

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE : 2018

THÈSE 2018 / TOU3 / 2068

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Obtenu après soutenance du
Mémoire du DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES de PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2018

par

THOLE Adrien

Né le 06 juillet 1989 à Tarbes (65)

**MECANISMES CELLULAIRES DE LA MISE EN PLACE D'UNE
CARCINOSE PERITONEALE DERIVEE DU CANCER OVARIEN:
IMPORTANCE DE PI3K α**

Directeur de thèse : Madame le Docteur Julie GUILLERMET-GUIBERT

Co-directeur de thèse : Monsieur le Docteur Benoît THIBAUT

JURY

Président : Madame le Docteur Fabienne THOMAS-JEAN

1^{er} Assesseur : Madame le Professeur Léa PAYEN-GAY

2^{ème} Assesseur : Madame le Docteur Julie GUILLERMET-GUIBERT

3^{ème} Assesseur : Monsieur le Docteur Benoît THIBAUT

4^{ème} Assesseur : Madame le Docteur Gaëlle LE ROCH

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 08 janvier 2018

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires	Universitaires
M. CESTAC P. Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*) Chimie Thérapeutique
Mme DE MAS MANSAT V. (*) Hématologie	Mme AUTHIER H. Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B. Droit Pharmaceutique	M. BERGE M. (*) Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F. Pharmacie Clinique	Mme BON C. Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C. Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*) Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S. Biochimie	Mme BOUTET E. (*) Toxicologie - Sémiologie
Mme THOMAS F. (*) Pharmacologie	M. BROUILLET F. Pharmacie Galénique
	Mme CABOU C. Physiologie
	Mme CAZALBOU S. (*) Pharmacie Galénique
	Mme CHAPUY-REGAUD S. Bactériologie - Virologie
	Mme COLACIOS-VIATGE C. Immunologie
	Mme COSTE A. (*) Parasitologie
	M. DELCOURT N. Biochimie
	Mme DERA EVE C. Chimie Thérapeutique
	Mme ECHINARD-DOUIN V. Physiologie
	Mme EL GARAH F. Chimie Pharmaceutique
	Mme EL HAGE S. Chimie Pharmaceutique
	Mme FALLONE F. Toxicologie
	Mme FERNANDEZ-VIDAL A. Toxicologie
	Mme HALOVA-LAJOIE B. Chimie Pharmaceutique
	Mme JOUANJUS E. Pharmacologie
	Mme LAJOIE-MAZENC I. Biochimie
	Mme LEFEVRE L. Physiologie
	Mme LE LAMER A-C. Pharmacognosie
	M. LEMARIE A. Biochimie
	M. MARTI G. Pharmacognosie
	Mme MIREY G. (*) Toxicologie
	Mme MONFERRAN S. Biochimie
	M. OLICHON A. Biochimie
	Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*) Chimie Analytique
	M. SAINTE-MARIE Y. Physiologie
	M. STIGLIANI J-L. Chimie Pharmaceutique
	M. SUDOR J. (*) Chimie Analytique
	Mme TERRISSE A-D. Hématologie
	Mme TOURRETTE-DIALO A. Pharmacie Galénique
	Mme VANSTEELANDT M. Pharmacognosie
	Mme WHITE-KONING M. (*) Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C. Physiologie	
M. MOUMENI A. Biochimie	
M. METSU D. Pharmacologie	
Mme PALUDETTO M.N. Chimie thérapeutique	
M. PAGES A. Pharmacie Clinique	
M. PERES M. Immunologie	
Mme SALABERT A.S. Biophysique	

Remerciements

Au président du Jury,

Madame le Docteur Fabienne THOMAS-JEAN,

Aujourd'hui, vous me faites l'honneur d'accepter la présidence du jury. Soyez assurée de ma sincère gratitude mais aussi de mon profond respect notamment pour la qualité des enseignements que vous dispensez.

Aux membres du Jury,

À Madame le Professeur Léa PAYEN-GAY,

J'ai l'honneur de vous compter parmi les membres de ce jury de thèse, soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de ma profonde considération.

À Madame le Docteur Julie GUILLERMET-GUIBERT,

Merci d'avoir accepté de m'encadrer sur ce travail de thèse et de l'avoir fait évoluer grâce à vos conseils et votre esprit critique. Je vous en suis très reconnaissant. Je suis conscient de la chance que j'ai d'avoir travaillé à vos côtés : votre détermination, votre enthousiasme et votre optimisme ne peuvent qu'imposer l'admiration et le respect.

À Monsieur le Docteur Benoît THIBAUT,

Merci d'avoir accepté de tenter cette nouvelle expérience avec moi, presque 5 ans après la première ! Merci pour ta patience, ta disponibilité, ton investissement, ton humanité et ton soutien pendant mes périodes de doutes de l'année passée. Je reste convaincu que l'enseignement fait partie de tes compétences, n'en doute pas. C'est toujours un plaisir de travailler avec toi, j'espère que nos chemins professionnels se croiseront de nouveau ! Moins sérieusement, merci pour les rires, les chansons de ce bon vieux Roger Mercure, les parodies de Calo et j'en passe... Ca me manque déjà !

À Madame le Docteur Gaëlle LE ROCH,

Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse, tu as le profil idéal pour juger ce travail, toi qui m'a précédé aux côtés de Julie. Merci pour ton enthousiasme au quotidien, ton sourire et ta simplicité, c'est un plaisir de travailler à tes côtés.

À toutes les équipes avec lesquelles j'ai travaillé au cours de mon internat,

*Ces 5 années de formation sont passées à une vitesse folle, j'en sors grandi et riche de rencontres inoubliables. Merci à l'équipe de la pharmacie de l'hôpital Saint-André à Bordeaux où tout a débuté, à l'équipe de PDV et de l'IUC à Toulouse, et à l'équipe du CH de Pau. Un grand merci à l'équipe 17 du CRCT, en particulier à **Nicole** pour ses conseils avisés et sa gentillesse. Enfin un grand merci à toute l'équipe de la stérilisation pour ce dernier semestre haut en couleur et plus particulièrement à **Laurent** pour son dévouement, sa gentillesse, sans oublier son humour !*

*Un merci tout particulier à **Elodie Civade** qui m'a guidé tout au long de ces années d'études.*

*Enfin, merci à **Marie-Claire Morin** sans qui cette thèse n'existerait pas. Merci de m'avoir permis de faire ce master, de m'avoir encouragé tout du long, et de continuer à le faire encore par vos petites attentions. Vous êtes un exemple de gentillesse, de bienveillance et de générosité que je tâcherai de suivre tout au long de ma vie professionnelle.*

À tous mes co-internes, et plus particulièrement,

*À **Marion G.**, ma toute première co-interne, que de souvenirs depuis ce premier jour de pluie à Bordeaux... L'internat permet de faire des rencontres, mais tu es probablement la meilleure !*

*À **Céline P. ou Kiki blondie**, merci pour le soutien mutuel au fil des semestres, je te souhaite tout le bonheur possible pour ta nouvelle vie !*

*À **Clémence R.**, pour ce semestre particulier auquel je n'aurai pas survécu sans ton aide...*

*À **Etienne ou Buzzy**, pour ton enthousiasme, ton goût de la vie, et ton énergie qui faisaient de nous le duo si contrasté de PDV...*

*À mes co-internes de l'équipe des DM (**Adeline, Audrey, Caroline, Céline DFF, Etienne, Magali et Marion**). Merci à tous pour ces nombreux bons moments passés et à venir.*

*À mes co-internes de l'UPCO (**Aïna, Elina, Laura, Lucie, Margaux, Sophie, Claire sans oublier la petite Marie**), merci pour les craquages répétés, le soutien pour Voldemort, et surtout pour cette bonne humeur quotidienne, Bisous câlins les copains !*

*À **Clémence T.**, pour ton soutien et ta compassion pendant ces derniers mois...*

À mes amis de Tarbes, de Toulouse, et d'ailleurs :

*À **Chloé, Cyril, Julie, Caro et Emilie**, pour m'avoir suivi et écouté tout au long de ces années... Vous avez été ma bulle d'oxygène!*

*À **Audrey B.**, qui me suit depuis le lycée sans jamais me lâcher... Merci pour ton soutien inébranlable !*

*À **Clémence, Lucie et Marie**, avec qui pharma a commencé et n'a pas forcément continué mais dont l'amitié grandit depuis 10 années...*

*À **Eve**, le petit éléphant des amphis, pour notre passion commune des balades en nature et des fleurs à découvrir mais aussi pour ces rires aux larmes dont tu as le secret !*

*À **Manon**, la reine du feu rouge, pour ta discrétion, ta douceur et tes conseils avisés durant toutes ces années !*

À Coraline, retardataire en chef, pour le soutien durant toutes ces années malgré la distance qui a pu nous séparer.

À Hélène, compagnon de galère de l'internat version IPR, merci pour le soutien pendant la préparation du concours mais surtout après... Nos soirées limoncello resteront un souvenir impérisable pour moi !

À Titia reine du dancefloor, déesse parmi les chanteuses, impératrice des barrières... Pour les rires sur les bancs de la fac, pour l'Irlande, pour New York et pour aujourd'hui, un immense MERCI ! Je n'oublie pas le soutien infaillible du concours de l'internat et cette fameuse enveloppe qui a bien failli te tuer... Je ne te remercierai jamais assez !

À toute ma famille,

À Papy Jean, Mamie Odette et Mamie Rosalie, qui m'ont appris ce qu'est le sens de la famille, le respect, la tolérance et surtout le partage. Chaque visite chez eux était un retour aux sources me rappelant qui j'étais...

À Papi Jeannot et son harmonica, qui pousserai sûrement la chansonnette s'il était là !

À Mamie Dédé, qui dévoue encore et toujours la totalité de ses poules et de son jardin à mon bien-être, tu en doutes sûrement mais si j'en suis là c'est aussi grâce à toi !

À mes Oncles et Tantes (Didier & Nadia, Francis & Pascale, Marie-Hélène & Philippe, Maryse & Michel). Merci d'apporter votre pierre à mon équilibre...

À mes cousin(e)s (Amélie, Elodie, Jérôme, Julien, Justine, Laëtitia, Laura, Marlène, Vincent et Sandrine). Pour tous les moments partagés ensemble, pour ce lien qui nous unit et ces retrouvailles qui nous réjouissent à chaque fois... Il n'y a pas de mots pour décrire la joie que j'ai de vous avoir !

À la Joly family, Merci pour votre accueil chaleureux et votre soutien. Votre courage n'a d'égal que votre gentillesse !

À Delphine, ma sœur, le pilier de toutes ces années, l'épaule sur laquelle je me suis tant de fois reposé et me repose encore... Merci et n'oublie pas de vivre ta vie !

Papa, Maman, vous m'avez tant appris... Je ne saurais vous exprimer ici toute la fierté que j'ai de vous avoir comme parents. J'espère que ce manuscrit vous rendra quelque part votre liberté. Merci pour votre soutien inconditionnel. Maintenant pensez à vous !

À Gwladys, ma fleur de sel de Vendée, tu donnes du goût à ma vie... Merci d'avoir mis toutes tes compétences au profit de ce projet et d'avoir veillé sur moi pendant cette année. Je ne peux qu'être admiratif de ton courage...

TABLE DES MATIERES

Index des Figures.....	10
Index des tableaux.....	10
Introduction.....	11
Revue Bibliographique.....	14
1 Le cancer des ovaires.....	15
1.1 Généralités.....	15
1.2 Types histologiques et stadification.....	15
1.3 Facteurs de risques et origines génétiques	17
1.4 Origines du cancer ovarien	18
1.5 Diagnostic.....	19
1.5.1 Interrogatoire et examen clinique	19
1.5.2 Imagerie.....	20
1.5.3 Marqueurs.....	20
1.5.4 Diagnostic anatomopathologique.....	21
1.5.5 Diagnostic oncogénétique.....	21
1.6 Evolution et carcinose péritonéale	21
1.6.1 Péritoine et carcinose péritonéale	22
1.6.2 Développement de la carcinose péritonéale	23
1.6.3 Du péritoine à la circulation générale	25
2 Prise en charge thérapeutique des cancers ovariens.....	25
2.1 Problématique du cancer ovarien.....	25
2.2 Chirurgie	27
2.2.1 Chirurgie des stades I à IIIB	27
2.2.2 Chirurgie des stades IIIC à IV	27
2.2.3 Complications liées à la chirurgie.....	27
2.3 Chimiothérapie	28
2.3.1 Chimiothérapie intraveineuse	28
2.3.2 Chimiothérapie Hyperthermique Intra-péritonéale	29
2.3.3 Effets indésirables.....	30
2.4 suivi des patientes.....	31
2.5 prise en charge d'une récurrence	31
2.6 Thérapies Ciblées	33
2.6.1 Cibles du microenvironnement.....	33

2.6.2	Cibles cellulaires.....	35
3	La voie des phosphoinositides 3-kinases	37
3.1	Généralités.....	37
3.1.1	Les PI3K.....	37
3.1.2	La voie des PI3K et cancers.....	39
3.1.3	La voie des PI3K et cancer ovarien	40
3.2	Les inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le cancer ovarien	41
3.2.1	Généralités.....	41
3.2.2	Les inhibiteurs de PI3K	42
3.2.3	Association d'inhibiteurs de PI3K et d'autres agents.....	43
3.3	Les phosphoinositide 3-kinases et l'adhésion cellule-cellule.....	45
3.3.1	PI3K et actine	45
3.3.2	Actine et adhésion inter-cellulaire	47
	Article en soumission	49
	PI3Kα contrôle le maintien des agrégats hétérocellulaires péritonéaux dérivés du cancer de l'ovaire.....	50
	Résumé.....	50
	Introduction.....	51
	Matériel et Méthodes.....	53
	1) Lignées cellulaires.....	53
	2) Inhibiteurs pharmacologiques	54
	3) Expérience de Cytotoxicité 2D.....	54
	4) Mise au point de la culture de tumorosphères	54
	5) Marquage cellulaire au Qdot®.....	55
	6) Mise au point de culture de tumorosphères hétérotypiques	55
	7) Expérience de cytotoxicité 3D	55
	8) Quantification de la mortalité cellulaire au sein des tumorosphères	56
	9) Développement de tumorosphères de cellules provenant de liquide d'ascite	56
	10) Western Blot	56
	11) Tests statistiques	57
	Résultats.....	57
	1) Mise au point de la culture de tumorosphères.....	57
	2) Validation de l'activité des inhibiteurs de PI3K α sur les cellules SKOV-3 GFP.....	59
	3) Evaluation de l'effet des inhibiteurs de PI3K α et du cisplatine sur la formation de tumorosphères	59
	4) Evaluation de l'effet des inhibiteurs de PI3K α et du cisplatine sur le maintien des tumorosphères	61

5) Evaluation de la résistance à l'effet cytotoxique des inhibiteurs de PI3K et du cisplatine induit par une culture en 3D	63
6) Morphologie des sphéroïdes de cellules SKOV-3 WT après traitements.....	63
7) Evaluation de l'effet de la combinaison d'inhibiteurs de PI3K et de cisplatine sur les tumorosphères de cellules SKOV-3.....	65
8) Influence du stroma sur les sphéroïdes de cellules SKOV-3.....	67
9) Observations cliniques.....	69
Discussion	70
Conclusion / Perspectives en recherche de transfert.....	77
Annexes	82
Bibliographie	87
Résumé.....	95

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Origine des différents cancers ovariens.....	19
Figure 2 : Illustration schématique du péritoine et images de carcinose péritonéale	22
Figure 3 : Molécules développées ayant potentiellement un impact sur les taux d'incidence, de survie et de mortalité.....	26
Figure 4 : Survie dans le cancer de l'ovaire.....	26
Figure 5 : Arbre décisionnel pour la prise en charge des rechutes dans le cancer des ovaires.	32
Figure 6 : Génération du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2).	38
Figure 7 : Schéma de signalisation des PI3K de classe I.....	39
Figure 8 : Rationnel moléculaire pour la combinaison des thérapies anticancéreuses avec les inhibiteurs de la voie des PI3K.....	44
Figure 9 : Schéma d'activation de Rac	46
Figure 10 : Schéma d'une jonction adhérente	48
Figure 11 : Mise au point de la culture de tumosphères de cellules tumorales ovariennes et validation de l'efficacité des inhibiteurs de PI3K	58
Figure 12 : L'inhibition de PI3K α empêche la formation de tumosphères de cellules tumorales ovariennes.	60
Figure 13 : L'inhibition sélective de PI3K α empêche le maintien de tumosphères de cellules tumorales ovariennes.....	62
Figure 14 : L'inhibition de PI3K α impacte la viabilité des cellules tumorales ovariennes cultivées en 3D.....	64
Figure 15 : Les inhibiteurs de PI3K sensibilisent à l'effet antitumoral sur les cellules cultivées en 3D du cisplatine à faible concentration	66
Figure 16 : Le stroma retrouvé dans l'ascite cellulaire des patientes atteintes de cancer ovarien impacte la formation des sphéroïdes et la sensibilité aux traitements	68
Figure 17 : Représentation schématique de l'implication de PI3K α dans la Carcinose péritonéale.....	75
Figure 18 : Schéma de puce microfluidique utilisée pour l'étude de l'effet du flux sur la croissance et les interactions moléculaires de sphéroïdes de cellules cancéreuses ovariennes.....	79
Figure S1 : Détermination en 2D des concentrations en inhibiteurs de PI3K et cisplatine à utiliser....	83
Figure S2 : Complément de l'inhibition de PI3K α impacte la viabilité des cellules tumorales ovariennes cultivées en 3D	83
Figure S3 : Complément à l'évaluation de l'effet des inhibiteurs de PI3K α ou β en combinaison avec du cisplatine sur des cellules SKOV-3 cultivées 3D.....	84
Figure S4 : Images des expériences LIVE/DEAD en couleurs	85
Figure S5 : Cultures de MSC.	86

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification internationale FIGO pour le cancer de l'ovaire.....	17
Tableau 2 : Modalité de prise en charge du cancer ovarien.....	28
Tableau supplémentaire 1 : IC50 (concentration inhibitrice 50) en nM des inhibiteurs de PI3K isoforme-spécifiques, calculée in vitro sur protéines recombinantes	82
Tableau supplémentaire 2 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour la révélation des Western Blot	82

INTRODUCTION

Le cancer ovarien est, à l'échelle mondiale, le cancer gynécologique le plus meurtrier. Du fait de symptômes insidieux, ce cancer n'est détecté dans 75% des cas qu'à stade avancé (1,2).

Son traitement comprend généralement une prise en charge chirurgicale associée à une chimiothérapie intraveineuse à base de sels de platine et de taxanes. Cependant, le cancer ovarien est reconnu pour la fréquence de ses récives (3,4).

En effet, ce cancer présente la particularité de ne disséminer que faiblement par voie hématogène mais préférentiellement par voie transcoelomique (au travers du péritoine). Ce mode de dissémination est caractérisé par le passage de cellules tumorales, vers l'espace péritonéal, de manière isolée ou sous forme de sphéroïdes. Ces amas cellulaires s'implantent par la suite à la surface du péritoine de la patiente et vont induire le développement de la maladie métastatique appelée carcinose péritonéale (3,5).

C'est dans l'espace péritonéal qu'est retrouvé le liquide d'ascite (épanchement liquidien péritonéal) se développant chez la quasi-totalité des patientes présentant un cancer ovarien à stade avancé (6,7). Il est reconnu que la structure tridimensionnelle des sphéroïdes ainsi que le microenvironnement fourni par ce liquide d'ascite participe à la chimiorésistance caractérisant les cellules de ces amas (8).

Au cours des dernières décennies, le pronostic vital des patientes atteintes de cancer des ovaires a peu évolué. Ceci est en partie explicable par le manque d'innovations associées à sa prise en charge (9).

La voie des phosphoinositides 3-kinases (PI3K) est l'une des plus communément dérégulées dans le cancer ovarien (10,11). L'isoforme α de ces enzymes semble présenter un intérêt tout particulier dans le développement de la carcinose péritonéale dérivée de cancer ovarien de par son rôle sur le cytosquelette d'actine (12,13).

Les inhibiteurs ciblant toutes les isoformes de PI3K testés en phase clinique dans le cancer ovarien se heurtent à l'apparition de résistances et de toxicités importantes. L'utilisation des inhibiteurs de PI3K en combinaison à des thérapies ciblant d'autres voies de signalisation semble être une alternative de choix. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'isoforme de PI3K permettrait de limiter les toxicités des inhibiteurs globaux tout en conservant une activité inhibitrice efficace sur la cible la plus pertinente choisie selon le profil moléculaire exprimé par les tumeurs (14).

Ce travail de thèse s'est donc articulé sous 3 axes principaux ayant pour but de comprendre l'importance de PI3K α dans la formation d'une carcinose péritonéale dérivée du cancer ovarien.

Tout d'abord nous avons mis au point une technique de culture en trois dimensions (3D) indépendante de l'ancrage permettant, à l'instar de la culture cellulaire en monocouche, de reproduire plus fidèlement la physiologie des sphéroïdes péritonéaux retrouvés dans les cancers ovariens.

Dans un deuxième temps, et grâce à ce modèle de culture, nous avons mis en évidence le rôle de l'isoforme α des PI3K (PI3K α) dans la formation et le maintien de sphéroïdes de cellules tumorales ovariennes.

Enfin nous avons évalué l'implication du microenvironnement tumoral dans les phénomènes de compaction et de chimiorésistance des sphéroïdes, grâce à des co-cultures 3D de cellules tumorales et de cellules souches mésenchymateuses (MSC).

Ce manuscrit de thèse s'articule en 3 parties. La première comprend une revue bibliographique portant sur le cancer des ovaires, son traitement et sur les PI3K ainsi que de leur importance dans la prise en charge actuelle du cancer ovarien.

La deuxième partie est consacrée aux travaux de recherches. Ces derniers sont présentés sous la forme d'un article et de résultats supplémentaires qui feront l'objet d'une publication future.

La dernière partie est une conclusion comprenant une synthèse du travail accompli.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 LE CANCER DES OVAIRES

1.1 GENERALITES

Avec 225500 nouveaux cas par an et 140200 décès dans le monde, le cancer ovarien est la première cause de mortalité parmi les pathologies gynécologiques dans les pays développés. En France sont dénombrés 4717 nouveaux cas et 3111 décès en 2017 (données de l'INCa). Ce cancer reste peu fréquent (8^{ème} rang mondial en termes d'incidence chez la femme), il est cependant de mauvais pronostic puisqu'il se situe au 4^{ème} rang de mortalité par cancer chez la femme (derrière les cancers du sein, du colon et du poumon) (1).

Du fait d'une détection souvent tardive, trois quarts de ces cancers sont diagnostiqués à un stade avancé (stade IIIB à IV). La survie à 5 ans, tous stade confondus est, en conséquence, de seulement 41,8% selon l'étude EUROCARE-4 menée en Europe (2)

Ce cancer survient rarement avant l'âge de 40 ans (principalement pour les formes héréditaires) mais plus généralement à un âge avancé, l'âge médian lors du diagnostic étant d'environ 65 ans (15,16).

De par la situation anatomique des ovaires, une tumeur ovarienne peut atteindre un volume important avant de provoquer des symptômes (15). Ceux-ci sont souvent variés et aspécifiques : inconfort ou douleurs abdomino-pelviennes, saignements ou pertes vaginales, troubles du transit, ... Environ un tiers des patientes présente un épanchement liquidien appelé « ascite » au sein de la cavité péritonéale au moment du diagnostic. Cet épanchement est cependant retrouvé chez toutes les patientes à stade avancé et peut représenter jusqu'à plusieurs litres (6).

1.2 TYPES HISTOLOGIQUES ET STADIFICATION

Dans 90% des cas, les tumeurs ovariennes se développent à partir des cellules épithéliales recouvrant les ovaires. Les tumeurs non épithéliales proviennent dans 3 à 5% des cas de cellules germinales et dans 7% des cas des cordons sexuels. En plus de ces tumeurs malignes, peuvent être retrouvées des tumeurs borderline (tumeurs frontières, à la limite entre tumeur bénigne et tumeur maligne) à faible potentiel malin qui n'infiltrant pas les tissus sous-jacents et présentent un bon pronostic (17).

L'OMS divise les tumeurs épithéliales ovariennes en différents types histologiques : les tumeurs séreuses, les tumeurs mucineuses, les tumeurs endométrioïdes, les tumeurs à cellules claires, les tumeurs de Brenner, les tumeurs épithéliales mixtes et les tumeurs indifférenciées (18).

Depuis quelques années, un modèle de classification dualistique permet la distinction en cancers ovariens de type I et de type II, selon leurs altérations génétiques. Les tumeurs de type I sont, le plus souvent, indolentes et diagnostiquées à des stades précoces (I et II). Elles incluent les tumeurs de bas grade séreuses, endométrioïdes, mucineuses, à cellules claires et les tumeurs malignes de Brenner. Elles sont généralement caractérisées par des mutations des gènes KRAS, BRAF, Phosphatase and tensin homolog (PTEN) ou encore des Phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K). Ces cancers résistent le plus souvent aux chimiothérapies conventionnelles mais répondent aux traitements hormonaux. Les tumeurs de type II, plus répandues, sont souvent diagnostiquées à des stades plus tardifs (III et IV) et incluent les histotypes de haut grade séreux, endométrioïdes ou indifférenciés. Elles ne sont, quant à elles, que rarement caractérisées par les mutations précédemment citées mais fréquemment par des mutations des gènes BRCA1/2 et du gène codant pour p53. Ces tumeurs se développent de manière agressive, répondent aux chimiothérapies conventionnelles mais plus rarement aux traitements hormonaux (17,18).

La classification en fonction du stade des cancers solides peut être réalisée selon les critères TNM : T pour caractériser la tumeur primitive, N pour l'envahissement ganglionnaire et M pour la présence ou non de métastases. En ce qui concerne les cancers ovariens, cette classification est supplantée par la classification établie par la Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique (FIGO) (Tableau n°1).

La Haute autorité de santé (HAS), en collaboration avec l'Institut National du Cancer (INCa), ont élaboré une correspondance de ces deux classifications dans leur « Guide – Affection Longue durée » du cancer de l'ovaire (4). Cette classification doit être réalisée à la suite d'une évaluation chirurgicale de la dissémination métastatique. Ainsi, l'adénocarcinome ovarien de stade I est confiné aux ovaires, le stade II correspond à l'atteinte d'un autre organe ou structure pelvienne, le stade III présente une dissémination au niveau du territoire péritonéal et/ou lymphatique locorégional et le stade IV est associé à une atteinte au-delà du péritoine (19).

Stades FIGO		Survie à 5 ans
Stade I : Tumeur est confinée à un ovaire / aux ovaires		
IA	La tumeur n'implique qu'un seul ovaire, la capsule est intacte. Aucune tumeur n'est détectée à la surface de l'ovaire. Pas de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	84%
IB	La tumeur implique les deux ovaires, la capsule est intacte. Aucune tumeur n'est détectée à la surface de l'ovaire. Pas de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
IC	La tumeur implique un ou deux ovaires. Rupture de la capsule ovarienne ou tumeur détectée à la surface de l'ovaire ou présence de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
Stade II : La tumeur implique un ou deux ovaires et s'est étendue au petit bassin		
IIA	La tumeur s'est étendue et/ou implantée dans l'utérus et/ou les trompes de Fallope.	59%
IIB	La tumeur s'est étendue à un autre organe dans le petit bassin. Pas de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
IIC	Tumeur IIA ou IIB avec présence de cellules malignes dans les ascites et lavages péritonéaux.	
Stade III : La tumeur implique un ou deux ovaires et s'est étendue au péritoine et aux ganglions lymphatiques régionaux		
IIIA	Métastases péritonéales microscopiques au-delà du petit bassin	35%
IIIB	Métastases péritonéales macroscopiques de taille inférieure ou égale à 2 cm au-delà du petit bassin	
IIIC	Métastases péritonéales macroscopiques de taille supérieure à 2 cm au-delà du petit bassin et/ou atteinte des ganglions lymphatiques régionaux	
Stade IV : Métastases à distance, au-delà du péritoine (foie, poumon)		22%

Tableau 1 : Classification internationale FIGO pour le cancer de l'ovaire

Traduit de la classification FIGO (International Federation of Obstetricians and Gynaecologists) <http://www.targetovariancancer.org.uk/page.asp?section=131§ionTitle=FIGO>. Les taux de survies à 5 ans sont issus du guide « affection longue durée » HAS/INCA de Janvier 2010.

1.3 FACTEURS DE RISQUES ET ORIGINES GENETIQUES

Les événements moléculaires responsables de l'initiation de la cancérogenèse ovarienne restent encore inconnus. Cependant, une bonne connaissance des facteurs de risque du cancer épithélial ovarien permettrait d'en faciliter la prévention, le dépistage et la détection précoce.

L'âge, l'utilisation de traitement hormonal substitutif prolongé lors de la ménopause, la puberté précoce, la nulliparité et la ménopause tardive sont considérés comme des facteurs de risque du cancer ovarien. En revanche, l'utilisation de la contraception orale, la multiparité et l'allaitement, semblent être des facteurs protecteurs (15).

Il existe également des facteurs de risque environnementaux associés aux populations des pays développés tels que l'utilisation du tabac, les grossesses tardives ou la surcharge pondérale (15,20).

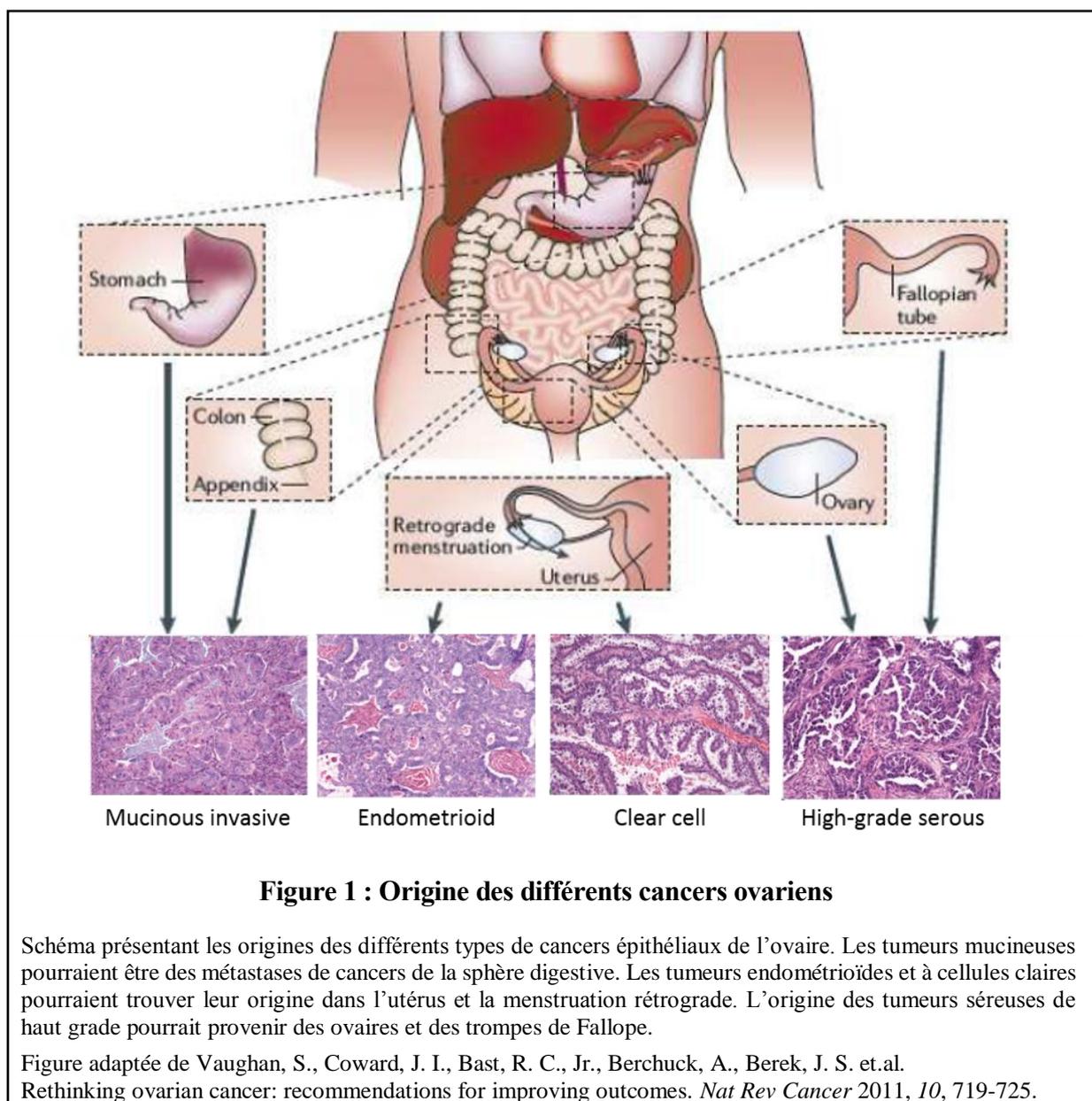
Cinq à 10% des cancers épithéliaux ovariens résultent de prédispositions génétiques et deux modes de développement ont été identifiés. Dans environ 90% des cas de prédispositions génétiques est retrouvé le syndrome du cancer sein-ovaire qui est associé à une mutation de l'un des gènes BRCA1 ou BRCA2 impliqués dans la réparation des dommages double-brin de l'ADN. Dans les 10% de cas restants, le syndrome du cancer colorectal héréditaire sans polypose (syndrome de Lynch) est à l'origine du cancer de l'ovaire et provient de la mutation de l'un des 4 gènes du Mismatch Repair (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2) intervenant dans la réparation des mésappariements de l'ADN (15,20).

1.4 ORIGINES DU CANCER OVARIEN

L'épithélium ovarien est considéré comme une forme spécialisée du mésothélium en continuité avec le péritoine qui lui est morphologiquement et histologiquement identique. La rupture de l'épithélium ovarien lors de l'ovulation est associée à des traumatismes répétés, causant des dommages à l'ADN étant historiquement considérés comme événements initiateurs de la transformation néoplasique de l'épithélium ovarien (21).

La difficulté à traiter correctement le cancer ovarien peut être attribuée à la mauvaise compréhension de sa pathogénèse. Des arguments clinicopathologiques, immunohistochimiques, et génétiques récemment mis en évidence sont en faveur d'une origine extra-ovarienne des cellules initiatrices des cancers ovariens. Les trompes de Fallope ont ainsi été identifiées comme la source de cancers séreux ovariens de haut grade. De la même manière, les cancers endométrioïdes et à cellules claires présentent un lien épidémiologique fort avec l'endométriose (présence de tissu endométrial en dehors de la cavité utérine) associée elle-même à des menstruations rétrogrades. La plupart des tumeurs mucineuses sont en réalité des métastases provenant de cancers solides gastro-intestinaux tels que le cancer du côlon ou de l'estomac (Figure 1). Enfin, quelques cancers ovariens ont plus en commun avec certains cancers du sein ou rénaux qu'avec d'autres histologies ovariennes. Par exemple, les cancers séreux ovariens de haut grade partagent des caractéristiques génomiques et transcriptionnelles avec les cancers du sein de type basal. Les différents histotypes de cancers ovariens pourraient être considérés comme des pathologies distinctes au vu de leur origine et mutations oncogéniques différentes (9,21).

Le terme de cancer ovarien n'est donc en réalité qu'un terme général désignant une série de maladies d'origine moléculaire et étiologique différentes qui ne partagent qu'une localisation anatomique. L'utilisation de « cancer péritonéal » ou « pelvien » pourrait remplacer ce terme et constituer la clé d'une meilleure prise en charge des patientes (9) (Figure 1).



1.5 DIAGNOSTIC

1.5.1 Interrogatoire et examen clinique

Comme vu précédemment, la symptomatologie du cancer des ovaires est aspécifique et souvent tardive. Lorsque ces symptômes sont observés, il est nécessaire de procéder à un examen clinique complet (examen abdominal, toucher pelvien, palpations des aires ganglionnaires et mesure du poids). Un interrogatoire reprenant les antécédents personnels et familiaux de cancer (notamment gynécologique évoquant les mutations BRCA 1 et 2) ainsi que les comorbidités doit lui être associé (4).

1.5.2 Imagerie

L'échographie abdominopelvienne sus pubienne et endovaginale reste l'examen d'imagerie de première intention. Un second avis échographique peut être demandé en cas de doute, d'anomalie pelvienne ou annexielle (dans la région utérine). Si une masse pelvienne indéterminée ou suspecte est mise en évidence lors de ce second avis échographique, une imagerie par résonance magnétique pelvienne peut s'avérer utile. Un examen différentiel est réalisé en cas de doute sur la présence de métastases ovarienne d'origine mammaire ou digestive (bilan sénologique, fibroscopie gastrique et coloscopie) (4,15,20).

Une imagerie par tomodensitométrie thoraco-abdominopelvienne est ensuite réalisée dans le but d'établir un bilan préopératoire et d'extension de la maladie (18).

1.5.3 Marqueurs

Le marqueur sérologique de référence pour le diagnostic du cancer ovarien est le Cancer Antigen 125 (CA-125). Il s'agit d'une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules cancéreuses et qui est libéré dans la circulation sanguine. Cependant, sa spécificité et sa sensibilité restent discutables. En effet, le taux de CA-125 peut être anormalement élevé dans des conditions bénignes (comme les diverticulites, fibroses utérines, ou grossesses ectopiques), dans des conditions physiologiques (grossesse, menstruations) mais également dans le cas de cancers d'origines digestives. De plus, une augmentation du taux de CA-125 est retrouvée dans 80% des cancers ovariens de stades avancés mais seulement dans 50% des cancers ovariens de stade I. Il reste cependant un très bon marqueur pour évaluer la progression ou la régression tumorale et est également un bon prédicteur de rechute au cours du traitement de ce cancer (15,22).

Le dépistage de masse tumorale ovarienne à l'aide de marqueurs sériques n'a pas été mis au point, à ce jour. Cependant, des chercheurs tentent de combiner différentes stratégies pour pallier au manque de sensibilité du CA-125. Ainsi, une équipe américaine a mis en place un index basé sur l'association des symptômes et la mesure du taux sérique de CA-125 pour améliorer la détection du cancer ovarien (23). L'utilisation de la combinaison d'un marqueur sérique tel que human epididymis protein 4 (HE4) avec le CA-125 améliore également la sensibilité diagnostique de 33,1% par rapport au CA-125 seul (spécificité de 95%). En revanche, l'ajout de marqueurs supplémentaires à cette combinaison n'améliore que peu la sensibilité diagnostique (au maximum de 2,4% avec CA72-4) et ne présente donc que peu d'intérêt (24). Les approches récemment développées, telles que la détection de l'ADN tumoral circulant ou des cellules tumorales

circulantes donnent un nouvel espoir quant à la détection précoce et le suivi du développement des résistances dans le cancer ovarien (25,26).

1.5.4 Diagnostic anatomopathologique

Le diagnostic de certitude du cancer ovarien nécessite un prélèvement histologique. Celui-ci est le plus souvent réalisé sur la pièce chirurgicale au cours de la laparotomie exploratrice recommandée en cas de masse annexielle palpable. En cas de carcinose péritonéale, une biopsie sera réalisée sous coelioscopie ou sous le contrôle de l'imagerie si la coelioscopie est impossible. C'est cet examen anatomopathologique qui permettra d'établir le type histologique de la tumeur selon la classification de l'OMS précédemment citée. Le grade histologique correspondant au degré de différenciation de la tumeur (grade 1 pour très différencié, 2 pour modérément ou 3 pour faiblement) et est un facteur pronostique important (4,15,19).

1.5.5 Diagnostic oncogénétique

L'hérédité joue un rôle non négligeable dans la survenue du cancer ovarien. C'est la raison pour laquelle son diagnostic peut aboutir à la recherche de mutation des gènes BRCA1 et BRCA2 prescrite au cours d'une consultation d'oncogénétique. Ce diagnostic oncogénétique est proposé à toutes les femmes atteintes de cancer de l'ovaire, isolé ou familial, survenu avant 70 ans (à l'exclusion des tumeurs frontières, mucineuses, ou non épithéliaux). Il est également proposé aux femmes atteintes de cancer de l'ovaire survenu à ou après 70 ans ayant un(e) apparenté(e) de premier degré (ou second si l'intermédiaire est un homme) atteint de cancer du sein ou de l'ovaire. Ce diagnostic permet d'informer les familles des prédispositions génétiques existantes et donc d'identifier les femmes ayant un risque accru de développer un cancer du sein ou de l'ovaire. Un suivi rapproché et un traitement chirurgical prophylactique (oophorectomie) peut alors être envisagé (4,15).

1.6 EVOLUTION ET CARCINOSE PERITONEALE

Le cancer épithélial ovarien se développe fréquemment par extension directe du site primaire de la tumeur vers les organes voisins. Bien que de récentes données montrent des mécanismes de métastase par voie hématogène (faisant intervenir la circulation sanguine), ce phénomène ne semble pas majoritaire dans le cancer ovarien. Ce dernier métastase fréquemment par un processus de migration transcoelomique (passage de cellules tumorales au travers du péritoine puis implantation à sa surface à distance ou diffusion dans la lymphe) (3,27).

1.6.1 Péritoine et carcinose péritonéale

Le péritoine est un organe séreux d'origine mésodermique qui présente à la fois des caractéristiques mésenchymateuses et épithéliales. Le péritoine pariétal couvre la paroi abdominale antérieure et postérieure alors que le péritoine viscéral couvre les organes. Dans les deux cas il se compose de différentes couches : le glycocalyx, les cellules mésothéliales, la lamina basale, le stroma submésothélial et la lamina élastique (Figure 2A).

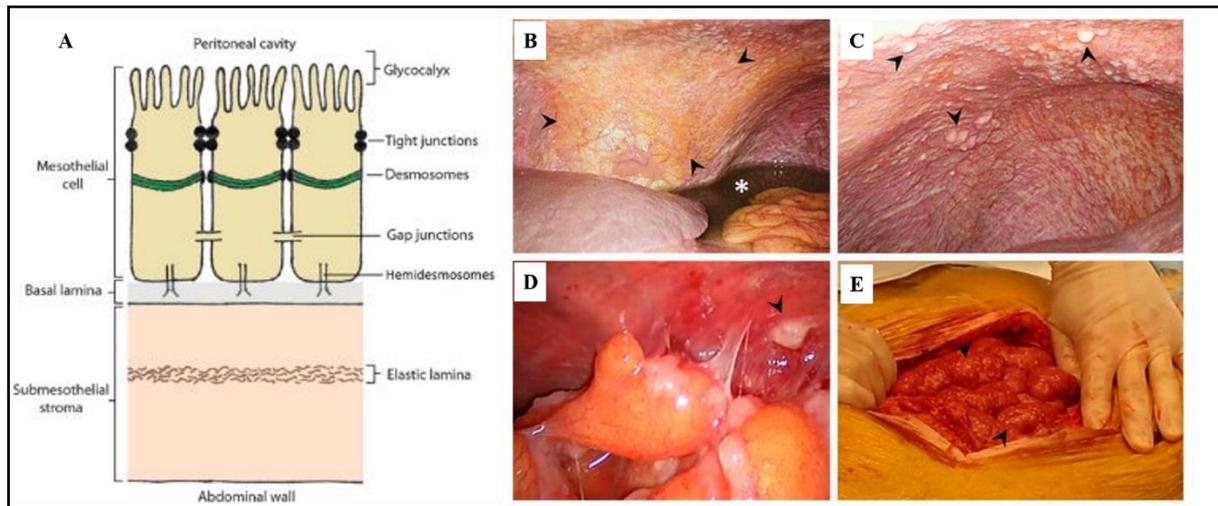


Figure 2 : Illustration schématique du péritoine et images de carcinose péritonéale

(A) Schéma de l'organisation du péritoine. La carcinose péritonéale est caractérisée par de petits dépôts blancs (flèches noires) localisés (B-D) sur le péritoine pariétal et (E) sur le péritoine viscéral. (A et B) Le diaphragme est parfois impacté et la présence de carcinose péritonéale est généralement accompagnée de liquide d'ascite malin (astérisque blanc).

Figure adaptée de van Baal JOAM, van Noorden CJF, Nieuwland R, Van de Vijver KK, Sturk A, van Driel WJ, et al. Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. *J Histochem Cytochem.* févr 2018;66(2):67-83.

Le rôle des cellules péritonéales est de réguler l'homéostasie intra-péritonéale par l'échange de fluides et de molécules. Il joue également un rôle important dans la réponse inflammatoire, la présentation d'antigènes, la fibrose et la fibrinolyse, la réparation tissulaire et le développement de métastases péritonéales responsables de la carcinose péritonéale (5).

La carcinose péritonéale se caractérise par des petits dépôts tumoraux blancs à la surface interne du péritoine viscéral et pariétal. Le péritoine est une membrane fine et fortement vascularisée. Les métastases péritonéales grossissent de manière superficielle et les dépôts restent de petite taille. L'invasion profonde des muscles abdominaux et de la séreuse des organes viscéraux reste rare (Figure 2 B-E).

Le développement de la carcinose péritonéale est un phénomène complexe passant par de multiples étapes (5).

1.6.2 Développement de la carcinose péritonéale

1.6.2.1 Etape 1 : Détachement de cellules de la tumeur primaire

La progression du cancer ovarien sur la surface péritonéale semble passer par un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) effectuée par les cellules tumorales. L'expression de l'E-cadhérine par les cellules tumorales diminue au cours de la TEM au profit de l'expression de la N-cadhérine facilitant ainsi le détachement des cellules ovariennes de la tumeur primaire. C'est notamment grâce à ce phénomène, que les cellules épithéliales se dépolarisent, acquièrent des propriétés fibroblastiques et adoptent un phénotype invasif et migratoire (3,16)

1.6.2.2 Etape 2 : Formation de sphéroïdes

Les sphéroïdes correspondent à l'agrégation de multiples cellules sous forme tridimensionnelle (3D) plus ou moins sphérique. La cohésion et la croissance cellulaire au sein des sphéroïdes semble être assurée par l'action de multiples intégrines (comme $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ou $\alpha 2\beta 1$) et cadhérines participant aux jonctions cellulaires. Ainsi, la formation de sphéroïdes permet la résistance des cellules tumorales ovariennes à l'anoïkis (mort cellulaire en absence d'ancrage des cellules dites « saines ») (16,28).

Il a par ailleurs été démontré que les sphéroïdes constituent une niche de chimiorésistance qui recolonise continuellement la cavité abdominale, faisant du cancer ovarien une pathologie extrêmement résistante aux thérapies actuelles. En effet, la formation de ces structures 3D non vascularisées crée un gradient dégressif en oxygène et nutriments et peut inhiber l'accès des agents chimiothérapeutiques aux cellules internes des sphéroïdes (28,29). De plus, du fait du développement indépendant de l'ancrage, certaines sous-populations cellulaires se multiplient plus lentement ou deviennent quiescentes, les rendant ainsi résistantes aux chimiothérapies conventionnelles (8,28,29). C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques incluant notamment des méthodes d'administration alternatives (par exemple sous forme de chimiothérapie intra péritonéale) permettant de cibler plus particulièrement les sphéroïdes (8,28,29).

1.6.2.3 Etape 3 : Dissémination transcoelomique

Une fois détachées, les cellules cancéreuses, seules ou sous formes de sphéroïdes, se trouvent en suspension dans le fluide péritonéal. Il existe au sein de la cavité péritonéale un mouvement naturel de fluide fournissant un mécanisme passif de dissémination aux cellules tumorales seules ou sous formes de sphéroïdes précédemment exfoliées de la surface de la tumeur primaire (3,5).

1.6.2.4 Etape 4 : Formation d'ascite

La formation d'ascite est un processus inflammatoire correspondant à l'accumulation de liquide séreux au sein de la cavité formée par les deux feuillets du péritoine. Ce phénomène résulte le plus souvent d'un défaut de drainage du liquide physiologiquement présent dans la cavité péritonéale et n'est pas spécifique du cancer ovarien (présent dans les infections ou l'inflammation) (16).

Dans le cancer ovarien, il n'est pas réellement établi si l'ascite est présente lorsque les premières cellules métastasent ou si sa quantité reflète au contraire un volume tumoral plus important. La formation d'ascite résulte tout de même d'une combinaison de facteurs. Les cellules cancéreuses peuvent obstruer les chaînes lymphatiques subpéritonéales et prévenir l'absorption du fluide péritonéal naturellement produit. De plus, la sécrétion de VEGF (facteur de croissance épithélial vasculaire) par les cellules cancéreuses augmente la perméabilité vasculaire et promeut la formation d'ascite (16,29).

La présence massive d'acide lysophosphatidique et de chimiokines telles que le stromal cell-derived factor 1, ou de protéinases dégradant la matrice extracellulaire (comme les métalloprotéinases matricielles et l'urokinases plasminogen activator) dans le liquide d'ascite crée un microenvironnement favorisant la mobilité et l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes et donc le phénomène métastatique (3).

1.6.2.5 Etape 5 : Implantation dans le péritoine

L'implantation à distance de cellules tumorales ovariennes se fait, dans un premier temps, au niveau des trompes de Fallope et de l'ovaire controlatéral. Par la suite, les sites métastatiques les plus fréquents sont l'omentum et le péritoine. Le péritoine situé sous le diaphragme droit et le mésentère de l'intestin grêle sont préférentiellement colonisés (3,16,29).

De nombreuses molécules sont impliquées dans l'adhésion des cellules tumorales ovariennes aux cellules mésothéliales et au stroma mésothélial sous-jacent. En effet, les cellules cancéreuses ovariennes expriment à leur surface des intégrines, majoritairement $\alpha 5 \beta 1$, contribuant à leur adhésion au péritoine. Les ligands de ces intégrines, incluant collagène, laminine, fibronectine, vitronectine et autres composants de la matrice extra-cellulaire sont exprimés dans le stroma et faciliteraient davantage l'adhésion des cellules tumorales au péritoine en comparaison aux molécules d'adhésion exprimées par les cellules mésothéliales (3,5).

Une couche continue de cellules mésothéliales constituerait donc une protection contre l'adhésion et la diffusion des cellules cancéreuses au travers du péritoine. A l'inverse, les lésions de

la couche cellulaire mésothéliale, consécutives à la chirurgie ou suite à une infection, faciliteraient possiblement l'adhésion des cellules tumorales par exposition du stroma sous-jacent (5).

1.6.3 Du péritoine à la circulation générale

Le fluide d'ascite transportant les cellules de cancer épithélial ovarien pénètre dans la lacune lymphatique sous-péritonéale entre les fibres musculaires du diaphragme. De cette lacune, le fluide traverse le diaphragme via les vaisseaux lymphatiques intrinsèques pour atteindre les lymphatiques collecteurs sous la plèvre diaphragmatique. Le fluide lymphatique est ensuite drainé par les vaisseaux lymphatiques retro-sternaux en atteignant la veine sous-clavière gauche. Une voie directe de la cavité abdominale vers la circulation générale est ainsi établie (3).

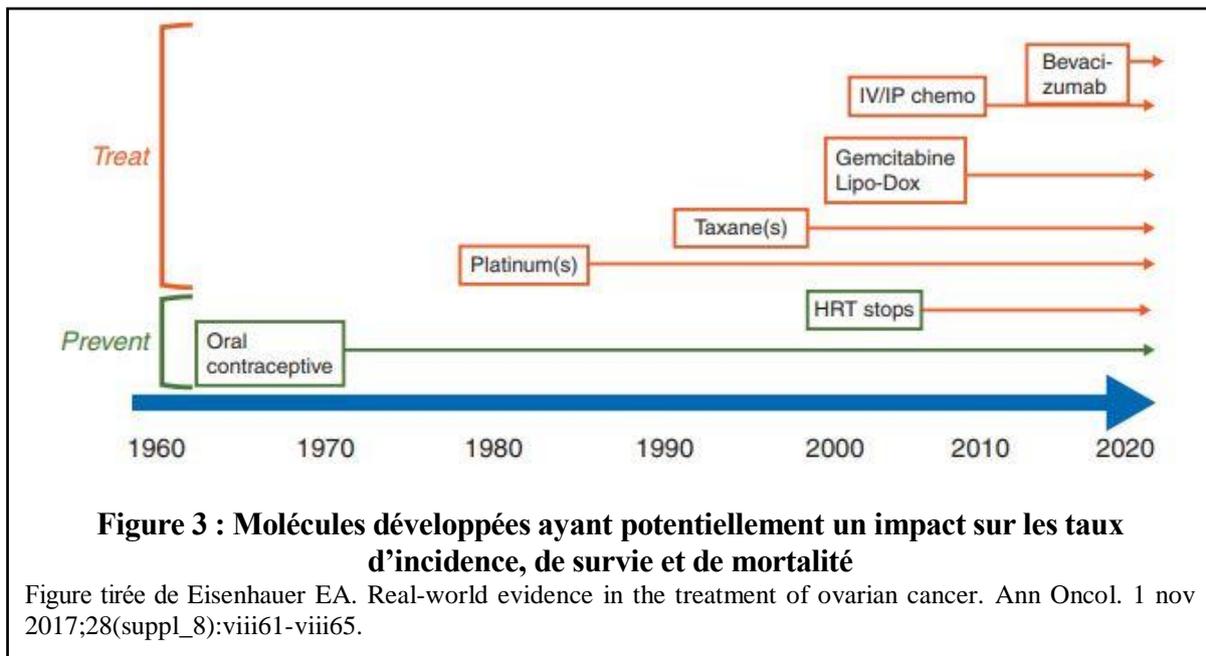
Cependant, les métastases de la voie hématogène dans le cancer ovarien restent rares en dépit de présence de cellules tumorales circulantes détectées dès le diagnostic précoce de la pathologie (3,27,29).

Le processus métastatique du cancer ovarien reste encore mal connu, mais il est certain que la voie transcoelomique est la plus commune concernant le cancer épithélial ovarien. La prise en charge de ce cancer doit donc évoluer afin de prendre en compte ce processus.

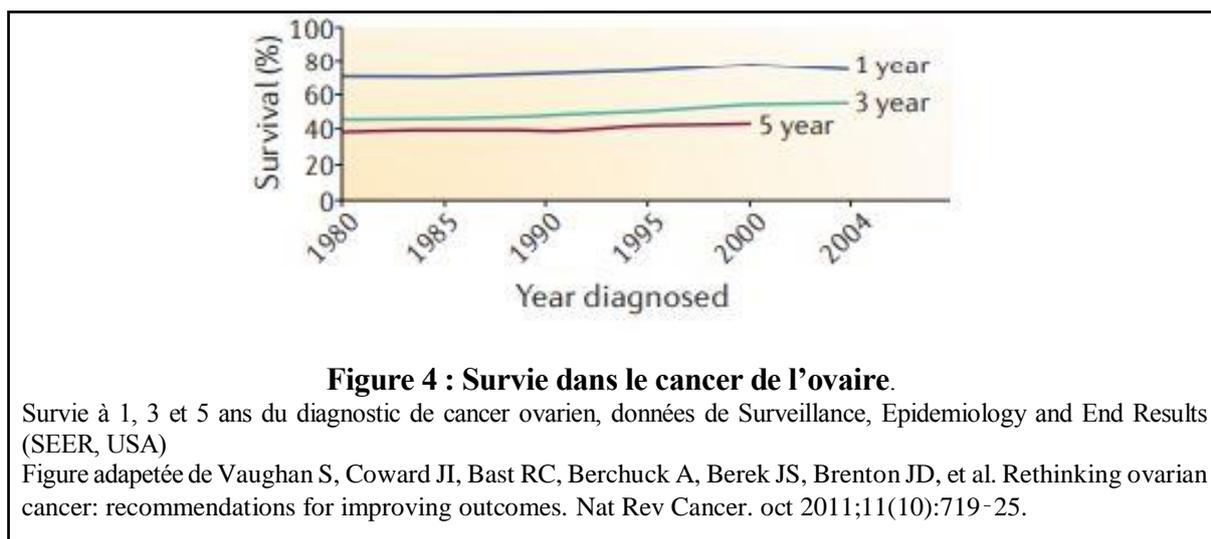
2 PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES CANCERS OVARIENS

2.1 PROBLEMATIQUE DU CANCER OVARIEN

Depuis l'apparition des sels de platine dans l'arsenal thérapeutique du cancer ovarien il y a environ 30 ans, peu de nouvelles molécules ont prouvé leur efficacité (Figure 3) (30).



Du fait de l'utilisation massive de la contraception orale par les femmes, le taux d'incidence du cancer ovarien a légèrement diminué (30). Cependant, le traitement standard du cancer ovarien reste le même et les taux de survie n'ont que peu évolués durant les 30 dernières années (Figure 4) (9).



Le traitement initial de ce cancer, reposant le plus souvent sur une chirurgie associée à une chimiothérapie, permet une première rémission clinique. Du fait de la présence de cellules tumorales résiduelles au sein du péritoine, la récurrence est malheureusement quasi systématique (15).

2.2 CHIRURGIE

2.2.1 Chirurgie des stades I à IIIB

La chirurgie est généralement la première phase du traitement selon les recommandations du Rapport HAS et INCa 2010. L'intervention standard minimale comprend une annexectomie bilatérale avec hystérectomie totale (femme ménopausée ou femme ne désirant plus d'enfant). La chirurgie permet la stadification complète et comprend au minimum une omentectomie totale, parfois une appendicectomie (formes mucineuses), un curage ganglionnaire pelvien et aortique infrarénal bilatéral, des biopsies et une cytologie péritonéale. Un traitement conservateur (annexectomie unilatérale) peut être proposé chez les femmes désirant une grossesse pour les stades IA G1 bien que ce traitement reste exceptionnel (4,15).

2.2.2 Chirurgie des stades IIIC à IV

Pour les stades avancés du cancer ovarien, la chirurgie est dite cytoréductive ou chirurgie de « débulking ». L'objectif de la chirurgie est la résection complète (absence de résidu macroscopique). Dans le cas où cette dernière ne peut être obtenue, une chimiothérapie néoadjuvante est réalisée. Une chirurgie d'intervalle ayant pour but de réaliser une résection complète est alors effectuée entre deux cures de chimiothérapie, au plus tard après la 3ème cure (4,15).

Si la réduction tumorale est incomplète, suivant l'état de santé de la patiente, une reprise chirurgicale est alors proposée pour obtenir une résection complète avant ou en cours de chimiothérapie (4,15).

La définition courante d'une résection optimale correspond à une maladie résiduelle n'excédant pas 1 cm. Le pronostic vital des patientes est corrélé au succès de la résection et l'absence de maladie résiduelle est de meilleur pronostic pour les patientes (20).

Les critères de non résécabilité sont : une carcinose péritonéale étendue d'emblée inextirpable, plus de 3 segments digestifs atteints, une carcinose diffuse du mésentère ou une atteinte majeure du hile hépatique et/ou splénique (31).

2.2.3 Complications liées à la chirurgie

La chirurgie pratiquée lors du traitement du cancer ovarien est une chirurgie lourde qui entraîne des complications (comme des complications thromboemboliques, infectieuses, digestives, ou des épanchements pleuraux) dans environ 30% des cas. Il convient donc de prendre en compte le risque de lymphocèle (collections de lymphes au site de curage ganglionnaire) et de lymphoedème pouvant nécessiter un drainage (4).

2.3 CHIMIOThERAPIE

2.3.1 Chimiothérapie intraveineuse

L'indication d'une chimiothérapie systémique adjuvante dépend du stade, du type et du grade de la tumeur (Tableau 2). En effet, elle n'est pas recommandée en cas de tumeur de stade IA ou IB de grade 1, discutée pour les stades IA IB de grade 2 mais est indiquée à partir du stade IC ou G3 ou en cas d'histologie particulière de mauvais pronostic (4).

Stade	Chirurgie	Chimiothérapie i.v.	Chimiothérapie i.p.
IA/IB G1	☑	-	-
IA/IB G2	☑	À discuter	-
IA/IB G3, IC et cellules claires	☑	☑	-
II à IIIB	☑	☑	À discuter
IIIC	☑	☑	À discuter
IV	À discuter	☑	-

Tableau 2 : Modalité de prise en charge du cancer ovarien

Le choix du traitement repose sur le stade et le grade de la pathologie. Le traitement peut comprendre une chirurgie, une chimiothérapie intraveineuse (i.v.) et/ou une chimiothérapie intra-péritonéale (i.p.).

Tableau adapté de HAS, INCa. Guide - Affection longue durée - Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique - Cancer de l'ovaire. 2010.

La chimiothérapie standard du cancer ovarien reste, depuis de nombreuses années, l'association d'un sel de platine et de taxane.

Les sels de platines sont des agents antinéoplasiques cytostatiques dont le mécanisme d'action est similaire à celui des agents alkylants. Ils forment des ponts inter et intracaténaux sur l'ADN dont la synthèse est alors inhibée, entraînant dans un second temps l'arrêt de la synthèse d'ARN et de protéines cellulaires (32,33). Le choix entre cisplatine et carboplatine est fonction des chimiothérapies antérieures reçues par la patiente, de sa tolérance et des toxicités cumulatives. Il n'a pas été mis en évidence de différence d'efficacité entre ces deux molécules mais le carboplatine est souvent préféré au cisplatine du fait de sa meilleure tolérance rénale (15,20).

Les taxanes sont des poisons des microtubules induisant l'assemblage des microtubules à partir des dimères de tubuline et empêchant leur dépolymérisation. Ces poisons entraînent ainsi la formation de fuseaux anormaux de microtubules essentiels aux fonctions vitales cellulaires et

aboutissant à la mort cellulaire (34). Le taxane de choix pour le cancer ovarien reste le paclitaxel (15,20).

La dose de paclitaxel est calculée en fonction de la surface corporelle en mg/m^2 . La clairance du carboplatine diffère chez chaque patient, indépendamment de la surface corporelle. L'exposition systémique au carboplatine est représentée par l'aire sous la courbe (AUC) de la concentration plasmatique de sel de platine en fonction du temps. C'est la raison pour laquelle l'administration du carboplatine est basée sur l'AUC, calculée le plus souvent à l'aide de la formule de Calvert ou, comme à Toulouse, avec la formule Chatelut ou la formule de Thomas.

Le schéma standard associe donc carboplatine (AUC 5 ou 6) au paclitaxel ($175\text{mg}/\text{m}^2$). Ces molécules sont administrées seulement le premier jour d'un cycle de 3 semaines et ce pour 6 cycles (une administration toutes les 3 semaines). Une alternative peut être proposée avec une administration hebdomadaire de paclitaxel à $80\text{mg}/\text{m}^2$ associé au carboplatine (AUC 5 ou 6) toutes les 3 semaines ou encore paclitaxel à $60\text{mg}/\text{m}^2$ hebdomadaire associé au cisplatine (AUC 2) hebdomadaire (31).

Il n'y a pas de recommandation d'utilisation de thérapie ciblée hors essais cliniques ni d'indication à la radiothérapie dans la prise en charge initiale des cancers ovariens (4).

2.3.2 Chimiothérapie Hyperthermique Intra-péritonéale

La chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP) est une technique consistant à administrer une chimiothérapie sous forme de « bain » en contact direct avec les organes au sein du péritoine et chauffée à environ 43°C pendant une période de 30 à 90 minutes. Cette technique est le plus souvent pratiquée au moment de la réalisation de la chirurgie de « debulking » afin d'améliorer l'élimination des implants microscopiques péritonéaux (35).

Les molécules administrées par cette voie sont généralement le cisplatine et le paclitaxel. Cette technique doit être discutée au cas par cas et pratiquée par des équipes expérimentées. Elle n'a cependant pas d'indication en dehors d'essais thérapeutiques mais se révèle particulièrement intéressante dans la prise en charge de la carcinose péritonéale (31).

Plusieurs études ont démontré au cours des dernières années que la pratique de la CHIP améliore la survie sans progression (de 3,5 mois (36)) et la survie globale (de 11,7 mois (36)) chez les patientes atteintes de carcinose péritonéale en comparaison à une chimiothérapie systémique seule (16,36–39).

La CHIP réalisée avec du cisplatine et du paclitaxel présente un profil pharmacocinétique favorable en permettant d'appliquer une forte concentration d'agent cytotoxique dans les tissus

péritonéaux tout en maintenant une exposition systémique faible (40). L'hyperthermie favorise la perméabilité des cellules aux traitements et la pratique immédiate de cette technique suite à la chirurgie limite le phénomène d'échappement cellulaire causé par l'adhésion cellulaire à la surface du péritoine. Cette technique permet donc de limiter l'évolution métastatique du cancer ovarien en réduisant le développement de la carcinose péritonéale (41,42).

La CHIP reste cependant peu pratiquée du fait des risques qu'une telle procédure peut présenter. Des troubles gastrointestinaux (comme des fistules intestinales, perforation gastrique, ou abcès) des complication pulmonaires (infections et effusions pleurales) et hématologiques sont en effet retrouvées après ce type d'intervention (43). Il a pourtant récemment été démontré qu'elle n'est pas associée à un taux plus important d'effets secondaires de grade 3 ou 4 (27% contre 25% pour la chirurgie seule) (36).

2.3.3 Effets indésirables

Savoir identifier les effets indésirables liés au traitement a toute son importance dans la prise en charge de la patiente car en cas d'apparition, il peut être nécessaire d'adapter les doses ou de changer de molécules. L'objectif de ce paragraphe n'est pas de faire une liste exhaustive des évènements iatrogènes liés au traitement mais d'identifier les plus fréquents.

Sont fréquemment retrouvés :

- des réactions allergiques : notamment avec les taxanes, les sels de platine et la doxorubicine liposomale. Ces réactions se présentent sous forme de flush, hyper ou hypotension, dyspnée, fièvre, frissons, douleurs abdominales, dorsales ou des membres, rash cutané, nausées, vomissements. La prise en charge est alors la même que celle d'une réaction allergique sans particularité (4,32–34,44).
- Des troubles hématologiques : neutropénie, thrombopénie, ou anémie. La neutropénie chimio-induite sans fièvre régresse généralement dans les 7 jours et ne nécessite qu'une surveillance clinique. En revanche, en cas de fièvre supérieure à 38°C contrôlée après une heure, ou en présence de frissons, dyspnée, vomissements ou diarrhée importante, un hémogramme doit être réalisé sans délai (4,32–34).
- Des troubles digestifs : nausées vomissements, diarrhée. Ces troubles sont généralement prévenus par des antiémétiques prescrits. En cas de diarrhée ou de vomissements persistants ou associés à une fièvre et/ou neutropénie, une hospitalisation doit être envisagée (4,32–34,44).

- Des neuropathies périphériques : paresthésies des extrémités. Fréquentes avec les taxanes, elles peuvent conduire à une réduction de posologie voire à l'arrêt du traitement (34).
- Alopécie : principalement observée avec les taxanes, elle est tout de même retrouvée avec la plupart des molécules anticancéreuses (4,34).
- Toxicité rénale : les sels de platines et plus particulièrement le cisplatine, présentent une toxicité rénale généralement prévenue par un protocole d'hyperhydratation du patient (32,33).
- Toxicité cardiaque : principalement observé avec la doxorubicine, elle est surveillée par la mesure de la Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche (FEVG) (44).

2.4 SUIVI DES PATIENTES

Le suivi post-thérapeutique des patientes atteintes de cancers épithéliaux de l'ovaire a pour but de détecter les récives et les effets indésirables liés au traitement.

A la fin de son traitement, la patiente effectue une visite de surveillance tous les 4 mois pendant 2 ans puis tous les 6 mois pendant 3 ans, et enfin une visite annuelle. Lors de cette visite, une évaluation clinique comprenant un examen pelvien ainsi qu'un interrogatoire sont réalisés. Il est également recommandé d'effectuer le dosage du CA-125 (ou autres marqueurs) s'il était élevé au diagnostic. Une élévation du taux sérique de CA-125 doit être confirmée par deux mesures séparées obtenues à une semaine d'écart. Aucun examen radiologique systématique n'est recommandé mais une échographie pelvienne sus-pubienne et endovaginale est réalisée pour les patientes ayant subi un traitement conservateur (4,18).

En cas de signe suggérant une récive, à savoir une élévation du CA-125 ou des symptômes physiques, des examens biologiques et d'imagerie (Tomodensitométrie, Imagerie à Résonance Magnétique) complémentaires sont effectués (15).

2.5 PRISE EN CHARGE D'UNE RECIDIVE

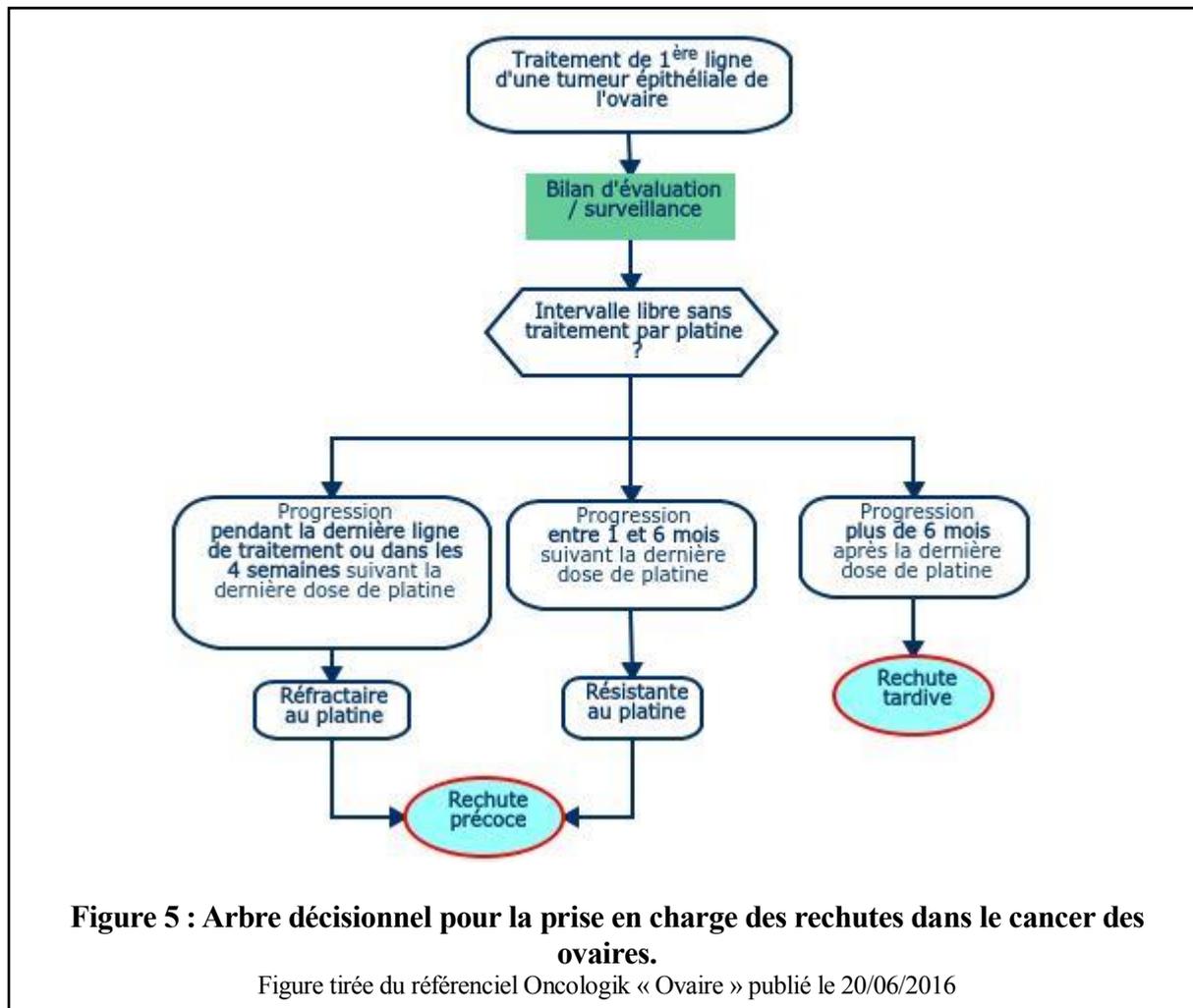
Plus de 70% des patientes qui ont bénéficié d'une cytoréduction optimale et 90% ayant eu une cytoréduction suboptimale rechutent dans les 18 à 24 mois suivant le premier traitement (16,17).

Les recommandations pour la prise en charge d'une récive sont les suivantes :

- une chirurgie : pour les patientes opérables avec récive localisée et en rémission complète pendant 12 mois après le traitement initial.

- une chimiothérapie dont les modalités dépendront du délai de la récurrence mais la participation aux essais cliniques est toujours encouragée.
- une radiothérapie peut être discutée pour les localisations tumorales limitées et particulières (4).

Les critères de choix de la chimiothérapie prennent en compte plusieurs facteurs. L'intervalle libre entre la fin du premier traitement et la récurrence étant l'un des plus importants (figure 5).



Si ce délai est supérieur à 6 mois, la patiente est dite sensible au platine. Un nouveau traitement par carboplatine et paclitaxel est alors recommandé et conduit à 20 à 50% de réponse. Chez ces mêmes patientes, l'association du carboplatine avec le paclitaxel, la gemcitabine ou la doxorubicine se révèle plus efficace que l'utilisation du sel de platine seul (17,18,31).

Si la récurrence apparaît dans un délai inférieur à 6 mois, la patiente est alors considérée comme résistante au platine (ou réfractaire si ce délai est inférieur à 4 semaines). Une seconde ligne de chimiothérapie différente de la première lui sera administrée en monothérapie. La doxorubicine

liposomale, le paclitaxel administré de manière hebdomadaire et le topotecan présentent chez ces patientes un intérêt pour le prolongement de leur survie sans progression (Figure 5) (17,18,20,31).

Il sera également nécessaire de prendre en compte l'état de santé de la patiente : son âge, ses comorbidités et les séquelles des traitements antérieurs qu'elle peut présenter. Les protocoles antérieurs, le grade tumoral et le profil oncogénétique (par exemple les mutations BRCA) peuvent également influencer l'utilisation de thérapies ciblées en cas de récurrence (31).

2.6 THERAPIES CIBLEES

2.6.1 Cibles du microenvironnement

L'étude du microenvironnement tumoral a mis en évidence les interactions réciproques entre les cellules cancéreuses et les cellules de l'hôte. Elles sont un prérequis indispensable à la croissance et la progression tumorale. L'ascite maligne agit comme un réservoir de multiples facteurs solubles et de composants cellulaires formant un microenvironnement tumoral particulier au cancer ovarien. Ce microenvironnement fournit des voies métastatiques efficaces, affaiblit la surveillance immunitaire et favorise la résistance aux traitements (6,7,45).

2.6.1.1 Les facteurs pro-angiogéniques

Parmi les facteurs solubles présents dans l'ascite, le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) est un promoteur clé de l'angiogenèse et de la progression tumorale du cancer épithélial ovarien (7). Les agents antiangiogéniques ont largement été testés dans le traitement du cancer ovarien (46). Le bevacizumab, un anticorps monoclonal se liant au VEGF, présente une activité démontrée notamment en combinaison à la chimiothérapie de référence avec une amélioration de la survie globale de 7,8 mois mais seulement de 3,6 mois pour la survie sans progression (chiffres de l'étude ICON7) (17,46–48).

Dans la prise en charge initiale des cancers ovariens de stade IIIB et plus, le bevacizumab est prescrit à 15mg/kg de poids corporel et administré toutes les 3 semaines en perfusion intraveineuse premièrement en association au carboplatine et paclitaxel pendant 6 cycles, suivi d'une administration en monothérapie en continue jusqu'à progression de la maladie ou toxicité inacceptable et ce pour 15 mois maximum (31).

D'autres inhibiteurs du VEGF (comme l'aflibercept) ou d'autres protéines proangiogéniques comme l'angiopoïétine (trebananib), le Platelet derived growth factor ou PDGF (imatinib et pazopanib) ou du récepteur au VEGF (pazopanib, sorafenib, sunitinib, cediranib) sont également testés en clinique mais ne font pas encore partie des recommandations dans la prise en

charge du cancer ovarien du fait, le plus souvent, d'effets indésirables notables. Par exemple, le Nintedanib est un triple inhibiteur d'angiokinase (VEGF, Fibroblast Growth Factor ou FGF, et PDGF) qui, malgré son avantage sur la survie sans progression, présente de trop forts effets indésirables gastriques.

2.6.1.2 Immunothérapie

Le Programmed Death 1 (PD-1) est un récepteur inhibiteur exprimé à la surface des cellules T activées. Ses ligands, PD-L1 et 2 agissent pour réguler l'activité immune antitumorale.

Le récent succès de l'immunothérapie dans le mélanome et le cancer du poumon ont donné naissance à des études proposant le nivolumab, anticorps monoclonal inhibant l'interaction de PD-1 avec son ligand, dans les cas de cancer épithélial ovarien résistant au platine. Cette étude de phase II sur 20 patientes résistantes au platine a permis de mettre en évidence une certaine efficacité de l'immunothérapie dans le cancer ovarien avec une stabilisation de la maladie chez de 45% des patientes dont 2 ayant une réponse complète durable (49). De nombreuses immunothérapies restent encore à ce jour à l'étude dans le cancer ovarien (50).

2.6.1.3 Autres cibles du microenvironnement

Les cellules résidentes de l'hôte, notamment les cellules mésothéliales présentes dans la cavité péritonéale, ainsi que les adipocytes au niveau de l'omentum, les cellules du système immunitaire et les fibroblastes associés au cancer présentent un rôle important dans le développement de la pathologie cancéreuse ovarienne et sont des cibles potentielles.

Le fluide péritonéal favorise également la progression du cancer ovarien, d'une part *via* son action mécanique, mais d'autre part car il contient des facteurs solubles (cytokines, lipides) et des vésicules extracellulaires favorisant la communication et la coopération intercellulaire au sein de l'espace péritonéal. L'identification des facteurs ainsi impliqués présente un intérêt pour la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques (6,7,45).

Des études ciblant des cytokines pro-inflammatoires du microenvironnement telles que les interleukines (IL-6) ou le tumor necrosis factor α (TNF- α) n'ont eu qu'un succès modeste. En effet, après une période de stabilisation de la maladie suite à l'utilisation d'infliximab (anti-TNF- α), les taux de cytokines pro inflammatoires des patientes ont commencé à augmenter et ce avant même la fin de l'étude (48).

2.6.2 Cibles cellulaires

2.6.2.1 *Poly(adenosine diphosphate ribose) polymérase (PARP)*

L'enzyme PARP joue un rôle vital dans la réparation de l'ADN en détectant les cassures simple brin de l'ADN et en activant la voie de la réparation par excision de base (BER). La production accrue de cassures simple brin de l'ADN induite par l'inhibition de PARP aboutit à la formation de cassures double brin durant la réplication de l'ADN. Ces défauts sont normalement réparés par le phénomène de recombinaison homologue qui requiert la protéine BRCA intacte. Les tumeurs présentant un défaut de recombinaison homologue, incluant les mutations de BRCA1/2 (retrouvés dans 10 à 20% des cancers ovariens), sont particulièrement sensibles à l'inhibition de PARP. Dans cette situation, les cassures double brins sont réparées par jonctions homologues, aboutissant à la production d'erreurs causant une augmentation de l'instabilité génétique qui conduit à la mort cellulaire. Cette approche exploite le phénomène de létalité synthétique (17,46,48).

Les défauts de recombinaison homologue sont retrouvés dans environ 50% des cancers ovarien séreux de haut grade. Une étude de phase III démontre un avantage significatif sur la survie sans progression lors de l'utilisation de l'olaparib, inhibiteur de PARP de référence, dans les cancers mutés pour BRCA1/2 (11,2 mois contre 7,4 mois chez les patientes non mutés). Le taux de réponse objective en étude de phase II reste intéressant chez les patientes sensibles au platine quel que soit le statut mutationnel de BRCA1/2 (41% chez les patientes mutés contre 24% chez les non mutés) (17,46,48). C'est la raison pour laquelle l'olaparib est indiqué, après discussion en RCP (Réunion de Concertation Pluridisciplinaire), dans les cancers de l'ovaire de haut grade quel que soit le type histologique avec mutation délétère de BRCA, en rechute sensible au platine et en entretien après une nouvelle réponse à une chimiothérapie comportant un sel de platine. Il est recommandé à une posologie de 400mg deux fois par jour. La surveillance de ce traitement se fait par numération de formule sanguine et plaquette mensuelle au cours des 12 premiers mois d'utilisation puis de manière périodique (17,31,46).

2.6.2.2 *Récepteurs pour les facteurs de croissance épidermiques humains (EGFR)*

Les récepteurs pour les facteurs de croissance épidermiques (EGFR) sont des récepteurs tyrosine kinase qui jouent un rôle clé dans la croissance cellulaire et la survie. Leur dérégulation est impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies malignes. Cependant, les inhibiteurs d'EGFR (cetuximab, erlotinib, trastuzumab) ne présentent pas d'effet majeur dans le traitement des cancers épithéliaux ovariens avec un taux de survie à 1 an de seulement 54,8% pour le cetuximab (51) et un taux de réponse de 7,3% pour le trasztuzumab (52). Le succès de ces thérapies, dans les

cancers digestifs notamment, est due à la présence d'aberrations génétiques non retrouvées dans le cancer ovarien, expliquant l'échec de ces thérapies dans cette indication (20).

2.6.2.3 Les folates

Les récepteurs des folates (FR), principalement FR- α , sont exprimés à hauteur de 80% dans les cancers non-mucineux ovariens. Ce récepteur fait partie intégrante du transport des folates et est absent de la majorité des tissus normaux. Le farletuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre FR- α à l'étude en monothérapie ou en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel chez des patientes sensibles au platine et en progression. Une réponse objective est observée chez 75% d'entre elles avec une diminution du CA-125 chez 80% des participantes. La vintafolide, un folate conjugué à un vinca alcaloïde, est également à l'étude chez des patientes résistantes au platine et en rechute. La voie des folates semble donc être une piste intéressante pour le traitement des cancers ovariens et mérite de plus amples investigations (46,48).

2.6.2.4 Le récepteur à l'œstrogène et l'aromatase

Après le succès de l'hormonothérapie dans le cancer du sein, des études cliniques ont été menées pour évaluer l'efficacité des antagonistes du récepteur aux œstrogènes comme le tamoxifène (taux de réponse de seulement 13%) ou le fulvestran (taux de réponse de 38%) dans le cancer ovarien. Malheureusement ces études n'ont révélé qu'un modeste bénéfice de ces traitements (46).

De la même manière l'utilisation d'inhibiteurs de l'aromatase comme l'Anastrozole, le Letrozole et l'Exemestane, n'a pas démontré de réel intérêt pour le traitement du cancer ovarien avec un taux de réponse global de seulement 8% (46).

Cette faible efficacité de l'hormonothérapie démontrée au cours des essais cliniques peut être en partie expliquée par le fait que les patientes incluses sont à stade avancé de leur maladie, souvent intensément prétraitées et résistantes au platine, et enfin non sélectionnées sur l'expression des récepteurs hormonaux. Malgré de premiers résultats peu convaincants, l'hormonothérapie mérite d'être d'avantage étudiée dans le cancer ovarien (46).

Les traitements utilisés dans la prise en charge standard du cancer ovarien sont peu nombreux et souvent anciens. La prise en charge du cancer ovarien a peu évolué au cours des dernières décennies expliquant la faible variation du taux de survie de ce cancer. Un manque cruel de molécules innovantes permettant d'améliorer la prise en charge du cancer ovarien ne peut qu'être constaté. C'est dans ce contexte que mon équipe s'est penchée sur une voie de signalisation

particulièrement intéressante pour le traitement du cancer ovarien : la voie des phosphoinositides 3-kinases, qui sera développée dans la troisième partie de cette revue bibliographique.

3 LA VOIE DES PHOSPHOINOSITIDES 3-KINASES

3.1 GENERALITES

3.1.1 Les PI3K

Les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) sont une famille de kinases phosphorylant des lipides, activées sous l'influence de signaux issus de facteurs de croissance, de cytokines ou autres signaux environnementaux. Elles participent ainsi à de multiples fonctions physiologiques et processus cellulaires incluant prolifération, croissance, survie, motilité et métabolisme cellulaire. Des altérations de la voie de signalisation impliquant les PI3K sont fréquemment retrouvées dans les cancers (53–55).

Les PI3K phosphorylent le groupement 3'-hydroxy du noyau inositol de trois substrats lipidiques : le phosphatidyl-inositol (PI) et les phosphatidylinositols 4 phosphate et 4,5 biphosphate (ou PIP2) (Figure 6). Elles sont divisées en 3 classes basées sur leur structure et la préférence de leur substrat. La classe I des PI3K phosphorylant uniquement le PIP2, est répartie en classe IA et IB sur la base de leur mode de régulation. Les PI3K de classe IA sont des hétérodimères contenant une sous-unité catalytique, p110 et une sous-unité régulatrice, p85. Il existe 3 sous-unités catalytiques de classe IA : p110 α , p110 β , et p110 δ codées respectivement par les gènes *PIK3CA*, *PIK3CB* et *PIK3CD*. Ces isoformes sont associées avec l'une des 5 isoformes régulatrices suivantes : p85 α (codée par *PIK3R1*), p85 β (codée par *PI3KR2*) et p85 γ (codée par *PIK3R3*) collectivement appelées sous-unités régulatrices de type p85 (53–55).

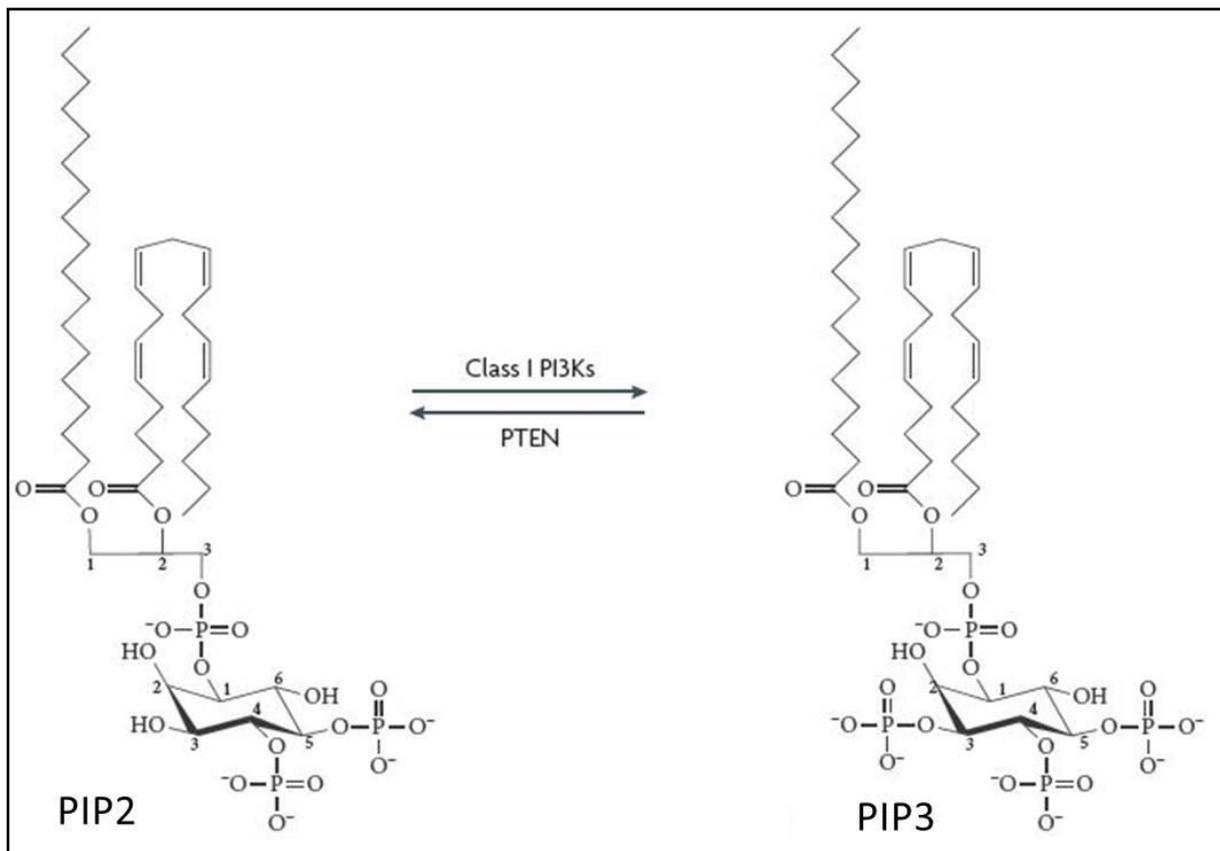


Figure 6 : Génération du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2).

Les PI3K phosphorylent le groupement 3'-hydroxy du noyau inositol du PIP2

Figure adaptée de Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nat Rev Drug Discov. août 2009;8(8):627-44.

Les enzymes de la classe IB sont des hétérodimères comprenant une sous-unité catalytique p110 γ (codée par *PIK3CG*) couplée à une sous-unité régulatrice p101 (codée par *PIK3R5*) ou p87 (codée par *PIK3R6*) (53–55).

Les sous-unités catalytiques α et β sont exprimées de manière ubiquitaire dans l'organisme alors que l'expression des isoformes δ et γ est limitée, dans un contexte physiologique, aux leucocytes (53–55).

En l'absence de signal activateur, la sous-unité p85 interagit avec p110 et inhibe son activité kinase. Suite à l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) ou de récepteurs couplés à des protéines G (RCPG), les PI3K de classe I sont recrutées au niveau de la membrane plasmique. L'inhibition induite par p85 est alors levée et p110 va phosphoryler le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) pour générer du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). Ce 3-phosphoinositide va coordonner la localisation et la fonction de multiples protéines effectrices qui vont lier ce lipide par l'intermédiaire d'un domaine spécifique de liaison aux lipides : domaine d'homologie à la pleckstrine, ou le domaine phox homology ou le domaine FYVE (53–55).

également possible que cette voie soit suractivée par l'activation de RTKs ou altération d'une isoforme de PI3K elle-même (53–55).

De fréquentes mutations du gène *PIK3CA* (7,1 à 35,5 % dans les cancers du sein ou 16,9 à 30,6% dans les cancers colorectaux) ont été identifiées comme participant à l'oncogenèse de multiples cancers faisant de cette enzyme une cible thérapeutique d'intérêt. Des mutations faux-sens peuvent survenir dans tous les domaines de p110 α mais les plus communes se situent au niveau du domaine hélicoïdal et dans le domaine kinase. Ces mutations ont été identifiées comme conférant une activation constitutive de p110 α . En revanche, les mutations d'autres isoformes de classe I restent rares et *PIK3CB*, *PIK3CD* et *PIK3CG* sont plus généralement amplifiés ou surexprimés mais non mutés (53–55).

De la même manière, des mutations de la sous-unité régulatrice p85 ont été constatées notamment pour le gène *PIK3R1*. La plupart de ces mutations empêchent cette sous-unité de stabiliser et inhiber la sous-unité catalytique p110 et conduisent à la promotion de l'activité des PI3K. Une expression réduite des autres sous-unités régulatrices a également été identifiée mais de manière moins fréquente (53–55).

3.1.3 La voie des PI3K et cancer ovarien

Plusieurs études ont prouvé qu'un ou plusieurs membres de la voie PI3K/AKT/mTOR (mammalian target of rapamycin) sont souvent altérés génétiquement dans les cancers ovariens (10,11). Comme dans la plupart des cancers solides, c'est le gène *PIK3CA* qui est le plus fréquemment muté dans ces cancers. La voie des PI3K est plus communément dérégulée dans les cancers ovariens à cellules claires (30% environ). Selon les études, la fréquence de la mutation de ce gène varie de 6,6 à 33% dans les cancers de l'ovaire et l'amplification ou le gain de copie du gène codant pour p110 α sont retrouvés dans 13 à 39,8% des cas. Le gène codant pour la sous-unité régulatrice p85 est également muté dans 3,8% des cas et sous exprimé dans 22% des cas de cancers ovariens. Comme dans la majorité des cancers, les gènes codant pour les autres sous-unités catalytiques sont rarement mutés dans le cancer ovarien (10,11,53).

La présence d'un gain de copie du gène *PIK3CA* a également été identifiée comme étant à l'origine d'une augmentation de la transcription de ce gène, de l'expression de p110 α et de son activité kinase (56).

La survie chez les patientes sauvages pour *PIK3CA* est en moyenne de 59,3 mois contre 28 mois pour les patientes présentant une mutation ou une amplification de ce même gène. De telles anomalies génétiques sont donc reconnues comme diminuant la survie des patientes atteintes de cancers ovariens les possédant et sont par conséquent de mauvais pronostic (57).

On retrouve également des mutations du gène codant pour mTOR, des activations oncogéniques de récepteurs tyrosine kinase (10 à 40%), des pertes de fonction du gène suppresseur de tumeur codant pour PTEN (7%) et des mutations et/ou amplification des gènes *AKT1* et *AKT2* (15%) (58).

Du fait du caractère potentiellement oncogénique de *PIK3CA* dans le cancer ovarien, et de la possibilité de produire des molécules ciblant les différents composants de la voie PI3K/AKT, l'utilisation d'inhibiteurs de PI3K dans le traitement de ce cancer paraît totalement justifiée (58).

3.2 LES INHIBITEURS DE LA VOIE PI3K/AKT/mTOR DANS LE CANCER OVARIEN

3.2.1 Généralités

Les premiers inhibiteurs de la voie à entrer en clinique furent les analogues de la rapamycine qui se lie au complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) et préviennent son activité. Les analogues ayant le moins de propriétés immunosuppressives comme le temsirolimus ou l'everolimus ont été testés dans le traitement du cancer ovarien. Cependant, une étude de phase II sur le temsirolimus a échoué dans la démonstration de son efficacité étant donné qu'une réponse objective n'a été observée que chez 9,3% des patientes avec un taux de survie sans progression à 6 mois de seulement 24%. De nouvelles études associant inhibiteurs de mTOR et chimiothérapie sont en cours (58–60).

Plusieurs raisons permettent d'expliquer l'échec des inhibiteurs de mTOR en clinique. Premièrement, les analogues de la rapamycine se heurtent à l'apparition de boucle de rétrocontrôle. En effet, ceux-ci induiraient l'activation secondaire d'AKT de manière PI3K-dépendante et ne permettraient pas l'inhibition de mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). Deuxièmement, leur efficacité serait plus grande sur une population de patientes sélectionnées sur le niveau d'expression de la voie. En effet, une étude de phase II dans le cancer ovarien montre d'ores et déjà que les patientes présentant des mutations de *PIK3CA* traitées par des inhibiteurs de PI3k/AKT/mTOR ont un plus fort taux de réponse que les patientes ne présentant pas ces mutations (17,20,46,48). Troisièmement, l'inhibition de la voie des PI3K seule paraît insuffisante et des stratégies de thérapies combinées semblent requises (58–60).

De par ces éléments, des inhibiteurs doubles de mTORC1/mTORC2 ont été développés ainsi que des inhibiteurs d'AKT. Un essai de phase I associant la perifosine (inhibiteur d'AKT) au docetaxel chez les patientes résistantes au platine et aux taxanes a été conduit dans le cancer ovarien. Aucune toxicité dose limitante n'a été détectée mais aucune efficacité n'a été démontrée. Le

GSK2110183, autre inhibiteur d'AKT, en association au carboplatine et au paclitaxel, a obtenu un taux de réponse de 50%. Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'AKT pourrait moduler la résistance aux sels de platine tout en conservant un profil de toxicité satisfaisant (58,60).

La metformine, utilisée pour ses propriétés anti-diabétiques, est également connue pour son activité inhibitrice de la voie de mTOR par l'activation de l'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK). Son activité combinée avec le temsirolimus (inhibiteur de mTORC1) est actuellement à l'étude (46).

Les résultats précédents donnent à réfléchir quant à l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le traitement du cancer ovarien. La modeste activité des inhibiteurs sus cités en monothérapie indique que l'addiction oncogénique du cancer ovarien à la voie PI3K/AKT/mTOR n'est pas absolue et démontre la nécessité de combiner les inhibiteurs de cette voie à d'autres agents dans le but de développer tout leur potentiel thérapeutique.

3.2.2 Les inhibiteurs de PI3K

3.2.2.1 Généralités

Les PI3K sont des enzymes qui possèdent plusieurs éléments structurels et domaines de liaison. Les inhibiteurs de PI3K ciblent cependant, tous, le domaine de liaison à l'ATP de ces enzymes.

La Wortmannine fut la première molécule développée exerçant son inhibition en se liant de manière covalente avec le résidu lysine présent dans le domaine catalytique des PI3K. Malheureusement, cette molécule présente de nombreux « off target » par ses liaisons hasardeuses avec une multitude d'autres molécules comme avec la myosin light chain kinase (MLK) ou la polo like kinase (PLK). Le LY294002 développé par la suite a, quant à lui, une activité compétitrice avec l'ATP. Son action est réversible mais il possède également de nombreux « off target ». De par leur toxicité et leur manque de spécificité, ces deux molécules n'ont pas été utilisées en clinique mais ont influencé les études qui ont suivi, permettant d'obtenir des inhibiteurs plus sélectifs et présentant moins de toxicité (61,62).

Les premiers inhibiteurs de PI3K développés sont des inhibiteurs pan-PI3K. Bien que certains soient toujours en développement clinique, leur utilisation s'est souvent soldée par l'apparition d'effets indésirables importants et de phénomènes de résistances (14,63). Un essai de phase I démontre actuellement que le BKM120 est relativement bien toléré avec tout de même la survenue de rashes cutanés, d'hyperglycémies, de diarrhées et d'altérations de l'humeur chez environ un tiers des patientes atteintes de cancer ovarien (60–62).

Le GDC0941 est un inhibiteur de PI3K de classe I oral. Son activité clinique a été démontrée chez 3 patientes incluses dans un essai de phase I, dont une patiente présentant une réponse clinique visible (évaluée par imagerie) et une diminution de 80% du taux de CA125. Un autre inhibiteur, le XL147 est testé en clinique en association au paclitaxel et carboplatine. Cet essai démontre que ces thérapies ne semblent pas présenter de toxicité cumulée, ni d'interaction pharmacocinétique et donc que cette combinaison est utilisable en clinique (60).

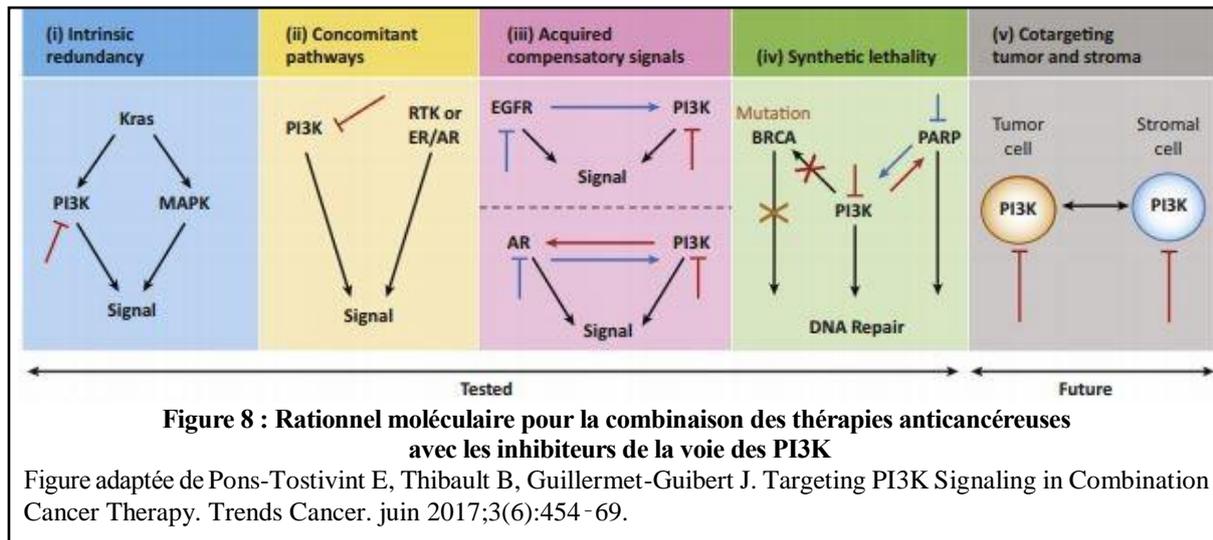
Par la suite, et afin de limiter les toxicités et les phénomènes de résistances des inhibiteurs spécifiques ont été développés afin de ne cibler qu'une des isoformes de la sous-unité catalytique p110 des PI3K de classe I. L'isoforme p110 α (PI3K α), dont le gène est fréquemment muté dans le cancer ovarien, présente un intérêt tout particulier. Le développement d'inhibiteurs spécifiques n'est cependant pas simple, étant donné la similitude existant entre les domaines catalytiques des différentes isoformes. Cette sélectivité permet de bloquer la cible la plus pertinente de la voie tout en limitant la toxicité observée avec les inhibiteurs pan-PI3K. Par exemple, cette approche devrait, en théorie, maximiser les effets thérapeutiques et éviter les toxicités sur le système immunitaire dans lequel les isoformes gamma et delta sont hautement exprimées et nécessaire à son fonctionnement normal. Des études précliniques démontrent de plus que les inhibiteurs de PI3K α présentent une efficacité significative chez les patientes présentant des tumeurs exprimant des mutations de *PIK3CA* (14,58,61).

3.2.3 Association d'inhibiteurs de PI3K et d'autres agents

3.2.3.1 Pertinence de l'utilisation de traitements combinés

Le raisonnement selon lequel ont été établies les différentes combinaisons est résumé en figure 8.

La voie PI3K/Akt/mTOR interagit avec de nombreuses autres voies de signalisations intracellulaires, et des événements pro-oncogéniques concomitants avec l'altération de la voie PI3K ont été mis en évidence (14,59). En effet des mutations et/ou surexpressions des RTK ou des mutations de *KRAS* peuvent coexister avec une perte de PTEN ou une activation oncogénique de PI3K α . Ce phénomène autorise le développement de résistances aux inhibiteurs de la voie des PI3K (14,58,59). L'inhibition de mTOR permet en effet la formation du complexe IRS-1/IGF-1R (Insulin receptor substrate 1/ insulin-like growth factor 1 receptor) aboutissant à l'activation d'AKT et à la naissance d'un mécanisme d'échappement notamment au traitement par inhibiteur de mTOR (60). Plusieurs études montrent également que les tumeurs *KRAS* ou *BRAF* mutées sont résistantes à l'inhibition de PI3K (14,58–60).



Il existe des voies redondantes intrinsèques à la voie des PI3K telles que la voie MAPK. En réponse à l'inhibition des PI3K l'activation de la voie des MAPK est déclenchée et ce phénomène est réciproque. Le traitement par everolimus (inhibiteur de mTORC1) a en effet montré une élévation de l'activation de Erk1/2 mettant ainsi en évidence un phénomène d'interconnexion entre la voie PI3K/mTOR et la cascade de transduction du signal Mek/Erk (14,58–60).

L'inhibition des RTK, de B-Raf, des récepteurs hormonaux, de MEK, ou de PARP induit une augmentation secondaire de l'activation de la voie des PI3K ou des mutations de PTEN ou de *PIK3CA*, source de résistance à l'inhibition seule de la voie des PI3K (14).

Enfin, les PI3K activent BRCA qui, conjointement avec PARP, répare les dommages à l'ADN. La perte de PTEN associée à l'inhibition de PI3K entraîne l'apparition de lésions de l'ADN. L'inhibition simultanée de la PARP et des PI3K déclenche alors un phénomène de létalité synthétique (14).

Le ciblage du stroma représente aujourd'hui un intérêt grandissant et l'inhibition de la voie des PI3K associée à l'inhibition de la réaction stromale pourrait également présenter un intérêt dans le traitement du cancer ovarien (14).

3.2.3.2 *Combinaisons existantes dans le traitement du cancer ovarien*

La connaissance de ces voies de signalisations interconnectées et les capacités adaptatrices ainsi développées par les cellules tumorales ont donné lieu à l'utilisation de combinaisons de traitements dans le but d'abolir les résistances primaires et acquises contre les traitements ciblant la voie des PI3K (58–60).

La voie des PI3K est activée en amont par des récepteurs à activité kinase. Dans ce contexte, une étude de phase I combine l'everolimus, le bevacizumab et le panitumumab (anti EGFR). Une autre étude teste la combinaison d'un anticorps anti-IGF-1R (dalotuzumab) avec l'inhibiteur d'AKT (MK2206) chez les patientes résistantes au cisplatine. L'utilisation du BYL719 (alpelisib), inhibiteur spécifique de PI3K α , avec le ganitumab (anti-IGF-1R) est aussi testée chez les patientes *PIK3CA* mutées ou amplifiées (60).

L'inhibition combinée des voie PI3K et MEK est également à l'étude dans un essai de phase I toutes tumeurs solides confondues. Cette étude évalue l'association BYL719 et MEK162 sur la base du statut mutationnel de *KRAS*, *BRAF* ou *PIK3CA*. Cependant cette association fait l'objet de toxicités cumulatives importantes notamment digestives et cutanées (60).

L'association d'inhibiteurs de la voie PI3K (temsirrolmus) et d'antiangiogène (bevacizumab) conduite au cours d'un essai de phase II dans le cancer ovarien a obtenu des résultats mitigés avec une augmentation du taux de réponse de seulement 10% sans augmentation de la survie globale, ni de la survie sans progression (60).

Une synergie d'action a été démontrée lors de l'utilisation de différents inhibiteurs pan-PI3K (buparlisib et pictilisib) en association avec un inhibiteur de PARP sur des cellules de cancer ovarien. Cette étude préclinique suggère également que cette association d'inhibiteurs présente un intérêt et ce indépendamment du statut mutationnel de BRCA ou PIK3CA. De plus une autre étude combinant buparlisib (inhibiteur pan-PI3K) ou alpelisib (inhibiteur de PI3K α) à l'olaparib révèle une toxicité supérieure du buparlisib.

L'association d'inhibiteurs pan-PI3K et d'hormonothérapie est également à l'étude dans le traitement du cancer ovarien en phase I (60).

3.3 LES PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASES ET L'ADHESION CELLULE-CELLULE

3.3.1 PI3K et actine

Le renouvellement des phospholipides membranaires permet aux cellules de changer ou maintenir leur forme sous l'influence du microenvironnement cellulaire par la régulation des associations réversibles entre la membrane et le cortex d'actine (64).

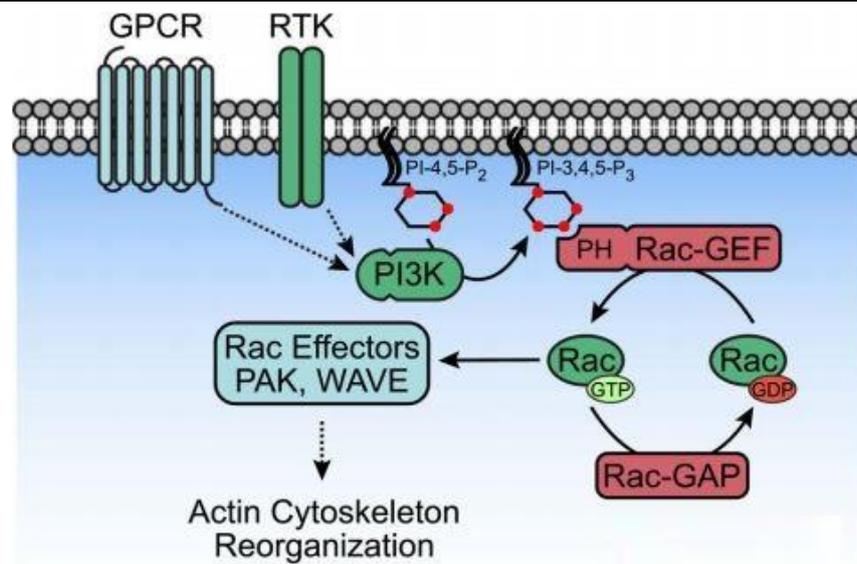


Figure 9 : Schéma d'activation de Rac

Figure adaptée de Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Curr Opin Cell Biol.* avr 2017;45:62-71.

Un des plus important processus cellulaire dépendant des PI3K est le remodelage du cytosquelette d'actine. Un effecteur majeur de ce processus est la famille des Rho GTPases (protéines catalysant l'hydrolyse de la guanosine triphosphate ou GTP en guanosine diphosphate ou GDP) et plus particulièrement Rac (65).

RhoA, Rac et Cdc42, appartenant à la famille des Rho GTPases, sont activés par de multiples stimuli captés par différents récepteurs au niveau de la membrane plasmique. Ces protéines sont ensuite impliquées dans la régulation de nombreux phénomènes dont la réorganisation du cytosquelette d'actine, les interactions cellule-cellule ou la prolifération. Les protéines GEF, protéine activant les Rho GTPases, contiennent un domaine d'homologie à la plekstrine (PH) permettant une liaison de haute affinité avec les phosphoinositides. Lorsque ce domaine interagit avec le PIP2 membranaire, la protéine GEF reste sous sa forme inactivée. En revanche, lors de la liaison du domaine PH de la GEF au PIP3 produit au niveau membranaire par les PI3K, il y a alors activation de cette GEF. Rac sous sa forme inactive lie le GDP et une fois la GEF activée, elle se lie à Rac et l'active par échange de son GDP en GTP (Figure 9) (65–67).

Rac ainsi activé va pouvoir réguler la réorganisation du cytosquelette d'actine en liant et activant des protéines cibles dont les plus connues restent la p21-activated kinase (PAK) et WAVE (65).

D'autre part, l'expression de la forme active de PI3K est suffisante pour induire le remodelage du cytosquelette d'actine et accroître le taux de migration cellulaire (68). De plus l'inhibition des PI3K restaure l'intégrité des filaments d'actine et inhibe la migration cellulaire (68).

Enfin, l'expression de la forme active d'Akt restaure le remodelage du cytosquelette d'actine au sein de cellules traitées par inhibiteur de PI3K (68). Il existe donc une voie dépendante d'Akt, par laquelle les PI3K sont capable d'induire le remodelage du cytosquelette d'actine (68,69).

En 2012, une équipe a mis en évidence que le remodelage du cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de l'activation de Rac est uniquement dépendant de la présence de l'isoforme α des PI3K (13), ce qui a également été démontré par une approche génétique par l'équipe dans le cancer du pancréas (12).

De plus, nous avons observé, dans des modèles murins de cancer du pancréas, une très large diminution du marquage α SMA autour des lésions préneoplasiques dont l'expression de PI3K α est inactivée et ce, en comparaison avec des lésions pré-neoplasiques de même grade histopathologique, chez des souris sauvages pour le gène de cette isoforme. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de PI3K α dans les cellules initiatrices du cancer du pancréas pour moduler la réaction stromale (12).

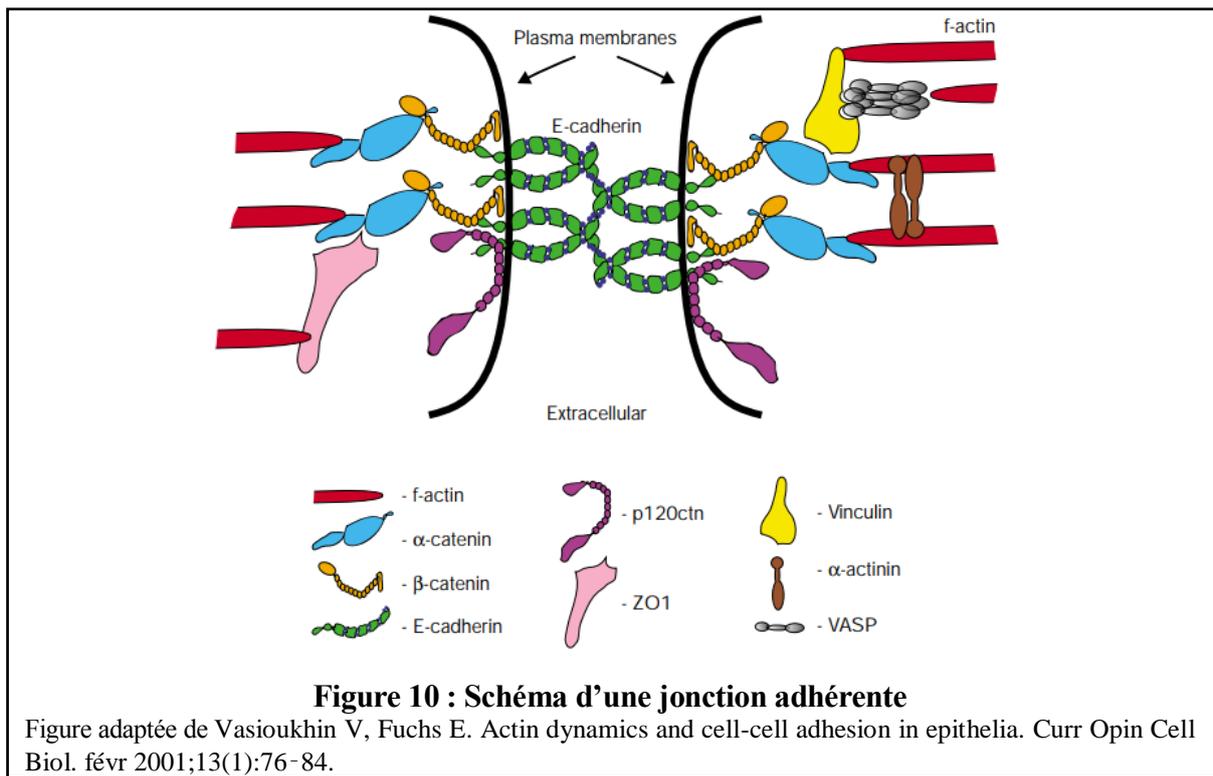
L'action des PI3K sur le remodelage du cytosquelette d'actine n'est plus à prouver et il semblerait que PI3K α soit l'isoforme clé dans ce phénomène.

3.3.2 Actine et adhésion inter-cellulaire

Les cellules adhèrent les unes aux autres par l'intermédiaire des jonctions adhérentes et des desmosomes qui vont connecter respectivement les filaments d'actine et les filaments intermédiaires de deux cellules voisines. Les jonctions adhérentes sont notamment composées de cadhérines dont les domaines extracellulaires se dimérisent de manière dépendante au calcium avec une molécule similaire présente sur la cellule voisine. La partie intracellulaire de l'E-cadhérine se lie à la caténine p120 qui est capable de moduler le regroupement des cadhérines. La partie distale du domaine intra-cellulaire de la cadhérine est capable d'interagir avec la β -caténine qui va se lier à son tour à l' α -caténine. L'extrémité C-terminale de l' α -caténine se lie directement à l'actine fibrillaire, permettant ainsi de lier les cadhérines au cytosquelette d'actine. L' α -caténine peut également s'associer à la vinculine ou ZO1 (zonula occludens-1) afin de renforcer sa liaison au cytosquelette d'actine. ZO1 est également impliquée dans la formation de jonctions serrées fournissant un lien entre ces jonctions et les jonctions adhérentes (Figure 10) (70,71).

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de l'actine comme la cytochalasine D, entraîne l'interruption rapide des jonctions intercellulaires, démontrant ainsi le rôle crucial de l'intégrité du cytosquelette d'actine dans la formation et la maintenance d'adhésion cellule-cellule (72).

Plusieurs études ont identifiés la E-cadhérine comme étant la cadhérine jouant un rôle vital dans la formation, le maintien et la résistance aux traitements des sphéroïdes multicellulaires retrouvés dans le cancer ovarien (73–75).



Les cadhérines participant aux jonctions intercellulaires au sein des sphéroïdes et sont donc en lien étroit avec le cytosquelette d'actine, lui-même sous l'influence de l'activité de PI3K α .

L'un des plus grands défis de la prise en charge du cancer ovarien reste de stopper son développement vers une carcinose péritonéale. Les sphéroïdes présents dans la cavité péritonéale et responsables de ce développement tumoral représentent donc une cible d'intérêt pour le traitement de ce cancer. Les PI3K, et plus particulièrement PI3K α , sont impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine, lui-même acteur dans l'élaboration et le maintien de jonctions intercellulaires au sein des sphéroïdes. Cette enzyme semble être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de la CP, en association aux thérapies conventionnelles.

De cette connaissance est née notre hypothèse selon laquelle PI3K α serait impliquée dans la formation et le maintien de sphéroïdes d'origine carcinomateuse ovarienne. L'étude de cette hypothèse est ainsi développée en deuxième partie sous la forme d'un article scientifique en préparation et d'ores et déjà présenté lors d'une communication orale pour le Workshop « Bio Fabrication & Cancer » du Cancéropôle Grand Sud-Ouest en 2017.

ARTICLE EN SOUMISSION

PI3K α CONTROLE LE MAINTIEN DES AGREGATS HETEROCELLULAIRES PERITONEAUX DERIVES DU CANCER DE L'OVAIRE.

Auteurs

Thole A ^{1,3}, Thibault B ^{1,3}, Basset C ^{1,2,3}, Guillermet-Guibert J ^{1,3*}.

1 : INSERM – UMR 1037 – Equipe 17, Toulouse

2 : Institut Universitaire du Cancer de Toulouse – Oncopole (IUCT-O), Toulouse

3 : LABEX TouCAN, Toulouse

*** auteur correspondant:** Julie Guillermet-Guibert

CRCT UMR1037 INSERM-Université Toulouse 3 - ERL5294 CNRS; 2 avenue Hubert Curien; Oncopole de Toulouse; CS 53717; 31037 TOULOUSE CEDEX 1 - FRANCE

Tel : +33-(0) 5 82 74 16 52

e-mail: julie.guillermet@inserm.fr

<http://www.crct-inserm.fr/17-j-guillermet-guibert-sigdyn-group-pi3k-isoforms-signalling-cancerogenesis-559.html>

<http://eupancreas.com/julie-guillermet-guibert>

<http://pi3k-phdproject.eu/partner/julie-guillermet-guibert/>

RESUME

La carcinose péritonéale (CP), implantation de cellules tumorales au sein du péritoine, est fréquente dans les cancers ovariens à stade avancé (75 % au diagnostic). Elle passerait par une étape de formation d'agrégats de cellules tumorales ou tumorosphères, présentant une résistance accrue aux thérapies conventionnelles et responsable de l'implantation métastatique dans le péritoine.

La voie des PI3K est fréquemment mutée dans les cancers ovariens, et nous démontrons dans cette étude, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'isoforme α des PI3K, le rôle clé de cette enzyme pour la formation et le maintien de tumorosphères d'origine ovarienne. Ce rôle ne dépend pas uniquement d'une activité cytotoxique des inhibiteurs de PI3K. La présence de MSC, représentant du stroma tumoral, entraîne l'apparition de compaction et de résistance accrue des sphéroïdes aux traitements.

Nous avons mis en évidence une voie de signalisation d'intérêt pour le traitement du cancer ovarien à stade avancé, permettant de limiter l'évolution de la maladie métastatique de ce cancer au pronostic sombre.

INTRODUCTION

Le cancer ovarien occupe au niveau mondial le 8^{ème} rang des cancers chez la femme en terme d'incidence mais se place au 4^{ème} rang pour la mortalité (1). Il est souvent associé à un mauvais pronostic du fait, à stade avancé, de la fréquente implantation intrapéritonéale de métastases que l'on nomme carcinose péritonéale (CP) (3,76). Retrouvée chez environ 45% des patientes au moment du diagnostic, la CP donne lieu, dans la plupart des cas, à la production massive de liquide d'ascite (exsudat présent dans la cavité péritonéale) (19,77).

Contrairement à la majorité des cancers solides, le cancer ovarien ne migre que peu par voie hématogène mais possède la particularité de disséminer par extension directe aux organes voisins et surtout *via* la voie transcoelomique (pénétration des cellules tumorales au travers du péritoine), permettant le développement de cette CP (3,76).

Plusieurs étapes sont nécessaires à l'établissement d'implants tumoraux péritonéaux issus de la migration transcoelomique de cellules tumorales ovariennes : i) la résistance à l'anoïkis, ii) la dissémination transcoelomique facilitée par le flux de liquide, iii) l'échappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire, iv) la formation de sphéroïdes ou tumorosphères à partir de l'agrégation des cellules tumorales dans le liquide d'ascite, v) la production de liquide d'ascite, vi) l'implantation des cellules tumorales au sein du péritoine via la matrice extracellulaire (3,29,76).

Il y a une vingtaine d'année, la CP était vue comme une pathologie incurable, ne nécessitant qu'une prise en charge palliative. Cependant, l'introduction de thérapies locorégionales combinant la chirurgie cytoréductrice à la chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP) à base de sels de platine ou de taxanes a changé la manière de considérer cette maladie (38,40,41).

La capacité de résistance d'une tumeur aux chimiothérapies peut être activée par sa structure 3D et la présence de son microenvironnement. En effet, une étude met en évidence que les cellules tumorales mammaires EMT-6 résistent aux agents alkylants (cyclophosphamide, cisplatine, thiotepa) uniquement lorsque celles-ci sont cultivées en 3 dimensions (3D) sous forme de sphéroïdes semblables à ceux retrouvées dans le péritoine (3,8).

La formation et les caractéristiques de ces tumorosphères péritonéales restent encore mal connues. Il a cependant été démontré que des cellules seules ou en agrégats se détachent de tumeurs mammaires ou prostatiques et sont retrouvées dans la circulation sanguine. Ces clusters présentent une capacité accrue à maintenir leur cohésion et à survivre une fois détachés de la tumeur primaire en comparaison aux cellules seules. L'étude de la formation de ces agrégats et de leur résistance au traitement constitue un intérêt majeur afin d'améliorer la compréhension et la prise en charge de la CP (78).

Le microenvironnement contribue à la résistance à la chimiothérapie. Parmi les cellules du microenvironnement, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont une source potentielle de divers types cellulaires, y compris de fibroblastes associés aux tumeurs (TAF). Il a été démontré que ces cellules contribuent à la capacité des tumeurs à former des sphéroïdes dans des conditions de culture indépendantes de l'ancrage, augmentant leur capacité à induire la formation de tumeurs *in vivo* après des xénogreffes chez la souris. Ces cellules du microenvironnement tumoral fourniraient un environnement favorisant la maladie métastatique et la résistance aux traitements (79,80).

Dans l'optique de réaliser un modèle physiologique de CP, il est nécessaire de prendre en compte le stroma qui la compose. Parmi les cellules du microenvironnement, nous avons décidé de nous intéresser en priorité aux cellules souches mésenchymateuses (MSC). Celles-ci peuvent être aussi bien mobilisées de la moelle osseuse que d'organes voisins sur le site d'inflammation résultant du développement des tumeurs (81,82).

La voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt est l'une des plus communément dérégulées dans les cancers, notamment ovariens, et pourrait avoir un rôle prépondérant comme le laisse notamment présager son implication dans la régulation du cytosquelette d'actine (12,83).

Il existe chez les mammifères 4 isoformes des PI3K de classe I : α , β , γ et δ . Ces enzymes hétérodimériques sont constituées d'une sous-unité catalytique p110 complexée à une sous-unité régulatrice. L'activation des PI3K entraîne la phosphorylation du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP₃) qui agit comme un second messenger dans la cellule. Les signaux en aval de PI3K, y compris la voie Akt / mTOR (mammalian target of rapamycin), sont nombreux et impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire et le réarrangement du cytosquelette d'actine. (55). L'activation de la voie des PI3K est associée à une augmentation de la migration et l'invasion de différentes sous-populations cellulaires de cancers ovariens, faisant de cette voie de signalisation un prédicteur du potentiel invasif et migratoire des cellules tumorales ovariennes (84). Le PIP₂ est également reconnu comme une interface cruciale entre la membrane plasmique et les protéines cytosoliques liant le cytosquelette d'actine à la membrane. L'expression de la forme active des PI3K est suffisante pour induire le remodelage des filaments d'actine et ce phénomène se fait par l'intermédiaire de la voie Akt/mTOR (64,68). L'utilisation d'inhibiteurs globaux de PI3K en monothérapie s'est révélée décevante en clinique notamment du fait de l'activation de voies alternatives, de l'apparition de résistances consécutives à l'inhibition de cette voie, et de toxicités importantes des inhibiteurs ciblant toutes les isoformes de PI3K (14). En effet, un essai clinique de

phase I dans les cancers ovariens séreux de haut grade a été mené pour tester l'association d'un inhibiteur pan-PI3K, le BKM120 (Buparlisib), (qui présente des actions non ciblées sur la polymérisation de la tubuline (85)) avec l'olaparib, un inhibiteur de PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) dont le gène est fréquemment muté dans les cancers ovariens. En dépit de résultats prometteurs concernant l'efficacité clinique, cet essai a fait face à l'apparition de toxicités graves compromettant l'utilisation optimale de ces inhibiteurs (86). Des inhibiteurs de PI3K isoformes-spécifiques sont actuellement testés avec pour objectif de diminuer ces toxicités tout en maintenant l'inhibition de la voie des PI3K. Par exemple, dans le cancer du sein, l'utilisation de BYL719 (alpelisib), un inhibiteur de PI3K α , en combinaison avec des inhibiteurs du récepteur aux œstrogènes dans un essai de phase I, montre d'ores et déjà des bénéfices cliniques avec une toxicité moindre en comparaison à l'utilisation d'inhibiteurs pan-PI3K (87).

L'objectif de cette étude est de produire un modèle de carcinose péritonéale avec des cellules cancéreuses ovariennes afin d'étudier l'implication de PI3K α dans la régulation du stroma mésenchymateux lors de la formation des sphéroïdes péritonéaux et de leur maintien. Pour cela, nous avons créé un système de culture 3D permettant la formation de tumorsphères (homotypiques, composées de cellules tumorales seules et hétérotypiques, composées de cellules tumorales et de MSC) similaires aux sphéroïdes retrouvés dans les cancers ovariens traités avec des inhibiteurs spécifiques de PI3K α .

L'utilisation de ces molécules ciblant PI3K est peu étudiée dans le cancer de l'ovaire ou la carcinose péritonéale. Ainsi, notre démonstration du rôle de PI3K α dans la formation des sphéroïdes et leur relation avec le stroma mésenchymateux offre de nouvelles stratégies thérapeutiques aux patients atteints de carcinose péritonéale.

MATERIEL ET METHODES

1) Lignées cellulaires

La lignée SKOV-3 WT correspond à des cellules tumorales péritonéales provenant d'ascite d'origine ovarienne et présentant les altérations génétiques suivantes: PIK3CA H1047R; perte d'une copie de TP53. La lignée SKOV-3 GFP correspond aux cellules SKOV-3 WT modifiées génétiquement pour exprimer la GFP (Green Fluorescent Protein). Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont issues de donneurs sains ayant subi une chirurgie de la hanche (EFS).

Les cellules sont cultivées à 37°C, 5% CO₂ sous atmosphère humide, dans un milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium ; Sigma) pour les SKOV-3 et du DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Sigma) pour les MSC. Le milieu de culture est supplémenté par 10% de SVF (Sérum de veau fétal), 1% de L-glutamine, 1% de pénicilline-streptomycine et 0,01% de plasmocine (Invitrogen)

2) Inhibiteurs pharmacologiques

Les inhibiteurs pharmacologiques utilisés lors de cette étude sont les suivants : A66 inhibiteur de PI3K α de Axon Medchem (IC₅₀ *in vitro* en nM: p110 α : 32; β : >12500; δ : >1250; γ : 3480) (88); BYL719 inhibiteur de PI3K α de Apex Bio (IC₅₀ *in vitro* en nM: p110 α : 4,6; β : 1156; δ : 290; γ : 250) (89); TGX-221 inhibiteur de PI3K β de Axon Medchem (IC₅₀ *in vitro* en nM: p110 α : 5000; β : 5; δ : 100; γ : 10000) (90); AZD8186 inhibiteur de PI3K β/γ de MedChemExpress (IC₅₀ *in vitro* en nM: p110 α : 35; β : 4; δ : 12; γ : 675) (Tableau supplémentaire 1) (91).

3) Expérience de Cytotoxicité 2D

Mille cellules SKOV-3-GFP et WT, et 10000 cellules MSC sontensemencées dans des puits de plaques 96 puits. Le jour suivant, les cellules sont traitées par des inhibiteurs spécifiques de PI3K α , A66 (Axon), BYL719 (APEX BIO) à concentrations croissantes de 0 à 10 μ M avec dilutions intermédiaires au 1/10 (triplicats, 7 concentrations différentes et une condition contrôle comprenant 1% de DMSO soit la concentration maximale de DMSO utilisée lors des traitements). Le traitement par cisplatine (fourni par la pharmacie de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, IUCT) est réalisé de la même manière à des concentrations croissantes de 0 à 100 μ M avec dilutions intermédiaires au 1/2. Après 72h de traitement, l'évaluation du nombre de cellules vivantes est effectuée par test colorimétrique au MTT. L'absorbance à 570 nm est lue au spectrophotomètre (Mitras) après 2 heures d'incubation à 37°C, 5% CO₂ sous atmosphère humide. La moyenne des valeurs obtenues pour chaque condition est rapportée à la moyenne de la condition contrôle (condition non traitée pour le cisplatine et 1% de DMSO pour les inhibiteurs de PI3K).

4) Mise au point de la culture de tumosphères

Les cellules SKOV-3 WT et GFP sont mises en suspension dans un milieu RPMI complet contenant ou non 5% de méthylcellulose (Sigma Aldrich). Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à fond rond (Nunclon Sphera, ThermoFisher Scientific) à 10000 ou 5000 cellules par puits. Les plaques sont centrifugées ou non une minute à 300g puis maintenues à 37°C, 5% CO₂ sous atmosphère humide. Les amas cellulaires obtenus sont observés et photographiés au microscope AxioVert à J1, J4, J7, J10, et J14 à l'aide du logiciel ZEN[®] (Carl Zeiss). Leur diamètre et surface sont mesurés à l'aide de ce même logiciel. Pour chaque condition des triplicatas sont

réalisés et les moyennes des valeurs d'aire sont rapportées aux moyennes des mesures du J1 de l'expérience correspondante (représentant 100% de la surface).

5) Marquage cellulaire au Qdot®

Les deux composants du kit sont préalablement mélangés de manière équivolumique puis dilués au 1/100^{ème}. La solution obtenue est incubée 1h à température ambiante puis est appliquée directement sur les cellules en culture. S'en suit une incubation de 45 min à 37°C, 5% CO₂ sous atmosphère humide. Les cellules marquées sont ensuite lavées deux fois avec du milieu de croissance complet.

6) Mise au point de culture de tumorosphères hétérotypiques

Une suspension cellulaire comprenant un mélange de 5000 cellules tumorales SKOV-3 WT et de 5, 50, 500 ou 5000 MSC (préalablement marquées au quantum dots) est ensemencée en triplicatas dans des plaques 96 puits à fond rond (Nunclon Sphera, ThermoFisher Scientific) dans une solution équivolumique de milieu DMEM et RPMI. Les amas ainsi obtenus sont photographiés et mesurés comme décrit au paragraphe 3 à l'aide du logiciel ZEN® au J1, J3 et J7. L'aire moyenne est rapportée à la moyenne des mesures de l'amas cellulaire contrôle (contenant uniquement 5000 cellules tumorales) au J1 de l'expérience correspondante (représentant 100% de la surface).

7) Expérience de cytotoxicité 3D

Des tumorosphères homotypiques et hétérotypiques (5000 cellules tumorales SKOV-3 GFP et 50 ou 500 MSC) sont réalisées. Les amas cellulaires sont traités à l'ensemencement ou 24h après, avec A66 ou BYL719, TGX-221 ou AZD8186 à 1 ou 10 µM en association ou non avec du cisplatine à 0,5, 5 ou 50 µM avec leurs contrôles respectifs. Les amas cellulaires sont traités à nouveau 3 jours après le premier traitement. Ils sont ensuite photographiés et mesurés comme décrit au paragraphe 3 en utilisant le logiciel ZEN® à J1, J4 et J7. Les aires moyennes sont rapportées au contrôle au jour 1 de l'expérience correspondante (représentant 100% de la surface).

Parallèlement, à la fin du traitement J0, J3 et J6, les cellules vivantes sont quantifiées par dosage colorimétrique en utilisant le réactif de viabilité cellulaire Alamar Blue™ (Invitrogen). L'absorbance est mesurée avec un spectrophotomètre Clariostar à 570 nm après 24 heures d'incubation à 37° C, 5% de CO₂ sous atmosphère humide (à J1, J4 et J7). Les absorbances moyennes sont rapportées au contrôle le jour de la mesure (représentant 100% des cellules vivantes).

8) Quantification de la mortalité cellulaire au sein des tumorosphères

Les cellules tumorales SKOV-3 WT sont cultivées et traitées comme décrit précédemment. À J1, J4 et J7, les cellules vivantes et mortes sont marquées à l'aide du kit LIVE / DEAD® (ThermoFisher Scientific). Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les agrégats obtenus sont photographiés comme décrit au paragraphe 3 en utilisant le logiciel ZEN®. La surface occupée par les cellules vivantes est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ®. Les moyennes sont rapportées au contrôle du jour correspondant (représentant 100% des cellules vivantes).

9) Développement de tumorosphères de cellules provenant de liquide d'ascite

Les liquides d'ascite sont prélevés sur des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire après recueil de leur consentement. Les cellules contenues dans ce liquide sont comptées avec Cellometer®, puis ensemencées et cultivées à 37° C, 5% CO₂ sous atmosphère humide, dans un milieu RPMI complet. Des tumorosphères sont ensuite produites et photographiées.

10) Western Blot

Les cellules SKOV-3 GFP sont ensemencées à 80% de confluence puis déprivées en sérum toute la nuit. Le lendemain matin, les cellules sont pré-traitées avec des inhibiteurs de PI3K α (A66 et BYL719) à 0.01, 0.1, 1 et 10 μ M pendant 1h. Les cellules sont ensuite supplémentées avec 10% de SVF pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées deux fois au PBS froid puis lysées sur glace dans du tampon de lyse (NaCl 150mM, EDTA 1mM, Tris HCL 50mM, Triton 1%, DTT 1mM, NaF 2mM, Na₃VO₄ 2mM, supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases « complete Mini EDTA-free » Roche®). La concentration protéique est déterminée par dosage protéique BCA (BiCinchononoc Acid assay, Interchim®).

Cinquante microgrammes de protéines sont ensuite déposés et séparés sur un gel de polyacrylamide 8 ou 12% en condition dénaturante à voltage constant (90V) dans du tampon de migration (25mM Tris Base, 192mM de glycine, 1% SDS) puis transférés sur membrane de Nitrocellulose 0.45 μ m (Whatman®) en phase liquide pendant 30 minutes grâce au système Transblot Turbo (Bio-Rad®) dans du tampon de transfert (25mM Tris, 192mM de glycine, 0.5% SDS, 20% Ethanol absolu). La membrane est saturée dans du TBS-T (« Tris Buffer Saline », 10mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 0,05% Tween) 5% lait écrémé pendant 45 min à température ambiante. Elle est ensuite incubée dans l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T/5% BSA (Bovine Serum Albumine) contenant 0,01% d'Azide de Na pendant toute la nuit à 4°C. La membrane est lavée 3 fois 10 minutes au TBS-T pour ensuite être incubée dans une solution de TBST/lait 5% contenant l'anticorps secondaire (ThermoFisher Scientific) couplé à la HRP (Horse Raddish

Peroxydase) dilué pendant 1h30. Les membranes sont lavées 3 fois 10 min au TBS-T puis les bandes spécifiques sont révélées en chambre noire après incubation de la membrane pendant 5 min avec un réactif ECL RevelBlot® Plus-Substrat chimioluminescent de l'HRP. La quantité relative des protéines est déterminée à l'aide du logiciel ImageJ® et correspond à deux expériences indépendantes (Tableau supplémentaire 2).

11) Tests statistiques

Les variables quantitatives ont été présentées par des moyennes et les données qualitatives par des pourcentages. Les comparaisons de groupes ont été faites en utilisant le test ANOVA (données appariées) et le test t de Student pour les tests paramétriques. Pour toute cette étude, une différence statistique est atteinte pour $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), ou $p < 0.05$ (*).

RESULTATS

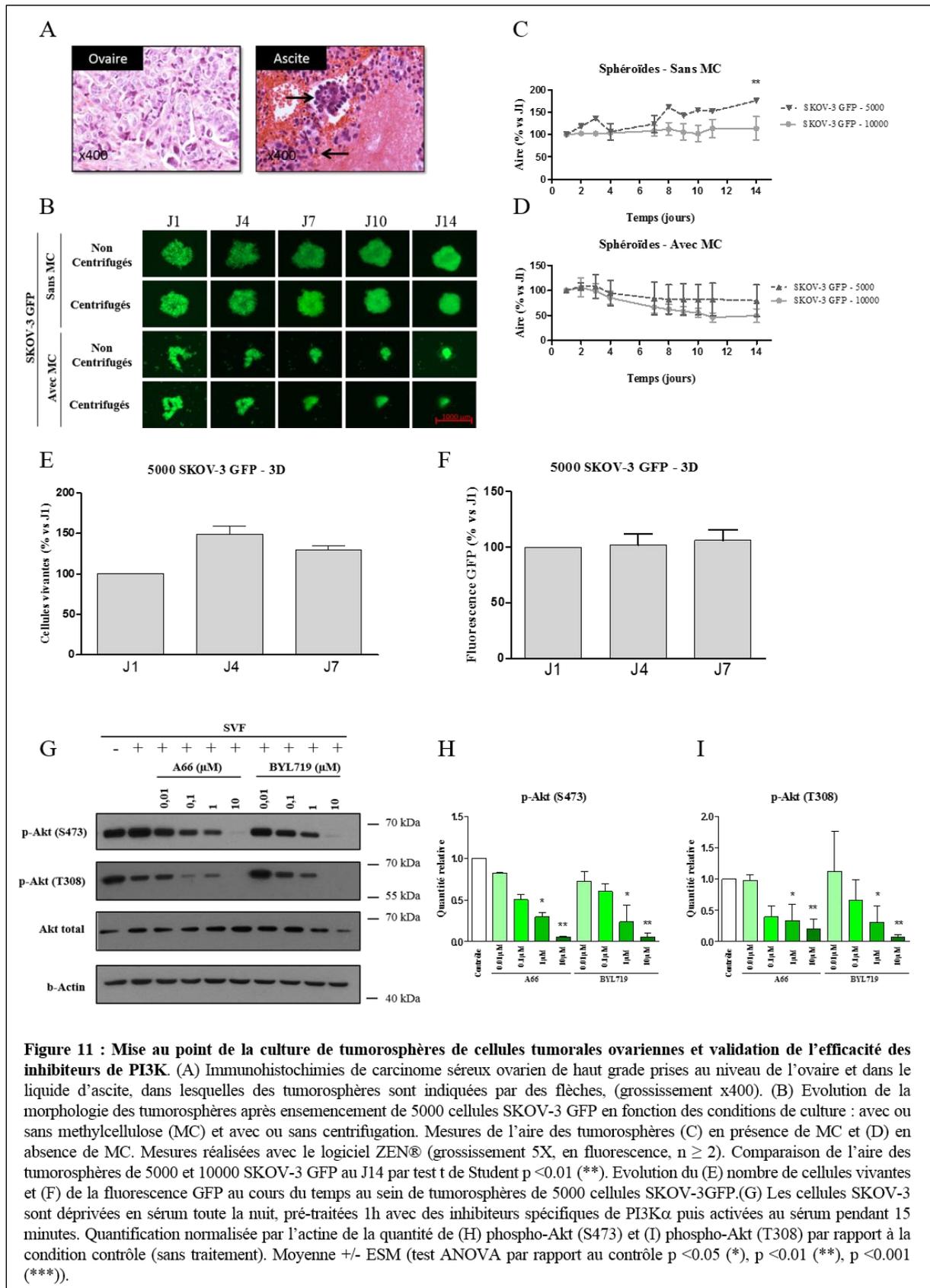
1) Mise au point de la culture de tumorosphères

Des sphéroïdes sont retrouvés au niveau de l'ovaire et dans le liquide d'ascite de patientes et peuvent être observés en coupe histologique (Figure 11A).

Afin de reproduire au mieux les conditions de la CP, nous avons dans un premier temps mis au point un système de culture en 3D de cellules tumorales péritonéales issues de cancer ovarien (SKOV-3) transfectées pour exprimer de manière constitutive la GFP (SKOV-3 GFP). Nous avonsensemencé 5000 ou 10000 cellules SKOV-3 GFP dans des plaques à fond rond traitées dans le but d'éviter l'adhésion des cellules au fond des plaques et avons mesuré en microscopie l'évolution de l'aire des tumorosphères ainsi formées (Figure 11). Après 14 jours, nous avons observé une augmentation de 13% et de 75% de l'aire des tumorosphères respectivement en condition 10000 et 5000 cellules. L'augmentation du nombre de cellules initiales ralentit la croissance des tumorosphères (Figure 11B et 11C).

Nous avons ensuite testé les effets de l'ajout de méthylcellulose (MC) dans le milieu de culture (dérivé polysaccharidique de cellulose favorisant la mise en suspension des cellules en rendant le milieu plus dense et visqueux) sur la formation des tumorosphères (92). Les observations, après 14 jours en présence de MC, révèlent une diminution de l'aire des tumorosphères de SKOV-3 GFP (20% par rapport à l'aire initiale pour la condition 5000 cellules). De plus, la MC semble retarder, de 4 jours environ, le regroupement des cellules SKOV-3 GFP (Figure 11B et D).

Enfin, nous avons testé l'utilisation de la centrifugation des plaques et celle-ci n'apporte aucune modification à la formation de sphéroïdes (Figure 11B).



Au vu des observations précédentes, nous avons choisi d'utiliser les conditions suivantes pour la suite des expérimentations : ensemencement de 5000 cellules, en absence de MC et sans centrifugation des plaques. C'est dans ces conditions que nous avons mesuré le nombre de cellules vivantes au cours du temps à l'aide du test colorimétrique, Alamar Blue® et la fluorescence moyenne au sein des tumorosphères. La fluorescence étant sous le contrôle d'un promoteur fort (promoteur CMV), elle reflète ici l'activité transcriptionnelle cellulaire. Malgré une augmentation de la taille des tumorosphères (condition 5000 cellules), le nombre de cellules ne semble pas varier puisque le pourcentage de cellules et leur fluorescence restent constants au cours des 7 jours d'observation (Figure 11E et F).

2) Validation de l'activité des inhibiteurs de PI3K α sur les cellules SKOV-3 GFP

Nous avons testé l'action de deux inhibiteurs sélectifs de PI3K α , A66 et BYL719, sur l'activation d'Akt dans la lignée SKOV-3 GFP (Figure 11G). Ces deux inhibiteurs entraînent une inhibition concentration-dépendante de la phosphorylation d'Akt sur ses deux sites de phosphorylation (S473 et T308) avec un effet visible à partir de 1 μ M et sans modification du niveau d'Akt total (Figure 11G, H et I), ce qui confirme que la voie PI3K est bien activée de manière constitutive dans les cellules SKOV-3, que cette activation de la voie est très dépendante de l'isoforme α des PI3K et que les agents pharmacologiques utilisés empêchent son activité.

3) Evaluation de l'effet des inhibiteurs de PI3K α et du cisplatine sur la formation de tumorosphères

La voie PI3K/Akt assure un rôle certain dans la prolifération et la survie cellulaire mais est également décrite comme impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine suggérant son rôle sur la formation des tumorosphères (12,55,64,68). Afin de déterminer le rôle de cette voie dans la formation des agrégats de SKOV-3 GFP, nous les avons traités avec des inhibiteurs de PI3K α et du cisplatine dont les concentrations ont été déterminées en 2D pour avoir une action sur la prolifération / survie (Figure S1) ou l'activité de la voie (visible sur la phosphorylation d'Akt en Western Blot Figure 11G et H) des cellules à l'ensemencement et 3 jours plus tard (Figure 12A).

En 7 jours, les tumorosphères traitées par 10 μ M de BYL719 voient leur morphologie changer par rapport au contrôle (Figure 12B), avec une réduction complète de l'aire (105% par rapport au contrôle) des tumorosphères (Figure 12D) et une perte significative de fluorescence de 100% dans cette condition (Figure 12F). Les agrégats traités par A66 à 10 μ M et BYL719 à 1 μ M présentent des profils d'évolution comparables (Figure 12B) avec une diminution de l'aire des tumorosphères d'environ 30% par rapport au contrôle au J4 (Figure 12D).

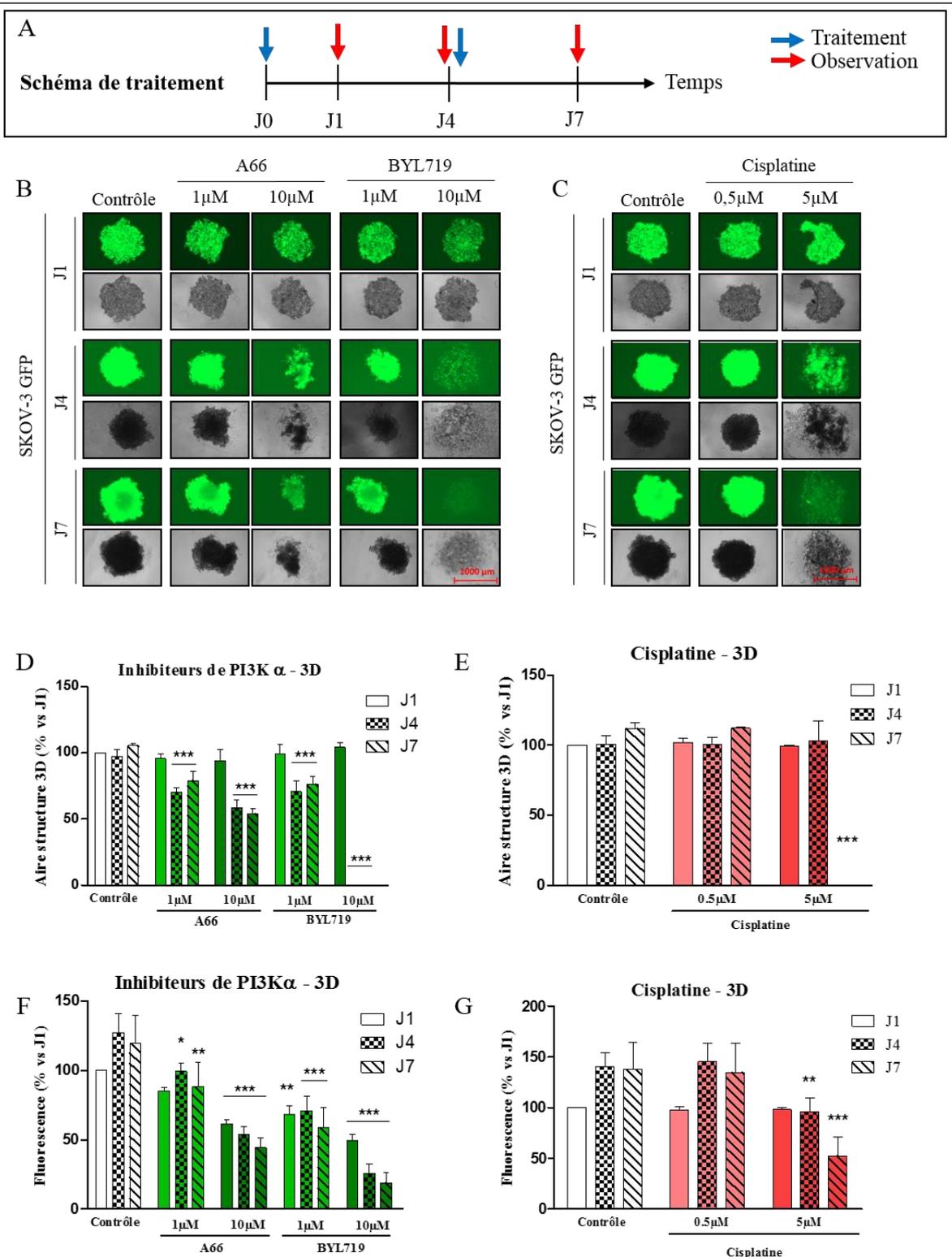


Figure 12 : L'inhibition de PI3K α empêche la formation de tumorsphères de cellules tumorales ovariennes. Des tumorsphères de 5000 cellules SKOV-3 GFP sont réalisées et traitées ou non avec A66 et BYL719 (1 et 10 μ M) ou du cisplatine (0,5 et 5 μ M) selon le schéma de traitement en A. (B, C) La morphologie des tumorsphères est évaluée à J1, J4 et J7. (D, E) L'aire et (F, G) l'intensité de fluorescence des tumorsphères sont évaluées à J1, J4 et J7 à l'aide du logiciel Zen® (grossissement 5X), n \geq 3, Moyenne \pm ESM (test ANOVA en comparaison à la condition contrôle du jour d'observation correspondant, p < 0.001 (***), p < 0.01 (**), p < 0.05 (*)).

Dès le premier jour d'observation et quel que soit l'inhibiteur de PI3K α utilisé, l'aire et l'intensité de fluorescence des tumorosphères traitées sont plus faibles que l'aire du contrôle au J1 (Figure 12D et F).

Nous avons également testé l'efficacité du cisplatine, traitement de référence dans la CHIP pratiquée dans la prise en charge de la CP, sur les cellules tumorales péritonéales SKOV-3 GFP. Le traitement avec 5 μ M de cisplatine désagrège ces agrégats, avec une réduction totale de l'aire des tumorosphères et une diminution significative de 85 % de l'intensité de fluorescence (Figure 12 C, E et G) mais, à contrario, cet effet n'est observé qu'après 7 jours de traitement. Cependant, à 0,5 μ M, le cisplatine ne présente aucun effet sur la morphologie des agrégats, ni l'intensité de fluorescence en comparaison au contrôle (Figure 12 D, E et F).

Ces résultats laissent penser que les inhibiteurs de PI3K α sont capables de réduire la formation des sphéroïdes de cellules tumorales, tout en ayant potentiellement un effet cytotoxique de manière dose-dépendante sur ces cellules agrégées ou non alors que le cisplatine ne semble présenter qu'un effet cytotoxique de manière retardée et à forte concentration.

4) Evaluation de l'effet des inhibiteurs de PI3K α et du cisplatine sur le maintien des tumorosphères

Afin de mesurer l'effet des inhibiteurs de PI3K α sur le maintien des tumorosphères, nous avons traité les agrégats de cellules SKOV-3 GFP déjà formés avec des inhibiteurs de PI3K α (A66 et BYL719) ou du cisplatine, un jour après formation des tumorosphères et 3 jours plus tard (Figure 13A). Afin de tester la spécificité d'action de PI3K α dans ce mécanisme, nous avons également traité ces tumorosphères avec des inhibiteurs de PI3K β (TGX-221) et de PI3K β/γ (AZD8186).

Les inhibiteurs de PI3K α entraînent une diminution concentration-dépendante de l'aire et une modification de la morphologie des tumorosphères avec un effet maximal à J7 (Figure 13B). Le traitement par BYL719 entraîne un effet supérieur à l'A66 avec une diminution significative de l'aire des sphéroïdes de 86% et 43% respectivement à concentration équivalente de 1 μ M (Figure 13C et D).

Le traitement par TGX-221, inhibiteur spécifique de PI3K β , n'entraîne aucune différence significative de la morphologie (Figure 13B) ou de l'aire des tumorosphères (Figure 13E) par rapport au contrôle.

L'inhibiteur mixte de PI3K β/δ , l'AZD8186 à 1 μ M n'entraîne quant à lui qu'une diminution significative de 38% de l'aire des tumorosphères après 7 jours de traitement (Figure 13F).

Avec un traitement par cisplatine à 5 μ M l'aire moyenne des sphéroïdes restante après 7 jours de traitement reste de 62,13% (Figure 13G et H).

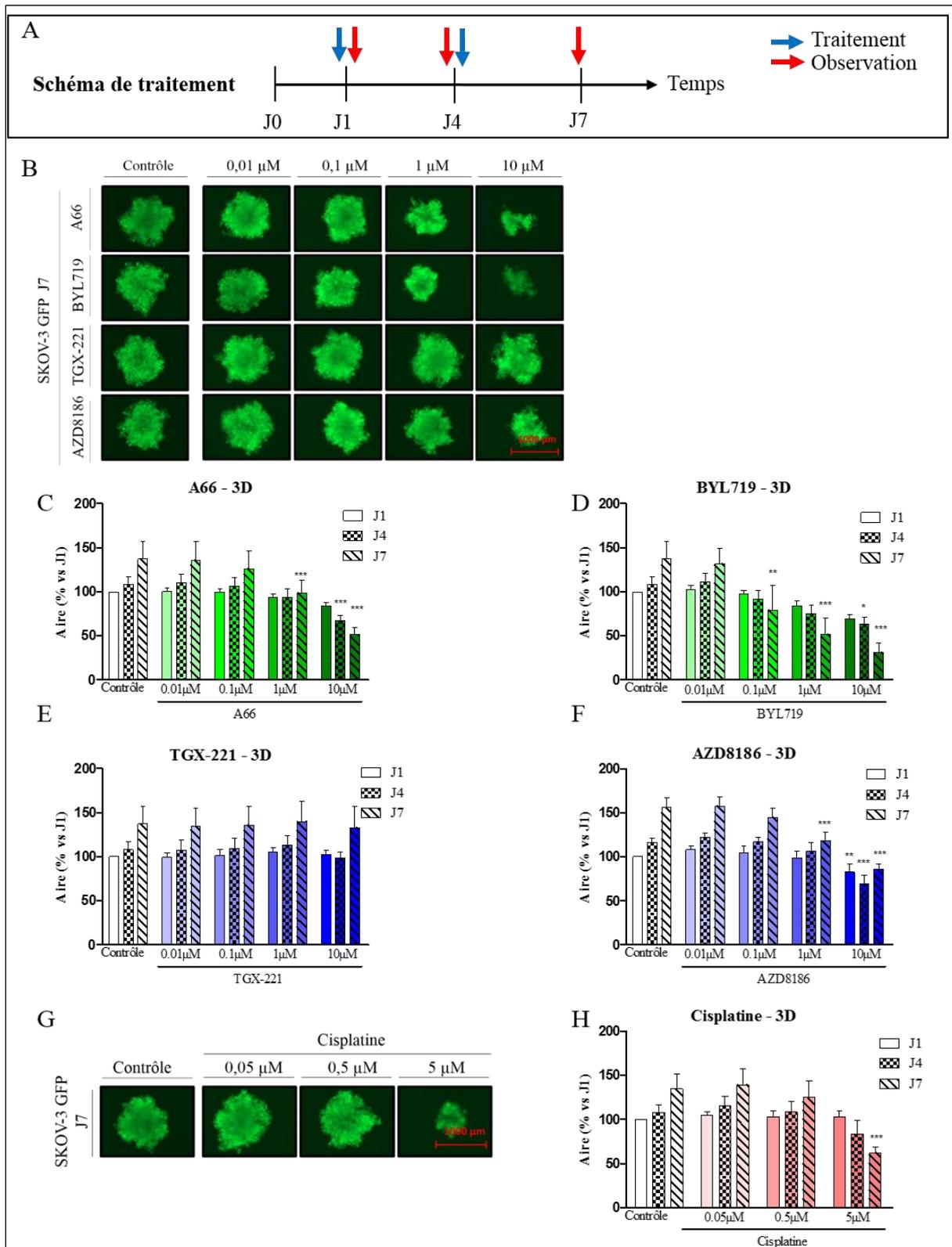


Figure 13 : L'inhibition sélective de PI3K α empêche le maintien de tumorosphères de cellules tumorales ovariennes. Des tumorosphères de 5000 cellules SKOV-3 GFP sont réalisées et traitées ou non avec des inhibiteurs de PI3K α (A66 et BYL719), ou de PI3K β (TGX-221 et AZD8186) de 0,01 à 10 μM ou avec du cisplatine (de 0,05 à 5 μM) selon le schéma de traitement en A. (B et G) La morphologie des tumorosphères est évaluée à J1, J3 et J7. (C-F et H) L'aire des tumorosphères est évaluée à J1, J3 et J7 à l'aide du logiciel Zen® (grossissement 5X), $n \geq 3$, Moyenne \pm ESM (test ANOVA en comparaison à la condition contrôle du jour d'observation correspondant, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*)).

Les inhibiteurs de PI3K α entraînent donc une diminution de l'aire des tumorosphères et ce phénomène semble être isoforme-spécifique.

5) Evaluation de la résistance à l'effet cytotoxique des inhibiteurs de PI3K et du cisplatine induit par une culture en 3D

Afin d'évaluer la résistance au traitement potentiellement induite par la culture en 3D, nous avons traité les cellules SKOV-3 GFP cultivées en 2D d'une part et en 3D d'autre part avec des inhibiteurs de PI3K ou du cisplatine et évalué le nombre de cellules vivantes avec un test MTT (2D) ou Alamar Blue (3D) (Figure 14).

En 2D, les deux inhibiteurs de PI3K α présentent une toxicité concentration-dépendante sur les cellules SKOV-3 GFP à partir d'une concentration de 1 μ M (diminution de plus de 30% du pourcentage de cellules vivantes pour les deux inhibiteurs au J7). A une concentration de 10 μ M, le BYL719 présente une toxicité significativement supérieure à l'A66 avec une diminution de 80% du pourcentage de cellules SKOV-3 GFP vivantes pour le BYL719 contre 66% pour l'A66 (Figure 14B). Une diminution significative du nombre de cellules vivantes est observée pour des concentrations en inhibiteurs de PI3K α supérieures ou égales à 1 μ M et pour des concentrations supérieures ou égales à 3,25 μ M en cisplatine (Figure 14B et C). En 3D cette diminution n'est significative que pour l'utilisation du BYL719 à 10 μ M (Figure 14D et E).

La culture en 3D dimension semble donc conférer une résistance à l'ensemble des traitements vis-à-vis de leur effet cytotoxique.

Les inhibiteurs de PI3K α conservent à J4, un effet concentration-dépendant (bien que non significatif) contrairement au cisplatine (Figure S2).

L'effet cytotoxique du cisplatine est donc aboli par la culture en 3D, en revanche avec un traitement par inhibiteurs de PI3K α on observe une augmentation de la résistance en 3D mais l'effet demeure.

6) Morphologie des sphéroïdes de cellules SKOV-3 WT après traitement

Afin d'analyser plus en détail l'organisation des tumorosphères traitées par des inhibiteurs de PI3K ou du cisplatine et la répartition au sein des sphères des cellules vivantes et mortes, nous avons marqué les cellules vivantes en vert et les cellules mortes en rouge à l'aide de fluorochromes et quantifié l'aire occupée par les cellules vivantes (Figure 14 F-H).

Les tumorosphères de cellules SKOV-3 non traitées semblent présenter un cœur contenant des cellules mortes. Comme précédemment, le TGX-221, inhibiteur de PI3K β , ne modifie pas la morphologie des tumorosphères de SKOV-3 WT, et ce même à forte concentration. L'AZD8186,

ne modifie que peu l'aire occupée par les cellules vivantes (Figure 14G) mais semble altérer la morphologie des tumorosphères (Figure 14F).

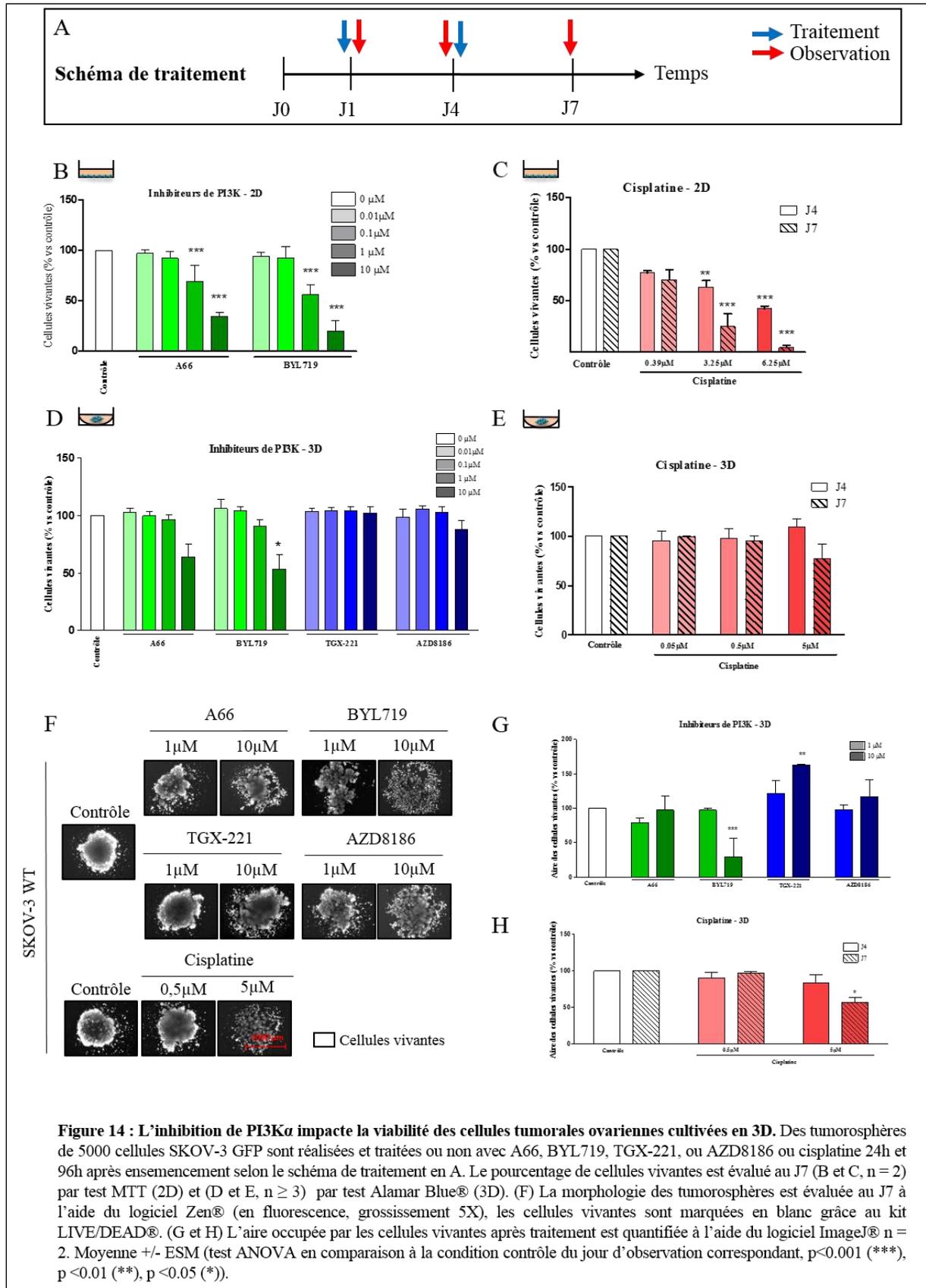


Figure 14 : L'inhibition de PI3Kα impacte la viabilité des cellules tumorales ovariennes cultivées en 3D. Des tumorosphères de 5000 cellules SKOV-3 GFP sont réalisées et traitées ou non avec A66, BYL719, TGX-221, ou AZD8186 ou cisplatine 24h et 96h après ensemencement selon le schéma de traitement en A. Le pourcentage de cellules vivantes est évalué au J7 (B et C, n = 2) par test MTT (2D) et (D et E, n ≥ 3) par test Alamar Blue® (3D). (F) La morphologie des tumorosphères est évaluée au J7 à l'aide du logiciel Zen® (en fluorescence, grossissement 5X), les cellules vivantes sont marquées en blanc grâce au kit LIVE/DEAD®. (G et H) L'aire occupée par les cellules vivantes après traitement est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ® n = 2. Moyenne +/- ESM (test ANOVA en comparaison à la condition contrôle du jour d'observation correspondant, p < 0.001 (***) , p < 0.01 (**), p < 0.05 (*)).

Le traitement des cellules SKOV-3 par des inhibiteurs de PI3K α entraîne une modification de la morphologie des sphéroïdes et semble augmenter la quantité de cellules mortes. Seul le BYL719 à 10 μ M provoque une diminution significative de l'aire occupée par les cellules vivantes (Figure 14G et H). De manière semblable aux résultats obtenus précédemment, une concentration de 0,5 μ M de cisplatine ne modifie pas la morphologie des agrégats. La désagrégation des tumorosphères et la diminution de la surface de cellules vivantes ne semble altérée qu'au bout de 7 jours après traitement par 5 μ M de ce sel de platine (Figure 14E et G). Le TGX-221, utilisé à forte concentration, présente également un effet sur les tumorosphères de SKOV-3 GFP qui correspond probablement à un effet non spécifique de cet inhibiteur mixte (Figure 14D, F et G). Les résultats ainsi obtenus sont semblables aux précédents avec un effet des inhibiteurs de PI3K α persistants et un effet retardé du cisplatine.

7) Evaluation de l'effet de la combinaison d'inhibiteurs de PI3K et de cisplatine sur les tumorosphères de cellules SKOV-3

Les cellules SKOV-3 sont cultivées en 3D de manière similaire à l'expérience précédente mais traitées par une combinaison de traitements associant inhibiteurs de PI3K à concentration fixe de 1 μ M et cisplatine à concentration croissante (Figure 15).

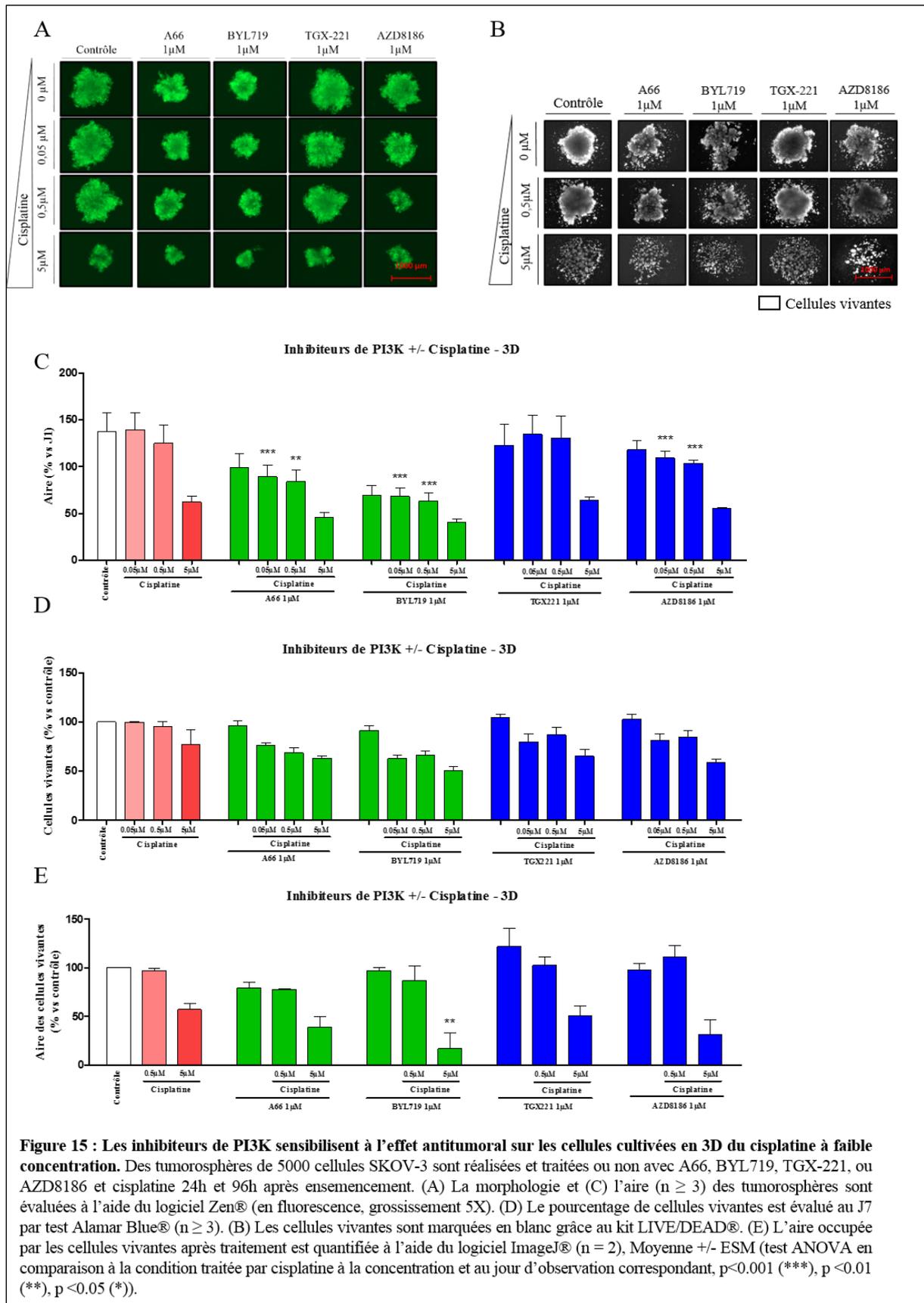
Seuls les inhibiteurs de PI3K α en association au cisplatine semblent altérer la morphologie des tumorosphères de SKOV-3 GFP par rapport au contrôle (cisplatine seul). Ces résultats sont confirmés par les mesures de l'aire de ces tumorosphères (Figure 15C).

Au J7, nous observons une différence significative entre les conditions contrôle (ne comprenant que du cisplatine) et les traitements associant les inhibiteurs de PI3K α au cisplatine à faible concentration (50% de différence par rapport au contrôle pour un traitement associant A66 et cisplatine à 0,05 μ M et 71% pour un l'association BYL et cisplatine 0,05 μ M). Cependant, en comparant les conditions précédentes associant 0,05 μ M de cisplatine et 1 μ M d'inhibiteur de PI3K α à la condition comprenant l'inhibiteur seul, aucune différence significative n'est observée.

En revanche à forte concentration en cisplatine (5 μ M), une différence significative est observée en comparant une association aux inhibiteurs de PI3K à la condition traitée par inhibiteur seul (Figure 15C et S3).

Bien que non significative, l'évaluation du nombre de cellules vivantes (Figure 5D) fourni des profils similaires à ceux de l'aire des tumorosphères avec une différence de 23,4% pour A66 et de 36,8% pour BYL719 combinés au cisplatine à 0,05 μ M. Les résultats obtenus avec le TGX-221 ne sont pas significatifs que ce soit concernant l'aire ou le nombre de cellules vivantes au sein des tumorosphères de SKOV-3 GFP. Les résultats de l'AZD8186 sont quant à eux uniquement

significatifs pour l'aire des tumosphères avec une différence de 30,2% pour la condition combinant AZD8186 et cisplatine à 0,05µM (par rapport au cisplatine seul).



L'utilisation de fluorochromes dans des conditions de culture et de traitement similaires aux expériences précédentes ont permis d'évaluer la répartition des cellules vivantes et mortes au sein des tumorosphères de SKOV-3 WT (Figure 15B). De la même manière seuls les traitements combinant inhibiteurs de PI3K α au cisplatine semblent altérer la répartition de ces cellules au sein des tumorosphères. Ces résultats sont retranscrits par les mesures de l'aire occupée par les cellules tumorales vivantes avec une différence significative de 40,1% par rapport à la condition contrôle retrouvée uniquement pour la combinaison cisplatine à 5 μ M et BYL719 à 1 μ M (Figure 15E). Les inhibiteurs de PI3K β n'apportent pas de différence significative par rapport au contrôle.

L'expérience de combinaison des traitements ne montre pas d'efficacité supérieure aux conditions seules, à faible concentration en cisplatine nous observons un effet équivalent au traitement par inhibiteur seul et à forte concentration en cisplatine, l'effet observé correspond à celui du cisplatine seul.

8) Influence du stroma sur les sphéroïdes de cellules SKOV-3

8.1) Culture 3D de MSC

Afin de prendre en compte les cellules non tumorales qui peuvent être retrouvées dans l'ascite des patientes, nous avons choisi d'intégrer des MSC à nos cultures. En 2D les inhibiteurs de PI3K α ne diminuent le nombre de MSC vivantes qu'à partir d'une concentration de 10 μ M (diminution d'environ 30% du pourcentage de cellules viables pour les deux inhibiteurs au J4) (Figure S5A). De la même manière, l'IC₅₀ du cisplatine pour les MSC (25,87 μ M; ESM:2,74) est au minimum 2 fois supérieure à celle des SKOV-3 GFP (4,37 μ M; ESM : 0,32) (Figure S5B).

Nous avons ensuite réalisé des cultures 3D de 10000 MSC et nous observons un profil d'évolution des agrégats de MSC totalement différent des cellules SKOV-3 avec une agrégation très rapide des cellules (dès le lendemain de l'ensemencement) et une diminution de la surface des agrégats de plus de 60% en 14 jours par rapport à l'aire initiale (Figure S5C et D). Nous avons également observé la formation de structures d'aspect fibreux au sein des agrégats de MSC dont la nature reste à déterminer (Figure S5C).

A forte concentration (10 μ M), A66 et BYL719 entraînent un retard sur la condensation initiale (différence significative de 40% par rapport au contrôle à J1 et de 20% non significative au J4) des agrégats formés par les MSC (Figure S5E et G). Ces inhibiteurs utilisés à plus faible concentration et le cisplatine ne modifient que légèrement la morphologie des agrégats de MSC (Figure S5E-H).

8.2) Co-culture 3D de MSC et de SKOV-3

Afin d'évaluer l'impact du stroma sur les sphéroïdes de SKOV-3, nous avons co-cultivé ces cellules tumorales (vertes par expression de la GFP) avec des MSC (marquées en rouge à l'aide de quantum dots) à différents ratio (5000 cellules tumorales SKOV-3 avec 5, 50, 500 ou 5000 MSC) et observé la morphologie, l'aire et l'intensité de fluorescence de ces tumorsphères hétérotypiques (Figure 16A-E). L'aire des tumorsphères est diminuée proportionnellement au nombre de MSC présentes au sein des tumorsphères (Figure 16A et D).

A fort ratio et après 7 jours d'observation, les cellules MSC semblent se regrouper au centre des tumorsphères (Figure 16C). Après 7 jours d'observation, les sphéroïdes contenant 5 000 MSC ont une aire 47,62% plus faible que le sphéroïde homotypique contrôle (Figure 16D). En revanche, la fluorescence GFP, correspondant aux cellules tumorales ne varie pas quel que soit le nombre de MSC présentes au sein des tumorsphères, indiquant que ces cellules induisent une compaction des tumorsphères sans modifier la prolifération des cellules tumorales (Figure 16E).

8.3) Influence du stroma sur la résistance des sphéroïdes de SKOV-3 au traitement par inhibiteurs de PI3K α et cisplatine

Afin d'évaluer l'impact du stroma sur la résistance des sphéroïdes de SKOV-3 au traitement, nous avons cultivé et traité des tumorsphères hétérotypiques (contenant 50 ou 500 MSC) avec des inhibiteurs de PI3K α ou du cisplatine et en avons observé la morphologie et mesuré l'aire (Figure 16F-I).

Une diminution de 121,7% de l'aire est observée au 7^{ème} jour après traitement par BYL719 à 10 μ M par rapport au contrôle en l'absence de MSC contre seulement 52,4% avec 50 MSC et 30,5% avec 500 MSC (Figure 16G). Des observations similaires sont réalisées avec un traitement par 5 μ M de cisplatine avec une diminution de l'aire de 91,12% en l'absence de MSC contre seulement 44,2% avec 50 MSC et 53% avec 500 MSC.

La présence de MSC au sein des tumorsphères semble donc empêcher la diminution de l'aire des sphéroïdes induits par les traitements aux inhibiteurs de PI3K α . Cependant, le traitement par inhibiteur semble maintenir un certain relâchement entre les cellules qui les composent.

9) Observations cliniques

Afin de confirmer le rôle du stroma sur la compaction des sphéroïdes, nous avons utilisé des cellules issues de patientes atteintes de cancer ovarien à stade avancé présentant une carcinose péritonéale. Ces cellules cultivées en 3D selon les modalités précédentes forment des sphéroïdes

très compacts ressemblant à ceux formés lors de la culture en 3D de sphéroïdes hétérotypiques à fort ratio de MSC (Figure 16J).

DISCUSSION

Du fait d'un diagnostic souvent tardif, les cancers ovariens sont dans 75% des cas associés à une CP. Ce processus métastatique passe par une étape de migration transcoelomique nécessitant la formation de sphéroïdes au sein de la cavité péritonéale. Cette structure tridimensionnelle confère aux cellules tumorales des capacités accrues de résistance aux chimiothérapies conventionnelles (3,93). Il existe, dans l'arsenal thérapeutique actuel, peu de traitements ciblant cette maladie métastatique qui représente pourtant un enjeu de santé publique majeur du fait de sa morbi-mortalité. A ce jour, la CHIP présente un intérêt thérapeutique certain dans le traitement de la CP mais reste peu pratiquée du fait des risques qu'une telle procédure fait encourir aux patientes (36,94–97).

Dans cette étude, nous avons mis au point une technique de culture en 3D permettant de retranscrire au mieux la formation d'agrégats retrouvés au sein du liquide d'ascite et responsables à court terme du phénomène de CP.

La formation de sphéroïdes est une étape précoce du processus de migration transcoelomique par lequel la CP du cancer ovarien se développe (3,76). La formation de sphéroïdes péritonéaux n'est cependant pas réservée au cancer ovarien mais est également retrouvée dans les cancers colorectaux, du pancréas ou encore du sein (80,98–100). Nous avons choisi de mettre en culture des cellules SKOV-3 GFP correspondant à une lignée cellulaire d'ascite d'origine ovarienne, dans des plaques à fond rond, traitées afin d'empêcher l'adhérence des cellules et permettant la formation d'agrégats cellulaires (101). Après seulement quelques heures, les cellules tumorales ovariennes se regroupent pour former des structures rondes ou elliptiques correspondant typiquement à celles des sphéroïdes décrits dans la littérature (100). L'aire des tumorosphères de cellules SKOV-3 GFP augmente au cours du temps et la grande majorité des cellules présentes au cœur des sphéroïdes formés sont mortes (Figure S4) de manière similaire aux observations d'autres équipes (102,103). Cependant, et de la même manière que la fluorescence GFP, la densité cellulaire ne varie pas de manière significative au cours du temps attestant de la stabilité du nombre de cellules qui composent ces sphéroïdes (Figure 11E et F).

Les PI3K, et plus particulièrement l'isoforme α , présentent un rôle dans le réarrangement du cytosquelette d'actine (12,104). L'implication de cette dernière dans les phénomènes de migration et d'invasion n'est plus à prouver et, selon notre hypothèse, PI3K α faciliterait la

formation des sphéroïdes de cellules tumorales ovariennes (55,64,68). Afin de valider cette hypothèse, nous avons traité des sphéroïdes de cellules SKOV-3 avec différentes concentrations en inhibiteurs de PI3K α , l'A66 (88) et le BYL719 (89). Après traitement de ces agrégats, et quelle que soit la concentration utilisée, nous observons en microscopie une désorganisation du sphéroïde pouvant aller jusqu'à sa désintégration complète pour un traitement à l'ensemencement par 10 μ M de BYL719. Les résultats des expériences de cytotoxicité menées en parallèle (Alamar Blue®) sur ces sphéroïdes montrent que cette désorganisation n'est pas seulement le fruit d'une cytotoxicité des inhibiteurs au regard des pourcentages de cellules viables obtenus : une concentration de 1 μ M de BYL719 entraîne une diminution de l'aire de 29,1% de l'agrégat mais n'entraîne qu'une diminution de 8,9% du pourcentage de cellules vivantes après 7 jours.

Nous avons cherché à déterminer par la suite, le rôle des PI3K sur le maintien de sphéroïdes existants. En effet, le traitement des patientes atteintes de cancer ovarien débute souvent à un stade tardif, ces patientes présentent pour la plupart du liquide d'ascite contenant des agrégats cellulaires déjà établis (105). De ce fait, nous avons traité nos sphéroïdes le jour suivant leur ensemencement. Alors qu'un traitement par 10 μ M de BYL719 à l'ensemencement des cellules entraîne après 7 jours une réduction totale de l'aire mesurable des sphéroïdes, ce même traitement n'entraîne qu'une réduction de 68,5% de l'aire des sphéroïdes s'il est débuté un jour plus tard. Dans ces conditions, la diminution d'efficacité de l'ordre de 30% observée après traitement par inhibiteurs de PI3K α est probablement due au défaut de pénétration des traitements au sein des sphéroïdes (106). Les inhibiteurs de PI3K α présentent tout de même un effet significatif quelle que soit la condition de traitement. PI3K α semble donc présenter à la fois un rôle dans la formation mais également dans le maintien des sphéroïdes tumoraux ovariens.

Quelle que soit la méthode de traitement, le cisplatine ne présente un effet significatif qu'à une forte concentration de 5 μ M (Figure 12G et 13H). Ce traitement à l'ensemencement réduit l'aire des sphéroïdes de 111,8%. Ce même traitement utilisé un jour plus tard n'entraîne qu'une diminution de 72,8% de l'aire. Une diminution de 40% de l'efficacité du traitement par cisplatine est donc observée lors du traitement sur sphéroïdes établis. De plus, un retard d'apparition de la réduction d'aire est observé avec le cisplatine dont l'effet observé n'apparaît qu'à forte concentration seulement après 7 jours contre 4 jours quel que soit l'inhibiteur de PI3K α utilisé à 10 μ M. Enfin, et contrairement au cisplatine qui requiert une concentration élevée pour modifier l'aire des tumorosphères, le BYL719 entraîne une réduction significative de ce paramètre à une concentration faible de 0,1 μ M. Il semblerait donc que les effets du BYL719 obtenus à une

concentration faible de 0,1 μ M permettent d'envisager un effet sur la carcinose péritonéale tout en conservant une toxicité moindre due à sa spécificité d'action sur PI3K α .

Nous avons également mené ces expériences avec des inhibiteurs de PI3K β , le TGX-221 (90) et l'AZD8186 (91). Le TGX-221 ne présente aucun effet significatif que ce soit sur l'aire des sph ro ides ou sur le nombre de cellules vivantes (Figure 13E et 14D). En revanche, L'AZD8186 présente une activité significative à forte concentration sur la diminution de l'aire des sph ro ides en partie explicable par le fait qu'il présente une activité à la fois sur PI3K β et sur PI3K δ (91). Ces expériences révèlent que l'effet maximal sur les sph ro ides est obtenu avec les inhibiteurs de l'isoforme α . Il semblerait donc que cet effet soit spécifique de l'isoforme PI3K α .

Notre hypothèse selon laquelle PI3K α agirait sur le développement des sph ro ides semble vérifiée par les expériences réalisées dans cette étude. L'action de PI3K α sur le cytosquelette d'actine pourrait être la source de cet effet sur les sph ro ides (65,68). Cette hypothèse est renforcée par la connaissance du lien entretenue entre l'actine polymérisée et les molécules adhésives telles que les E ou P cadhérines. L'expression de la P-cadhérine promeut le potentiel migratoire et favorise le rassemblement des cellules circulantes de cancer ovarien en agrégats multicellulaires (107). La myosine IIa, présente également une relation étroite avec l'actine notamment dans les phénomènes contractiles et de tension cellulaire. Ces éléments mettant en évidence le rôle de l'actine pourrait en partie expliquer l'implication de PI3K α dans le regroupement cellulaire en amas de type sph ro ides (5,108).

Les cellules mésothéliales tapissant le péritoine sécrètent de nombreuses protéines de la matrice extra-cellulaire (collagène, hyaluronine, fibronectine, ...) et des molécules d'adhésion (intégrines, CD44, ...) qui favorisent l'ancrage des cellules carcinomateuses au péritoine (5,109). De la même manière, la P-cadhérine est impliquée dans ce phénomène d'adhésion et son lien avec le cytosquelette d'actine induit une implication indirecte des PI3K. De plus, le rôle de la voie PI3K/Akt dans l'adhésion des cellules tumorales aux péritoine n'est plus à démontrer (110,111). Nous étudierons le rôle de PI3K α dans l'implantation de sph ro ides à la surface du péritoine grâce à un modèle *in vitro* permettant d'observer l'adhésion de cellules ou agrégats tumoraux prétraités ou non par inhibiteurs ou siRNA dirigés contre PI3K α , sur des cellules mésothéliales.

Les interactions intercellulaires entre deux cellules de même type présentent un rôle dans le développement de la maladie métastatique. Par l'injection intrapéritonéale en série de cellules fluorescentes vertes et rouges, il a été démontré que les cellules cancéreuses nouvellement introduites adh rent préférentiellement aux tumeurs existantes (112). Les thérapies ciblant l'adhésion entre des cellules cancéreuses de même type, comme les inhibiteurs de PI3K α , valent la

peine d'être prises en considération pour l'amélioration de la prise en charge de la CP. Nos résultats mettent en évidence l'obtention, avec un traitement par inhibiteurs de PI3K α , de cellules isolées à partir de sphéroïdes. Ces cellules sont connues pour être plus sensibles aux thérapies conventionnelles et leur obtention démontre tout l'intérêt que pourrait présenter les inhibiteurs de PI3K α dans un traitement combiné avec ce type de chimiothérapie (8,28)

Il a été démontré à plusieurs reprises que les études de cytotoxicité 2D ne rendent pas compte de la physiologie complète des tissus et surestiment le potentiel cytotoxique des molécules testées (8,28). L'étude de la formation de sphéroïdes a, en effet, donné lieu à la découverte de l'existence de résistances multicellulaires et a mis en évidence une protection des cellules de carcinome ovarien contre l'apoptose induite par le cisplatine. Dans une culture 3D, ces cellules sont 18, 15 ou 58 fois plus résistantes au cisplatine à 25, 50 et 100 μ M respectivement (8). De plus, la prolifération au sein des sphéroïdes décroît en comparaison avec des cellules cultivées en 2D, expliquant partiellement l'échappement de ces cellules à la mort induite par de tels traitements ciblant les cellules en répliation (8,109). Une augmentation de 33,4% de la résistance au traitement par BYL719 à 10 μ M est observée par le passage en culture 3D des SKOV-3 GFP après 7 jours. La résistance au cisplatine, traitement de référence dans la CHIP du cancer ovarien, est quant à elle augmentée d'environ 70% par cette culture en 3D (Figure 14). La confrontation de nos résultats de cytotoxicité 2D et 3D rend compte du même type de résistance pour les cellules SKOV-3 GFP que celle observée dans la littérature. Les inhibiteurs semblent conserver un effet concentration dépendant au 4^{ème} jour par rapport au cisplatine qui à ce stade est inefficace (Figure S2), laissant penser que les inhibiteurs conservent une action plus précoce sur la cohésion des sphéroïdes, comparé au cisplatine.

Le traitement courant de la carcinose péritonéale comprend l'utilisation de sels de platine administrés en intrapéritonéal (94–96). Nos résultats démontrent que l'effet des inhibiteurs de PI3K α ne repose pas uniquement sur leur propriété cytotoxique, contrairement au cisplatine (Figure 14). Nous avons donc pensé qu'il serait intéressant de combiner ces inhibiteurs au traitement de référence. L'effet observé en Figure 15 avec un traitement par cisplatine à faible dose combiné aux inhibiteurs de PI3K α à 1 μ M ne diffère pas significativement de celui observé avec le traitement par inhibiteur seul, que ce soit sur l'aire ou sur le pourcentage de cellules vivantes. Cette association de traitement ne montre ni synergie, ni antagonisme. Il est cependant prouvé que l'efficacité des inhibiteurs de PI3K α est diminuée lors d'une administration répétée avec un intervalle supérieur à 24h. Une administration quotidienne pourrait donc être une alternative intéressante au schéma de traitement testé dans cette étude (113). La désorganisation des sphéroïdes induite par les inhibiteurs

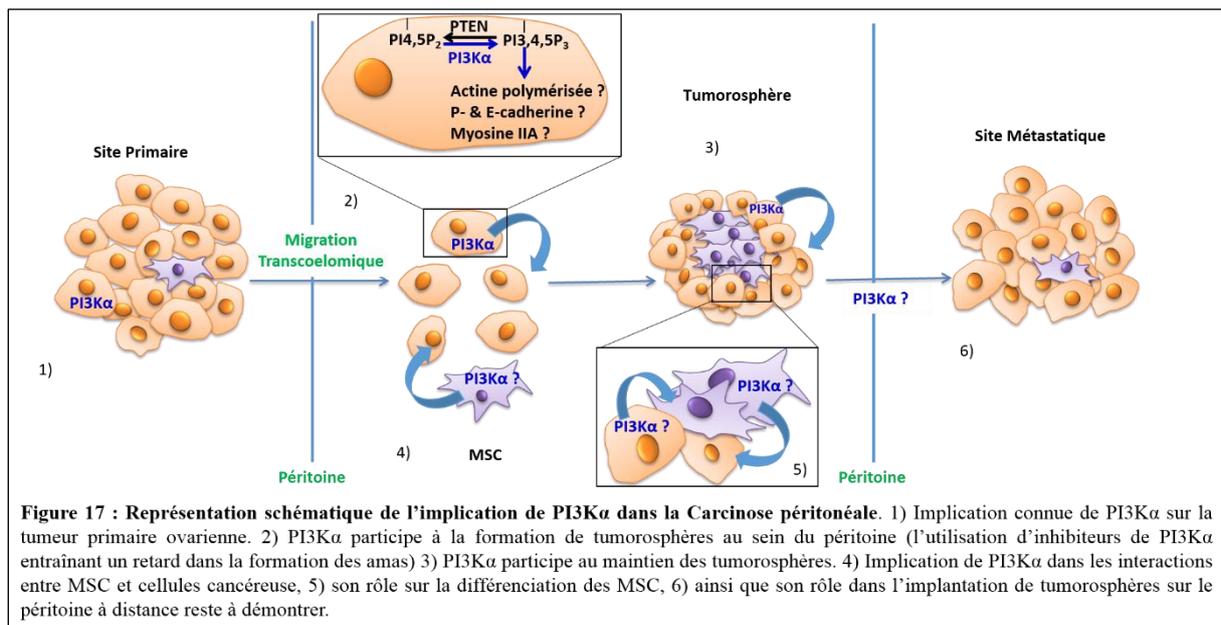
de PI3K α permettrait une meilleure biodisponibilité du cisplatine au sein des sphéroïdes en rompant le gradient de diffusion décroissant existant de la périphérie vers le centre de ces structures 3D (114).

Des inhibiteurs sélectifs de PI3K α , notamment le BYL719 (Alpelisib), sont actuellement testés en clinique avec une administration par voie orale. Une administration intrapéritonéale de ce type de molécule n'a encore jamais été testée et il est envisageable d'utiliser une combinaison des inhibiteurs de PI3K α avec une CHIP à base de sel de platine par exemple. Un traitement séquentiel débutant par une désorganisation des sphéroïdes avec un traitement par inhibiteurs de PI3K α suivi d'une CHIP à base de sel de platine dont l'action est purement cytotoxique paraît également être une possibilité pour la potentialisation des traitements (14).

Afin de prendre en compte la physiologie complète de la CP, il est nécessaire de considérer le stroma existant dans la cavité péritonéale. Les MSC participent à la constitution de ce stroma notamment par leur capacité à se différencier. Leur recrutement, par les cellules tumorales, favorise la formation de sphéroïdes notamment dans le cancer colorectal et du sein en stimulant la compaction des sphéroïdes cancéreux en culture 3D (98,99,105). Dans un modèle de xéno greffe du cancer du pancréas, la présence de MSC favorise également la formation de tumeurs et le développement de résistances aux traitements (80). Les résultats du modèle de co-culture de cellules tumorales avec des MSC que nous avons établi montrent également qu'avec un ratio de seulement 1 MSC pour 10 SKOV-3 GFP, l'aire de l'agrégat hétérotypique ainsi formé diminue en 7 jours de 72,5% par rapport au contrôle ne contenant que des cellules tumorales (Figure 16A et D). La présence de MSC au sein des tumorsphères entraîne donc une condensation de ces structures 3D sans modification de la prolifération des cellules (Figure 16D et E). La présence de MSC au sein des sphéroïdes de cellules tumorales semble augmenter la résistance de ces dernières à l'inhibition de PI3K α . En effet, le traitement par BYL719 à 10 μ M entraîne une diminution de 121,8% de l'aire des sphéroïdes homotypiques en 7 jours (Figure 16G). Ce même traitement utilisé sur des sphéroïdes hétérotypiques comprenant 1 MSC pour 10 cellules tumorales n'entraîne qu'une diminution de 52,4% de l'aire par rapport à la condition non traitée (Figure 16G). Un traitement par cisplatine à 5 μ M entraîne une diminution de l'aire des sphéroïdes homotypiques de 91,1% par rapport au contrôle. Ce même traitement utilisé sur sphéroïdes hétérotypiques n'entraîne qu'une diminution de l'aire d'environ 45-50%, soit une perte de 40% d'efficacité du cisplatine à forte concentration par l'ajout de MSC (Figure 16H et I). Les résultats préliminaires des traitements en 2D des MSC montrent une résistance accrue de ces cellules aux différents traitements par rapport aux cellules tumorales étudiées (Figure S5 A et B). Ces résultats suggèrent que l'intégration de

cellules du micro-environnement dans notre modèle favorise l'apparition de résistances aux différents traitements testés. Le rôle de PI3K α dans les interactions entre cellules tumorales et MSC, son implication dans la compaction, dans la résistance et sur l'état de différenciation des MSC des sphéroïdes hétérotypiques reste à déterminer.

En vue de réaliser un modèle *in vitro* plus fidèle encore à la physiopathologie de la carcinose péritonéale, plusieurs équipes ont pris en compte la présence de liquide d'ascite et des forces de cisaillement que celui-ci applique aux cellules tumorales grâce à un système de culture 3D en puce micro-fluidique (3,110,115,116). Ainsi, il a été démontré que ces forces de cisaillement produites par un flux semblable à celui du liquide d'ascite provoquent l'expression de marqueurs de cellules souches et de la transition épithélio-mésenchymateuse par les cellules cancéreuses ovariennes au sein de sphéroïdes. Ces caractéristiques ainsi exprimées par les cellules tumorales provoquent alors une augmentation de la résistance au cisplatine et paclitaxel qui n'apparaît pas en l'absence du flux (115,116). De plus, l'activation d'Akt est significativement augmentée dans les sphéroïdes soumis au flux et le blocage des PI3K par un inhibiteur pharmacologique de toutes les isoformes (LY294002) entraîne la diminution de l'expression des protéines d'efflux (ABCG2, P-gp, Oct4) et des marqueurs souches, sources de résistance aux traitements conventionnels. Ces résultats confirment que la voie PI3K/Akt est une voie clé dans le développement des propriétés souches des cellules cancéreuses ovariennes et de la chimiorésistance consécutive aux forces de cisaillement (115,116).



L'ensemble des résultats de cette étude démontre le rôle crucial de PI3K α dans la formation et le maintien des sphéroïdes de cellules tumorales ovariennes, faisant de cette enzyme une cible thérapeutique d'intérêt pour le traitement de la CP (Figure 17). En effet, l'utilisation d'un

prétraitement par inhibiteur de PI3K α en intra-péritonéal, séparant les agrégats en cellules individuelles semble présenter un intérêt dans la sensibilisation des sphéroïdes aux traitements utilisés dans la CHIP et constitue une alternative prometteuse afin d'améliorer la prise en charge d'une pathologie au pronostic très sombre.

CONCLUSION / PERSPECTIVES EN RECHERCHE DE TRANSFERT

Dans les dernières décennies, il n'y a eu qu'une mince amélioration de la survie des patientes atteintes de cancer ovarien à stade avancé. En dépit de récentes avancées dans la caractérisation génomique de cette pathologie, les thérapies innovantes manquent toujours cruellement dans l'arsenal thérapeutique de ce cancer (59,60).

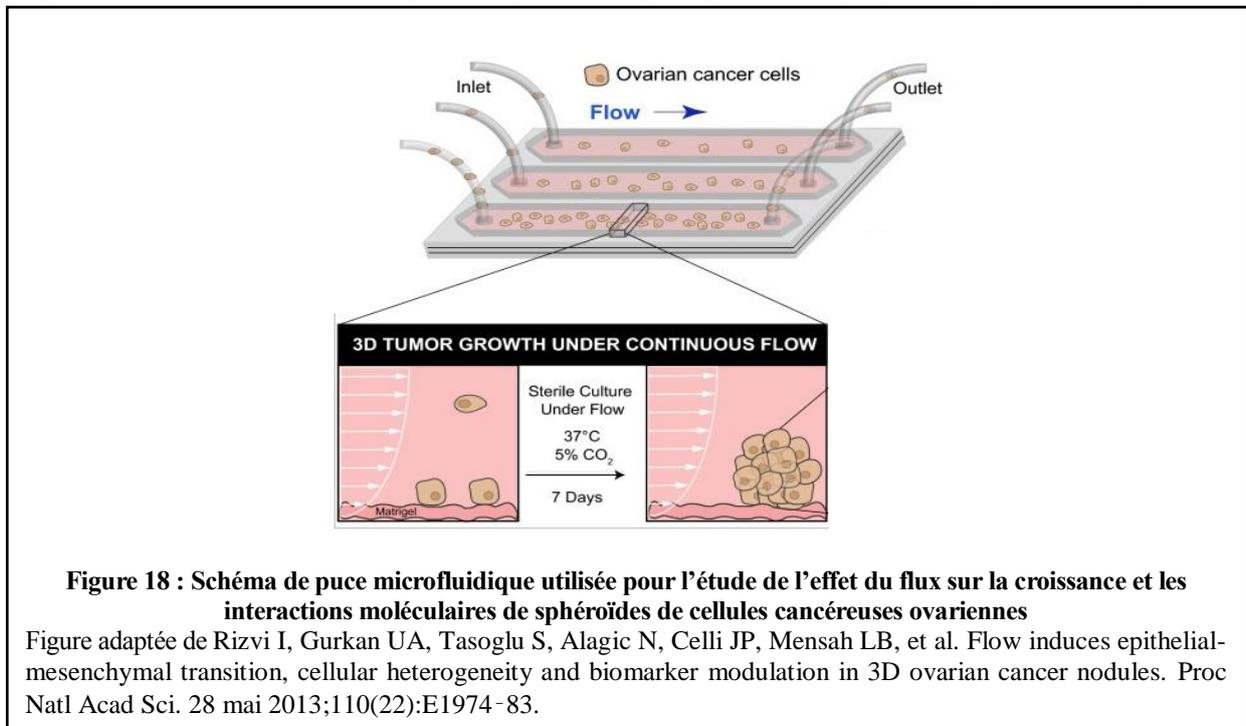
L'utilisation d'un système de culture 3D rend compte au mieux in vitro de la physiologie des sphéroïdes responsables à terme du phénomène de carcinose péritonéale existants dans le liquide d'ascite de patientes atteintes de cancer ovarien. Grâce à ce mode de culture, une augmentation de la résistance de cellules tumorales ovariennes aux traitements conventionnels a été mise en évidence. De plus, nous avons démontré que ce type de résistance est retrouvé de manière accrue lors de la présence de cellules mésenchymateuses du stroma au sein des tumorsphères. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'isoforme de PI3K sur les sphéroïdes a permis d'identifier le rôle prépondérant joué par PI3K α dans la formation et le maintien des sphéroïdes, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles modalités de traitements pour le traitement de la carcinose péritonéale.

Au vu de l'hétérogénéité des tumeurs ovariennes, des biomarqueurs prédictifs mais également pharmacodynamiques sont nécessaires afin de sélectionner les patientes les plus à même de répondre aux thérapies ciblées. Plusieurs études montrent que la réponse aux traitements ciblant la voie des PI3K est, le plus souvent, dépendante de l'altération génétique de cette voie. A ce jour, les patientes entrant dans les essais d'inhibiteurs de PI3K ne sont pas sélectionnées sur la base d'altérations moléculaires telles que des mutations de PIK3CA ou PTEN (14,58–60).

Dans cette optique, une combinaison de thérapies bloquant à la fois PI3K/AKT et PARP devrait être évaluée chez les patientes présentant une mutation de PI3K et de BRCA, et une combinaison de traitements ciblant à la fois PI3K/AKT et MAPK chez les patientes mutées sur la voie PI3K ou Ras/MAPK. Il semble donc critique pour les futures études incluant des patientes non sélectionnées, de développer en parallèle des études biologiques afin d'identifier des biomarqueurs candidats pour cette sélection (14,58–60).

La prise en charge du développement du liquide d'ascite représente un challenge clinique considérable dans le traitement du cancer ovarien. En effet, ce liquide fournit une multitude d'opportunités pour la recherche. Son accessibilité et sa riche composition cellulaire en font une excellente source de tissu tumoral pour l'étude de biomarqueurs pronostiques et prédictifs (6,7). La technologie de l'ADN tumoral circulant paraît également être une alternative attractive et non invasive, en comparaison à la technique de la biopsie classique, permettant la caractérisation du profil moléculaire des tumeurs (14,117).

Le rôle joué par les mouvements du liquide d'ascite sur les cellules tumorales, impliquant la voie des PI3K et induisant l'expression de marqueurs souches par ces cellules nous a conduit à débiter une collaboration avec l'équipe ELiA du LAAS (Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes, Toulouse). Cette équipe nous fournira les moules nécessaires à la fabrication de puces microfluidiques permettant de soumettre nos sphéroïdes à des mouvements de fluides dont la composition et la vitesse serait maîtrisée et similaire à celle du liquide d'ascite. Nous pourrions ainsi évaluer l'implication de PI3K α sur le maintien des tumorosphères dans un modèle de culture reproduisant plus fidèlement la physiologie de l'espace péritonéal (Figure 18) (79,115,116).



Notre étude nous a permis d'évaluer l'importance de PI3K α pour la formation et le maintien des sphéroïdes de cellules d'origine ovarienne. Cependant, ce rôle n'est fondé que sur l'hypothèse que cette action menée par PI3K α est réalisée, en partie, par l'intermédiaire de son influence sur le cytosquelette d'actine. Dans un futur proche, il sera nécessaire de confirmer le rôle de PI3K α sur le cytosquelette d'actine et son influence sur la cohésion des cellules au sein des sphéroïdes. Une première étape pourrait être l'observation de la localisation de l'actine au sein des cellules traitées ou non par inhibiteur de PI3K α grâce à un marquage à la phalloïdine. Dans un deuxième temps l'étude des cadhérines E et P, à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes différents, permettrait de confirmer le lien PI3K/Actine/Cadhérine et cohésion cellulaire (12,13,65,68,70,71,73).

Les puces microfluidiques du LAAS nous permettrons, par la suite, d'évaluer le rôle tenu par PI3K α dans l'adhésion des cellules de sphéroïdes au péritoine. En effet, il est possible d'utiliser

des cellules de péritoine comme matrice de ces puces et d'évaluer l'adhésion des agrégats cellulaires à ce pseudo-péritoine avant et après traitement par inhibiteur de PI3K. Une observation des intégrines et cadhérines impliquées respectivement dans l'adhésion à la matrice extra-cellulaire et dans l'adhésion cellule-cellule est également envisageable à l'aide d'anticorps spécifiques marqués de fluorochromes (110,111).

Le microenvironnement tumoral joue un rôle crucial dans le développement de la carcinose péritonéale du cancer ovarien. Nous avons vu que les cellules souches mésenchymateuses confèrent aux sphéroïdes hétérotypiques ainsi obtenus des capacités de résistance accrues. La voie des PI3K est cruciale non seulement pour les cellules cancéreuses mais également pour les cellules du stroma environnant. Les futures combinaisons impliquant des thérapies ciblées sur la voie des PI3K requerront probablement des thérapies ciblant les composants du stroma comme les cellules souches mésenchymateuses (14).

L'utilisation de thérapies ciblées sur la voie des PI3K en monothérapie en clinique s'est heurtée à l'apparition de résistances impliquant de multiples mécanismes moléculaires. Cette observation a donné naissance à l'utilisation d'inhibiteurs de PI3K en combinaison à d'autres thérapies. Toutes les combinaisons possibles ne peuvent pas être testées en clinique, d'où l'importance de développer des modèles animaux mimant la biologie du cancer ovarien humain. Dans l'étude des modèles animaux, il est important de prendre en compte la capacité du cancer ovarien à métastaser non seulement par voie lymphatique et hématogène mais surtout *via* la voie transcoelomique. Le développement de tels modèles est également critique pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ou biomarqueurs prédictifs (17).

Les objectifs conventionnels des essais cliniques, comme la réponse au traitement évaluée selon les critères de Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST), ne semblent pas appropriés pour évaluer correctement l'activité des inhibiteurs de PI3K. En effet, ces traitements tendent plus à la stabilisation de la pathologie par blocage de l'évolution métastatique qu'à la réduction tumorale. La chimiothérapie reste un élément central dans la prise en charge du cancer ovarien, et les inhibiteurs de PI3K pourraient avoir un intérêt en tant que traitement de maintenance notamment chez les patientes rendues résistantes au platine (60).

L'éducation thérapeutique (ETP) a pour objectif d'améliorer ou de maintenir l'état de santé de la patiente, de sa qualité de vie et de celle de ses proches. Elle vise à accompagner la patiente dans l'acquisition de compétences lui permettant de comprendre sa maladie, ses traitements et leurs effets indésirables éventuels. L'ETP permet d'améliorer l'observance, de planifier le suivi post-traitement, de faire face aux changements de mode de vie de la patiente, de comprendre et accepter

une prise en charge nutritionnelle et d'impliquer l'entourage de la patiente à la gestion de la maladie. C'est également au cours d'entretien d'ETP que peut être proposées une participation à un essai thérapeutique. Ce processus éducatif reste un élément clé de la prise en charge actuelle des patients atteint de cancer et est indispensable au bon déroulement des essais cliniques (4).

Le chemin semble encore long pour trouver un traitement efficace contre le cancer des ovaires et sa carcinose péritonéale associée. Cependant les techniques naissantes de détection précoce du cancer et la multitude de thérapies innovantes arrivant sur le marché permettent d'entrevoir une stratégie de combinaison de traitements ciblés, « à la carte » selon les biomarqueurs ou mutations exprimées par chaque tumeur. Parmi ces thérapies ciblées, les inhibiteurs de PI3K, et plus particulièrement de PI3K α , présentent un potentiel certain dans la prise en charge du cancer ovarien et notamment contre l'évolution de la maladie métastatique. Il semblerait qu'une combinaison de traitement soit la meilleure stratégie thérapeutique afin de prévenir les phénomènes de résistances par boucle de rétroaction. Les futurs essais engageant des inhibiteurs de PI3K devront dans tous les cas faire l'objet d'ETP qui prend, à l'heure actuelle, une part grandissante dans la prise en charge des patients atteints de cancer. L'ETP place le patient comme acteur central de son parcours de soin, est indispensable au bon déroulement des essais clinique et fait partie des missions attribuées aux pharmaciens notamment lors de la délivrance de traitement (4)(8)(21).

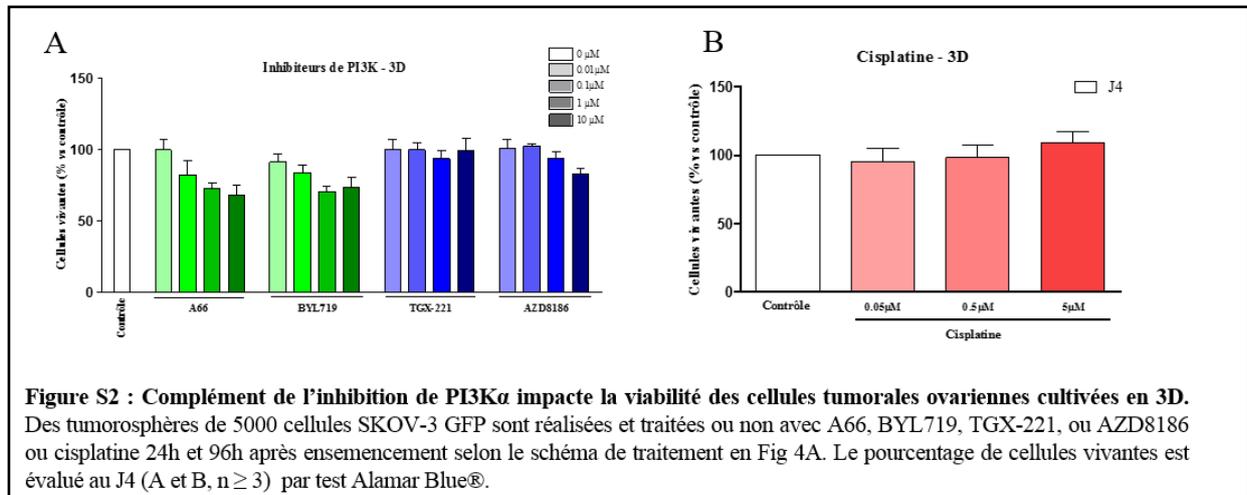
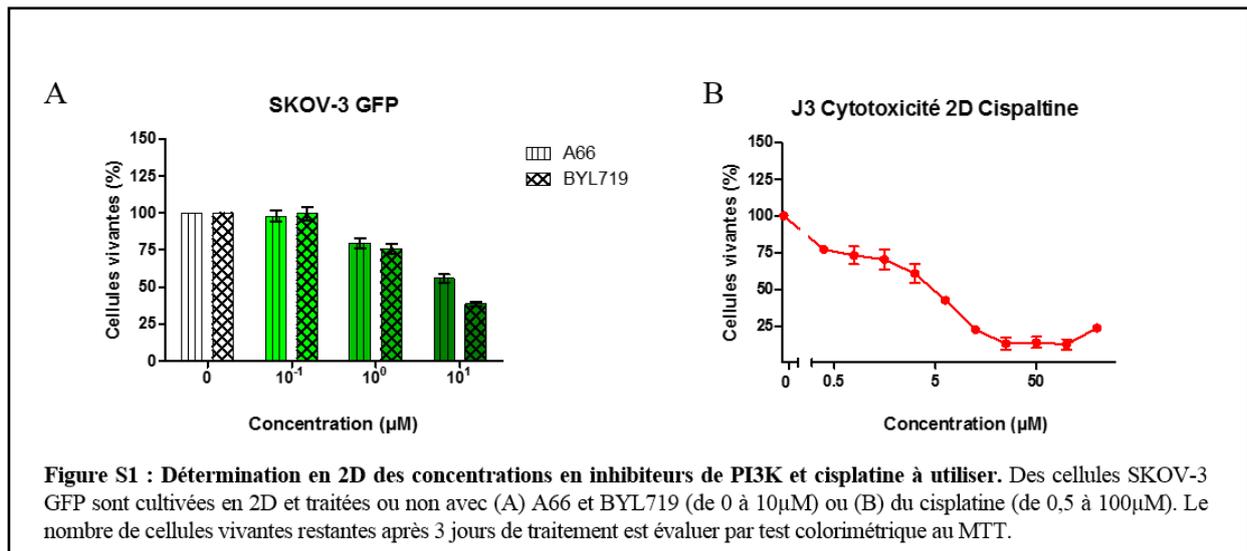
ANNEXES

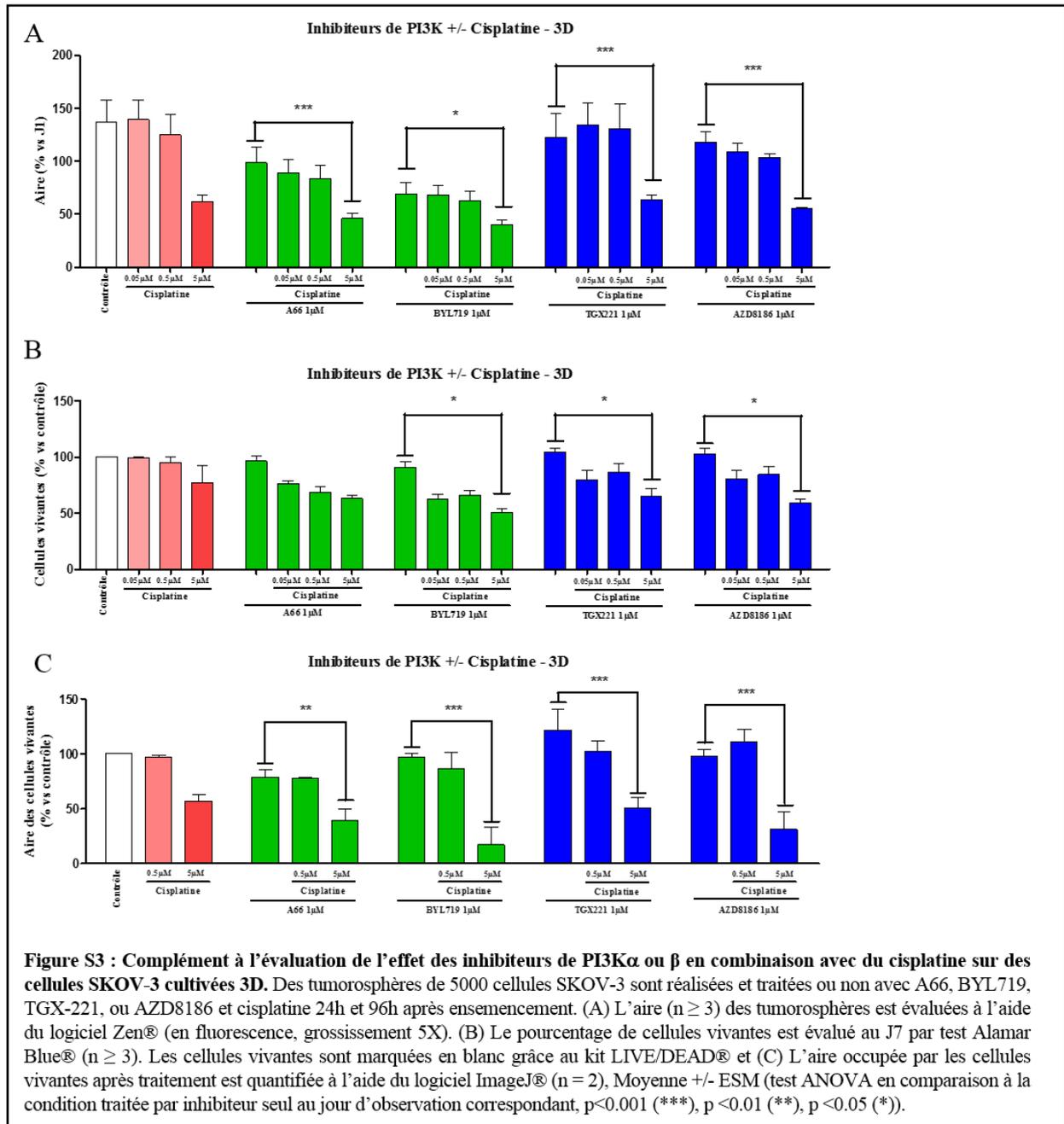
Inhibitor	PI3Kα IC₅₀ (nM)	PI3Kβ IC₅₀ (nM)	PI3Kδ IC₅₀ (nM)	PI3Kγ IC₅₀ (nM)
A66 (88)	32	> 12500	> 1250	3480
BYL719 (89)	4.6	1156	290	250
TGX-221 (90)	5000	5	100	10000
AZD8186 (91)	35	4	12	675

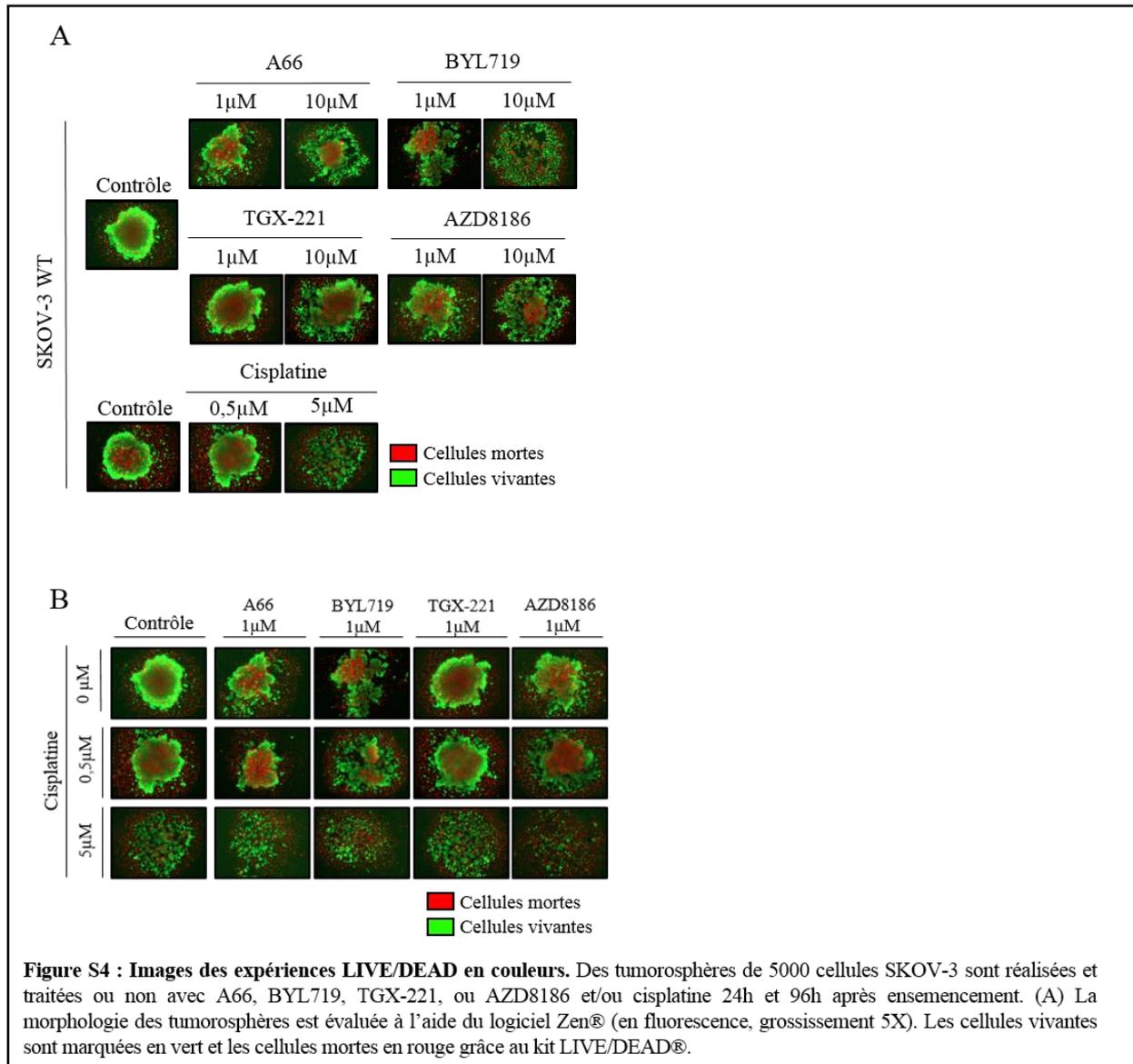
Tableau supplémentaire 1 : IC₅₀ (concentration inhibitrice 50) en nM des inhibiteurs de PI3K isoforme-spécifiques, calculée in vitro sur protéines recombinantes

Anticorps primaire	Origine	Dilution	Fournisseur	Taille	Anticorps secondaire
pAkt (S473)	Rabbit	1/1000	Cell signaling #4060	60kDa	1/3300
pAkt (T308)	Rabbit	1/1000	Cell signaling #4056	60kDa	1/3300
Akt total	Rabbit	1/1000	Cell signaling #4691	60kDa	1/20 000
P-Cofiline	Rabbit	1/1000	Cell signaling #3313	19kDa	1/3300
Cofiline totale	Rabbit	1/1000	Cell signaling #5175	19kDa	1/20000
β-Actine	Mouse	1/2000	Sigma Aldrich AC74	42kDa	1/10 000

Tableau supplémentaire 2 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour la révélation des Western Blot







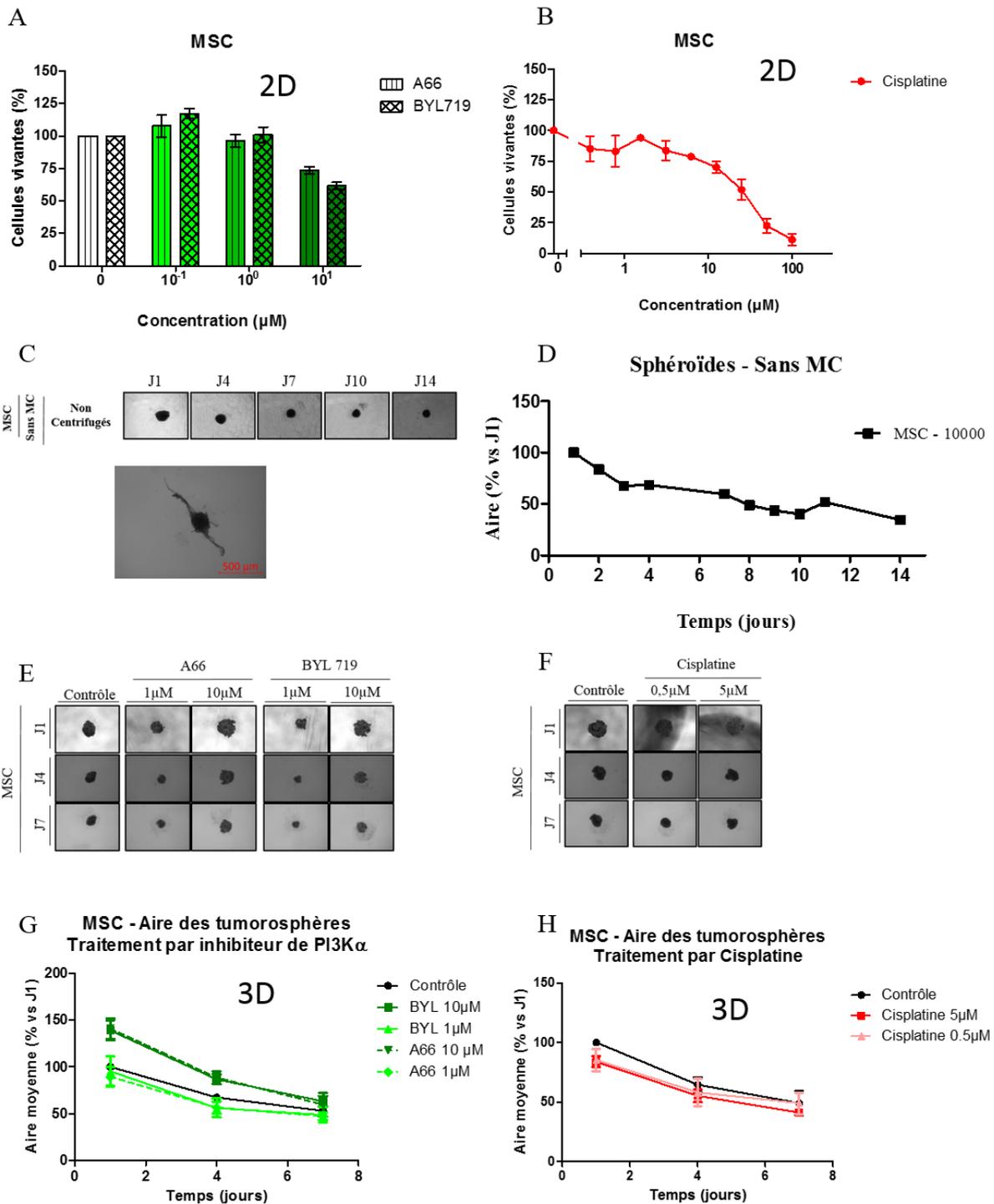


Figure S5 : Cultures de MSC. Des MSC sont cultivées en 2D et traitées ou non avec (A) A66 et BYL719 (de 0 à 10 μM) ou (B) du cisplatine (de 0,5 à 100 μM). Le nombre de cellules vivantes restantes après 3 jours de traitement est évalué par test colorimétrique au MTT. (C) Evolution de la morphologie des tumorosphères après ensemencement de 10000 MSC sans MC et sans centrifugation. Mesures de l'aire des tumorosphères (D) réalisées avec le logiciel ZEN® (grossissement 5X). Des tumorosphères de 10000 MSC sont réalisées et traitées ou non avec A66 et BYL719 (1 et 10 μM) ou du cisplatine (0,5 et 5 μM) selon le schéma de traitement en Fig 2A. (E, F) La morphologie des tumorosphères est évaluée à J1, J4 et J7. (G, H) L'aire des tumorosphères sont évaluées à J1, J4 et J7 à l'aide du logiciel Zen® (grossissement 5X), n \geq 3, Moyenne \pm ESM

BIBLIOGRAPHIE

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* mars 2011;61(2):69-90.
2. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995–1999. Results and commentary. *Eur J Cancer.* avr 2009;45(6):931-91.
3. Tan DSP, Agarwal R, Kaye SB. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol.* nov 2006;7(11):925-34.
4. HAS, INCa. Guide - Affection longue durée - Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique - Cancer de l'ovaire. 2010.
5. van Baal JOAM, van Noorden CJF, Nieuwland R, Van de Vijver KK, Sturk A, van Driel WJ, et al. Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. *J Histochem Cytochem.* févr 2018;66(2):67-83.
6. Ahmed N, Stenvers KL. Getting to Know Ovarian Cancer Ascites: Opportunities for Targeted Therapy-Based Translational Research. *Front Oncol* [Internet]. 2013
7. Kipps E, Tan DSP, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer.* avr 2013;13(4):273-82.
8. Kobayashi H, Man S, Graham CH, Kapitain SJ, Teicher BA, Kerbel RS. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 avr 1993;90(8):3294-8.
9. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer.* oct 2011;11(10):719-25.
10. Levine DA. Frequent Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancers. *Clin Cancer Res.* 15 avr 2005;11(8):2875-8.
11. Campbell IG, Russell SE, Choong DYH, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CSF, et al. Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancer. *Cancer Res.* 1 nov 2004;64(21):7678-81.
12. Baer R, Cintas C, Dufresne M, Cassant-Sourdy S, Schönhuber N, Planque L, et al. Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110 α . *Genes Dev.* 1 déc 2014;28(23):2621-35.
13. Zhang L-J, Tao B-B, Wang M-J, Jin H-M, Zhu Y-C. PI3K p110 α Isoform-Dependent Rho GTPase Rac1 Activation Mediates H2S-Promoted Endothelial Cell Migration via Actin Cytoskeleton Reorganization. Yang C-M, éditeur. *PLoS ONE.* 7 sept 2012;7(9):e44590.
14. Pons-Tostivint E, Thibault B, Guillermet-Guibert J. Targeting PI3K Signaling in Combination Cancer Therapy. *Trends Cancer.* juin 2017;3(6):454-69.
15. Colombo N, Van Gorp T, Parma G, Amant F, Gatta G, Sessa C, et al. Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* nov 2006;60(2):159-79.

16. Halkia E, Spiliotis J, Sugarbaker P. Diagnosis and Management of Peritoneal Metastases from Ovarian Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:1 - 12.
17. Romero I, Bast RC. Minireview: Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy. *Endocrinology.* avr 2012;153(4):1593-602.
18. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 1 oct 2013;24(suppl 6):vi24-vi32.
19. Heintz APM, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet.* nov 2006;95 Suppl 1:S161-192.
20. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *The Lancet.* oct 2009;374(9698):1371 - 82.
21. Kuhn E, Kurman RJ, Shih I-M. Ovarian Cancer is an Imported Disease: Fact or Fiction? *Curr Obstet Gynecol Rep.* mars 2012;1(1):1-9.
22. Gubbels JAA, Claussen N, Kapur AK, Connor JP, Patankar MS. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2010;3(1):8.
23. Andersen MR, Goff BA, Lowe KA, Scholler N, Bergan L, Drescher CW, et al. Combining a symptoms index with CA 125 to improve detection of ovarian cancer. *Cancer.* 1 août 2008;113(3):484-9.
24. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* févr 2008;108(2):402-8.
25. Lee M, Kim EJ, Cho Y, Kim S, Chung HH, Park NH, et al. Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) captured by microfluidic device in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* mai 2017;145(2):361-5.
26. Shao X, He Y, Ji M, Chen X, Qi J, Shi W, et al. Quantitative analysis of cell-free DNA in ovarian cancer. *Oncol Lett.* déc 2015;10(6):3478-82.
27. Pradeep S, Kim SW, Wu SY, Nishimura M, Chaluvally-Raghavan P, Miyake T, et al. Hematogenous Metastasis of Ovarian Cancer: Rethinking Mode of Spread. *Cancer Cell.* juill 2014;26(1):77-91.
28. Shield K, Ackland ML, Ahmed N, Rice GE. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol.* avr 2009;113(1):143-8.
29. Lengyel E. Ovarian Cancer Development and Metastasis. *Am J Pathol.* sept 2010;177(3):1053-64.
30. Eisenhauer EA. Real-world evidence in the treatment of ovarian cancer. *Ann Oncol.* 1 nov 2017;28(suppl_8):viii61-viii65.
31. CAROL, ONCOBOURGOGNE, ONCOCHA, ONCOLIE, ONCOLOR. Référentiel Oncologik - Ovaire. 2017.
32. ANSM. Résumé des caractéristiques du produit - Carboplatine. 2013.

33. ANSM. Résumé des caractéristiques du produit - Cisplatine. 2013.
34. ANSM. Résumé des caractéristiques du produit - Paclitaxel. 2015.
35. Ferron G, Martinez A, Mery E, Querleu D, Thomas F, Chatelut E, et al. [Importance of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in ovarian cancer]. *Bull Cancer (Paris)*. déc 2009;96(12):1243-52.
36. van Driel WJ, Koole SN, Sikorska K, Schagen van Leeuwen JH, Schreuder HWR, Hermans RHM, et al. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 18 janv 2018;378(3):230-40.
37. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, et al. Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 5 janv 2006;354(1):34-43.
38. Wright AA, Cronin A, Milne DE, Bookman MA, Burger RA, Cohn DE, et al. Use and Effectiveness of Intraperitoneal Chemotherapy for Treatment of Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*. 10 sept 2015;33(26):2841-7.
39. Montori G, Coccolini F, Fugazzola P, Ceresoli M, Tomasoni M, Rubicondo C, et al. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in ovarian and gastrointestinal peritoneal carcinomatosis: results from a 7-year experience. *J Gastrointest Oncol*. avr 2018;9(2):241-53.
40. Ansaloni L, Coccolini F, Morosi L, Ballerini A, Ceresoli M, Grosso G, et al. Pharmacokinetics of concomitant cisplatin and paclitaxel administered by hyperthermic intraperitoneal chemotherapy to patients with peritoneal carcinomatosis from epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. janv 2015;112(2):306-12.
41. Bakrin N, Bereder JM, Decullier E, Classe JM, Msika S, Lorimier G, et al. Peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for advanced ovarian carcinoma: A French multicentre retrospective cohort study of 566 patients. *Eur J Surg Oncol EJSO*. déc 2013;39(12):1435-43.
42. Singh S, Armstrong A, Robke J, Waggoner S, Debernardo R. Hyperthermic Intra-Thoracic Chemotherapy (HITeC) for the management of recurrent ovarian cancer involving the pleural cavity. *Gynecol Oncol Case Rep*. août 2014;9:24-5.
43. Mehta SS, Gelli M, Agarwal D, Goéré D. Complications of Cytoreductive Surgery and HIPEC in the Treatment of Peritoneal Metastases. *Indian J Surg Oncol*. juin 2016;7(2):225-9.
44. EMA. Résumé des caractéristiques du produit - Doxorubicine liposomale.
45. Worzfeld T, Pogge von Strandmann E, Huber M, Adhikary T, Wagner U, Reinartz S, et al. The Unique Molecular and Cellular Microenvironment of Ovarian Cancer. *Front Oncol [Internet]*. 22 févr 2017
46. Schmid BC, Oehler MK. New perspectives in ovarian cancer treatment. *Maturitas*. févr 2014;77(2):128-36.
47. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 29 déc 2011;365(26):2473-83.

48. Coward JJ, Middleton K, Murphy F. New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer. *Int J Womens Health*. févr 2015;189.
49. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, et al. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*. déc 2015;33(34):4015-22.
50. Bose CK. Immune Checkpoint Blockers and Ovarian Cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol Off J Indian Soc Med Paediatr Oncol*. juin 2017;38(2):182-9.
51. Schilder RJ, Pathak HB, Lokshin AE, Holloway RW, Alvarez RD, Aghajanian C, et al. Phase II trial of single agent cetuximab in patients with persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma with the potential for dose escalation to rash. *Gynecol Oncol*. avr 2009;113(1):21-7.
52. Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 15 janv 2003;21(2):283-90.
53. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. janv 2015;15(1):7-24.
54. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. août 2009;8(8):627-44.
55. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2010;11(5):329-41.
56. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*. janv 1999;21(1):99-102.
57. Huang J, Zhang L, Greshock J, Colligon TA, Wang Y, Ward R, et al. Frequent genetic abnormalities of the PI3K/AKT pathway in primary ovarian cancer predict patient outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. août 2011;50(8):606-18.
58. Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, Sasano T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. avr 2015;137(1):173-9.
59. Gasparri ML, Bardhi E, Ruscito I, Papadia A, Farooqi AA, Marchetti C, et al. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Ovarian Cancer Treatment: Are We on the Right Track? *Geburtshilfe Frauenheilkd*. oct 2017;77(10):1095-103.
60. Cheaib B, Auguste A, Leary A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer*. 5 janv 2015;34(1):4-16.
61. Mazzoletti M, Brogгинi M. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in ovarian cancer. *Curr Med Chem*. 2010;17(36):4433-47.
62. Crabbe T, Welham MJ, Ward SG. The PI3K inhibitor arsenal: choose your weapon! *Trends Biochem Sci*. oct 2007;32(10):450-6.

63. Janku F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. *Cancer Treat Rev.* sept 2017;59:93-101.
64. Tsujita K, Itoh T. Phosphoinositides in the regulation of actin cortex and cell migration. *Biochim Biophys Acta.* juin 2015;1851(6):824-31.
65. Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Curr Opin Cell Biol.* avr 2017;45:62-71.
66. Hanna S, El-Sibai M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell Signal.* oct 2013;25(10):1955-61.
67. Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol.* oct 2003;15(5):590-7.
68. Qian Y, Corum L, Meng Q, Blenis J, Zheng JZ, Shi X, et al. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *Am J Physiol-Cell Physiol.* janv 2004;286(1):C153-63.
69. Vandermoere F, Yazidi-Belkoura IE, Demont Y, Slomianny C, Antol J, Lemoine J, et al. Proteomics Exploration Reveals That Actin Is a Signaling Target of the Kinase Akt. *Mol Cell Proteomics.* janv 2007;6(1):114-24.
70. Vasioukhin V, Fuchs E. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol.* févr 2001;13(1):76-84.
71. Ohashi K, Fujiwara S, Mizuno K. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *J Biochem (Tokyo).* 12 janv 2017;mvw082.
72. Bershadsky A. Magic touch: how does cell-cell adhesion trigger actin assembly? *Trends Cell Biol.* nov 2004;14(11):589-93.
73. Saias L, Gomes A, Cazales M, Ducommun B, Lobjois V. Cell-Cell Adhesion and Cytoskeleton Tension Oppose Each Other in Regulating Tumor Cell Aggregation. *Cancer Res.* 15 juin 2015;75(12):2426-33.
74. Xu S, Yang Y 'nan, Dong L, Qiu W, Yang L, Wang X, et al. Construction and characteristics of an E-cadherin-related three-dimensional suspension growth model of ovarian cancer. *Sci Rep [Internet].* mai 2015
75. Roggiani F, Mezzanzanica D, Rea K, Tomassetti A. Guidance of Signaling Activations by Cadherins and Integrins in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 23 août 2016;17(9):1387.
76. Yin M, Li X, Tan S, Zhou HJ, Ji W, Bellone S, et al. Tumor-associated macrophages drive spheroid formation during early transcoelomic metastasis of ovarian cancer. *J Clin Invest.* 10 oct 2016;126(11):4157-73.
77. Thomassen I, Lemmens VEPP, Nienhuijs SW, Luyer MD, Klaver YL, de Hingh IHJT. Incidence, Prognosis, and Possible Treatment Strategies of Peritoneal Carcinomatosis of Pancreatic Origin: A Population-Based Study. *Pancreas.* janv 2013;42(1):72-5.

78. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 28 août 2014;158(5):1110-22.
79. Lee J-H, Kim S-K, Khawar IA, Jeong S-Y, Chung S, Kuh H-J. Microfluidic co-culture of pancreatic tumor spheroids with stellate cells as a novel 3D model for investigation of stroma-mediated cell motility and drug resistance. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. déc 2018
80. Kabashima-Niibe A, Higuchi H, Takaishi H, Masugi Y, Matsuzaki Y, Mabuchi Y, et al. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci*. févr 2013;104(2):157-64.
81. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. oct 2007;449(7162):557-63.
82. Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT, Pereboeva L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther*. mars 2006;5(3):755-66.
83. Huang J, Zhang L, Greshock J, Colligon TA, Wang Y, Ward R, et al. Frequent genetic abnormalities of the PI3K/AKT pathway in primary ovarian cancer predict patient outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. août 2011;50(8):606-18.
84. Bai H, Li H, Li W, Gui T, Yang J, Cao D, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway is a potential predictor of distinct invasive and migratory capacities in human ovarian cancer cell lines. *Oncotarget* [Internet]. 22 sept 2015
85. Brachmann SM, Kleylein-Sohn J, Gaulis S, Kauffmann A, Blommers MJJ, Kazic-Legueux M, et al. Characterization of the Mechanism of Action of the Pan Class I PI3K Inhibitor NVP-BKM120 across a Broad Range of Concentrations. *Mol Cancer Ther*. 1 août 2012;11(8):1747-57.
86. Wang D, Wang M, Jiang N, Zhang Y, Bian X, Wang X, et al. Effective use of PI3K inhibitor BKM120 and PARP inhibitor Olaparib to treat PIK3CA mutant ovarian cancer. *Oncotarget* [Internet]. 15 mars 2016
87. Mayer IA, Abramson VG, Formisano L, Balko JM, Estrada MV, Sanders ME, et al. A Phase Ib Study of Alpelisib (BYL719), a PI3K α -Specific Inhibitor, with Letrozole in ER⁺/HER2⁻ Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 1 janv 2017;23(1):26-34.
88. Jamieson S, Flanagan JU, Kolekar S, Buchanan C, Kendall JD, Lee W-J, et al. A drug targeting only p110 α can block phosphoinositide 3-kinase signalling and tumour growth in certain cell types. *Biochem J*. 15 août 2011;438(1):53-62.
89. Fritsch C, Huang A, Chatenay-Rivauday C, Schnell C, Reddy A, Liu M, et al. Characterization of the Novel and Specific PI3K Inhibitor NVP-BYL719 and Development of the Patient Stratification Strategy for Clinical Trials. *Mol Cancer Ther*. 1 mai 2014;13(5):1117-29.
90. Jackson SP, Schoenwaelder SM, Goncalves I, Nesbitt WS, Yap CL, Wright CE, et al. PI 3-kinase p110 β : a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med*. mai 2005;11(5):507-14.
91. Barlaam B, Cosulich S, Degorce S, Fitzek M, Green S, Hancox U, et al. Discovery of (R)-8-(1-(3,5-Difluorophenylamino)ethyl)-N,N-dimethyl-2-morpholino-4-oxo-4H-chromene-6-carboxamide (AZD8186): A Potent and Selective Inhibitor of PI3K β and PI3K δ for the Treatment of PTEN-Deficient Cancers. *J Med Chem*. 22 janv 2015;58(2):943-62.

92. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol.* janv 2007;83(11-12):849-71.
93. Liao J, Qian F, Tchabo N, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, Qian Z, et al. Ovarian Cancer Spheroid Cells with Stem Cell-Like Properties Contribute to Tumor Generation, Metastasis and Chemotherapy Resistance through Hypoxia-Resistant Metabolism. Orsulic S, éditeur. *PLoS ONE.* 7 janv 2014;9(1):e84941.
94. Bakrin N, Bereder JM, Decullier E, Classe JM, Msika S, Lorimier G, et al. Peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for advanced ovarian carcinoma: a French multicentre retrospective cohort study of 566 patients. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* déc 2013;39(12):1435-43.
95. Goéré D, Malka D, Tzanis D, Gava V, Boige V, Eveno C, et al. Is there a possibility of a cure in patients with colorectal peritoneal carcinomatosis amenable to complete cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy? *Ann Surg.* juin 2013;257(6):1065-71.
96. Singh S, Armstrong A, Robke J, Waggoner S, Debernardo R. Hyperthermic Intra-Thoracic Chemotherapy (HITEC) for the management of recurrent ovarian cancer involving the pleural cavity. *Gynecol Oncol Case Rep.* août 2014;9:24-5.
97. Manzanedo I, Pereira F, Pérez-Viejo E, Serrano Á, Hernández-García M, Martínez-Torres B, et al. Hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) with primary or secondary cytoreductive surgery in the treatment of advanced epithelial ovarian cancer. *Minerva Ginecol.* avr 2017;69(2):119-27.
98. Widder M, Lützkendorf J, Caysa H, Unverzagt S, Wickenhauser C, Benndorf RA, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells promote tumor growth in distinct colorectal cancer cells by a β 1-integrin-dependent mechanism: MSC-Mediated Growth Promotion of CRC. *Int J Cancer.* 15 févr 2016;138(4):964-75.
99. Bartosh TJ, Ullah M, Zeitouni S, Beaver J, Prockop DJ. Cancer cells enter dormancy after cannibalizing mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *Proc Natl Acad Sci.* 18 oct 2016;113(42):E6447-56.
100. Nagelkerke A, Bussink J, Sweep FCGJ, Span PN. Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: How to go three-dimensional. *Anal Biochem.* juin 2013;437(1):17-9.
101. McKenzie AJ, Hicks SR, Svec KV, Naughton H, Edmunds ZL, Howe AK. The mechanical microenvironment regulates ovarian cancer cell morphology, migration, and spheroid disaggregation. *Sci Rep [Internet].* déc 2018
102. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* juill 2016;163:94-108.
103. Matte I, Legault CM, Garde-Granger P, Laplante C, Bessette P, Rancourt C, et al. Mesothelial cells interact with tumor cells for the formation of ovarian cancer multicellular spheroids in peritoneal effusions. *Clin Exp Metastasis.* déc 2016;33(8):839-52.
104. Campa CC, Ciralo E, Ghigo A, Germena G, Hirsch E. Crossroads of PI3K and Rac pathways. *Small GTPases.* 3 avr 2015;6(2):71-80.

105. Kim S, Kim B, Song YS. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci.* sept 2016;107(9):1173-8.
106. Ayuso JM, Basheer HA, Monge R, Sánchez-Álvarez P, Doblaré M, Shnyder SD, et al. Study of the Chemotactic Response of Multicellular Spheroids in a Microfluidic Device. Rao CV, éditeur. *PLOS ONE.* 7 oct 2015;10(10):e0139515.
107. Usui A, Ko SY, Barengo N, Naora H. P-Cadherin Promotes Ovarian Cancer Dissemination Through Tumor Cell Aggregation and Tumor-Peritoneum Interactions. *Mol Cancer Res.* avr 2014;12(4):504-13.
108. Saias L, Gomes A, Cazales M, Ducommun B, Lobjois V. Cell-Cell Adhesion and Cytoskeleton Tension Oppose Each Other in Regulating Tumor Cell Aggregation. *Cancer Res.* 15 juin 2015;75(12):2426-33.
109. Burluson KM, Casey RC, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Skubitz AP. Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers. *Gynecol Oncol.* avr 2004;93(1):170-81.
110. Lee J-G, Ahn J-H, Jin Kim T, Ho Lee J, Choi J-H. Mutant p53 promotes ovarian cancer cell adhesion to mesothelial cells via integrin $\beta 4$ and Akt signals. *Sci Rep [Internet].* oct 2015
111. Matsuoka T, Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K, Olden K, Roberts JD. PI3K/Akt signalling is required for the attachment and spreading and growth in vivo of metastatic scirrhous gastric carcinoma. *Br J Cancer.* avr 2012;106(9):1535-42.
112. Steinkamp MP, Winner KK, Davies S, Muller C, Zhang Y, Hoffman RM, et al. Ovarian Tumor Attachment, Invasion, and Vascularization Reflect Unique Microenvironments in the Peritoneum: Insights from Xenograft and Mathematical Models. *Front Oncol [Internet].* 2013
113. De Buck SS, Jakab A, Boehm M, Bootle D, Juric D, Quadt C, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of BYL719, a phosphoinositide 3-kinase antagonist, in adult patients with advanced solid malignancies: Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of BYL719. *Br J Clin Pharmacol.* sept 2014;78(3):543-55.
114. Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* mars 2017;23:27-36.
115. Rizvi I, Gurkan UA, Tasoglu S, Alagic N, Celli JP, Mensah LB, et al. Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules. *Proc Natl Acad Sci.* 28 mai 2013;110(22):E1974-83.
116. Ip CKM, Li S-S, Tang MYH, Sy SKH, Ren Y, Shum HC, et al. Stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells under shear stress. *Sci Rep [Internet].* juill 2016 [cité 16 juin 2018];6(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/srep26788>
117. Cheng X, Zhang L, Chen Y, Qing C. Circulating cell-free DNA and circulating tumor cells, the « liquid biopsies » in ovarian cancer. *J Ovarian Res [Internet].* déc 2017

Mécanismes cellulaires de la mise en place d'une carcinose péritonéale dérivée du cancer ovarien: importance de PI3K α

Avec 225500 nouveaux cas par an et 140200 décès dans le monde, le cancer ovarien est la première cause de mortalité parmi les cancers gynécologiques dans les pays développés. La prise en charge standard actuelle repose sur une chirurgie le plus souvent associée à une chimiothérapie à base de sels de platine et de taxanes. Malheureusement, 70% des cancers ovariens diagnostiqués récidivent. Ce phénomène est en partie explicable par le fait que ce cancer présente la particularité de métastaser préférentiellement par voie transcoelomique. Ce processus repose sur le détachement de cellules de la tumeur primaire se regroupant sous forme de sphéroïdes dans l'espace péritonéal où l'on retrouve le liquide d'ascite. La structure tridimensionnelle et le microenvironnement particulier du cancer de l'ovaire confèrent aux cellules tumorales des propriétés accrues de chimiorésistance. Ces sphéroïdes vont par la suite adhérer au péritoine pour former la carcinose péritonéale.

La fréquente altération de la voie des PI3K dans le cancer ovarien en fait une cible thérapeutique d'intérêt. Les PI3K ont une action connue sur le cytosquelette d'actine et notre équipe a par ailleurs démontré l'importance de l'isoforme α dans ce phénomène. L'existence d'un lien étroit entre le cytosquelette d'actine et l'adhésion intercellulaire par l'intermédiaire des cadhérines n'est plus à prouver. Cette interconnexion entre PI3K α , cytosquelette d'actine et adhésion cellulaire nous a conduits à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de PI3K α sur les sphéroïdes de cellules tumorales ovariennes. Cette isoforme s'est ainsi révélée cruciale pour la formation et le maintien de ces structures.

De plus, nous avons mis en évidence que la présence de cellules stromales mésenchymateuses entraîne une compaction et une chimiorésistance accrues des sphéroïdes tumoraux.

Bien que les modalités n'en soient pas encore totalement définies, le traitement par inhibiteurs de PI3K α semble présenter un intérêt notamment en association à la chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale, traitement de référence de la carcinose péritonéale.

Cellular mechanisms of ovarian derived peritoneal carcinomatosis development: importance of PI3K α

With 225500 new cases per year and 140200 deaths worldwide, ovarian cancer is the leading cause of death among gynecological pathologies in developed countries. Current standard management is based on surgery most often associated with platinum salts and taxanes chemotherapy. Unfortunately, 70% of diagnosed ovarian cancers recur. This phenomenon is partly explained by the fact that ovarian cancer has the particularity of metastasize preferentially *via* the transcoelomic way. This process relies on the detachment of cells from the primary tumor that cluster together as spheroids in the peritoneal cavity where ascitic fluid is found. Three-dimensional structure and the particular microenvironment of ovarian cancer enhances chemoresistance properties of tumor cells. These spheroids then adhere to peritoneum and form peritoneal carcinomatosis.

The frequent alteration of the PI3K pathway in ovarian cancer makes it a therapeutic target of interest. PI3K have a known action on the actin cytoskeleton and our team also demonstrated the importance of isoform α in this phenomenon. The existence of a close link between actin cytoskeleton and intercellular adhesion via cadherins is no longer to be proven. This interconnection between PI3K α , actin cytoskeleton and cell adhesion led us to use specific PI3K α inhibitors on ovarian tumor cell spheroids. This isoform appeared to be crucial for the formation and maintenance of these aggregates.

In addition, we have shown that the presence of mesenchymal stromal cells leads to increased compaction and chemoresistance of tumor spheroids.

Although treatment modalities are not yet fully defined, treatment with PI3K α inhibitors seems to be of interest, particularly in combination with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, a standard treatment for peritoneal carcinomatosis.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : Cancer ovarien, carcinose péritonéale, PI3K, microenvironnement tumoral, culture 3D
KEYWORDS : Ovarian cancer, peritoneal carcinomatosis, PI3K, tumor microenvironment, 3D culture

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR :

Université Paul Sabatier Toulouse 3 - Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35, Chemin des maraîchers
31 062 TOULOUSE Cedex 9

Directeurs de thèse : GUILLERMET-GUIBERT Julie
Codirecteur de thèse : THIBAUT Benoît