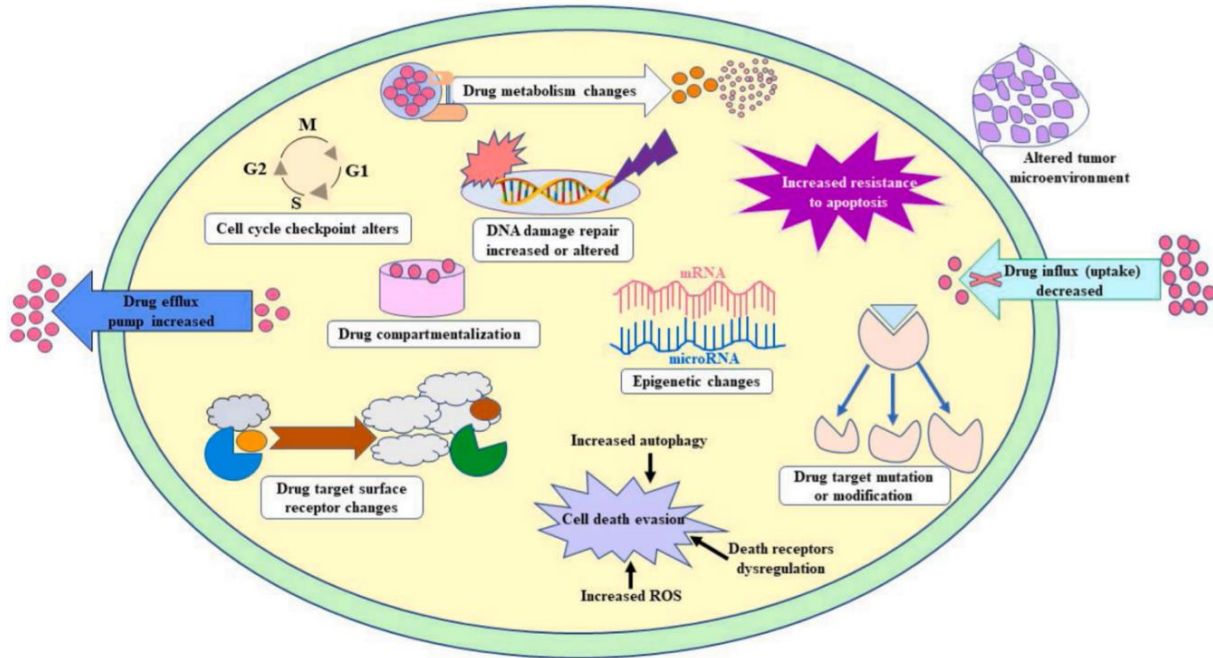


Figure 12 : Mécanismes de résistance au Taxol® (Das et al, 2021)

La résistance au Taxol® est un processus complexe et multifactoriel. Plusieurs mécanismes potentiels peuvent être envisagés. Ceux qui seront abordés dans ce mémoire, sont ceux liés à une augmentation de l'efflux, des altérations des microtubules (altération de la cible) et une diminution de la sensibilité au « signaling » induisant l'apoptose.

a. Mécanismes de résistance impliquant les systèmes d'efflux

La *P-glycoprotéine* (P-gp) ou *Multidrug resistance 1* (MDR1) est une protéine de la famille des *ATP-Binding Cassette* (ABC) (Das et al, 2021). Il s'agit d'un groupe de protéines transmembranaires qui régulent le flux à travers la membrane plasmique de nombreux xénobiotiques. Les P-gp comportent des domaines transmembranaires et des domaines intracytoplasmiques dénommés NBD (Nucleotide Binding Domains). Les domaines NBDs sont les

sites de liaison de l'ATP. Au niveau des domaines transmembranaires, l'assemblage des hélices alpha forme une poche pouvant accueillir un substrat et donc le médicament.

Dans le cas des cancers résistants, son expression est augmentée avec pour conséquence l'augmentation de l'excrétion des médicaments administrés et donc la diminution de leur concentration efficace au niveau de la cible cellulaire. Le Taxol® est un substrat de la P-gp qui l'excrète hors de la cellule (Figure 13). En général, le médicament s'intègre au feuillet externe de la membrane plasmique puis ensuite être transféré au feuillet interne avant de venir dans la région transmembranaire de la P-gp. La fixation de l'ATP sur les domaines NBDs conduit à un changement conformationnel permettant l'expulsion de la molécule vers l'extérieure de la cellule. En effet, la liaison de ces ATPs entraîne une augmentation de l'affinité des NBD pour l'ATP et conduit à une dimérisation des 2 domaines de liaison NBDs. Cela va ainsi déplacer le médicament vers un site de faible affinité orienté vers l'extérieur de la cellule (efflux).

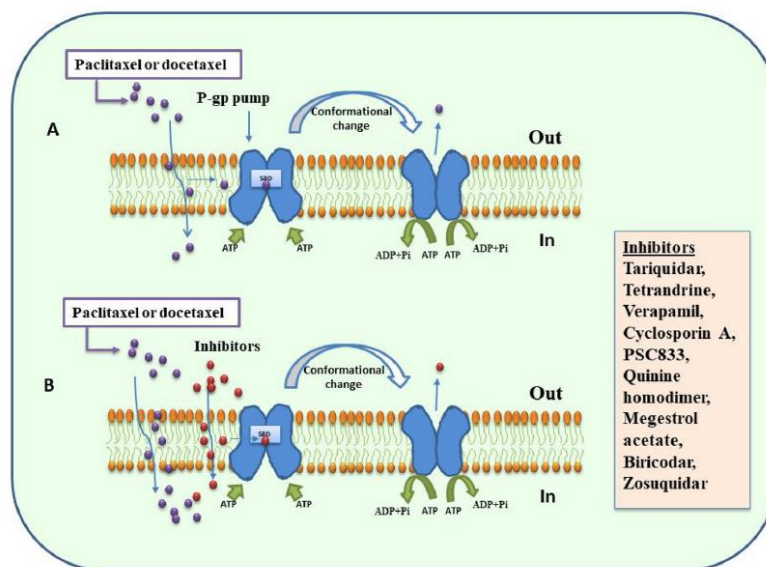


Figure 13 : Mécanisme de résistance impliquant la pompe d'efflux P-gp (Das et al, 2021)

Une corrélation significative a été mise en évidence entre l'augmentation de l'expression de la P-gp dans les cellules cancéreuses et leur résistance accrue au paclitaxel, ainsi qu'à l'étoposide, à l'olaparib, à la doxorubicine et à la vinblastine (Bukowsky *et al*, 2020).

Ce mécanisme est un point clé de la résistance des cancers aux chimiothérapies. Des molécules inhibitrices telle que le Vérapamil sont alors administrées pour contrer l'action de

cette pompe d'efflux. Ces molécules prennent la place des substrats tel que le Taxol® pour être excrétées à leur place (Figure 13) (Das *et al*, 2021).

b. Mécanismes de résistance impliquant les MTs

Comme vu précédemment, les MTs sont la cible des molécules stabilisatrices comme le Taxol®. Pour contrecarrer cet effet, différents mécanismes de résistance ont été proposés (Figure 14).

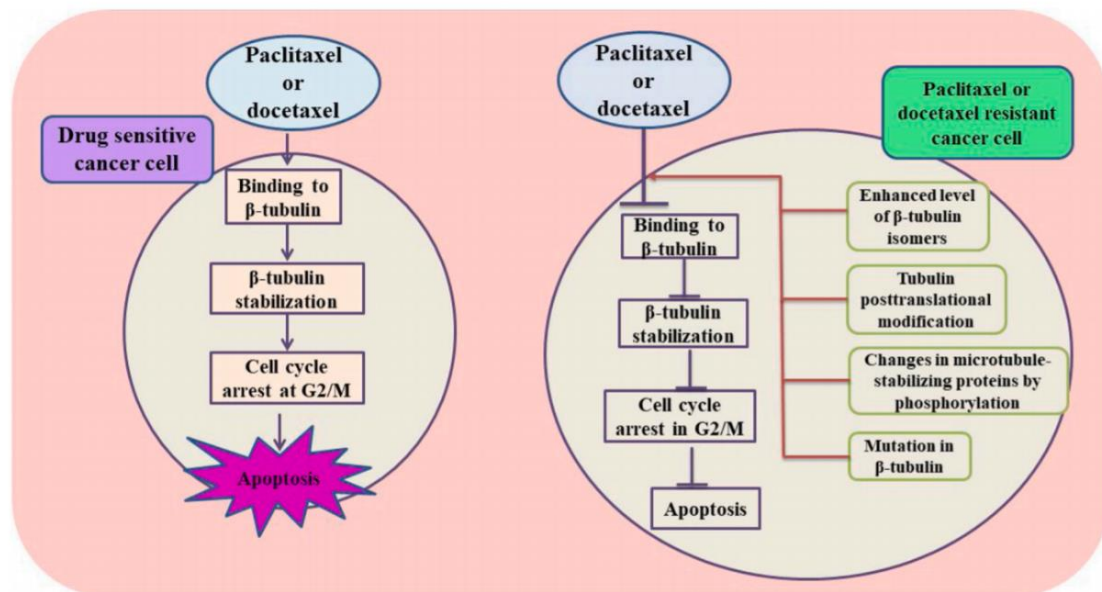


Figure 14 : Mode d'action du Taxol® et mécanismes de résistance impliquant la β -tubuline (Das *et al*, 2021)

L'augmentation de l'expression de la β -tubuline est un premier exemple (Huzil *et al*, 2007). En effet, faisant suite à l'administration du Taxol®, l'Acide RiboNucléique messager (ARNm) de la β -tubuline est stabilisé entraînant une augmentation de la quantité de protéines. En effet, en temps normal, la synthèse de β -tubuline dépend de la quantité de α -tubuline libre présente dans la cellule (et non de celle déjà liée à la β -tubuline). De cette façon, la β -tubuline n'est synthétisée que lorsqu'il y a suffisamment d' α -tubuline disponible. Dans le cas d'un traitement avec du Taxol®, la quantité d' α -tubuline libre baisse brutalement suite à la stabilisation des MTs. Pour maintenir un équilibre dans la cellule, il y a une stabilisation de l'ARNm de l' α -tubuline ce qui a pour conséquence d'augmenter la quantité d' α -tubuline et donc

d'augmenter l'expression de la β -tubuline par la stabilisation de son propre ARNm. Cette augmentation a pour effet de stimuler la croissance des MTs qui ont donc à leur disposition, le matériel nécessaire à leur polymérisation. Cette stimulation de la dynamique des MTs va à l'encontre de l'action du Taxol® et induit donc une résistance à cette molécule.

Citons également les mutations de la β -tubuline qui augmentent l'instabilité des MTs et qui affectent l'interaction du Taxol® avec sa cible (Huzil *et al*, 2007). En effet, les mutations du site de fixation du Taxol® diminuent son affinité avec sa cible et donc son interaction. L'activité du Taxol® est ainsi diminuée puisque sa fixation sur la β -tubuline est altérée. Il y également des mutations de la β -tubuline à des sites plus éloignés du site de fixation du Taxol®. Ces mutations ont pour effet d'augmenter l'instabilité des MTs et ce, en l'absence de médicaments. Elles n'entraîneraient donc pas réellement un phénomène de résistance au Taxol® mais permettraient naturellement de contrer son action par une dynamique déjà augmentée.

Un autre exemple concerne les modifications post-traductionnelles de la tubuline telles que l'acétylation ou la polyamination, où l'ajout de ces groupements sur la tubuline peut impacter la structure et la fonction de la tubuline et/ou des MTs modulant ainsi l'action des molécules agissant sur ces filaments (Song et Brady, 2015). On peut également prendre en compte les phénomènes de tyrosinations. En effet, les sous-unités d' α -tubuline possédant une tyrosine terminale ont une dynamique microtubulaire plus importante. Une augmentation de la tyrosination de l' α -tubuline dans des cellules traitées avec du Taxol® entraîne donc un effet contraire à cette molécule.

Pour finir, un autre mécanisme de résistance impliquant la dynamique des MTs a été proposé au laboratoire (Froidevaux-Klipfel *et al*, 2015). Les MTs des cellules résistantes au Taxol® en présence de ce dernier présentent une augmentation de leurs paramètres de dynamique comme les sauvetages (*rescue*) et les *catastrophes* (Figure 15). Cela signifie qu'il y a un plus grand nombre de passages de la phase de dépolymérisation à la phase de polymérisation (*rescue*) et inversement (*catastrophe*). Cette augmentation de la dynamique est mise en place pour contrer l'action stabilisatrice du Taxol®.

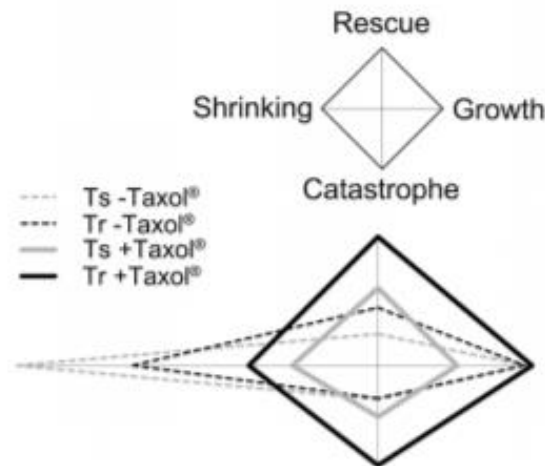


Figure 15 : Diagramme en diamant présentant les différents paramètres de la dynamique des MTs amplifiés dans des cellules résistantes ou non au Taxol® (Froidevaux-Klipfel et al, 2015). Ts : cellules témoin sensibles au Taxol® ; Tr : cellules résistantes au Taxol®

c. Mécanismes de résistance impliquant la voie de l'apoptose

Un autre mécanisme de résistance des cellules au Taxol® est la régulation négative de l'apoptose, un échappement constitutif à l'apoptose. En effet, il y a une régulation par les protéines de la famille de Bcl-2, avec notamment une surexpression des membres anti-apoptotiques de Bcl-2 qui bloque l'action des protéines Bax et Bak, des pro-apoptotiques. Cela diminue donc la libération du cytochrome c et l'engagement des cellules vers l'apoptose via l'absence de formation de l'apoptosome. Une surexpression des protéines de Bcl-2 favorise donc la survie cellulaire et induit ainsi une chimiorésistance (Ibrado *et al*, 1998 ; Schmitt et Lowe 2001, ; Whitaker et Placzek, 2019).

d. Cas clinique : Mécanismes de résistance des HGSC

Concernant spécifiquement la résistance des HGSCs aux chimiothérapies, différents mécanismes ont été mis en avant dans et notamment au Taxol® (Chen *et al*, 2013). Tout d'abord, il y a l'augmentation des systèmes d'efflux par l'intermédiaire des ABC qui permet de protéger le génome des agents mutagènes et la cellule des molécules intervenant sur ses composants comme les microtubules. Ensuite, un autre mécanisme de résistance mis en avant des ces tumeurs est la résistance à l'apoptose de ces cellules tumorales. En effet, il a été

montré que les HGSC étaient résistant au tumor necrosis factor alpha–mediated apoptosis et que la transition épithélio-mésenchymateuse était requise pour la résistance de ces tumeurs au Paclitaxel. The phénomène est obtenue après la répression de gènes qui inactivent p53 et permettent aux cellules de cancer de l’ovaire d’acquérir un phénotype similaire aux cellules souches (Chen *et al*, 2013).

Partie II : Etude *in vitro* de l'Impact de la syntabuline dans résistance au Taxol® des cellules cancéreuses ovariennes

Introduction

L'objectif de ce travail a été de mieux comprendre l'implication de la protéine syntabuline dans la résistance, des cellules de cancer ovarien, au Taxol®. Cette étude a été réalisée sur des modèles *in vitro*. Nous avons utilisé deux lignées humaines de cancer ovarien, l'une exprimant la syntabuline et l'autre non. Le taux de mortalité induite après exposition au Taxol® a été évalué par un test de viabilité cellulaire afin de confirmer dans un premier temps que l'absence d'expression de la syntabuline sensibilise bien les cellules au Taxol®. Nous avons comparé dans un second temps les capacités de production d'ATP entre ces deux lignées, traitées ou pas avec du Taxol®. La distribution dans la cellule et le phénotype des mitochondries ainsi que les paramètres de dynamique des MTs ont été explorés et comparés entre ces deux lignées, en présence ou pas de Taxol®. Nous avons exploré ensuite l'hypothèse d'une implication potentielle de la syntabuline dans les mécanismes de résistance au Taxol® et des mécanismes dépendant des mitochondries telles que l'apoptose et l'autophagie. L'effet de la surexpression de la syntabuline sur le phénotype mitochondrial et sur les MTs, a été également exploré.

Matériel et Méthodes

I- Lignée cellulaire

Afin d'évaluer les conséquences de l'absence d'expression de la syntabuline, les expériences ont été réalisées à partir de la lignée COV318 short airpin SYBU (shSYBU) qui est dérivée de la lignée de cancer de l'ovaire de haut grade séreux COV318 wild type (wt) et qui n'exprime plus cette protéine (Dr Nahmias, Institut Gustave Roussy, Inserm U981). La lignée COV318 shSYBU est comparée à la lignée contrôle dérivée de la lignée COV318 wt, COV318 sh control (shCT).

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®) supplémenté de 10% de sérum fœtal de veau (SVF), de Glutamax et d'antibiotiques (100 U/mL

de pénicilline et 100µL/mL de streptomycine) en présence de 5% de CO₂ à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité. D'un point de vue expérimental, des étapes de mise au point liées à la culture de ces lignées ont été nécessaires.

II- Test de viabilité cellulaire

Le test de viabilité cellulaire au MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich®) a été réalisé avec des plaques 24 puitsensemencées à 100 000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été traitées pendant 24h par une gamme de concentrations de Taxol® (Paclitaxel, Sigma®, T7402) de 0 à 15 nM en présence de Vérapamil (100µM) (Vérapamil hydrochloride, Sigma®, V4629). Les cellules sont ensuite incubées avec une solution de MTT à 0,5mg/mL dissous dans du milieu stock pendant 2h à 37°C. Après aspiration du milieu, les cristaux de formazan formés par l'activité mitochondriale des cellules vivantes ont été dissouts dans du DMSO (diméthylsulfoxyde)(Sigma-Aldrich®). L'intensité de la coloration ainsi obtenue est mesurée par absorption avec un spectrophotomètre fixé à 560 nm et à 620 nm qui est la valeur de référence (mesure l'absorbance du rouge de phénol résiduel). L'absorbance donne une valeur proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

III- Dosage de l'ATP

Le dosage de l'ATP a été réalisé avec le kit ATP Colorimetric/FLuorometric Kit (Sigma-Aldrich®, MAK-190). Pour cela, les cellules ont tout d'abord été traitées avec du Taxol® (5 nM) (+vérapamil 100 µM) pendant 24h puis elles ont été décollées avec de la trypsine et centrifugées dans du PBS pendant 3 min à 1200 rpm. L'équivalent d'un volume de 5 millions de cellules a de nouveau été centrifugé puis le culot a été repris à froid dans 200µL d'ATP Assay Buffer. L'extrait ainsi obtenu a ensuite été filtré sur membrane à froid à 12000 rpm à 4°C et le filtrat a été réparti dans 3 puits (50µL par puit). Une gamme étalon a été réalisée en parallèle à des concentrations de 0 à 4 nmol d'ATP Standard (1mM) par puit. Les échantillons et la gamme sont ensuite incubés avec 50 µL du mix colorimétrique pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Après mesure de l'absorbance à 560 nm, la densité

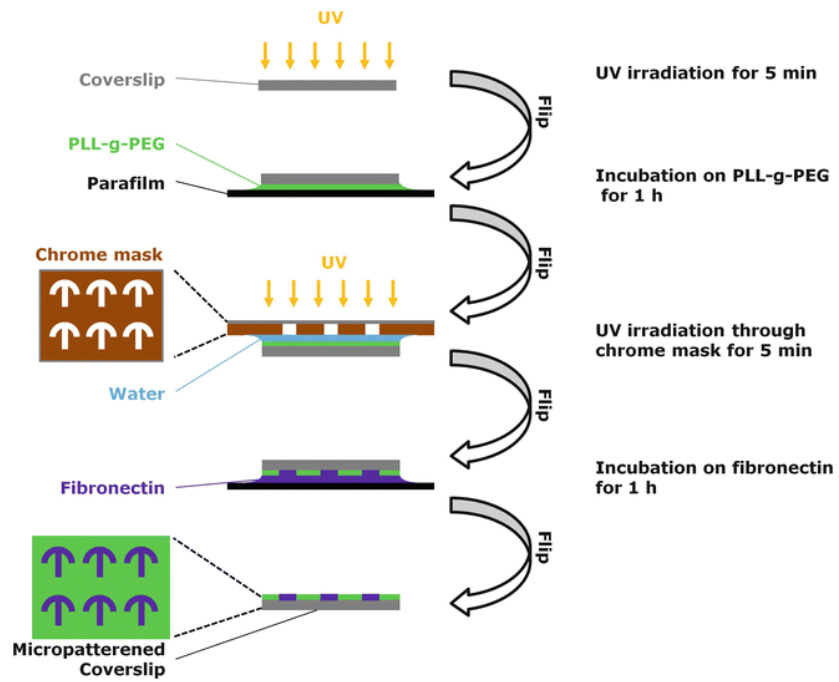


Figure 16 : Méthode de fabrication des micropattern (Grossier, Goud and Schauer, 2014)

optique de nos échantillons ainsi obtenue a été reportée sur la gamme étalon pour en déduire la quantité d'ATP présente dans nos échantillons.

IV- Immunofluorescence

Pour le marquage des mitochondries, un anticorps anti- TOM-20 (BD Biosciences®, 612278) spécifique d'une protéine la *Translocase of outer membrane 20* de la membrane externe est utilisé. Les marquages ont été réalisés sur des lamelles de 18mm de diamètre, placées dans des plaques 12 puits préalablementensemencées avec 150 000 ou 300 000 cellules. Les cellules ont été traitées pendant 24h avec du Taxol® à 5nM (+vérapamil 100 µM) avant d'être fixées avec du Paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 min à température ambiante.

Ce marquage a également été réalisé sur des lamelles de micropattern placées dans des plaques 6 puits etensemencées avec 150 000 cellules. Ces lamelles de micropattern sont des lamelles de 22mm contenant des motifs en flèche de 40 µm qui ont été confectionnées par le Dr Carpi (Institut Curie). Brièvement, les lamelles sont incubées avec du polyéthylène glycol, sur lesquelles on découpe aux UV des motifs à l'aide d'un masque. Elles sont ensuite incubées avec de la fibronectine qui va combler le motif et permettre aux cellules de s'accrocher et de prendre la forme souhaitée (Figure 16). Dans notre cas, les cellules ont été prétraitées pendant 6h avec du Taxol® à 5nM avant d'êtreensemencées sur les lamelles de micropattern, puis traitées pendant 18h supplémentaires avant d'être fixées avec du PFA à 4%.

Après fixation, les cellules ont été perméabilisées par du Triton à 0,1%, pendant 10 min à 37°C puis incubées avec une solution d'anticorps de souris anti-TOM 20 dilué au 1/100^{ème} dans du tampon phosphate (PBS) avec du sérum albumine de veau (BSA) à 1% pendant 1h à 37°C. Les lamelles ont ensuite été lavées au PBS pendant 3x5min puis incubées pendant 45 min à 37°C avec une solution d'anticorps anti-souris Alexa Fluor rouge (Molecular Probes®, A21422). Puis, les lamelles ont de nouveau été lavées 3x5min avec du PBS avant d'être montées sur des lames de microscope avec un liquide de montage Invitrogen™ ProLong™ Gold Antifade+ 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (Invitrogen™, P36930). Le marquage des autophagosomes a été réalisé en utilisant un anticorps de lapin ciblant la protéine LC3 (MBL®, PM036), sur des lamelles de 18mm de diamètre, placées dans des plaques 12 puitsensemencées avec 25 000

à 50 000 cellules. Les cellules ont été traitées pendant 24h avec du Taxol® à 5nM (+vérapamil 100 µM) avant d'être fixées avec du PFA 4% pendant 15 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec du PBS + 0,075% de Saponine + 1% de BSA + 5% de SVF pendant 30 min à température ambiante. L'anticorps anti-LC3 a été dilué au 1/200^{ème} dans du PBS + 0,075% de Saponine + 1% de BSA puis incubé sur les lamelles pendant 1h à 37°C. Puis, 5 lavages consécutifs ont été effectués, 2 avec du PBS + 0,075% de Saponine + 1% de BSA, 1 avec du PBS + 0,037% de Saponine + 0,5% de BSA et 2 derniers avec du PBS. L'anticorps secondaire anti-lapin Alexa Fluor vert (Molecular Probes®, A21206) a été dilué dans la même solution que les anticorps primaires au 1/1000^{ème} puis incubé pendant 1h à 37°C. Par la suite, les 5 même lavages ont été réalisés avant de monter les lamelles sur des lames de microscope avec une solution de Invitrogen™ ProLong™ Gold Antifade + DAPI.

Pour effectuer le marquage des mitochondries, des MTs et de la *Green fluorescent Protein* (GFP), un anticorps de souris anti-TOM20, un anticorps humain anti-α tubuline (UMR-S 1193) et un anticorps anti-GFP de lapin (Abcam®, ab290) ont utilisés respectivement. Les marquages ont été réalisés sur des lamelles de 18mm de diamètre, placées dans des plaques 12 puits préalablementensemencées avec 150 000 cellules. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec du TurboFect™ Transfection Reagent (Thermo Scientific™, R0533) et 0,5 µg/mL de plasmide GFP-SYBU (Dr NAHMIAS, Institut Gustave Roussy). Après 24h, les cellules ont été fixées avec du PFA à 4% pendant 15 min à température ambiante. Après fixation, les cellules ont été perméabilisées par du Triton à 0,1%, pendant 10 min à 37°C puis incubées avec une solution d'anticorps de lapin anti-GFP dilué au 1/200^{ème} dans du PBS avec du BSA à 1% pendant une nuit à 4°C. Les lamelles ont ensuite été lavées au PBS pendant 3x5min puis incubées pendant 45 min à 37°C avec une solution d'anticorps anti-lapin Alexa Fluor vert (Molecular Probes®) au 1/1000^{ème}. Par la suite les lamelles ont été incubées avec une solution d'anticorps de souris anti-TOM 20 au 1/100^{ème} et d'anticorps humain anti-α tubuline au 1/250^{ème} dans du PBS avec du BSA à 1% pendant 1h à 37°C. Après un rinçage au PBS pendant 3x5 min, les lamelles ont été incubées pendant 45 min à 37°C avec une solution d'anticorps anti-souris bleu au 1/50^{ème} et d'anticorps anti-humain rouge au 1/1000^{ème}. Les lamelles ont été lavées 3x5min avec du PBS avant d'être montées sur des lames de microscope avec un liquide de montage Invitrogen™ ProLong™ Gold Antifade+ DAPI.

V- Dynamique des MTs

La dynamique des microtubules a été mesurée en ensemençant préalablement 75 000 cellules sur des lamelles carrées de 18mm dans des boîtes de 35mm de diamètre. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec du TurboFect™ Transfection Reagent et 0,8 µg/mL de plasmide exprimant la protéine *Plus-end microtubule binding proteins Cytoplasmic Linker Protein of 170kDa domaine H1 – Green fluorescent Protein* (+TIPS CLIP 170 HI-GFP). Cette protéine qui présente la caractéristique d'évoluer sur l'extrémité en croissance du MT permet d'observer la dynamique de ce filament. Après 24h, les cellules ont été traitées avec du Taxol® (5 nM) (+vérapamil 100 µM) pendant encore 24h puis des séquences d'évolution de la protéine GFP-CLIP 170 sur cellules vivantes ont été enregistrées au microscope (x40). Les paramètres de la dynamique des microtubules (vitesse de croissance et de décroissance, nombre de pauses, de catastrophes et de sauvetages) ont ensuite été évalués à partir du logiciel ImageJ au moyen de Kymographes (enregistrement graphique des mouvements).

VI- Extraction et dosage des protéines

500 000 à 10⁶ cellules sont ensemençées dans des boîtes de 60 mm de diamètre, puis traitées avec du Taxol® (5 nM) (+vérapamil 100 µM) pendant 24h. Après rinçage des cellules au PBS, les protéines ont été extraites avec du tampon d'extraction (TE) 2X par grattage. Les échantillons sont chauffés pendant 5min à 100°C puis centrifugés à 1200g.

Pour l'exploration du flux autophagique, 500 000 cellules sont ensemençées dans des boîtes de 60 mm de diamètre, avant d'être traitées avec du pp242 (Tochris®, 4257) (1 µM) pendant 2h, ou de la Bafilomycine A1 (Tochris®, 1334) (100 nM) pendant 1h ou avec du pp242 (1 µM) pendant 2h dont 1h avec de la Bafilomycine A1 (100 nM). L'extraction des protéines a été ensuite réalisée sur la glace, après rinçage des cellules au PBS froid pendant 5 min et addition de 180 µL d'un tampon de Radioimmunoprecipitation (RIPA) supplémenté de Fluorure de Sodium (NaF) (0,1 M) au 1/1000^{ème}, d'Orthovanadate de Sodium (NaOV) (1 M) au 1/1000^{ème}, de Fluorure de Phénylméthylsulfonyl (PMSF) (0,2 M) au 1/200^{ème}, et de Benzamidine (0,2 M) et Leupeptine (2 mg/mL) au 1/200^{ème}. Après incubation de 10 à 30 min sur la glace, les cellules ont été grattées et transférées dans des eppendorfs de 1,5 mL pour une centrifugation à froid

à 13 rpm de 10 min. Enfin, il y a transfert du surnagent dans des nouveaux eppendorfs de 1,5 mL. La quantité de protéines contenue dans chaque échantillon a ensuite été obtenue par dosage colorimétrique selon la méthode de l'acide bicinchoninique (kit Pierce™ BCA Protein Assay) (Thermo Scientific®, 23225). La quantité de protéines contenue dans nos échantillons a été déduite de la gamme étalon réalisée à partir de BSA.

VII- Western Blot

Les échantillons ont été préparés en ajoutant du TE 4X aux extraits protéiques. Les gels de bisacrylamide ont été réalisés à un pourcentage de 7% pour séparer la protéine PARP1 (116 kDa) et son produit clivé (89 kDa) et à 15 % pour séparer la β -actine (43 kDa) et les deux formes de la protéine LC3 (LC3-I 18 kDa et LC3-II 14 kDa). La migration des échantillons se fait dans un tampon de migration 1X pour électrophorèse à 110V pendant environ 2h. Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à 0,1 μ m dans un tampon de transfert à 1X sous un courant de 110V pendant 1h30 à froid. La membrane est ensuite saturée avec du Tampon Buffer Saline (TBS)-Tween 0,1% supplémenté avec 5% de lait en poudre pendant 1h à température ambiante et sous agitation orbitale. Différentes solutions d'anticorps sont réalisées dans du TBS-Tween 0,1% + 5% Lait à des dilutions de 1/1000ème pour les anticorps de lapin anti-LC3 (Cell Signaling Technology®, 4108S) et anti-PARP1 (Cell Signaling Technology®, 9542), et 1/10000ème pour l'anticorps de souris anti- β actine couplé avec une Horth Raddish Peroxydase (HRP) (Santa Cruz Biotechnology®, sc-47778 HRP). Les membranes ont été hybridées avec ces anticorps pendant la nuit sous agitation à 4°C puis rincées pendant 1h sous agitation orbitale dans du TBS-Tween 0,1%. Les dilutions d'anticorps secondaire de lapin (Ozyme) et de souris (Ozyme) couplés à la peroxydase ont été réalisés au 1/1000ème dans une solution de TBS-Tween 0,1% + 5% lait. Après 1h d'hybridation des membranes à température ambiante sous agitation, les membranes ont été rincées pendant 1h sous agitation orbitale à température ambiante. Le signal de luminescence est ensuite révélé par ajout du réactif électrochimoluminescence (ECL) (Thermo Scientific®, 32209) et exposition des membranes sur film radiographique.

VIII- Statistiques

Les mesures de la viabilité cellulaire au MTT ont été réalisées en triplicat sur 3 expériences indépendantes (n=3). Après s'être assuré de la normalité des distributions, une analyse de variance à deux facteurs a été réalisée pour évaluer la différence de sensibilité au Taxol® entre les lignées COV318 shCT et COV318 shSYBU. Les résultats de la production d'ATP n'ont pu être réalisés que sur deux expériences (n=3) du fait de la mise au point expérimentale nécessaire et de la quantité de réactif disponible dans le kit. Le phénotype de fragmentation a été exploré en calculant la longueur des mitochondries pour chaque cellule au moyen du logiciel ImageJ. Les résultats de quantification sur trois expériences indépendantes sont présentés sous la forme d'une boîte à moustache représentant la dispersion des tailles des mitochondries pour l'ensemble des cellules et pour chaque condition. Les longueurs d'environ 300 mitochondries ont été calculées par condition. La moyenne des longueurs des populations a été comparée entre chaque condition au moyen du test paramétrique t de Student. La distribution des mitochondries sur micropattern par Immunofluorescence a été étudiée sur 1 à 2 expériences indépendantes de 20 cellules chacune. Les résultats de la dynamique des MTs ont été obtenus à partir de 3 à 4 expériences indépendantes de 4 à 5 cellules chacune pour un total de 20 MTs par condition. La quantification des « dots » de LC3 par Immunofluorescence a été réalisée au moyen du logiciel ImageJ sur 3 expériences indépendantes (n=3) et 20 cellules chacune. Les résultats de Western Blot ont été obtenus à partir de 2 à 3 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPadprism®.

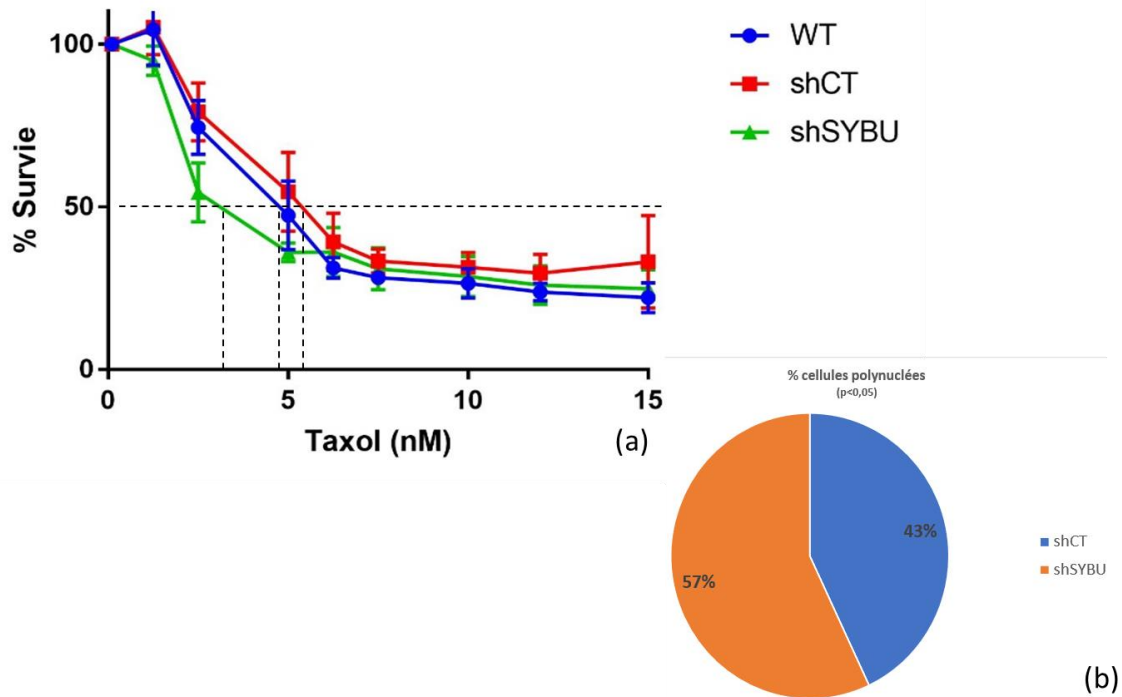


Figure 17 : a) Pourcentage de viabilité cellulaire des cellules COV318 wt, COV318 shCT et COV318 shSYBU sur 24h en présence de Taxol®, Moyenne +/- erreur standard à la moyenne (n=3), p<0,0001 (shSYBU versus shCT) ; b) Proportion de micronoyaux dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol® 5nM (n= 3)

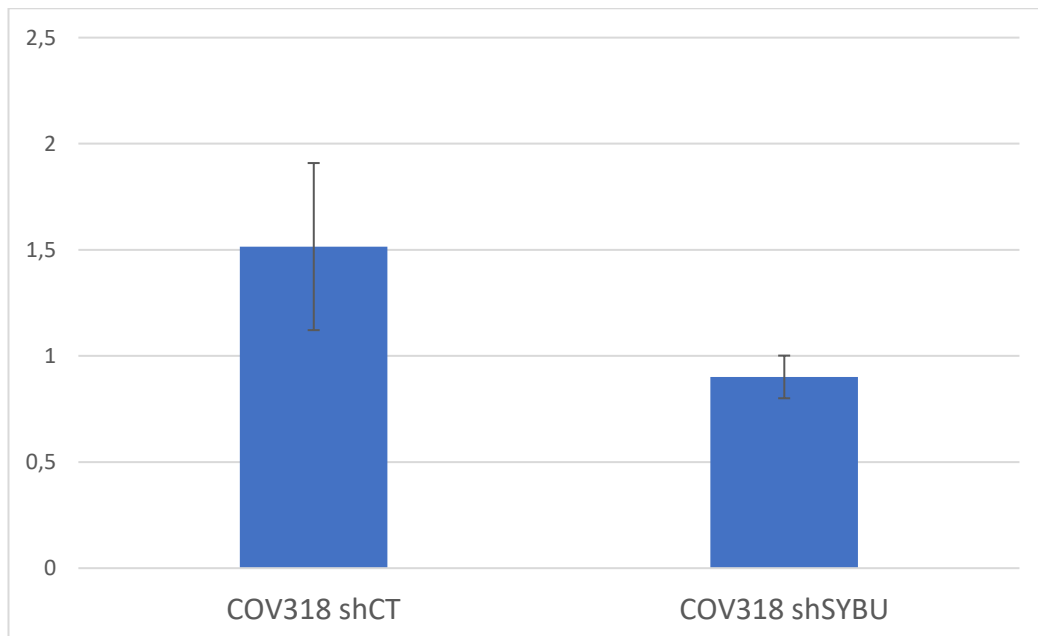


Figure 18 : Rapport des concentration (ng/μL) d'ATP dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées au Taxol® 5 nM pendant 24h sur les concentrations (ng/μL) d'ATP dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU non traitées, Moyenne +/- erreur standard à la moyenne, (n=3)

Résultats et discussion

I- Sensibilité au Taxol® des lignées COV318 wt, COV318 shCT et COV318 shSYBU

L'équivalence de sensibilité au Taxol® des lignées COV318 wt et COV318 shCT est confirmée par l'obtention de la même IC50 (5 nM) (Figure 17a). En revanche, la sensibilité des cellules COV318 shSYBU est plus importante puisque l'IC50 est proche de 3 nM. Les cellules COV318 shSYBU présentent donc une sensibilité au Taxol® plus importante que les cellules COV318 wt ou COV318 shCT. Ces résultats diffèrent de ceux de Raab *et al.* (2019) et de Van Hoesen *et al.* (2017) qui ne mettent pas en avant d'IC50 pour les cellules COV318 en présence de Taxol® aux doses que nous utilisons, pour ces études les auteurs utilisent respectivement IC75=14nM et IC50=250 nM à 48h de traitement. Contrairement à nos conditions, leurs expériences n'ont pas été réalisées en présence d'un inhibiteur de la pompe d'efflux ce qui peut expliquer les différences obtenues. Une autre étude, Liebmann *et al.* (1993), fait état de plusieurs IC50 pour différentes lignées cellulaires autres que des COV318 traitées au Taxol® pendant 24h : IC50HeLa=2,6 nM, IC50A549=4,1 nM, IC50MCF-7=2,5 nM, et IC50OVG-1=4 nM. Les sensibilités au Taxol® des lignées HeLa et MCF-7 sont équivalentes à la lignée COV318 shSYBU.

La sensibilité cellulaire au Taxol® peut aussi être évaluée par le nombre de micronoyaux que provoque cette molécule. En effet, la formation des micronoyaux est un marqueur de la toxicité du Taxol® qui s'explique par la non-séparation des cellules filles en fin de mitose (Long et Fairchild, 1994). Le marquage au DAPI des cellules a permis de mettre en évidence la présence de micronoyaux dans une proportion supérieure à la moitié des cellules (57%) pour les cellules COV318 shSYBU contre 43% pour les cellules COV318 shCT, après traitement au Taxol® (Figure 17b). Ces résultats complètent donc ceux obtenus par le test MTT.

II- Etude de la production d'ATP dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU

Les rapports des concentrations d'ATP dans les cellules COV318shCT traitées au Taxol® montrent une augmentation de la concentration d'ATP en présence de Taxol® avec un rapport de 1,5 par rapport au cellules non traitées (Figure 18). En revanche, cette augmentation de la

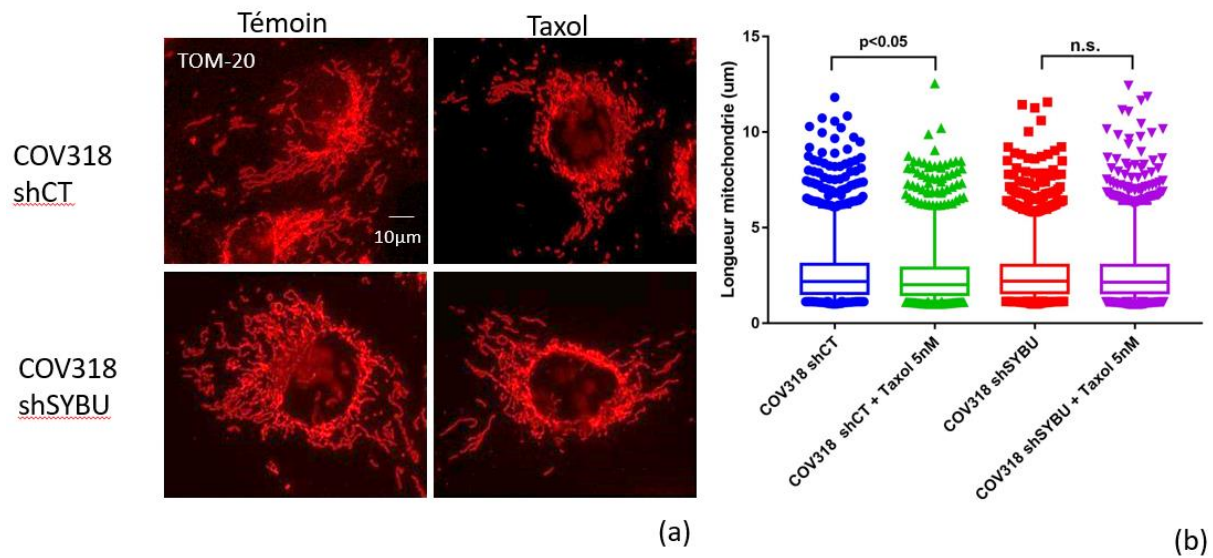


Figure 19 : a) Marquage par Immunofluorescence de TOM-20 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol® (5 nM) ; b) Taille (μm) des mitochondries, rapportés à la taille de la cellule, 300 mitochondries, Moyenne +/- erreur standard à la moyenne, (n=3), p<0,05

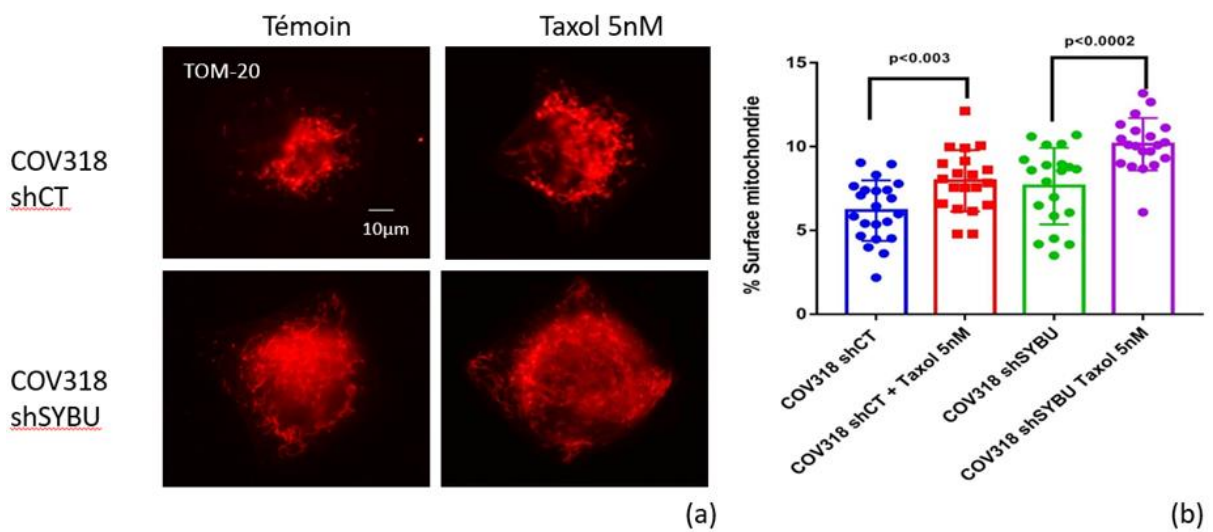


Figure 20 : a) Marquage des micropattern par Immunofluorescence de TOM-20 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol® (5 nM) ; b) Pourcentage de surface occupée par les mitochondries rapportée à la taille de la cellule, 20 à 40 cellules, Moyenne +/- erreur standard à la moyenne, p<0,03 et p<0,002

concentration d'ATP en présence de Taxol® n'est pas retrouvée dans les cellules COV318 shSYBU traitées avec un rapport de 0,9. Il y a même peut-être une diminution de la concentration d'ATP après traitement au Taxol®.

Malheureusement ces résultats sont non significatifs probablement à cause nombre peu élevé d'expériences indépendantes (n=3). Il existe peu de données dans la littérature sur l'impact du Taxol® à faible dose sur la production d'ATP. En revanche, les études de Untch *et al.* (1993) et Glass-Marmor et Beitner (1999) ont montré que des fortes doses de Taxol®, respectivement 5µM pour des cellules de cancer de l'ovaire humain et 25 µM pour des cellules B16 F19 de mélanome de souris, ont pour effet de diminuer la quantité d'ATP dans les cellules.

III- Dynamique des mitochondries

La comparaison des phénotypes (fragmentation) des mitochondries dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU n'a pas montrée de différences dans les cellules non traitées au Taxol® (Figure 19a et 19b). En revanche les cellules COV318 shCT traitées avec du Taxol® présentent des mitochondries plus petites, suggérant une légère fission, qui ne se retrouve pas dans les cellules COV318 shSYBU. Cette augmentation de la fission des mitochondries dans les cellules traitées avec du Taxol® a également été mis en avant dans l'étude de Turi *et al.* (2015), ce phénomène s'explique par la nécessité de conserver les mitochondries fonctionnelles et de séparer les mitochondries filles qui auront été endommagées (Meyer *et al.*, 2018). Cette réponse étant un mécanisme de protection, son absence dans les cellules COV318 shSYBU pourrait être un facteur impliqué dans la sensibilité de ces cellules au Taxol®.

IV- Etude de la distribution des mitochondries par la technique du micropattern

Les micropattern offrent l'avantage de normaliser la taille et la forme des cellules. Ceci permet l'observation d'évènements comme la distribution d'organites dans la cellule ou encore l'interaction d'organites entre eux. Comme décrit dans la Figure 20, les mitochondries des cellules COV318 shSYBU non traitées au Taxol® occupent une surface cellulaire totale plus importante par rapport aux cellules COV318 shCT témoin (Figure 20a et 20b). Ce phénomène

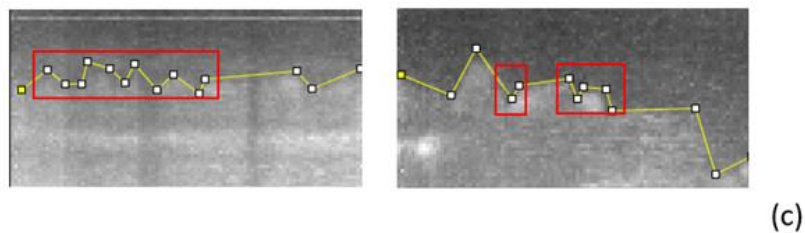
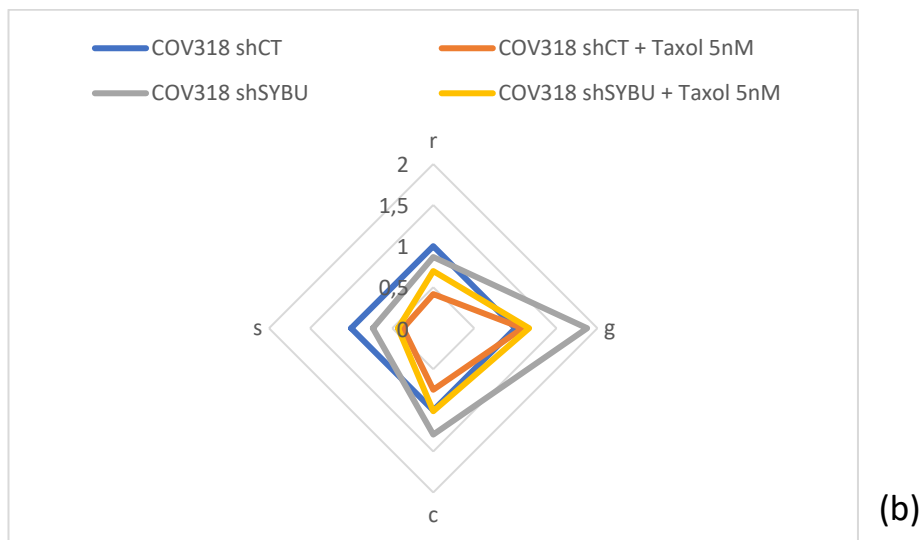
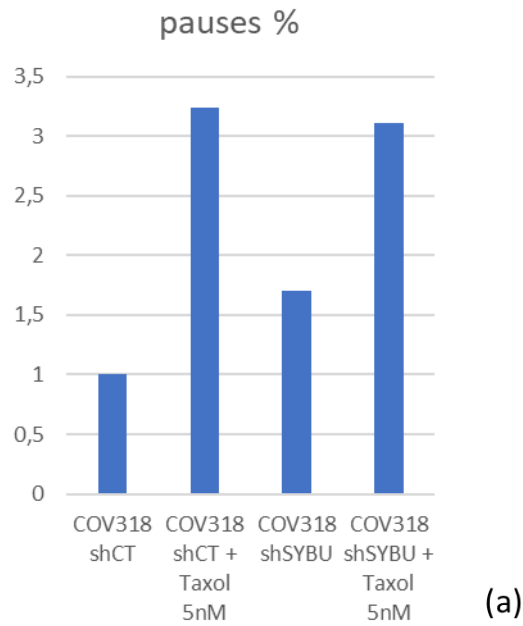


Figure 21 : a) Proportion (pourcentage) de temps passé en pause par l'ensemble de la population des MTs ; b) Diagramme en diamant des paramètres de dynamique des MTs : vitesse de polymérisation (g) et dépolymérisation (s), et fréquence de sauvetage (r) et catastrophe (c) des cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol® (5 nM) ; c) Kymographe de MT d'une cellule de COV318 shCT (gauche) et COV318 shSYBU traitées, 20 MTs

est accentué lorsque les cellules sont traitées avec du Taxol[®], avec une augmentation plus importante dans les cellules COV318 shSYBU que dans les COV318 shCT. Sachant que les mitochondries se déplacent dans des régions cytoplasmiques où la demande en ATP est importante (Detmer et Chan, 2007), cette différence de distribution chez les cellules COV318 shSYBU peut être expliquée par la production d'ATP plus faible de ces cellules, avec donc une nécessité de répartir les mitochondries dans tout le cytoplasme pour permettre un apport suffisant d'énergie dans toute la cellule.

V- Dynamique des MTs

La proportion du temps passé en pause des MTs (Figure 21a) est augmentée pour les cellules COV318 shCT traitées avec du Taxol[®] (3,2%) par rapport aux cellules témoins (1%) et pour les cellules COV318 shSYBU en présence de Taxol[®] (3,1%) comparé aux cellules témoins (1,6%). Cette augmentation de la durée des pauses est en accord avec l'action stabilisatrice du Taxol[®] sur les MTs (Schiff et Horwitz, 1980). L'exploration de la dynamique des MTs ne montre pas de différences sur les paramètres de dépolymérisation (s), de sauvetage (r) et de catastrophe (c) pour les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU témoins et traitées avec du Taxol[®] (Figure 21b). En revanche, il y a une augmentation d'un facteur 2 de la vitesse de polymérisation (g) chez les cellules COV318 shSYBU témoins par rapport aux cellules COV318 shCT témoins. Cette différence peut être expliquée par la distribution particulièrement étendue des mitochondries dans ces cellules qui permettrait, malgré une production diminuée d'ATP, de consacrer cette énergie à la croissance des MTs. L'augmentation de la vitesse de polymérisation en rapport avec la production d'ATP a aussi été constatée en utilisant le *carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone* (CCCP), un découpleur de la phosphorylation oxydative (Hirose *et al*, 1973) qui provoque un défaut de production d'ATP (données non publiées). Cependant en présence de Taxol[®], l'ensemble des paramètres sont équivalents entre les deux lignées cellulaires, ce qui suggère que la dynamique des MTs est la même avec ou sans l'expression de syntabuline. Il est donc peu probable que la sensibilité des cellules au Taxol[®] par les cellules COV318 shSYBU puisse s'expliquer par une modification de la dynamique des MTs dans ces cellules. Cependant, la limite de résolution du microscope ne permet pas d'intégrer sur les Kymographes (Figure 21c) des événements (représentés par les points) trop proches les uns

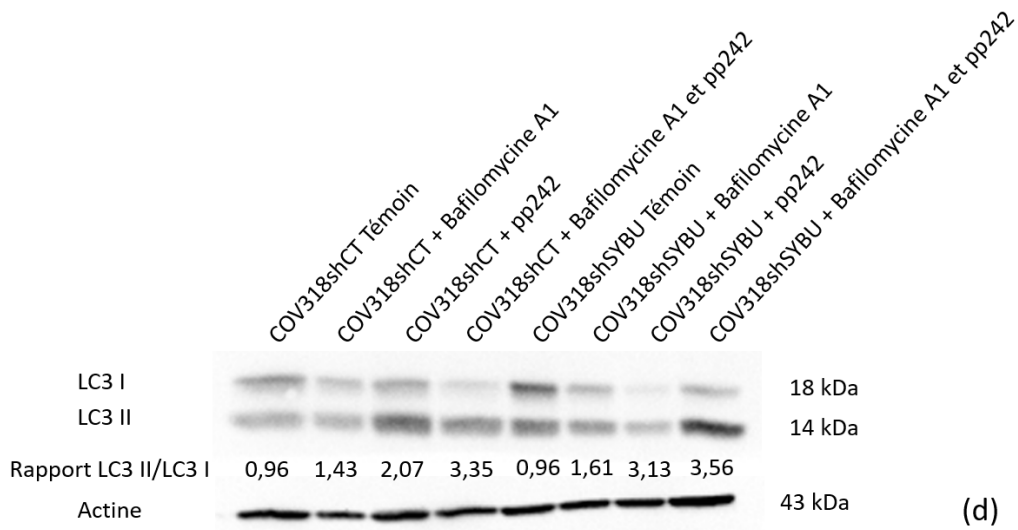
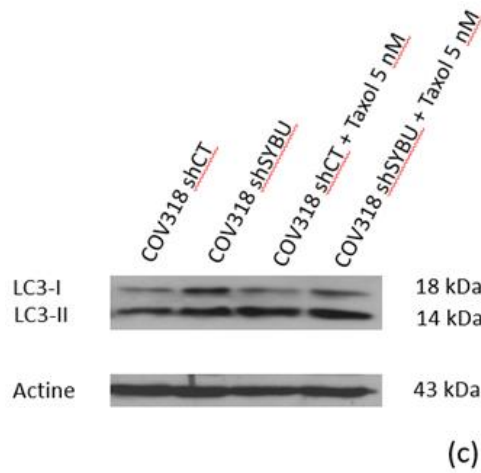
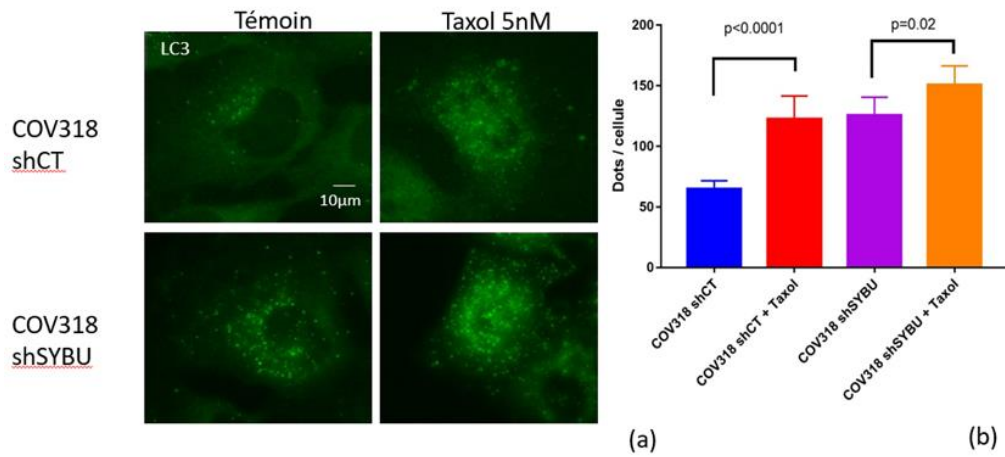


Figure 22 : a) Marquage sur micropattern par Immunofluorescence de LC3 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol® (5 nM) ; b) Nombre de Dots par cellule, Moyenne +/- erreur standard à la moyenne (n=3), $p < 0,0001$ et $p = 0,02$; c) Western blot de LC3 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées pendant 24h avec du Taxol® (5 nM) avec l'actine en témoin de charge (n=2) ; d) Western blot de LC3 dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU traitées avec de la Bafilomycine A1 pendant 1h et/ou avec pp242 pendant 2h avec l'actine en témoin de charge et rapport du signal de LC3 II/ LC3 I (n=3)

des autres ($>0,5 \mu\text{m}$) tels que ceux mis en évidence dans les encadrés rouge. Du fait de cette limite de résolution, des événements qui à l'œil de l'expérimentateur apparaissent comme étant clairement des déplacements très rapides sur de courtes distances, sont considérés comme des pauses par le logiciel. Une sous-estimation des paramètres de la dynamique en présence de Taxol® n'est donc pas à exclure.

VI- Autophagie

La quantification du signal d'immunofluorescence de LC3 montre un taux basal plus élevé dans les cellules COV318 shSYBU (125 dots/cellule) par rapport aux cellules COV318 shCT (60 dots/cellule) (Figure 22a et 22b). Lorsque les cellules sont traitées au Taxol®, la proportion de LC3 augmente de manière plus importante (+50%) dans les COV318 shCT que dans les COV318 shSYBU (+20%). Cette augmentation moins importante dans les cellules COV318 shSYBU en présence de Taxol® peut expliquer la sensibilité plus importante de cette lignée. En effet, l'augmentation de l'autophagie a été décrite comme pouvant être un mécanisme de résistance au Taxol® (Ajabnoor *et al*, 2012).

L'ensemble de ces résultats est confirmé par la technique du Western-Blot puisque le signal de luminescence de LC3 montre également un taux élevé de LC3-II dans les cellules COV318 shSYBU par rapport aux COV318 shCT avec une proportion plus marquée en présence de Taxol® (Figure 22c). Au stade du travail, la proportion plus élevée de LC3-II dans les COV318 shSYBU s'explique soit par une activité basale (et provoquée par le Taxol®) autophagique plus élevée que chez les COV318 shCT, soit par un flux autophagique moins élevé (Klionsky *et al*. 2008). En effet, un flux autophagique moins élevé a pour conséquences l'accumulation d'autophagosomes dans la cellule.

L'étude du flux autophagique dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU par l'intermédiaire de la Bafilomycine A1, un inhibiteur de la dégradation des autophagosomes et de pp242 qui induit l'autophagie, montre un rapport de LC3 II/LC3 I plus important dans les cellules COV318 shSYBU (Figure 22d). Ce rapport est plus important en présence de pp242 qu'en présence de Bafilomycine A1. Ces cellules ont donc une activité autophagique plus importante que les cellules COV318 shCT, surtout lors de la stimulation de l'autophagie. Malheureusement, il y a peu de données dans la littérature concernant le flux autophagique

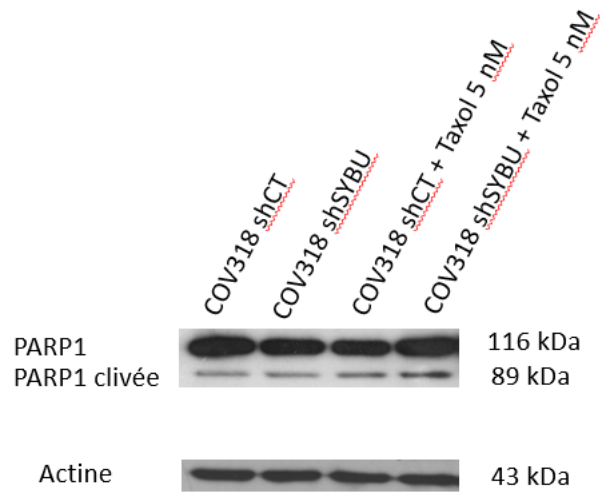


Figure 23 : Werstern Blot de la forme clivée de PARP1 avec l'actine en témoin de charge (n=3)

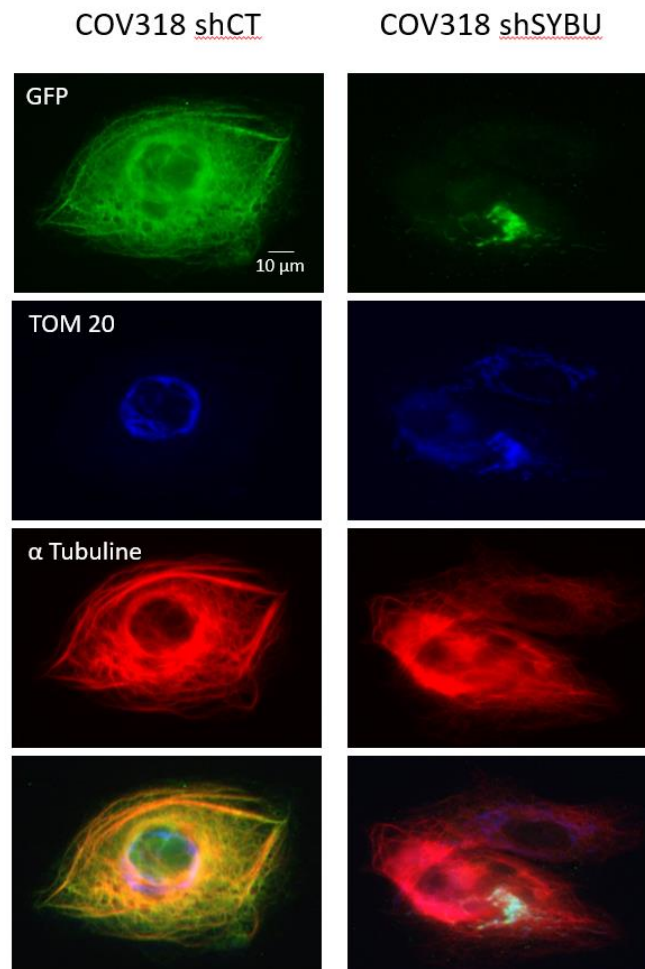


Figure 24 : Marquage par Immunofluorescence de GFP, TOM 20 et α -Tubuline dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU avec une image composite (n=2)

dans les cellules COV318 ou de lien entre l'autophagie et la syntabuline. En revanche, les résultats de cette expérience ne montrent pas une activité basale plus importante dans les cellules COV318 shSYBU que dans les cellules COV318 shCT, il faudrait peut-être refaire des extractions protéiques pour vérifier nos résultats.

VII- Apoptose

Comme mentionné dans l'introduction, la PARP1 peut être utilisée comme marqueur de l'apoptose. L'augmentation constatée de la forme clivée de PARP1 en présence de Taxol® (Figure 23) est le reflet d'une augmentation de l'engagement des cellules vers l'apoptose, ce qui est conforme à l'action du Taxol® (Milross *et al*, 1996). Cependant, cette augmentation semble plus importante dans les COV318 shSYBU que dans les COV318 shCT. Ceci pourrait expliquer du moins en partie, la sensibilité plus élevée des COV318 shSYBU au Taxol® par rapport aux COV318 shCT.

VIII- Surexpression de la syntabuline

La surexpression de la syntabuline dans les cellules COV318 shCT et COV318 shSYBU est associée à la présence d'un phénomène de fusion mitochondriale avec la formation de « bundles » mitochondriaux qui sont fortement colocalisés avec le GFP associé à cette protéine (Figure 24). La formation de « bundles » de MTs colocalisés avec la syntabuline a également été observée. Cependant, le degré de fusion mitochondriale et de formation de ces « bundles » de mitochondries et de MTs a semblé être dépendant du signal du GFP et donc de l'expression de la syntabuline. Il y a peu de données dans la littérature sur la surexpression de la syntabuline et son effet sur la formation de ces bundles, en revanche, l'équipe du Dr Clara NAHMIAS a reproduit cette expérience sur des cellules HeLa qui sont des cellules cancéreuses du col de l'utérus et a obtenu des résultats similaires (Annexe 2).

Conclusion

Ce travail a permis d'obtenir des résultats préliminaires intéressants concernant l'implication de la protéine syntabuline dans la résistance des cancers de l'ovaire au Taxol®. En effet, les études actuelles portent surtout sur le rôle de la syntabuline dans les maladies neurodégénératives mais peu de travaux s'axe sur le rôle de cette protéine dans la réponse thérapeutique des cellules cancéreuses. Nous avons pu montrer que les cellules de cancer de l'ovaire de haut grade séreux n'exprimant plus la protéine syntabuline, les COV318 shSYBU, présentent une mortalité plus importante que les COV318 shCT en présence de Taxol®. L'absence d'expression de la syntabuline rend donc les cellules cancéreuses ovariennes plus sensibles au Taxol®, montrant une plus grande efficacité du Taxol®.

Comme déjà décrit dans la littérature, les cellules cancéreuses d'une manière générale ont besoin de beaucoup d'énergie, fournie sous forme d'ATP pour leur survie et l'inactivation du gène de la syntabuline, conduirait à une meilleure réponse des cellules cancéreuses en réduisant la production d'ATP. En effet, contrairement aux cellules sauvages, dans les cellules n'exprimant pas la syntabuline (COV318 shSYBU), la production d'ATP n'est pas augmentée en présence de de Taxol®. Parallèlement, dans ces cellules, la distribution des mitochondries est plus importante que celle constatée dans les cellules COV318 shCT. Cette différence de distribution pourrait permettre de compenser le déficit partiel en ATP de cette lignée et d'apporter au plus près des MTs la source d'énergie nécessaire à leur dynamique. Le Taxol® amplifie cette dispersion des mitochondries chez les cellules COV318 shSYBU, ce qui est également retrouvé chez les cellules COV318 shCT. Il serait intéressant de mieux comprendre pourquoi dans la lignée COV318 shSYBU, les mitochondries peuvent se distribuer dans le cytoplasme malgré l'absence de la syntabuline. Pour cela, il conviendrait de vérifier si la distribution des mitochondries dans les cellules COV318 shSYBU pourrait s'expliquer par d'autres moteurs moléculaires que KIF5B ou par d'autres adaptateurs aux MTs présents en surface des mitochondries. Pour ce faire, l'utilisation de micropattern de plus grande taille associée à de l'immunofluorescence (TOM-20 et α -tubuline) permettrait de voir si les mitochondries sont toujours au contact des MTs sur un cytoplasme plus étalé.

L'évaluation des paramètres de dynamique des MTs, a montré qu'ils ne sont pas modifiés dans les cellules shSYBU, en présence de Taxol®, suggérant que les MTs ne sont pas impliqués dans la sensibilité au Taxol® de ces cellules. Cela dit, une possible sous-estimation quantitative des paramètres de la dynamique liée à la limite de sensibilité de la technique employée n'est cependant pas à exclure. Pour aller plus loin, l'évaluation des paramètres de la dynamique des MTs avec ou sans Taxol® dans des cellules COV318 shCT qui surexpriment la syntabuline (au moyen d'un vecteur d'expression) serait intéressante. En effet, nous devrions retrouver le même caractère de résistance que celui observé dans les tumeurs résistantes au Taxol® qui sur-expriment elles aussi la syntabuline. On pourrait également agir sur la production d'ATP en l'augmentant dans les cellules COV318 shSYBU par activation de l'Adénine Monophosphate Protéine Kinase (AMPK), la protéine impliquée dans la régulation de la balance énergétique des cellules (Moore et al, 1991). Nous pourrions alors comparer les distributions des mitochondries selon le niveau de production d'ATP. Inversement, l'utilisation de la Roténone, une molécule qui bloque la production d'ATP, chez les cellules COV318 shCT permettrait d'observer le comportement de dispersion des mitochondries en cas de déplétion en ATP (Cunnif et al, 2016). Ceci pourrait apporter des informations complémentaires sur les différences de distribution des mitochondries, de production d'ATP et de croissance des MTs entre nos lignées cellulaires.

L'observation des cellules COV318 shCT met en avant une légère fragmentation des mitochondries en présence de Taxol®, contrairement aux cellules COV318 shSYBU. Or, il a été montré que la fission était un mécanisme de protection en réponse au Taxol® (Meyer et al, 2018). L'absence de fission dans les cellules COV318 shSYBU pourrait donc expliquer du moins en partie la sensibilité plus importante au Taxol® de cette lignée. Pour explorer les autres explications à cette sensibilité, nous nous sommes concentrés sur les voies de morts cellulaires, à commencer par l'autophagie. L'augmentation de LC3-II en présence de Taxol® est plus importante dans les cellules COV318 shCT ce qui signifie que la sensibilité plus importante des COV318 shSYBU serait également due à une activation moins importante de l'autophagie en présence de Taxol®. Cela dit, l'activité autophagique reste plus importante dans les cellules COV318 shSYBU. Il conviendrait de vérifier l'augmentation de LC3 dans les cellules COV318 shSYBU et de comparer les variations du flux autophagique en présence de Taxol®. Ceci pour confirmer l'hypothèse selon laquelle la sensibilité des cellules COV318

shSYBU au Taxol® serait due à une réponse autophagique moins importante. Ensuite, nous avons également exploré l'effet de l'inactivation du gène SYBU dans l'apoptose. Cette inactivation semble sensibiliser les cellules aux mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose en présence de Taxol®, puisque nous avons constaté une proportion plus importante de protéine PARP1 clivée dans les cellules COV318 shSYBU que dans les cellules COV318 shCT.

Enfin, la surexpression de la syntabuline entraîne une fusion mitochondriale avec la formation de « bundles » mitochondriaux et de MTs chez les deux lignées. Pour une exploration plus approfondie du sujet, il faut confirmer tous les résultats obtenus en utilisant la technologie du small interfering ARN (siARN) de SYBU dans les cellules COV318 wt pour savoir si de cette façon nous obtenons les mêmes résultats qu'avec les cellules COV318 shSYBU. Et/ou en surexprimant le gène SYBU dans les cellules COV318 shSYBU pour essayer de retrouver un phénotype « normal » similaire aux cellules COV318 shCT. Et également d'approfondir les effets de la surexpression de SYBU dans les cellules COV318 wt qui aurait alors le même phénotype que les cellules de cancers de l'ovaire de haut grade séreux résistantes au Taxol®.

A ce stade préliminaire du projet, les résultats ont mis en avant une sensibilité plus importante des cellules COV318 shSYBU en présence de Taxol®. Cela laisse à penser que cette protéine mitochondriale, la syntabuline, est effectivement impliquée dans la résistance des cancers de l'ovaire de haut grade séreux au Taxol®. Cependant, certains résultats comme la production d'ATP et la dynamique des MTs se sont révélés assez inattendus. De nombreuses autres expérimentations se révéleront nécessaire pour faire la lumière sur le rôle de la syntabuline dans la résistance au Taxol®.

Bibliographie :

Ajabnoor, G M A, T Crook, et H M Coley. « Paclitaxel Resistance Is Associated with Switch from Apoptotic to Autophagic Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cells ». *Cell Death & Disease* 3, no 1 (janvier 2012): e260 e260. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.139>

Akhmanova, Anna, et Casper C. Hoogenraad. « Microtubule Minus-End-Targeting Proteins ». *Current Biology* 25, no 4 (février 2015): R162 71. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.027>.

Ashrafi, G, et T L Schwarz. « The Pathways of Mitophagy for Quality Control and Clearance of Mitochondria ». *Cell Death & Differentiation* 20, no 1 (janvier 2013): 31 42. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>.

Bukowski, Karol, Mateusz Kciuk, et Renata Kontek. « Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy ». *International Journal of Molecular Sciences* 21, no 9 (2 mai 2020): 3233. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>.

Cai, Qian, Claudia Gerwin, et Zu-Hang Sheng. « Syntabulin-Mediated Anterograde Transport of Mitochondria along Neuronal Processes ». *Journal of Cell Biology* 170, no 6 (12 septembre 2005): 959 69. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506042>.

Chen, Xiaoxiang, Jing Zhang, Zhihong Zhang, Hongxia Li, Wenjun Cheng, et Jinsong Liu. « Cancer Stem Cells, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Drug Resistance in High-Grade Ovarian Serous Carcinoma ». *Human Pathology* 44, no 11 (novembre 2013): 2373 84. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.05.001>.

Chi, Dennis S., Ennapadam S. Venkatraman, Vivek Masson, et William J. Hoskins. « The Ability of Preoperative Serum CA-125 to Predict Optimal Primary Tumor Cytoreduction in Stage III Epithelial Ovarian Carcinoma ». *Gynecologic Oncology* 77, no 2 (mai 2000): 227 31. <https://doi.org/10.1006/gyno.2000.5749>.

Cunniff, Brian, Andrew J. McKenzie, Nicholas H. Heintz, et Alan K. Howe. « AMPK Activity Regulates Trafficking of Mitochondria to the Leading Edge during Cell Migration and Matrix Invasion ». Édité par Carl-Henrik Heldin. *Molecular Biology of the Cell* 27, no 17 (septembre 2016): 2662 74. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-05-0286>.

Das, Tuyelee, Utpal Anand, Swaroop Kumar Pandey, Charles R. Ashby, Yehuda G. Assaraf, Zhe-Sheng Chen, et Abhijit Dey. « Therapeutic Strategies to Overcome Taxane Resistance in Cancer ». *Drug Resistance Updates* 55 (mars 2021): 100754. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100754>.

Detmer SA, Chan DC. 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:870–879. doi:10.1038/nrm2275

Fanale, Daniele, Giuseppe Bronte, Francesco Passiglia, Valentina Calò, Marta Castiglia, Florinda Di Piazza, Nadia Barraco, et al. « Stabilizing versus Destabilizing the Microtubules: A Double-Edge Sword for an Effective Cancer Treatment Option? » *Analytical Cellular Pathology* 2015 (2015): 1 19. <https://doi.org/10.1155/2015/690916>.

Foulkes WD, Clarke BA, Hasselblatt M et al. No small surprise—small cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type, is a malignant rhabdoid tumour. *J Pathol* 2014; 233: 209–214.

Froidevaux-Klipfel, Laurence, Benjamin Targa, Isabelle Cantaloube, Hayat Ahmed-Zaid, Christian Poüs, et Anita Baillet. « Septin Cooperation with Tubulin Polyglutamylation Contributes to Cancer Cell Adaptation to Taxanes ». *Oncotarget* 6, no 34 (3 novembre 2015): 36063 80. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5373>.

Fujiwara, Keiichi, Kosei Hasegawa, et Shoji Nagao. « Landscape of Systemic Therapy for Ovarian Cancer in 2019: Primary Therapy ». *Cancer* 125, no S24 (15 décembre 2019): 4582 86. <https://doi.org/10.1002/cncr.32475>.

Gatta, Gemma, Jan Maarten van der Zwan, Paolo G. Casali, Sabine Siesling, Angelo Paolo Dei Tos, Ian Kunkler, Renée Otter, et al. « Rare Cancers Are Not so Rare: The Rare Cancer Burden in Europe ». *European Journal of Cancer* 47, no 17 (novembre 2011): 2493 2511. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.08.008>.

Glass-Marmor, Lea, et Rivka Beitner. « Taxol® Žpaclitaxel/ Induces a Detachment of Phosphofructokinase from Cytoskeleton of Melanoma Cells and Decreases the Levels of Glucose 1,6-Bisphosphate, Fructose 1,6-Bisphosphate and ATP », 1999, 5.

Glick, Danielle, Sandra Barth, et Kay F. Macleod. « Autophagy: Cellular and Molecular Mechanisms ». *The Journal of Pathology* 221, no 1 (mai 2010): 3 12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>.

Grossier, J., Goud, B. and Schauer, K., 2014. Probabilistic Density Maps to Study the Spatial Organization of Endocytosis. *Exocytosis and Endocytosis*, pp. 117-138.

Gupta, Sudeep, Shona Nag, Shyam Aggarwal, Amit Rauthan, et Narayanankutty Warriar. « Maintenance Therapy for Recurrent Epithelial Ovarian Cancer: Current Therapies and Future Perspectives – a Review ». *Journal of Ovarian Research* 12, no 1 (décembre 2019): 103. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0579-0>.

Hirose, Shigehisa, Nakatsugu Yaginuma, et Yuji Inada. « Disruption of Charge Separation Followed by That of the Proton Gradient in the Mitochondrial Membrane by CCCP ». *The*

Journal of Biochemistry 76, no 1 (juillet 1974): 213 16.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130549>.

Ho, Gwo Yaw, Natasha Woodward, et Jermaine I.G. Coward. « Cisplatin versus Carboplatin: Comparative Review of Therapeutic Management in Solid Malignancies ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 102 (juin 2016): 37 46.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.014>.

Hoang, Bao, Patrick Frost, Yijiang Shi, Eileen Belanger, Angelica Benavides, Gholam Pezeshkpour, Susanna Cappia, Tommasina Guglielmelli, Joseph Gera, et Alan Lichtenstein. « Targeting TORC2 in Multiple Myeloma with a New MTOR Kinase Inhibitor ». *Blood* 116, n° 22 (25 novembre 2010): 4560-68. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-285726>.

Huzil, J. Torin, Ke Chen, Lukasz Kurgan, et Jack A. Tuszynski. « The Roles of β -Tubulin Mutations and Isozyme Expression in Acquired Drug Resistance ». *Cancer Informatics* 3 (janvier 2007): 117693510700300. <https://doi.org/10.1177/117693510700300028>.

Ibrado, Am, Cn Kim, et K Bhalla. « Temporal Relationship of CDK1 Activation and Mitotic Arrest to Cytosolic Accumulation of Cytochrome C and Caspase-3 Activity during Taxol®-Induced Apoptosis of Human AML HL-60 Cells ». *Leukemia* 12, no 12 (décembre 1998): 1930 36.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401218>.

Jeong, S. and Seol, D., 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Reports*, 41(1), pp.11-22. Karbowski, M, et R J Youle. « Dynamics of Mitochondrial Morphology in Healthy Cells and during Apoptosis ». *Cell Death & Differentiation* 10, no 8 (août 2003): 870 80.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401260>.

Kaufmann, S., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. and Poirier, G., 1993. Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-ribose) Polymerase: An Early Marker of Chemotherapy-induced Apoptosis. *Cancer Research*, 53, pp.3976-3985.

Kemppainen, Jukka, Johanna Hynninen, Johanna Virtanen, et Marko Seppänen. « PET/CT for Evaluation of Ovarian Cancer ». *Seminars in Nuclear Medicine* 49, no 6 (novembre 2019): 484 92. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.06.010>.

Kim, Young Chul, et Kun-Liang Guan. « MTOR: A Pharmacologic Target for Autophagy Regulation ». *Journal of Clinical Investigation* 125, n° 1 (2 janvier 2015): 25-32.
<https://doi.org/10.1172/JCI73939>.

Klionsky, Daniel J., Hagai Abeliovich, Patrizia Agostinis, Devendra K. Agrawal, Gjurmakch Aliev, David S. Askew, Misuzu Baba, et al. « Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy in Higher Eukaryotes ». *Autophagy* 4, no 2 (16 février 2008): 151 75.
<https://doi.org/10.4161/auto.5338>.

Leary, Alexandra, Patricia Pautier, Youssef Tazi, Philippe Morice, Pierre Duvillard, Sébastien Gouy, Catherine Uzan, Hélène Gauthier, Corinne Balleyguier, et Catherine Lhommé. « Biologie moléculaire des cancers épithéliaux de l'ovaire ». *Bulletin du Cancer* 99, no 12 (décembre 2012): 1161-73. <https://doi.org/10.1684/bdc.2012.1667>.

Levine, Beth, et Guido Kroemer. « Autophagy in the Pathogenesis of Disease ». *Cell* 132, no 1 (janvier 2008): 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>.

Liebmann, J., Cook, J., Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J. and Mitchell, J., 1993. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines. *British Journal of Cancer*, 68(6), pp.1104-1109.

Ludueña, R F, E M Shooter, et L Wilson. « Structure of the Tubulin Dimer. » *Journal of Biological Chemistry* 252, no 20 (octobre 1977): 7006-14. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)66927-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)66927-9).

Long, B. and Fairchild, C., 1994. Paclitaxel Inhibits Progression of Mitotic Cells to G1 Phase by Interference with Spindle Formation without Affecting Other Microtubule Functions during Anaphase and Telephase. *Cancer Research*, 54, pp.4355-4361.

Mahmood, Reem D., Robert D. Morgan, Richard J. Edmondson, Andrew R. Clamp, et Gordon C. Jayson. « First-Line Management of Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer ». *Current Oncology Reports* 22, n° 6 (juin 2020): 64. <https://doi.org/10.1007/s11912-020-00933-8>.

Mauvezin, Caroline, et Thomas P Neufeld. « Bafilomycin A1 Disrupts Autophagic Flux by Inhibiting Both V-ATPase-Dependent Acidification and Ca-P60A/SERCA-Dependent Autophagosome-Lysosome Fusion ». *Autophagy* 11, n° 8 (3 août 2015): 1437-38. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1066957>.

Meyer, Joel N., Tess C. Leuthner, et Anthony L. Luz. « Mitochondrial Fusion, Fission, and Mitochondrial Toxicity ». *Toxicology* 391 (novembre 2017): 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.019>.

Milross, C. G., K. A. Mason, N. R. Hunter, W.-K. Chung, L. J. Peters, et L. Milas. « Relationship of Mitotic Arrest and Apoptosis to Antitumor Effect of Paclitaxel ». *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 88, no 18 (18 septembre 1996): 1308-14. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.18.1308>.

Mishra, Prashant, et David C. Chan. « Mitochondrial Dynamics and Inheritance during Cell Division, Development and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, no 10 (octobre 2014): 634-46. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>.

Mitchison, Tim, et Marc Kirschner. « Dynamic Instability of Microtubule Growth ». *Nature* 312, no 5991 (novembre 1984): 237-42. <https://doi.org/10.1038/312237a0>.

Momenimovahed, Zohre, Azita Tiznobaik, Safoura Taheri, et Hamid Salehiniya. « Ovarian Cancer in the World: Epidemiology and Risk Factors ». *International Journal of Women's Health* Volume 11 (avril 2019): 287-99. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604>.

Moore, Frances, John Weekes, et D. Grahame Hardie. « Evidence That AMP Triggers Phosphorylation as Well as Direct Allosteric Activation of Rat Liver AMP-Activated Protein Kinase. A Sensitive Mechanism to Protect the Cell against ATP Depletion ». *European Journal of Biochemistry* 199, n° 3 (août 1991): 691-97. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16172.x>.

Nolfi-Donagan, Deirdre, Andrea Braganza, et Sruti Shiva. « Mitochondrial Electron Transport Chain: Oxidative Phosphorylation, Oxidant Production, and Methods of Measurement ». *Redox Biology* 37 (octobre 2020): 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>.

Nunnari, Jodi, et Anu Suomalainen. « Mitochondria: In Sickness and in Health ». *Cell* 148, no 6 (mars 2012): 1145-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>.

Prat, Jaime, Emanuela D'Angelo, et Iñigo Espinosa. « Ovarian Carcinomas: At Least Five Different Diseases with Distinct Histological Features and Molecular Genetics ». *Human Pathology* 80 (octobre 2018): 11-27. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.06.018>.

Raab, Monika, Nene F. Kobayashi, Sven Becker, Elisabeth Kurunci-Csacsko, Andrea Krämer, Klaus Strebhardt, et Mourad Sanhaji. « Boosting the Apoptotic Response of High-grade Serous Ovarian Cancers with CCNE1 Amplification to Paclitaxel in Vitro by Targeting APC/C and the Pro-survival Protein MCL-1 ». *International Journal of Cancer* 146, n° 4 (15 février 2020): 1086-98. <https://doi.org/10.1002/ijc.32559>.

Rao, S., S. B. Horwitz, et I. Ringel. « Direct Photoaffinity Labeling of Tubulin With Taxol® ». *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 84, no 10 (20 mai 1992): 785-88. <https://doi.org/10.1093/jnci/84.10.785>.

Ray-Coquard, I., P. Morice, D. Lorusso, J. Prat, A. Oaknin, P. Pautier, et N. Colombo. « Non-Epithelial Ovarian Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up ». *Annals of Oncology* 29 (octobre 2018): iv1-18. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy001>.

Rojas, Veronica, Kim Hirshfield, Shridar Ganesan, et Lorna Rodriguez-Rodriguez. « Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment ». *International Journal of Molecular Sciences* 17, no 12 (15 décembre 2016): 2113. <https://doi.org/10.3390/ijms17122113>.

Rousseau, D., 2012. Etude de la fonction d ATAD3 au cours de la différenciation adipocytaire. Grenoble. (Thèse)

Sahdev, Anju. « CT in Ovarian Cancer Staging: How to Review and Report with Emphasis on Abdominal and Pelvic Disease for Surgical Planning ». *Cancer Imaging* 16, no 1 (décembre 2016): 19. <https://doi.org/10.1186/s40644-016-0076-2>.

Schiff, P. B., et S. B. Horwitz. « Taxol® Stabilizes Microtubules in Mouse Fibroblast Cells. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, no 3 (1 mars 1980): 1561-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1561>.

Schmitt, Clemens A, et Scott W Lowe. « Bcl-2 Mediates Chemoresistance in Matched Pairs of Primary Eμ-Myc Lymphomas in Vivo ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 27, no 1 (janvier 2001): 206-16. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2000.0372>.

Shetty, Mahesh. « Imaging and Differential Diagnosis of Ovarian Cancer ». *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* 40, no 4 (août 2019): 302-18. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2019.04.002>.

Yoo, S. and Jung, Y., 2018. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Molecules and Cells*, 41, pp.18-26.

Soldani, C., Scovassi, A.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis* 7, 321–328 (2002). <https://doi-org.docelec.u-bordeaux.fr/10.1023/A:1016119328968>

Song, Zhiyin, Mariam Ghochani, J. Michael McCaffery, Terrence G. Frey, et David C. Chan. « Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion ». Édité par Janet M. Shaw. *Molecular Biology of the Cell* 20, no 15 (août 2009): 3525-32. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-03-0252>.

Song, Yuyu, et Scott T. Brady. « Post-Translational Modifications of Tubulin: Pathways to Functional Diversity of Microtubules ». *Trends in Cell Biology* 25, no 3 (mars 2015): 125-36. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.004>.

Stewart, Christine, Christine Ralyea, et Suzy Lockwood. « Ovarian Cancer: An Integrated Review ». *Seminars in Oncology Nursing* 35, no 2 (avril 2019): 151-56. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>.

Su, Qingning, Qian Cai, Claudia Gerwin, Carolyn L. Smith, et Zu-Hang Sheng. « Syntabulin Is a Microtubule-Associated Protein Implicated in Syntaxin Transport in Neurons ». *Nature Cell Biology* 6, n° 10 (octobre 2004): 941-53. <https://doi.org/10.1038/ncb1169>.

Sweeney, H. Lee, et Erika L.F. Holzbaur. « Motor Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10, no 5 (mai 2018): a021931. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021931>.

Teplinsky, Eleonora, et Franco Muggia. « Targeting HER2 in Ovarian and Uterine Cancers: Challenges and Future Directions ». *Gynecologic Oncology* 135, no 2 (novembre 2014): 364-70. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.09.003>.

Turi, Zsuzsanna, Eniko Hocsak, Boglarka Racz, Aliz Szabo, Andras Balogh, Balazs Sumegi, et Ferenc Gallyas. « Role of Mitochondrial Network Stabilisation by a Human Small Heat Shock Protein in Tumour Malignancy ». *Journal of Cancer* 6, no 5 (2015): 470-76. <https://doi.org/10.7150/jca.11494>.

Untch, M., Sevin, B., Perras, J., Angioli, R., Untch, A., Hightower, R., Koechli, O. and Averette, H., 1994. Evaluation of paclitaxel (Taxol®), cisplatin, and the combination paclitaxel-cisplatin in ovarian cancer in vitro with the ATP cell viability assay. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 47(3), pp.321-321.

Valiron, O., Caudron, N. and Job, D., 2001. Review Microtubule Dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, pp.2069-2084.

Van Hoesen, Kylie, Sonia Meynier, Pascale Ribaux, Patrick Petignat, Florence Delie, et Marie Cohen. « Circulating GRP78 Antibodies from Ovarian Cancer Patients: A Promising Tool for Cancer Cell

Targeting Drug Delivery System? » *Oncotarget* 8, n° 63 (5 décembre 2017): 107176-87. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22412>

Webb, Penelope M., et Susan J. Jordan. « Epidemiology of Epithelial Ovarian Cancer ». *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 41 (mai 2017): 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006>.

Whitaker, Robert H., et William J. Placzek. « Regulating the BCL2 Family to Improve Sensitivity to Microtubule Targeting Agents ». *Cells* 8, no 4 (12 avril 2019): 346. <https://doi.org/10.3390/cells8040346>.

Xie, Long-long, Feng Shi, Zheqiong Tan, Yueshuo Li, Ann M. Bode, et Ya Cao. « Mitochondrial Network Structure Homeostasis and Cell Death ». *Cancer Science* 109, no 12 (décembre 2018): 3686-94. <https://doi.org/10.1111/cas.13830>.

Yang, C. and Horwitz, S., 2017. Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), p.1733.

Youle, Richard J., et Derek P. Narendra. « Mechanisms of Mitophagy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, no 1 (janvier 2011): 9-14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>.

Zwetsloot, Alexander James, Gokhan Tut, et Anne Straube. « Measuring Microtubule Dynamics ». Édité par James G. Wakefield et Carolyn A. Moores. *Essays in Biochemistry* 62, no 6 (7 décembre 2018): 725-35. <https://doi.org/10.1042/EBC20180035>.

Indexation des sites internet :

- (1) The histology Guide <https://www.histology.leeds.ac.uk/>
The Ovary [Female reproductive system: The Histology Guide \(leeds.ac.uk\)](#)
Ovarian Follicle [Female reproductive system: The Histology Guide \(leeds.ac.uk\)](#)
- (2) CNGOF (Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français) <http://www.cngof.fr/>
Le Cycle Menstruel [Cycle ovarien \(cngof.fr\)](#)
- (3) Referentiel OncoBN <https://onconormandie.fr/>
Cancers Epithéliaux Invasifs de l'Ovaire, de la Trompe et du Péritoine Prise en Charge Diagnostique Et Therapeutique Version 5-1– Juin 2017, <https://onconormandie.fr/wp-content/uploads/2017/10/r%C3%A9f%C3%A9rentiel-cancer-de-lovaire-2017m.pdf>
- (4) Docteur Eric Seban <https://www.docteur-eric-sebban.fr>
Les différents stades du cancer de l'ovaire, <https://www.docteur-eric-sebban.fr/cancer-ovaires/diagnostic/differents-stades-cancer-ovaires/#:~:text=Pour%20stadifier%20le%20cancer%20de,est%20%C3%A9tendue%20dans%20le%20corps.>
- (5) Société Canadienne du Cancer <https://cancer.ca/fr>
Classification histologique du cancer de l'ovaire, <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/ovarian/grading>
- (6) HAS <https://www.has-sante.fr>
Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Cancer de l'ovaire, https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-02/ald30_gm_k_ovaire_vd_2010-02-11_15-00-56_15.pdf
- (7) Oncologik <http://oncologik.fr>
Ovaire, <http://oncologik.fr/referentiels/rrc/ovaire>
- (8) Khan Academy <https://fr.khanacademy.org/>
Les mitochondries et les chloroplastes, <https://fr.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-cells/hs-prokaryotes-and-eukaryotes/a/chloroplasts-and-mitochondria> [visité le : 26 mai 2021]

(9) Researchgate <https://www.researchgate.net/>

Représentation du système de phosphorylation oxydative de la mitochondrie CI à CIV

https://www.researchgate.net/figure/Representation-du-systeme-de-phosphorylation-oxydative-de-la-mitochondrie-CI-a-CIV_fig28_330751315 [visité le : 11 juin 2021]

Annexe :

Annexe 1 : Classification Clinique des cancers de l'ovaire (Référentiel

OncoBN)

FIGO 1994 :

Stade I Tumeur limitée aux ovaires.

- Stade IA Tumeur limitée à un seul ovaire, pas d'ascite. Pas de tumeur de surface. Capsule intacte, cytologie négative.
- Stade IB Tumeur limitée aux deux ovaires, pas d'ascite. Pas de tumeur de surface. Capsule intacte, cytologie négative.
- Stade IC Tumeur limitée à 1 ou 2 ovaires mais avec tumeur à la surface ovarienne ou rupture capsulaire ou cytologie positive dans l'ascite ou le liquide de lavage péritonéal.

Stade II Tumeur de un ou deux ovaires avec extension pelvienne

- Stade IIA Extension et/ou métastases à l'utérus et/ou aux trompes.
- Stade IIB Extension aux autres tissus pelviens organes ou péritoine.
- Stade IIC Tumeur au stade II a ou II b avec tumeur à la surface ovarienne ou rupture capsulaire ou cytologie positive dans l'ascite ou le liquide de lavage péritonéal.

Stade III Tumeur de un ou deux ovaires avec implants péritonéaux en dehors du pelvis et/ou ganglions rétro péritonéaux ou inguinaux positifs. Les métastases capsulaires hépatiques de surface sont des stades III. L'atteinte du péritoine abdominal doit être prouvée histologiquement.

- Stade IIIA Tumeur limitée au pelvis, avec des ganglions négatifs, mais avec atteinte microscopique, histologiquement confirmée du péritoine abdominal.
- Stade IIIB Tumeur de un ou deux ovaires, avec des ganglions négatifs, mais implants, histologiquement confirmés, de surface du péritoine abdominal, aucun n'excédant 2 cm de diamètre.
- Stade IIIC Implants du péritoine abdominal, de plus de 2 cm de diamètre. **et/ou** métastases ganglionnaires rétro péritonéales **ou** inguinales.

Stade IV Métastases à distance

- Stade IV Tumeur envahissant un ou deux ovaires avec métastases à distance. En cas d'épanchement pleural, une cytologie de l'épanchement positive est nécessaire pour classer la tumeur Stade IV. Les métastases hépatiques intra parenchymateuses sont des Stades IV au même titre que les ganglions sus-claviculaires ou les ganglions thoraciques.

Différences avec la précédente classification : FIGO 2014 :

Stade IC:

IC1 : rupture peropératoire

IC2 : rupture préopératoire ou végétations en surface

IC3 cellules malignes dans l'ascite ou le liquide de lavage péritonéal.

Stade IIIA

IIIA1 : adénopathie rétropéritonéale seule (prouvé par cytologie/histologie)

IIIA1(i) : foyer adénocarcinomateux dans l'adénopathie ≤ 10 mm

IIIA1(ii) : foyer adénocarcinomateux dans l'adénopathie >10 mm.

IIIA2 : extension péritonéale \pm adénopathies.

Stade IV : cancer de l'ovaire avec métastases à distance

IVA : plèvre (cytologie positive)

IVB : autres métastases y compris adénopathies inguinales.

Annexe 1bis : Classification histologique des cancers de l'ovaire

(Référentiel OncoBN)

Classification histologique des cancers ovariens (OMS 2003)

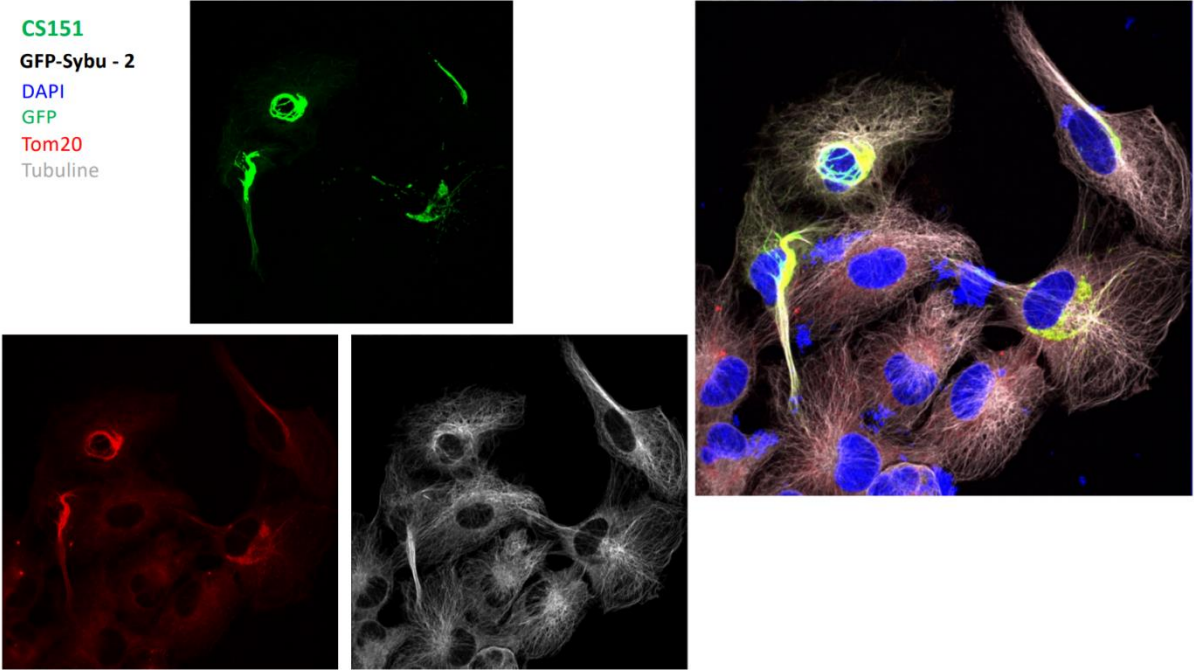
- Tumeurs épithéliales communes
- Tumeurs du mésenchyme des cordons sexuels
- Tumeurs à cellules lipidiques
- Tumeurs à cellules germinales
- Gonadoblastome
- Tumeurs des tissus mous non spécifiques
- Tumeurs non classées
- Tumeurs secondaires
- Lésions pseudo tumorales

Classification histologique des tumeurs épithéliales communes de l'ovaire (OMS 2003)

- Tumeurs séreuses ou séro papillaires
- Tumeurs mucineuses
- Tumeurs endométrioïdes
- Tumeurs à cellules claires
- Tumeurs de Brenner et à cellules transitionnelles
- Tumeurs mixtes épithéliales
- Carcinomes indifférenciés
- Tumeurs non classées

Annexe 2 : Surexpression de la syntabuline dans les cellules HeLa

(Dr Clara NAHMIAS, Institut Gustave Roussy)



Serment de Galien :

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés
- D'actualiser mes connaissances
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

La syntabuline (SYBU) est une protéine mitochondriale surexprimée dans des cancers de l'ovaire résistants au Taxol®. Les fonctions de SYBU sont peu connues mais dans les neurones, elle est impliquée dans le transport des mitochondries (Mito) le long des microtubules (MTs). Sachant que les Mito sont impliquées dans la synthèse d'ATP, que les MTs utilisent cette source d'énergie pour leur dynamique et que celle-ci est augmentée au cours de la résistance au Taxol®, l'hypothèse du projet est que la surexpression de la SYBU dans les cellules résistantes au Taxol® permettrait de fournir un apport d'énergie plus important aux MTs, favorisant ainsi leur dynamique et donc la résistance au Taxol®. Le travail présenté dans ce mémoire fait état des premiers résultats obtenus sur le sujet. Nous confirmons par un test de cytotoxicité que les cellules COV318shSYBU (lignée humaine de cancer ovarien qui n'expriment plus la SYBU) sont plus sensibles au Taxol® que les cellules COV318 contrôles. Par ailleurs, les cellules COV318shSYBU ont un déficit de production en ATP en présence de Taxol® mais la dynamique des MTs ne semble pas expliquer la sensibilité plus importante au Taxol® de cette lignée. Enfin, nos résultats suggèrent que cette sensibilité au Taxol® serait liée à l'absence de fission mitochondriale, une augmentation de l'apoptose et à une diminution de l'activité autophagique.

Syntabulin (SYBU) is a mitochondrial protein overexpressed in Taxol®-resistant ovarian cancers. Little is known concerning the biological role of SYBU, but in neurons, it is involved in the transport of mitochondria (Mito) along microtubules (MTs). Since Mito are involved in the synthesis of ATP, that MTs use this energy for its own dynamic that is further increased during resistance to Taxol®, our hypothesis is that overexpression of SYBU in Taxol®-resistant cells would provide enough energy for MTs to adapt their dynamic to counteract Taxol® activity. In this work, we confirmed that COV318shSYBU cells (human ovarian cancer line deleted for SYBU) are more sensitive to Taxol® than control COV318 cells. We next explored the level of ATP in COV318shSYBU cells and found that this was lower than in control cells with Taxol® but without impact on the MT dynamic. The greater sensitivity to Taxol® of this cell line may therefore not be explained by the modulation of MT dynamic. Finally, our results suggest that Taxol® sensitivity is linked to the absence of mitochondrial fission, an increase of apoptosis and a decrease of autophagic activity.