

**UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER**  
**FACULTE DE MEDECINE**

---

ANNEE 2013

2013 TOU315XX

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**  
**MEDECINE SPECIALISEE CLINIQUE**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Cécile GANDY**

Interne des Hôpitaux  
Le 26 Septembre 2013

**INFLUENCE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL SUR LA  
CHIMIORESISTANCE DES CANCERS OVARIENS**

*Analyse rétrospective de l'expression du récepteur CD44 en immunohistochimie et de sa valeur prédictive de chimiorésistance*

Directeur de thèse : Professeur Jean-Pierre DELORD

**JURY**

Président :	Professeur Henri ROCHE
1er assesseur :	Professeur Pierre LEGUEVAQUE
2ème assesseur :	Professeur Jean-Pierre DELORD
3ème assesseur :	Docteur Laurence GLADIEFF
Suppléant :	Docteur Gwenaël FERRON
Membre invité :	Docteur Eliane MERY



# Remerciements

**Au Président du Jury,**

**Monsieur le Professeur Henri Roché,**

Professeur des Universités- Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer  
Oncologie

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie de la bienveillance et du soutien que vous m'avez apportés dès le début de mon internat. Votre grande expérience et votre expertise me sont très précieuses, partagées lors de formations théoriques, de formations scientifiques, de réunions de concertations pluridisciplinaires ou directement auprès des patients.

**Aux membres du Jury,**

**Monsieur le Professeur Jean-Pierre Delord,**

Professeur des Universités- Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer  
Oncologie

Merci de m'avoir soutenue depuis mes débuts toulousains, d'avoir répondu présent pour mon M2R et pour ma thèse. Le sujet que tu m'as proposé m'a permis de créer un pont entre le questionnement des chercheurs et la « vraie vie » des cliniciens. Merci de m'avoir présenté une équipe de recherche dans laquelle il était facile de s'intégrer, de m'avoir fait découvrir les phases I et toutes leurs péripéties ! Tes grandes compétences cliniques, ton implication dans la recherche et l'enseignement restent des modèles pour moi. J'espère pouvoir m'inspirer de ton exemple durant les prochaines années.

**Mr le Pr Pierre Leguevaque,**

Professeur des Universités- Praticien Hospitalier  
Chirurgie Générale et Gynécologique

Je vous suis très reconnaissante d'avoir immédiatement accepté de participer à ce jury. Je suis consciente de l'honneur que vous me faites de juger ce travail en apportant votre expertise de grande qualité.

**Mme le Docteur Laurence Gladiëff,**

Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer  
Oncologie

Un grand merci pour ton écoute et la grande aide apportée dans ce projet. Plus généralement, merci pour ton enseignement durant mon internat. Tu es un exemple de professionnalisme pour nous tous, et un modèle à suivre pour moi. J'ai hâte de continuer à apprendre à tes côtés.

**Mme le Docteur Eliane Mery,**

Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer

Laboratoire de cytologie et d'anatomo-pathologie

Ce fut un véritable plaisir et un grand bonheur de pouvoir travailler avec toi. J'ai eu la chance de te connaître depuis le début de mon internat et de bénéficier de ton expérience en pathologie gynécologique. Ces quelques mois passés en anatomo pathologie furent très enrichissants et agréables! Ta gentillesse, ta compétence et tes connaissances font de toi quelqu'un de très précieux pour l'ICR. J'espère avoir de nouvelles opportunités de réaliser d'autres études avec toi.

**Mr le Dr Gwenaël Ferron,**

Praticien spécialiste des Centres de Lutte contre le Cancer

Chirurgie Générale et Gynécologique

Parce que l'oncologie gynécologique ne serait rien sans ses chirurgiens, merci de participer activement à notre formation scientifique et oncologique. Je trouve remarquable ta prise en charge des patients, avec ta capacité à former une équipe autour d'eux et de nous encourager à tous nous dépasser.

## **A tous les autres sans qui rien de tout cela n'aurait été possible !**

A l'équipe d'anatomopathologie, aux techniciennes en particulier Armelle et Audrey pour leur grande aide durant cette thèse.

A Tom et Nadia, nos statisticiens hors pair qui nous sauvent en se mettant à notre portée lors de nos travaux et depuis le début de notre internat avec les séances de bibliographie...

L'équipe de recherche qui m'a permis de dompter les pipettes, les boîtes de Pétri et autres réjouissances. Ce M2R m'aura permis de belles rencontres avec celles de Bettina, Magali, Benoit et plus loin côté pharmaco Diane-Charlotte et Quentin ainsi que les Isabelle H et L, Thierry, Sabrina, Fabienne, Mélanie, Anthony et le Dr Chatelut.

A Anne S, on se connaît maintenant depuis déjà 6 ans. -Il est bien agréable de t'avoir à l'horizon et de pouvoir t'appeler à l'aide dès que j'en éprouve le besoin !

A Audrey E qui ne m'a pas tenu rigueur de ma technique bien personnelle de rangement de notre bureau commun et qui m'a aiguillé lors de mes débuts à Claudius.

A Anouchka, pour cette route menée en parallèle, j'espère poursuivre notre collaboration et notre amitié encore de nombreuses années !

A Suzanne, pour ses avis dermato/ hémato et le soutien lors du M2. A celle qui m'a montré qu'avoir 2 enfants pendant son internat, faire un M2 et sa thèse c'était facile (enfin possible en tout cas) !

A Caroline, pour ces semestres où nous avons découvert la radiothérapie et pour toutes ces discussions lors des trajets Montauban/Toulouse!

A Mony, avec qui j'ai commencé et fini mon internat.

A nos aînés, Yann, bien sûr qui nous a laissé les rênes de l'ASIO après l'avoir créée. Et les radiothérapeutes, Aurélien, Anne D et Sabrina.

A tous les internes d'oncologie, nous sommes de plus en plus nombreux à pratiquer cette belle et prenante discipline : Thibault (et Laurie !), Anne-Pascale, François P, François C, Sarah B puis L, Nouritza, Nadia, Jonathan, Juliette, Anne D, Elvire, Romain et Mathieu ?

Aux autres internes rencontrés au fil des stages : Claire et Audrey D (et voilà la fin de ces belles après-midi passées à l'ARS), Ludivine et Laetitia (les chirurgiens chercheurs)

Aux diverses équipes paramédicales ; infirmières, aides-soignantes, diététiciennes, psychologues, secrétaires, qui nous encadrent, nous supportent et nous aident !

A tous mes maitres qui m'ont enseigné la médecine puis l'oncologie : Florence, Christine Chevreau, Loïc, Nathalie, Jean-Louis, Carlos, Marion M, Marion D, Rosine, Pascale, ...

## **A ma famille,**

Ma mère qui bien sûr me manque et sans qui je ne serai pas ce que je suis,

Mon père qui m'a toujours apporté son soutien inconditionnel et qui encore aujourd'hui a relu ma thèse.

A mes frères, Raph avec qui je peux tenir de vraies conversations sur la médecine et la vie en générale.

Philou qui m'apprend que des pommes et des fraises peuvent se disséquer !? Et dont j'attends toujours l'aide pour faire de beaux schémas sous Word...

A Benjamin et Ellie qui se préparent pour les stages linguistiques des loulous,

A Benoit, notre financier international avec un don naturel pour le cinéma,

A Sophie et Guillaume, merci de prendre le relais...je suis impatiente d'être tatie !

A mes belles mères !

Johanna (alias Mimina), je te tire ma révérence d'avoir assuré la logistique nécessaire à la cohabitation de 7 personnes sous le même toit (voire 8 avec Rémy et 9 avec Rainbow!). J'apprécie tout le soutien que tu as pu m'apporter (et m'apporte encore) en toute simplicité.

Et Chantal qui m'a tout de suite intégrée dans sa famille, toujours disponible et dynamique. Tu as brillamment réussi ta tâche de double Mimicha, on pose une option sur août 2014 !

A Christian J. pour être là quand il le faut.

A mes grands-parents, qui restent des modèles, toujours en forme, toujours prêts à accueillir leurs petits enfants (et arrières..), à les régaler de bons « petits » plats et de sages conseils.

A Rémy, mon cher et tendre qui m'a suivi depuis tout ce long et beau parcours, merci pour ta patience, ton aide de tous les jours. Pour tout quoi !

A Baptiste et Elsa, pour leurs sourires et leurs rires

## TABLE DES MATIERES

<b>PARTIE 1 : REVUE GENERALE</b> .....	<b>12</b>
<b>Généralités sur les cancers ovariens :</b> .....	<b>12</b>
1 Généralités .....	12
1.1 Epidémiologie : .....	12
1.2 Facteurs de risque et de protection.....	12
1.3 Classification FIGO-TNM .....	13
1.4 Classification histologique .....	13
1.5 Profil immunohistochimique.....	14
1.6 Grade histo-pronostique.....	14
1.7 L'apport de la biologie moléculaire .....	16
1.8 Classification histo-moléculaire ou modèle dualiste.....	17
2 Cancérogénèse ovarienne : .....	18
2.1 Théorie historique de l'ovulation incessante .....	18
2.2 L'hypothèse hormonale : .....	19
2.3 Théorie de l'inflammation chronique.....	19
2.4 Origine tubaire ? .....	19
2.5 Vers un modèle intégré ? .....	20
3 Traitement initial des cancers ovariens avancés .....	23
3.1 Chirurgie.....	23
3.2 Chimiothérapie.....	23
3.3 Thérapies ciblées .....	25
3.4 Séquence de traitement.....	27
4 Evolution et enjeux: Eviter et traiter les rechutes .....	28
4.1 Les facteurs pronostics : .....	28

4.2	Les différents types de rechute et leurs traitements .....	31
<b>Chimiorésistance et microenvironnement .....</b>		<b>34</b>
1	Chimiorésistance des cancers ovariens .....	34
1.1	Les résistances intrinsèques .....	35
1.2	Les résistances extrinsèques .....	36
2	Le microenvironnement.....	37
2.1	Généralités.....	37
2.2	Le microenvironnement des tumeurs ovariennes .....	41
2.3	Le cas particulier des cellules souches mésenchymateuses.....	43
<b>CD44.....</b>		<b>46</b>
1	Généralités .....	46
2	En oncologie.....	48
3	Dans le cancer de l’ovaire .....	50
<b>PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS .....</b>		<b>53</b>
1	Objectifs :.....	53
1.1	Objectif principal:.....	53
1.2	Objectifs secondaires : .....	53
2	Matériel et méthodes.....	53
2.1	Patientes .....	53
2.2	Recueil des données anatomopathologiques.....	54
2.3	Etude immunohistochimique .....	54
2.4	Analyse de la chimiorésistance.....	56
2.5	Analyse statistique.....	56
3	Résultats.....	58
3.1	Description de la population.....	58
3.2	Caractéristiques tumorales : .....	59

3.3	Type de traitement reçu.....	59
3.4	Données immunohistochimiques : .....	60
3.5	Survie .....	66
3.6	Chimiorésistance et CD44 .....	67
3.7	Facteurs clinico-biologiques .....	71
3.8	Sous population des patientes stade avancé, III IV avec un adénocarcinome séreux de haut grade .....	72
4	DISCUSSION.....	74
4.1	Caractéristiques générales de la cohorte : .....	74
4.2	Marquage CD44 et pronostic .....	74
4.3	Concordance du marquage entre tumeur primitive et métastatique .....	81
4.4	Marquage CD44 et chimiorésistance .....	81
5	Perspectives .....	83
5.1	Une meilleure compréhension des mécanismes de chimiorésistance par le microenvironnement et CD44.....	83
5.2	Améliorer la caractérisation des différents composants du micro environnement :.....	83
	<b>Conclusion.....</b>	<b>85</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>86</b>

## ABREVIATIONS

**IHC** : Immunohistochimie

**PI3K** : Phosphatidyl Inositol-3 Kinase

**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog

**ARID1A**: l'AT-rich interactive domain containing protein 1A

**PARP**: poly [ADP-ribose] polymérase

**WT1**: Wilms tumor protein 1

**Protocole SEE-FIM**: Sectioning and Extensively Examining the FIMbriated End

**TILT**: lésion tubaire intraépithéliale en transition

**STIC** : carcinome séreux tubaire in situ

**SSP** : survie sans progression

**SG** : survie globale

**EMDR** : environment mediated drug resistance

**CAM-DR** : cell adhesion mediated drug resistance

**SFM-DR**: soluble factor drug-mediated drug resistance

**XIAP**: X-linked inhibitor of apoptosis protein

**TAF** : fibroblastes associés aux tumeurs

**MSC** : cellules souches mésenchymateuses

**IRS** : Immuno Reactive Score

**FIGO**: International Federation of Gynecology and Obstetrics

**TEM** : transition épithélio mésenchymateuse

# **PARTIE 1 : REVUE GENERALE**

## **GENERALITES SUR LES CANCERS OVARIENS :**

### **1 Généralités**

#### **1.1 Epidémiologie :**

Chaque année, plus de 4500 nouveaux cas de cancers ovariens sont diagnostiqués en France, conduisant à plus de 3000 décès par an (4ème rang en terme de mortalité par cancer chez la femme) <sup>1-3</sup>. Cette mortalité élevée est attribuée à plusieurs facteurs dont le diagnostic tardif à un stade avancé dans plus de 70% des cas et à un taux de rechute élevé concernant près de 75% des patientes dû à une chimiorésistance <sup>4-6</sup>. La survie relative à 5 ans tous stades confondus n'est que de 35% en France.

#### **1.2 Facteurs de risque et de protection**

Les principaux facteurs de risque reconnus de cancer ovarien sont l'âge et les antécédents familiaux. En effet, 10% des cancers ovariens surviennent chez des patientes ayant une prédisposition génétique : soit une mutation des gènes BRCA1 et 2 dans près de 90% des cas ou plus rarement un syndrome de Lynch. Les autres facteurs de risque classiquement retrouvés sont la puberté précoce, la ménopause tardive et le traitement hormonal substitutif.

A l'inverse, l'usage de contraceptifs oraux, la ligature des trompes, l'hystérectomie, le nombre de grossesse et l'allaitement seraient des facteurs protecteurs<sup>7</sup>.

### 1.3 Classification FIGO-TNM

Le stade FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) tout comme la classification TNM permet de classer les cancers ovariens selon leur extension tumorale. C'est l'un des facteurs pronostiques principaux avec des taux de survie globale à 5 ans allant de plus de 80% pour les stades I à 20-40% pour les stades III-IV (tableau 1).

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

**Tableau 1 : Classification FIGO et correspondance TNM<sup>2</sup>**

### 1.4 Classification histologique

Les tumeurs ovariennes représentent un groupe hétérogène de tumeurs. Leurs différentes origines ont permis leur classification en 3 groupes histologiques

principaux : les tumeurs épithéliales, les tumeurs des cordons sexuels et du stroma gonadique et les tumeurs germinales (classification OMS 2003).

Nous nous intéresserons au groupe le plus fréquent constitué par le groupe des tumeurs épithéliales malignes ou carcinomes. Parmi ces tumeurs, on retrouve les carcinomes séreux (55%), les carcinomes endométrioïdes (15 à 20%), les carcinomes mucineux (9 à 15%), les carcinomes à cellules claires (5-10%) et les carcinomes à cellules transitionnelles et indifférenciés.

## 1.5 Profil immunohistochimique

L'immunohistochimie a contribué à différencier les sous types histologiques. L'expression du WT1 est spécifique des tumeurs séreuses (marquage nucléaire diffus dans 80 à 90% des cas). Il permet notamment de les distinguer des tumeurs endométrioïdes (WT1 négatives), ces 2 sous types pouvant avoir de grandes similitudes morphologiques en cas de tumeur indifférenciée.

Les carcinomes mucineux ovariens ont souvent une expression de type tumeur digestive avec un marquage diffus de CK7, une expression de CK20 et n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni le CA125 ni le WT1.

Les carcinomes à cellules claires expriment dans 95% des cas le marqueur HNF1-béta et n'expriment ni WT1 ni P53.

## 1.6 Grade histo-pronostique

L'examen anatomopathologique permet également de grader les tumeurs en différents groupes histo-pronostiques selon leur histologie initiale.

### 1.6.1 Carcinomes séreux :

Plusieurs systèmes de grading sont proposés : le système de Silverberg et le système du MD Anderson.

### 1.6.1.1 Silverberg

Depuis les années 2000, la classification de référence (OMS 2003) pour les carcinomes séreux est celle de Silverberg qui fait évaluer 3 facteurs : le type d'architecture tumorale, le degré d'atypies cellulaires et le nombre de mitoses au fort grossissement (tableau2) <sup>8</sup>.

Grade	Type architectural prédominant	Degré d'atypie cytologique	Nombre de mitoses
1	Glandulaire	Faible	0-9
2	Papillaire	Modérée	10-24
3	Massif	Elevée	≥25

**Tableau 2 : Système de grading de Silverberg, d'après Silverberg, Histopathologic Grading of Ovarian Carcinoma, 2000 <sup>8</sup>**

Le grading de Silverberg est construit comme celui de Scarff Bloom et Ricardson dans les carcinomes mammaires par la somme de ces 3 facteurs (architecture, atypies et mitose) ce qui permet la distinction en 3 grades, grade I pour les tumeurs bien différenciées (score 3 à 5), grade 2 pour les tumeurs avec un score de 6 ou 7 et grade 3, les plus fréquentes comprenant les tumeurs totalisant un score de 8 ou 9.

### 1.6.1.2 MD Anderson

Plus récemment, ce grading a été simplifié par l'évaluation de 2 paramètres principaux : le degré d'atypies cellulaires ainsi que l'index mitotique sans tenir compte de l'architecture. On distingue alors les carcinomes séreux de bas grade, caractérisés par l'absence de pléomorphisme nucléaire et par un faible index mitotique  $\leq 12$  mitoses/ 10 champs au fort grossissement. A l'inverse, les tumeurs de haut grade sont composées de cellules atypiques et ont un index mitotique  $> 12$  mitoses /10 champs au fort grossissement <sup>9</sup>. Dans l'étude princeps, il existait une très bonne corrélation entre les 2 classifications (les carcinomes séreux de haut grade correspondant au grade 2 et 3 de Silverberg). Cette classification tend à remplacer celle de Silverberg devant sa facilité d'utilisation et la démonstration de sa valeur pronostique indépendante (temps médian

de décès après diagnostic de 4,2 ans pour les tumeurs de bas grade contre 1,7ans pour les tumeurs de haut grade) <sup>9</sup>.

Il faut préciser que les carcinomes séreux de bas grade ne représentent que 10% des carcinomes séreux tandis que les hauts grades sont majoritaires (90% restant).

### **1.6.2 Carcinomes endométrioïdes**

Leur grade est basé sur l'architecture tumorale et les atypies nucléaires selon le grading FIGO utilisés dans les cancers de l'endomètre.

### **1.6.3 Carcinomes à cellules claires**

Les carcinomes à cellules claires sont toujours considérés comme des tumeurs de haut grade devant leur mauvais pronostic et ne doivent pas être gradés.

## **1.7 L'apport de la biologie moléculaire**

Les principales mutations reconnues dans les cancers ovariens sont résumées dans la revue de Kurman et diffèrent selon les sous-types histologiques (figure 1)<sup>10</sup>.

Les carcinomes séreux de bas grade ovariens présentent communément des mutations KRAS, BRAF, ERBB2 et PI3KCA tandis que les carcinomes séreux de haut grade sont quasiment tous mutés pour P53 avec une inactivation fréquente de BRCA.

D'autres voies sont impliquées pour les carcinomes endométrioïdes, avec des mutations des gènes PTEN, KRAS, PI3KCA, ARID1A et  $\beta$  caténine. On peut également observer une instabilité satellitaire, surtout en cas de syndrome de Lynch.

Les carcinomes à cellules claires partagent de nombreuses mutations communes avec ces derniers dont les mutations PI3KCA dans 50% des cas ainsi que des mutations du gène ARID1A.

Pour finir, les carcinomes mucineux semblent une entité bien à part avec des mutations communes avec les cancers digestifs telle la mutation KRAS <sup>10-12</sup>.

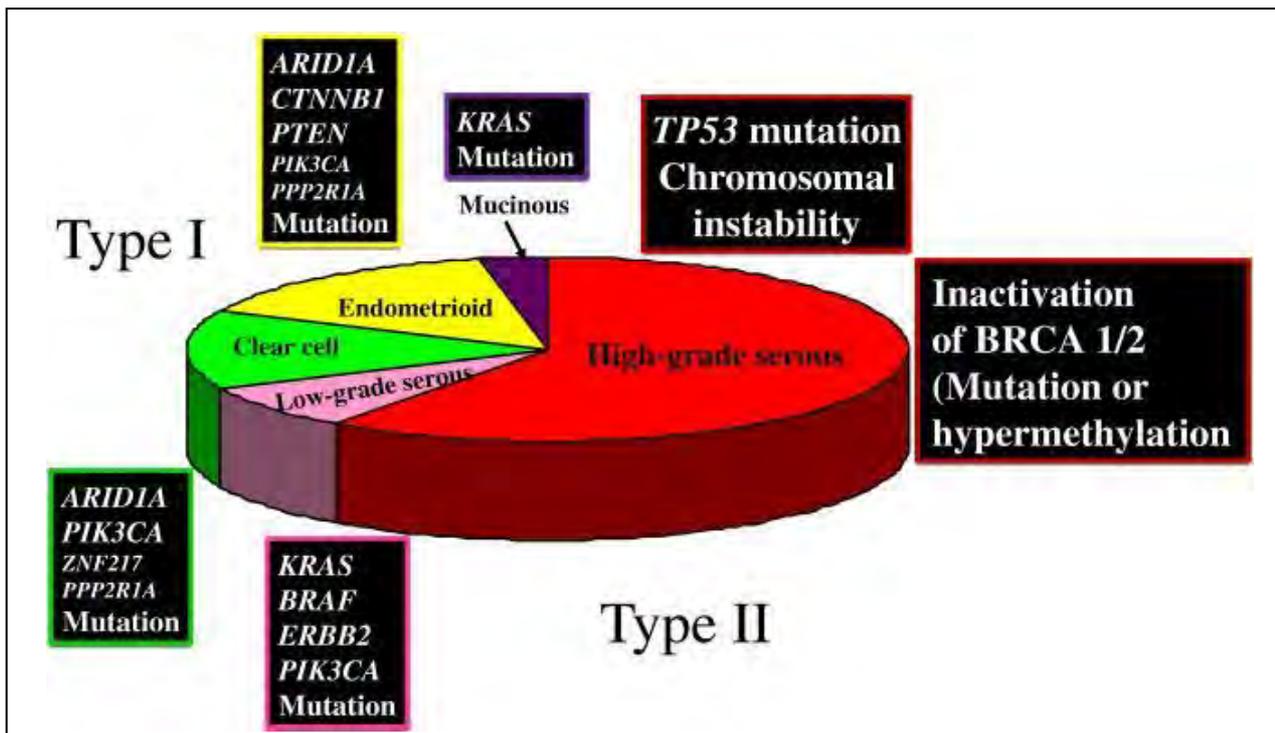


Figure 1: Prévalence des types histologiques de cancers épithéiaux ovariens et modifications moléculaires associées, d'après Kurman <sup>10</sup>

### 1.8 Classification histo-moléculaire ou modèle dualiste

L'apport de la biologie moléculaire a permis de mieux caractériser ces sous types identifiés sur le plan morphologique en histologie. Elle a également fait progresser la compréhension des voies de carcinogénèse.

Un modèle dualiste a pu être créé selon les propriétés cliniques, histologiques et moléculaires des cancers ovariens <sup>10,13</sup>. Il sépare les tumeurs de type I (dites de « bas grade ») et de type II (« haut grade »). Ces 2 classes diffèrent par les sous types histologiques, leur pronostic, leur stade au diagnostic, les mutations retrouvées et donc par leur histoire naturelle (tableau3).

**Les tumeurs de type I** ou de bas grades sont les moins fréquentes et regroupent les carcinomes séreux de bas grade, les carcinomes endométrioides, mucineux et à cellules claires (l'appartenance des carcinomes à cellules claires à ce sous-groupe reste cependant très controversée). Parmi les tumeurs de type I, les **carcinomes séreux de bas grade** représentent 10% des carcinomes séreux. Ils ont de fréquentes mutations des voies KRAS/BRAF, PI3K, sans mutation de P53 et sont de bon pronostic.

A l'inverse, **les tumeurs de type II** sont les plus fréquentes et sont composées principalement par les carcinomes séreux de haut grade. Elles présentent de façon quasi permanente une anomalie du gène P53 sans mutation KRAS/BRAF. On retrouve des anomalies d'expression de la protéine BRCA 1 ou BRCA2 plus fréquentes ainsi qu'une instabilité génétique. La survie à 5 ans des patientes est alors réduite à moins de 35% avec un stade souvent étendu au diagnostic (tableau 3 pour détail)<sup>10,11</sup>.

	<b>Type I</b>	<b>Type II</b>
<b>Fréquence</b>	25%	75%
<b>Stade diagnostic</b>	Localisé (I)	Etendu (III_IV)
<b>Evolution</b>	Lente	Rapide
<b>Survie 5 ans</b>	55%	30%
<b>Profil génétique expression</b>	Mutations BRAF, KRAS, PTEN, bcatenine, ARID 1A, PI3KCA	P53, BRCA
<b>Instabilité génétique</b>	faible	importante
<b>Ki67</b>	10-15%	>50%
<b>Précurseur</b>	Endométriose, tumeur borderline	De novo, STICs?
<b>Type histologique</b>	Séreux bas grade, endométriøide de bas grade, cellules claires, mucineux	Séreux haut grade, endométriøides de haut grade, carcinomes indifférenciés,carcinosarcome

**Tableau 3: Modèle dualiste des cancers ovariens, D'après Chene et al, 2013** <sup>13</sup>

Le démantèlement de ces mutations et de cette classification en 2 groupes de pronostic différent permet d'élaborer de nouvelles hypothèses concernant les voies de cancérogénèse ovarienne.

## **2 Cancérogénèse ovarienne :**

Plusieurs théories se sont succédées et complétées dans le temps<sup>11</sup>.

### **2.1 Théorie historique de l'ovulation incessante**

La théorie historique se base sur le postulat que les cellules cancéreuses épithéliales ovariennes proviennent de l'épithélium ovarien de surface. En 1971, Fathalla a observé une incidence plus élevée de cancers ovariens chez les femmes

nullipares et a émis l'hypothèse que l'ovulation pouvait être à l'origine de la transformation maligne de l'épithélium ovarien. Lors de l'ovulation, il se créerait une brèche dans l'épithélium ovarien de surface, nécessitant une cicatrisation avec un risque de prolifération cellulaire et de transformation tumorale <sup>14</sup>. Cette théorie est soutenue par le caractère protecteur des grossesses, de l'allaitement et de la contraception oestro-progestative.

Une théorie proche est celle du développement des kystes d'inclusion corticale. A la suite d'ovulations répétées, l'épithélium ovarien de surface s'invaginerait dans le stroma ovarien et formerait des kystes. Ces kystes pourraient être l'objet d'une transformation tumorale et expliqueraient les caractéristiques mullériennes des tumeurs ovariennes.

## 2.2 L'hypothèse hormonale :

Les androgènes, les estrogènes et la progestérone sont également impliqués dans les cancers ovariens. L'hyperandrogénie et l'insuffisance lutéale (hyperestrogénie relative) sont reliées à un sur risque de cancer ovarien.

## 2.3 Théorie de l'inflammation chronique

Cette théorie se fonde sur le rôle protecteur de la ligature tubaire et de l'hystérectomie ainsi qu'aux facteurs de risque inflammatoires telle l'endométriose, l'exposition au talc et l'asbestose. Lors de l'ovulation, les cellules épithéliales proches de la brèche seraient exposées à des cytokines inflammatoires et aux radicaux libres de l'oxygène (ROS) et pourraient subir secondairement une transformation tumorale.

## 2.4 Origine tubaire ?

Depuis le début des années 2000, plusieurs publications proposent une autre hypothèse expliquant les similitudes entre les cancers ovariens (notamment séreux) et le système mullérien primaire <sup>10,15</sup>. Le site d'origine du cancer ne serait pas l'ovaire mais le revêtement tubaire, en particulier le pavillon (dérivé du système mullérien primaire). Le stade de cancer in situ considéré comme précurseur des cancers invasifs est peu décrit dans les cancers ovariens en comparaison à d'autres tumeurs solides. En 2001,

l'équipe hollandaise de Piek *et al* a décrit pour la 1<sup>ère</sup> fois l'existence de carcinome intraépithélial tubaire, secondairement nommé les STIC (serous tubal intraepithelial carcinomas) et de carcinome séreux de haut grade occulte à partir d'une série de 12 patientes mutées pour BRCA opérées pour annexectomie prophylactique <sup>16</sup>. Une des raisons pour lesquelles cette voie n'aurait pas été identifiée auparavant pourrait être l'examen non exhaustif des trompes en technique de routine, l'origine ovarienne étant reconnue jusqu'à lors. D'autres travaux avec une analyse fine des trompes (protocole SEE-FIM pour sectioning and extensively examining the fimbriated end of fallopian tube) ont retrouvé ces anomalies dans près de 50% des patientes atteintes d'un cancer ovarien sporadique. Des équipes ont ensuite proposé un modèle de séquence de carcinogénèse ovarienne pour les cancers séreux de haut grade avec un 1<sup>er</sup> précurseur : la « **signature p53** » correspondant à une phase débutante, l'épithélium tubaire reste morphologiquement normal mais l'examen par immunohistochimie trouve des foyers de plus de 12 cellules consécutives exprimant la p53 avec un Ki67 <10%. La 2<sup>e</sup> étape : **lésion tubaire intraépithéliale en transition (TILT)** où l'on observe un épithélium tubaire stratifié sans atypie nucléaire ni mitose mais exprimant P53. Le 3<sup>e</sup> stade est celui **du carcinome séreux tubaire in situ (STIC)** avec une histologie modifiée par une stratification épithéliale, des atypies et des mitoses. En IHC, le marquage p53 est intense et diffus et le Ki67 > 70%. Cette mutation de p53 présente dans tous ces stades et dans le stade de cancer ovarien séreux de haut grade avancé est un argument fort en faveur d'une origine commune avec un continuum lésionnel.

Cependant, l'origine tubaire ne semble pas pouvoir expliquer l'origine de tous les carcinomes séreux dits ovariens de haut grade. En effet, les travaux précédents ne trouvent pas d'anomalies tubaires dans tous les cas (seulement dans 40 à 50%) laissant encore leur place aux précédentes théories.

## 2.5 Vers un modèle intégré ?

Plusieurs équipes ont essayé d'uniformiser ces différentes théories et de les faire coïncider avec l'apport de la biologie moléculaire et le modèle dualiste <sup>10,17</sup> (figure 2 pour synthèse).

L'équipe de Kurman<sup>10</sup> propose une nouvelle théorie essayant de composer avec toutes les précédentes. Il suggère que les **tumeurs séreuses** de haut grade de l'ovaire,

des trompes de Fallope et du péritoine ne soient qu'une seule et même entité dérivant du pavillon tubaire. Une voie possible de cancérogénèse serait alors les mutations de p53 intervenant précocement (dès le stade de STIC). Kurman propose également de modifier la théorie des kystes d'inclusion corticale mais en l'expliquant par un phénomène d'endosalpingiose. Il serait possible que les carcinomes se développent à partir de cellules du revêtement tubaire qui coloniseraient l'épithélium ovarien de surface. S'ils sont mutés pour p53, ils se transforment alors en tumeur de haut grade, tandis qu'ils deviennent des carcinomes de bas grade en cas de mutation KRAS/BRAF/ERRB2.<sup>13</sup>

Concernant les **tumeurs endométrioides** et les **tumeurs à cellules claires** plusieurs études morphologiques et moléculaires ont démontré leur origine endométriosique (à partir de kystes endométrioides ou de foyers d'endométriose). Ces 2 cancers ont un lien épidémiologique fort avec l'endométriose. Des mutations de la sous unité catalytique de la PI3K (PI3K-CA) et de l'AT-rich interactive domain containing protein 1A (ARID1A) sont fréquemment retrouvées dans des lésions endométriosiques adjacentes aux tumeurs reliant ces 2 phénotypes. L'hypothèse est que ces tumeurs seraient issues du tissu endométrial qui s'implanterait dans le tissu ovarien par flux menstruel rétrograde ou sur lésions d'endométriose.

Enfin, les **tumeurs mucineuses** ovariennes sont pour la plupart des métastases de cancer digestif. Les tumeurs mucineuses primitives auraient pour origine des cellules de la zone de jonction entre l'épithélium tubaire et le revêtement péritonéal. Cette hypothèse expliquerait leur phénotype très différent des tumeurs précédentes (origine non mullérienne) mais reste à être confirmée. (figure 2).

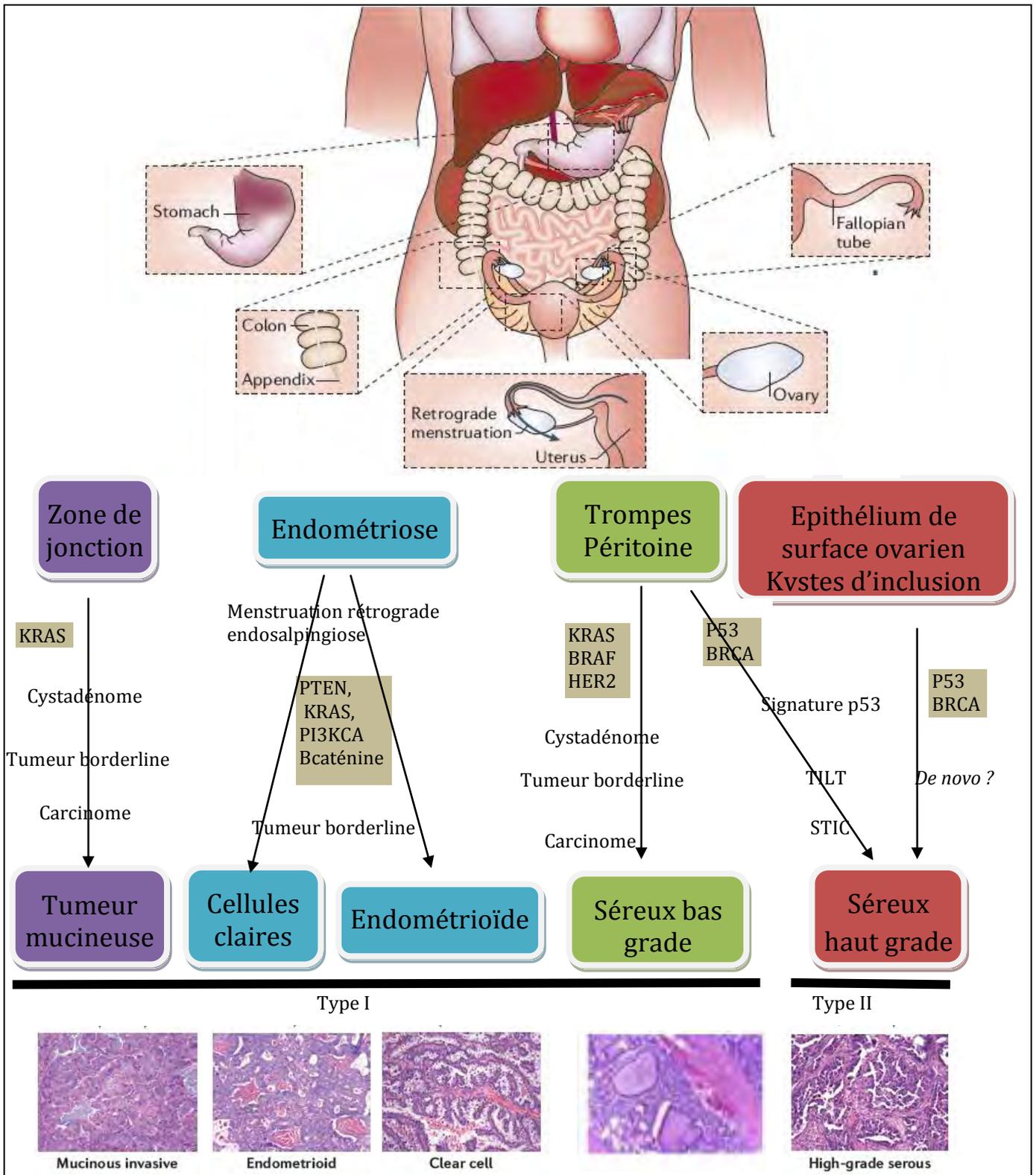


Figure 2 : Synthèse de la cancérogénèse ovarienne: de la théorie à la biologie moléculaire, adapté de Vaughan, Nat Rev 2011<sup>17</sup>

Cette nouvelle classification et le démantèlement de ces cancers ovariens et de leurs mutations ouvrent de nouvelles perspectives de recherche avec des cibles mieux définies. Pour l'instant, le traitement reste cependant le même indifféremment de l'histologie et des mutations présentées (non recherchées en routine) en dehors d'essais.

### **3 Traitement initial des cancers ovariens avancés**

La base du traitement repose sur l'association de la chirurgie radicale ne laissant aucun résidu à un doublet de chimiothérapie à base de sels de platine et de taxanes.

#### **3.1 Chirurgie**

La chirurgie a une place essentielle dans la prise en charge du cancer ovarien. Elle est unique dans le cadre des tumeurs solides car permet un traitement curatif même à des stades très étendus sur le plan péritonéal. Le standard actuel reste une cytoréduction complète chirurgicale première suivi d'une chimiothérapie à base de platine. Un des facteurs pronostic majeur reste la qualité de la cytoréduction qui doit être complète <sup>18</sup>. Une étude récente a confirmé la différence en survie globale à 3 ans selon l'importance du résidu tumoral (étude prospective de 226 patientes stade IIA-IV). La survie globale à 3 ans était significativement différente à 72.4% pour les patientes sans aucun résidu, 65.8% avec un résidu minimal et 45.2% quand le résidu était supra centimétrique <sup>19</sup>. La définition d'une « cytoréduction optimale » est à présent consensuelle et ne concerne que le sous-groupe de patientes sans aucun résidu macroscopique (exclusion des résidus infracentimétriques) <sup>19,20</sup>.

#### **3.2 Chimiothérapie**

La chimiothérapie est l'autre traitement clé du cancer ovarien. Depuis les années 1970, les sels de platine en sont la base. L'association avec les taxanes a été validée depuis plus de 15 ans par les résultats du GOG (Gynecologic Oncology Group) en 1996. Le traitement de référence reste ainsi inchangé depuis de nombreuses années avec du paclitaxel et du cisplatine (remplacé ensuite par du carboplatine en raison de la toxicité moindre et de l'efficacité comparable) <sup>21-23</sup>. Depuis plus de 20 ans, plusieurs approches ont été étudiées afin d'optimiser ce doublet de référence.

**Voie intrapéritonéale (IP):** Les cancers ovariens ayant une dissémination et une rechute quasi exclusivement péritonéale, cette voie d'administration de chimiothérapie semble naturellement séduisante. Trois essais randomisés, dont le GOG 172, ont démontré l'intérêt de cette voie, notamment pour les patientes avec un résidu <1cm permettant l'amélioration de leur survie globale de 65,6 mois pour la voie IP en comparaison à 49,7 mois pour la voie intraveineuse (IV) classique (p=0,03). Elle est cependant moins bien tolérée que la voie générale et ne doit être discutée que chez les patientes en bon état général avec résection optimale <sup>24</sup>.

**Rythme d'administration** : Le rythme d'administration est sujet à discussion avec 2 études récentes prouvant le bénéfice de délivrer le taxol de façon hebdomadaire. La 1ere étude est une étude japonaise, JGOG 3016 où les 637 patientes recevaient soit le carboplatine (AUC6) associé au paclitaxel (180mg/m<sup>2</sup>) toutes les 3 semaines ou du carboplatine associé au paclitaxel hebdomadaire à 80mg/m<sup>2</sup>. Après un suivi de 29 mois, la PFS était de 17 mois dans le bras standard versus 28 mois dans le bras dose-dense <sup>25</sup>. Les données réactualisées ont confirmé ces résultats avec un effet sur la survie globale. Les réserves concernant cet essai sont que la population était majoritairement asiatique avec un métabolisme possiblement différent de la population caucasienne.

S. Pignata a présenté à l'ASCO 2013 les résultats de l'étude MITO-7 ayant comparé, chez 822 patientes, un schéma paclitaxel + carboplatine hebdomadaires au schéma 3 semaines conventionnel. Contrairement à l'étude japonaise, cet essai n'a pas mis en évidence de différence en survie sans progression (HR = 0,88 ; p = 0,18), ni en survie globale. En revanche, une évaluation de la qualité de vie a mis en évidence la meilleure tolérance du schéma hebdomadaire. Ce schéma pourrait ainsi devenir un nouveau standard en 1ere ligne.

**Triplet de chimiothérapie :** durant les 15 dernières années, plus de 11000 patientes ont été incluses dans des essais testant l'ajout d'une 3<sup>e</sup> molécule de chimiothérapie sans aucun gain en survie. L'essai GOG182 (ICON 5) a proposé l'ajout du topotecan, de la gemcitabine, ou de la doxorubicine lyposomale pégylée sans bénéfice.

Peu d'essais sont en cours pour tester de nouvelles molécules de chimiothérapies, les espoirs sont davantage tournés vers les thérapies ciblées.

### 3.3 Thérapies ciblées

#### 3.3.1 Les antiangiogéniques :

**Le bevacizumab** : Deux essais de phase III ont démontré une amélioration de la survie sans progression en associant du bevacizumab (anti VEGF) à ce doublet de chimiothérapie standard <sup>26,27</sup> en traitement de 1<sup>ère</sup> intention. En résumé, Burger et al observe après 10 mois de bevacizumab en entretien une amélioration de la survie sans progression (SSP) de 4 mois dans le GOG218 <sup>26</sup>. De façon similaire, Perren et al rapporte un gain significatif de 2 mois de SSP, avec un effet supérieur pour les patientes à haut risque de rechute <sup>27</sup>. Bien que positives (sur le gain de SSP), ces 2 études n'ont pas prouvé de bénéfice de survie globale. De plus, certains auteurs déplorent l'absence d'études « coût efficacité » et l'absence de facteur prédictif de réponse (biomarqueur) à l'heure actuelle. Plus récemment, les données de l'étude européenne ICON 7 ont été analysées en termes de qualité de vie. A 54 semaines, les patientes recevant le bevacizumab ressentent une qualité de vie moindre que celles dans le bras standard (score de qualité de vie de 76,1 versus 69,7 points,  $p < 0.0001$ )<sup>28</sup>. Cette donnée doit également être prise en compte lors de la décision thérapeutique. Sur la base de ces 2 études, le bevacizumab a obtenu son AMM en traitement de 1<sup>ère</sup> ligne des cancers ovariens.

**Le pazopanib** : Il s'agit d'un inhibiteur administré oralement, dirigé contre VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 – PDGFR $\alpha$  et  $\beta$  et c-KIT). L'étude Ovar16, randomisée internationale, en double aveugle contre placebo, a évalué la place du pazopanib (à la dose de 800 mg/j) en entretien, durant 2 ans, chez les patientes non progressives à l'issue de la chirurgie et de la chimiothérapie de première ligne. Un total de 940 patientes a été randomisé, de stade III-IV (> 90 %), séreux de haut grade (>75 %). Le pazopanib a permis un allongement significatif de la survie sans progression, mais pas de la survie globale, tout comme avec le bevacizumab. Il existe donc un effet-classe des agents antiangiogéniques validant le concept de cible du microenvironnement tumoral par le biais de la vascularisation dans les cancers de l'ovaire.

**Le nintedanib** est un inhibiteur VEGFR/PDGFR et FGF R (fibroblast GFR) administré également par voie orale. L'étude OVAR-12 étudie son bénéfice en maintenance après chirurgie et chimiothérapie par carboplatine et taxol avec un objectif primaire de gain en PFS.

### **3.3.2 Les anti-EGFR**

L'EGFR est surexprimé chez 70% des patientes présentant un cancer ovarien et semblait une cible potentielle prometteuse. Cependant, les résultats de la large étude conduite par l'EORTC évaluant l'erlotinib en maintenance s'est révélée négative. 835 patientes ont été randomisées entre erlotinib en maintenance à la dose de 150mg/jour pendant 2 ans et observation. Après un suivi médian de 51mois, la survie sans progression était de 12,4 mois dans le groupe observationnel contre 12,7 dans le groupe erlotinib (HR, 1.05; 95% CI, 0.90 to 1.23; p=0.525). Vingt-cinq pourcent des patientes ont dû stopper l'erlotinib du fait d'effets secondaires (rash et diarrhées)<sup>29</sup>.

### **3.3.3 Les inhibiteurs de PARP**

La classe des inhibiteurs de PARP (*poly [ADP-ribose] polymérase*) a suscité beaucoup d'intérêt depuis l'ASCO 2009 avec la présentation de 2 études, publiées ensuite dans le Lancet, concernant les patientes mutées pour BRCA1/2<sup>30,31</sup>. Ces 2 études de phase II s'adressaient à des femmes mutées pour BRCA1 et 2, l'une pour les cancers du sein, l'autre pour les cancers ovariens. Ces travaux ont rapporté des taux de réponse objective importants allant jusqu'à 33% à forte dose (posologie de 400mg deux fois par jour)<sup>30</sup>. Ces 1ères études ont permis de valider le concept de létalité synthétique. En effet, les patientes mutées pour BRCA1/2 (suppresseurs de tumeur) ont plus de risque de développer un cancer car les cellules perdant l'activité de BRCA sont déficientes dans un des systèmes de réparation de l'ADN (recombinaison homologue). Or, PARP joue un rôle important dans un autre système de réparation de l'ADN (réparation par excision de base). Le traitement des cellules BRCA mutées par inhibiteur de PARP semble donc rationnel, la cellule ne pouvant plus réparer les lésions irréversibles de son ADN, elle entre alors en apoptose. Pourtant en 2012, JA Ledermann a rapporté les résultats décevants de l'étude « 19 », évaluant pour 269 patientes, l'apport de l'olaparib (anti PARP-1) en maintenance dans les cancers ovariens en rechute platino-sensible. Le gain

en survie sans progression était net de 4.8 mois à 8.4 mois (HR=0.35; 95% CI 0.25–0.49  $P<0.001$ ), mais sans aucun bénéfice en terme de survie globale (HR=0.94; 95% CI, 0.63 – 1.39  $P<0.75$ ).

L'actualisation rapportée en communication orale à l'ASCO 2013 pourrait relancer cette molécule dans le cancer ovarien avec l'ouverture prochaine d'une phase III. Les auteurs ont réévalué rétrospectivement le bénéfice de l'olaparib en fonction du statut BRCA germinale (initialement connu dans seulement 36,6% des cas). Parmi ces 254 patientes testées, 136 ont pu être détectées « mutées ». Chez celles-ci, la survie sans progression est allongée de 4 à 11 mois (HR = 0,18 ;  $p < 0,00001$ ). Malgré des médianes de survie globale de 31,9 vs 34,9 mois, le gain en survie globale n'est toujours pas établi même pour cette sous population (HR 0.74; 95% CI 0.46-1.19,  $p=0.21$ ). Il faut cependant noter que 23% des patientes BRCA mutées ayant reçu le placebo ont ensuite reçu un inhibiteur de PARP pouvant sous-estimer ces résultats. Le statut "gBRCAm" (mutation germinale de BRCA) est enfin un prédicteur puissant. Les études de phase III annoncées seront ainsi restreintes à la population "gBRCAm" (mutation germinale de BRCA) (Ledermann JA et al, abstr. 5505).

### 3.4 Séquence de traitement

La séquence de traitement entre chirurgie et chimiothérapie reste un sujet de débat. De façon historique, la chirurgie était réalisée en premier lieu à visée diagnostique et thérapeutique puis la chimiothérapie intervenait en traitement de clôture. Plusieurs essais ont démontré la faisabilité de la séquence inverse (chimiothérapie néoadjuvante puis chirurgie d'intervalle ou de clôture) sans différence en terme de survie<sup>18</sup>. L'étude conjointe de l'EORTC-GCG (European Organisation for Research en Treatment of Cancer - Gynaecological Cancer Group) et du NCIC (National Cancer Institute Canada) - Clinical Trials Group publiée par Vergote *et al* en 2010 a randomisé 632 patientes entre chirurgie première suivie de chimiothérapie et à une chimiothérapie néoadjuvante (maximum à 3 cycles) puis une chirurgie d'intervalle. Ils prouvent la non infériorité de cette deuxième approche (données de survies globale et sans progression identiques). De plus, les taux de résidus infracentimétriques obtenus sont supérieurs (80,6% pour la chirurgie d'intervalle contre 41,6% lors de la chirurgie 1<sup>ère</sup>). Les complications post

opératoires sont moindres dans le bras néoadjuvant. Par ailleurs, le facteur pronostic le plus fort reste la qualité de la résection chirurgicale, quelque soit la séquence <sup>18</sup>.

S. Kehoe a présenté à l'ASCO 2013 les résultats de l'étude CHORUS qui a comparé, chez 552 patientes, la réalisation de chimiothérapie néo-adjuvante avec chirurgie d'intervalle à 3 cycles, à de la chirurgie première suivie de chimiothérapie. De même que dans l'étude de l'EORTC, aucune différence significative n'a été observée, ni en survie sans progression (HR = 0,90 ; IC<sub>95</sub> : 0,75-1,07), ni en survie globale.

Cependant malgré ces traitements et quel que soit leur séquence, plus de 2/3 des patientes présentant un cancer ovarien diagnostiqué à un stade avancé récidiveront dans un délai médian de 18 à 24 mois<sup>17,32</sup>.

## 4 Evolution et enjeux: Eviter et traiter les rechutes

### 4.1 Les facteurs pronostics :

Peu de facteurs permettent de connaître le risque de rechute (la majorité des patientes étant malheureusement concernées). En revanche, on distingue plusieurs facteurs pronostics, utilisés pour l'indication de la chimiothérapie adjuvante ou le choix de la chimiothérapie à la rechute (figure 3).

On distingue 3 grands groupes de facteurs pronostiques :

- liés à la tumeur :

**Le stade tumoral** : établi selon la classification FIGO après une chirurgie complète. La survie globale à 5 ans est ainsi de 80% pour les stades I et devient inférieure à 20% pour les stades IV <sup>33</sup>

**Le grade histologique** (surtout important dans les stades précoces ou stade I)

**Le type histologique** : il semblerait que les tumeurs mucineuses soient de moins bon pronostic à stade égal. Les adénocarcinomes à cellules claires seraient également associés à un moins bon pronostic en raison de leur chimiorésistance.

- Liés aux patientes

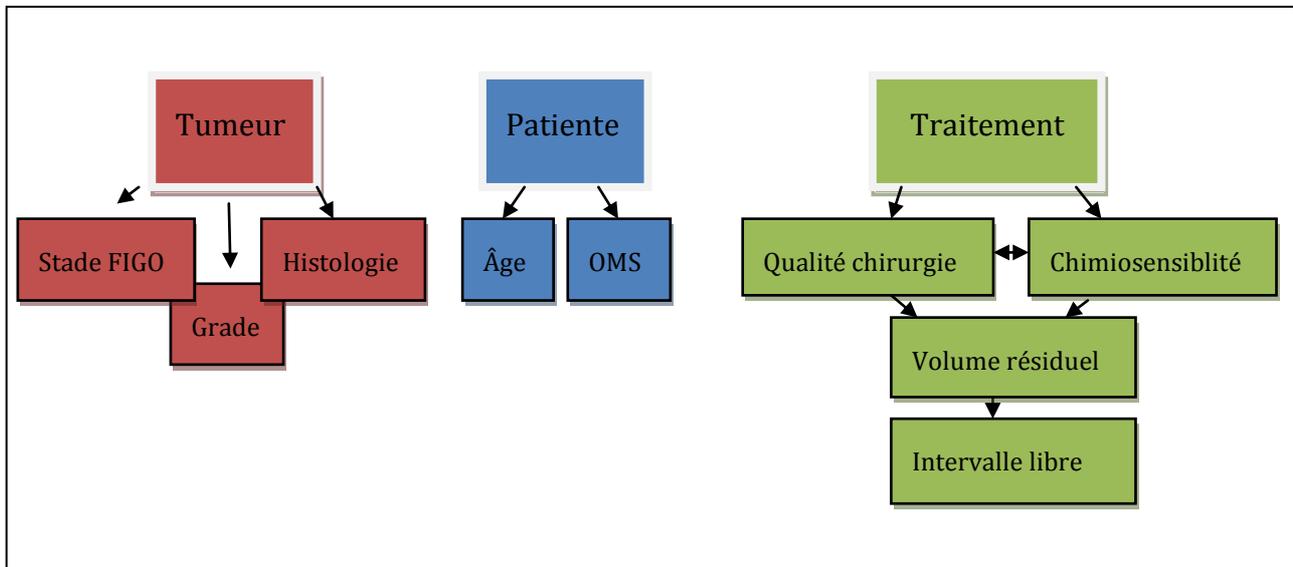
**Age et indice de performance**

- Liés au traitement :

**Qualité de la chirurgie initiale**

**Volume résiduel tumoral après chirurgie**

**Intervalle libre sans traitement**



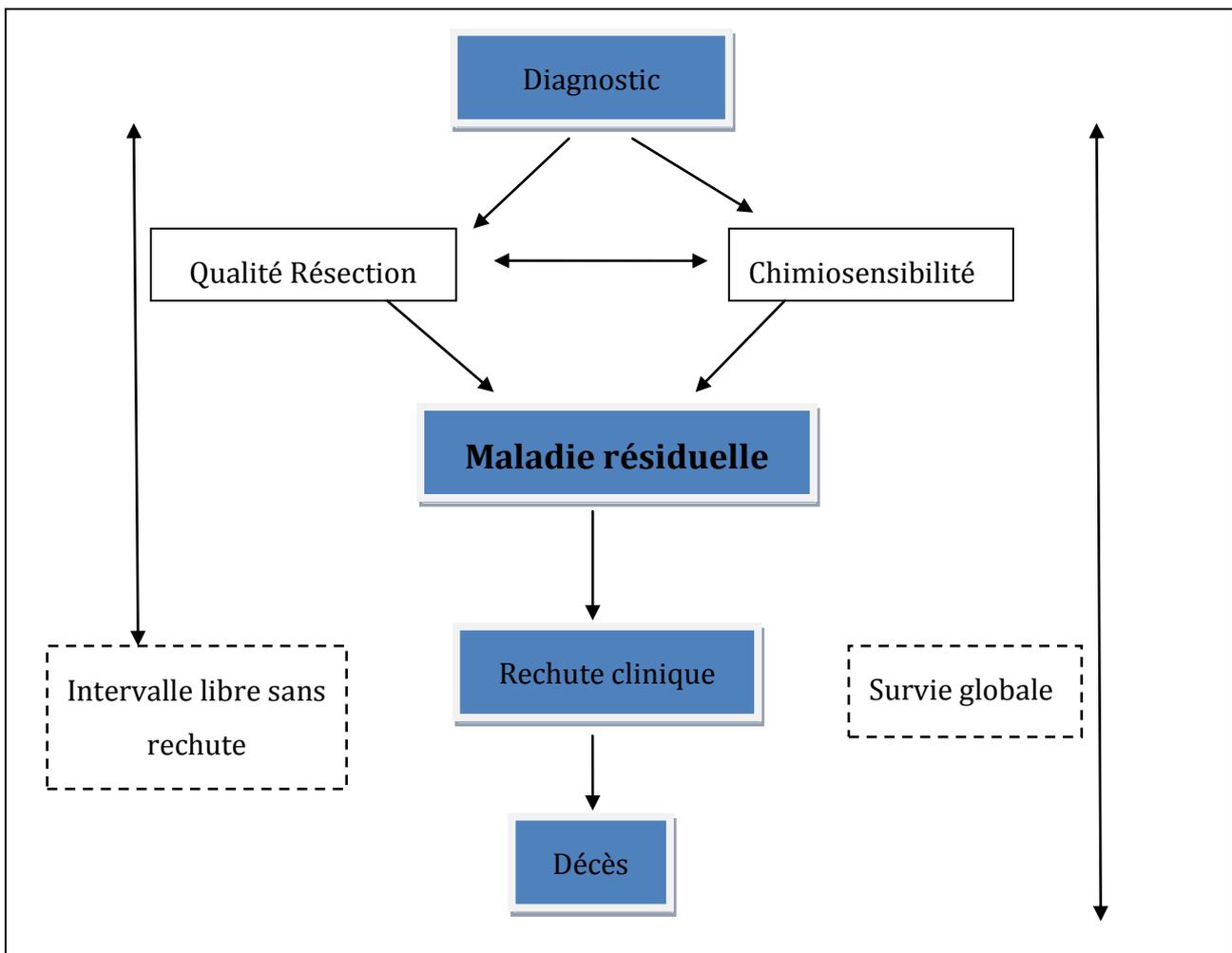
**Figure 3 : Principaux facteurs pronostics des cancers ovariens**

Ce schéma permet d'illustrer l'importance du traitement de première ligne avec la notion de maladie résiduelle. C'est avec une chirurgie complète associée à une chimiothérapie efficace que la maladie résiduelle sera absente ou minimale et que l'on pourra éviter les rechutes, ou au moins les retarder (figures 4 et 5).

Le concept de maladie résiduelle (ou maladie résiduelle minimale) est un enjeu majeur en oncohématologie. Elle peut être définie par la persistance pour un malade donné de cellules tumorales indétectables par les méthodes classiques (cliniques ou para cliniques). La détection de la maladie résiduelle est déjà utilisée en pratique en hématologie, dans le suivi des leucémies aiguës par exemple, par quantification de la maladie résiduelle moléculaire. Ces méthodes, basées sur la détection de certaines mutations ou transcrits spécifiques permet la détection d'une cellule leucémique sur un million de cellules normales. Cet outil est un moyen de diagnostic des rechutes précoces, encore accessibles à un traitement curatif.

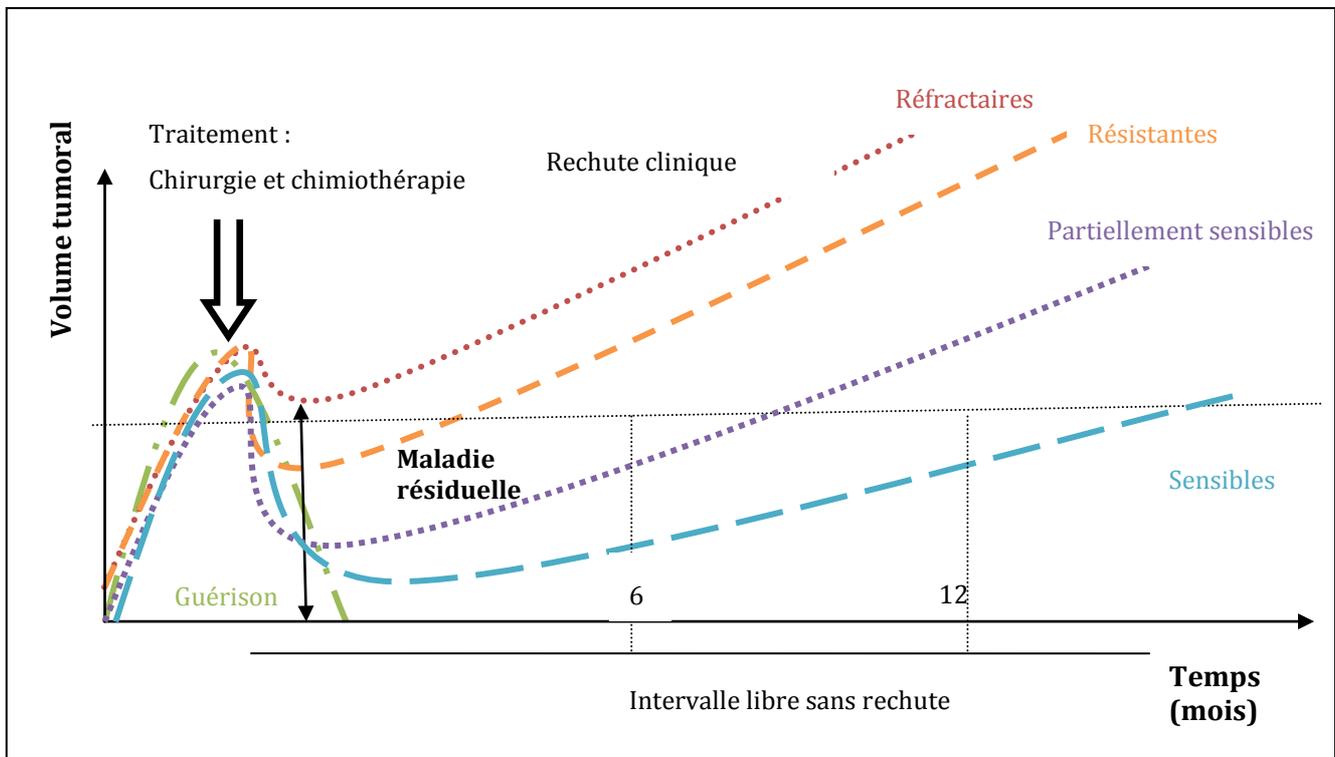
En oncologie, le rationnel des traitements par chimiothérapie adjuvante est basé sur cette notion de maladie résiduelle. Les patients considérés à haut risque de récurrence

avec suspicion de maladie « micro métastatique » reçoivent alors de la chimiothérapie alors que toute la maladie « visible » a été traitée (par chirurgie ou chirurgie et radiothérapie). Certaines cellules échappent ainsi au traitement initial (créant le noyau de la maladie résiduelle). Elles peuvent, par exemple, résister à la chimiothérapie en se trouvant en dehors du cycle cellulaire (en dormance). De plus, la théorie Goldie et Coldman élaborée en 1979 décrit l'apparition de mutations aléatoires dans les cellules tumorales entraînant l'émergence spontanée de clones chimio-résistants avant tout traitement. Une tumeur de 1 cm ( $10^9$  cellules) possède statistiquement au moins un clone chimio-résistant qui pourra être responsable de la rechute. Le modèle du cancer ovarien illustre très bien ce concept. Il est reconnu que la chimiothérapie adjuvante (même en cas de chirurgie complète, sans cellules visibles) améliore le pronostic des patientes<sup>34</sup>. Malgré ce traitement, la majorité des patientes rechutent selon des délais variables (fig. 5). Ce délai ou « intervalle libre de platine » est un facteur pronostic fort.



**Figure 4 : Concept de maladie résiduelle**

Il permet de catégoriser les patientes en différents sous-groupes pronostiques et orientera la décision thérapeutique ultérieure (figure 5).



**Figure 5 : Histoire naturelle des cancers de l'ovaire**

#### 4.2 Les différents types de rechute et leurs traitements

Le choix du traitement lors de cette récurrence dépend principalement du délai de rechute. On parle d'intervalle libre sans platine (intervalle entre la fin du dernier cycle de chimiothérapie par platine et la date de rechute). Markman a démontré en 1991 puis en 2004 l'importance de la durée de réponse au platine dans une étude rétrospective de 176 patientes traitées pour des cancers ovariens ou péritonéaux primitifs. Lorsque l'intervalle libre sans platine était inférieur à 12 mois, le taux de réponse à une nouvelle ligne de chimiothérapie par platine n'était que de 33% contre 75% si l'intervalle était supérieur à 18 mois (chiffre équivalent aux patientes chimio naïves) <sup>32,35</sup>. Depuis, ces données ont été confirmées et affinées avec la classification des rechutes en plusieurs sous-groupes : patientes dites réfractaires, résistantes, partiellement sensibles ou sensibles (figure 5).

### **4.2.1 Maladie sensible au platine**

Les patientes rechutant après un intervalle d'un an ont un meilleur pronostic et ont un taux de réponse au platine permettant sa reprise. La réintroduction d'une chimiothérapie de type platine/ paclitaxel -si la toxicité résiduelle le permet- prolonge le SSP et la survie globale <sup>36</sup>. Plus l'intervalle est long, meilleur est le pronostic et le taux de réponse attendu : 55% pour les rechutes entre 12 et 17 mois et 75% pour les rechutes survenant après 18 mois <sup>32</sup>. Pour ces patientes, une reprise chirurgicale doit être discutée.

Pour les tumeurs sensibles, d'autres traitements à base de platine sont possibles tels les associations : carboplatine/doxorubicine pégylée, carboplatine/gemcitabine (+/- bevacizumab), carboplatine/docetaxel <sup>34</sup>.

L'association sans platine par de la trabectedine (yondelis®) et de la doxorubicine liposomale pégylée (DLP) (caelyx®) a reçu son AMM pour les patientes récidivant après 6 mois (sensibles ou intermédiaires) après les résultats de l'étude OVA-301. Cette étude de phase III randomisée a démontré un allongement de la survie sans progression, dans le sous-groupe des patientes présentant trabectedine + DLP 30 mg/m<sup>2</sup> par rapport au groupe DLP 50 mg/m<sup>2</sup> seule de 9,7 mois versus 7,5 mois, soit un gain absolu de 2,2 mois, (HR = 0,73 IC 95% [0,56 - 0,95], p = 0,0170). La tolérance a été moins bonne pour le doublet avec une toxicité principalement hématologique : neutropénie de grades 3 et 4 (72% versus 29,5%) et thrombopénie de grades 3-4 (23,1% versus 4,3%) et hépatique (augmentation des ALAT de grades 3 et 4 (50,1% versus 2,2%))<sup>37</sup>.

### **4.2.2 Maladie de sensibilité intermédiaire**

On classe ici les patientes rechutant entre 6 et 12 mois après le primo traitement. Pour beaucoup d'auteurs, elles peuvent être incluses dans le groupe des maladies sensibles au platine <sup>6,34</sup>. Le traitement peut également être une reprise d'un doublet à base de platine et de paclitaxel (standard ou hebdomadaire) ainsi que les autres doublets cités ci-dessus.

### **4.2.3 Maladie résistante au platine**

Elle est définie par une rechute documentée dans les 6 mois suivants la fin de la chimiothérapie. Ces patientes ont un faible pourcentage de réponse au platine (10 à

20%) lors d'une nouvelle ligne par platine et de 10 à 25% par d'autres molécules<sup>5</sup>. Elles sont donc le plus souvent traitées par une chimiothérapie de 2<sup>e</sup> ligne ne contenant pas de platine, souvent en monothérapie pour préserver la qualité de vie. Les plus fréquemment utilisées sont le paclitaxel, le topotecan, la gemcitabine ou la doxorubicine liposomale pégylée<sup>6,34</sup>. Une des rares études positive pour l'instant est encore une étude ciblant l'angiogenèse. En effet, les résultats de l'étude de phase III AURELIA évaluant l'association de ces monothérapies avec le bevacizumab ont été présentés à l'ASCO 2012. Le Dr Pujade-Lauraine a rapporté un effet de doublement de la survie sans progression chez ces patientes (de 3,4 à 6,7 mois) (HR= 0,48 ; 95 CI 0,38-0,60) avec des taux de réponse allant de 13 % (bras contrôle) à 31% (bras expérimental) (p<0,001)<sup>38</sup>.

#### **4.2.4 Maladie réfractaire au platine :**

Elle comporte les patientes évoluant en cours de chimiothérapie. Ce sous-groupe de patientes a un pronostic effroyable, caractérisé par des taux de réponse toute chimiothérapie confondue <10% et une survie globale < à 12 mois<sup>35</sup>. La priorité doit être l'inclusion dans des essais thérapeutiques afin d'améliorer ce pronostic.

Pour résumer, les taux de réponses attendus et la survie sans progression des cancers ovariens dépendent fortement de l'intervalle libre de la première rechute. Or, des travaux récents sur une large cohorte de 1620 patientes en rechute ont pu démontrer l'intérêt du traitement des rechutes (jusqu'en quatrième ligne) en terme de survie. Cependant, au fur et à mesure des rechutes, durée de temps jusqu'à progression se raccourcit, avec une sensibilité moindre aux traitements. Les deux seuls facteurs pronostiques indépendants pour la survie sans progression retrouvés dans cette étude étaient le type de chimio sensibilité de la tumeur (à la première ligne) et la qualité de la chirurgie initiale et ce jusqu'à la troisième rechute<sup>36</sup>. Ces deux facteurs sont connus pour être directement corrélés à la qualité de la maladie résiduelle. Nos deux objectifs majeurs pour l'amélioration de la prise en charge des cancers ovariens doivent donc être :

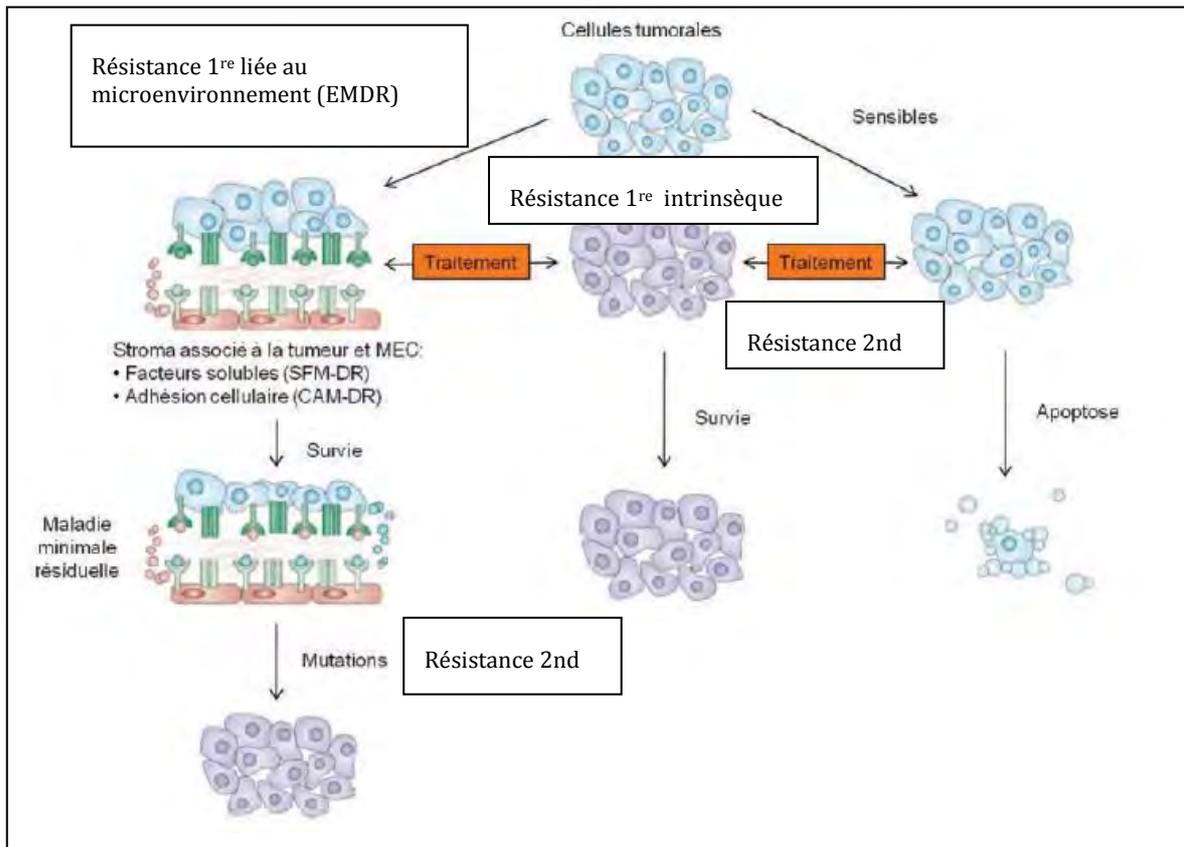
- Obtenir une résection chirurgicale complète (par des équipes entraînées, après une chimiothérapie néoadjuvante si nécessaire car non résécable d'emblée)
- Trouver des moyens pour accroître la chimiosensibilité des patientes.

L'augmentation de la chimiosensibilité des cancers ovariens est donc devenue un enjeu majeur pour améliorer leur prise en charge. Cette étape passe impérativement par une meilleure compréhension des mécanismes de chimiorésistance.

## **CHIMIORESISTANCE ET MICROENVIRONNEMENT**

### **1 Chimiorésistance des cancers ovariens**

Comme nous l'avons vu ci-dessus, la chimiorésistance est un des enjeux majeurs en oncologie et en particulier dans les cancers ovariens. Ils sont d'excellents modèles pour étudier la chimiorésistance puisqu'elle est parfaitement corrélée au devenir clinique des patientes. La résistance est classiquement divisée en deux catégories théoriques: résistance primaire (de novo) et secondaire (acquise) (figure 6). Les patientes réfractaires (voire résistantes) ne répondant pas ou rechutant très rapidement après le primo traitement (<6 mois d'intervalle libre) correspondent aux tumeurs ayant des résistances primaires. A l'inverse, les patientes rechutant plus tardivement, considérées comme porteuses de tumeurs platine-sensibles, doivent acquérir des résistances secondairement. Comme nous l'avons vu précédemment, plus on enchaîne les rechutes et les lignes de chimiothérapies, moins les taux de réponse sont importants, preuve directe de l'apparition de chimiorésistance <sup>36</sup>. Les mécanismes responsables de ces résistances primaires ou secondaires sont soit d'origine tumorale pure (origine intrinsèque) ou liée au microenvironnement (EMDR) (figure 6).



**Figure 6 : Mécanismes de résistance des cancers ovariens, adapté de Meads, nat rev 2009<sup>39</sup> et thèse R Lis.**

## 1.1 Les résistances intrinsèques

Les résistantes intrinsèques *de novo* sont liées à des mutations génétiques pré existantes à tout traitement mais que la cellule tumorale a déjà acquises pour leur avantage de survie ou de prolifération. Cette voie a été la plus étudiée depuis de nombreuses années avec l'étude de mutations somatiques spécifiques ou d'altérations épigénétiques. On retrouve principalement des anomalies des voies de réparation, des pompes d'efflux (modification concentration intracellulaire de la chimiothérapie), de contrôle du cycle cellulaire, d'apoptose <sup>5</sup>.

Un des mécanismes généraux de résistance consiste en des dysfonctionnements des voies de l'apoptose, ou de la régulation du cycle cellulaire, la majorité des traitements actuels étant des cytotoxiques. La plupart des gènes impliqués sont des oncogènes (tels RAS, AKT) qui seront activés ou au contraire des suppresseurs de tumeur qui seront déficients (P53, PTEN). Des mutations peuvent aussi se produire directement sur les protéines des voies apoptotiques (survivine, XIAP et la famille de

BCL2)<sup>40</sup>. Cependant, le rôle précis de toutes ces molécules (et de leurs interactions) requiert de plus amples études, particulièrement en situation clinique.

*In vitro*, des phénomènes d'efflux des drogues via des transporteurs du système ABC sont responsables de résistance. Malgré plusieurs études leur rôle n'est pas établi dans les cancers ovariens en clinique.

Des anomalies des voies de réparation des cellules tumorales peuvent également entraîner une résistance *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins. Le cisplatine va agir par formation d'adduits au niveau de l'ADN. Si la voie de réparation NER (réparation par excision de nucléotide) est hyper fonctionnelle, les tumeurs semblent plus chimiorésistantes (car les lésions induites par le platine seront réparées et donc n'induiront pas d'apoptose).

En résumé, de nombreuses données sur la cellule tumorale et les mécanismes de résistance mais avec aucune implication réelle en clinique pour les cancers ovariens. Comme cités précédemment, les cancers ovariens sévères de haut grade présentent pour la plupart des anomalies de P53. Cela entraîne une instabilité génomique et peut expliquer l'hétérogénéité de ces tumeurs, la sélection rapide d'un phénotype résistant et la difficulté de trouver une seule cible thérapeutique. Les perspectives de restauration de la chimiosensibilité se sont donc tournées vers le microenvironnement<sup>17</sup>. En effet, l'essai AURELIA apporte des données encourageantes avec l'amélioration de la survie sans progression chez des patientes considérées comme chimiorésistantes lors de son association à de la chimiothérapie.

## 1.2 Les résistances extrinsèques

Elles sont liées à l'environnement (EMDR pour environment mediated drug resistance). Ces phénomènes de résistance au microenvironnement tumoral sont connus depuis longtemps à travers l'hypoxie, responsable de chimio et de radio résistance<sup>39,41</sup>.

Le microenvironnement peut interagir avec les cellules tumorales

- soit par des phénomènes **d'adhérence cellulaire** (CAM-DR ou cell adhesion mediated drug resistance) : interaction directe cellules-cellules et interaction cellules-matrice extracellulaire
- ou encore par des **facteurs solubles** (SFM-DR pour soluble factor drug-mediated drug resistance). Les cellules stromales peuvent sécréter des cytokines, des facteurs de croissance.

Ces interactions déclenchent des cascades de voies de signalisation induisant entre autres des signaux de survie et des signaux anti apoptotiques aux cellules tumorales<sup>5</sup>.

Ces modifications extrinsèques sont tout d'abord transitoires et réversibles. Lors d'expériences in vitro, on observe une perte de la chimiorésistance lors de l'isolement des cellules tumorales de leur environnement.

Avant d'étudier plus en avant ces mécanismes, nous allons revenir sur le concept de microenvironnement tumoral et son rôle dans les cancers ovariens.

## 2 Le microenvironnement

### 2.1 Généralités

Le concept de microenvironnement est connu depuis de nombreuses années. En 1889, Stephen Paget introduisait déjà la notion du « Seed and Soil »<sup>42</sup>. Ce chirurgien anglais avait autopsié 735 patientes atteintes de cancer du sein et avait objectivé une dissémination métastatique préférentielle au niveau osseuse et hépatique, identifiant des relations entre les cellules cancéreuses et les cellules de l'hôte.

Depuis, les différents composants du microenvironnement sont de mieux en mieux décrits et il devient clair pour toute la communauté scientifique que les cellules tumorales ne peuvent agir seules et nécessitent des « complices ». Ils peuvent être classés en trois catégories principales :

- **les cellules vasculaires** : cellules endothéliales et péricytes
- **les cellules de type fibroblastiques** associées au cancer parmi lesquelles on retrouve les fibroblastes associés aux tumeurs (TAF), les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les adipocytes activés,

- **et les cellules immunitaires** telles que les lymphocytes T CD4, régulateurs ou LT CD8, Lymphocytes B, natural killers (NK), les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les mastocytes et les plaquettes<sup>43,44</sup>.

Toutes ces cellules environnantes constituent un véritable réseau de communication et d'échanges autour du compartiment parenchymateux tumoral constitué des cellules cancéreuses et des cellules souches cancéreuses (figure 7A).

Selon le modèle de cancérogénèse de Weinberg dans sa version réactualisée de 2011, le microenvironnement a une implication reconnue dans 7 des 8 signatures du cancer (figure 7B). Ainsi, les cellules stromales soutiennent des rôles de maintien des signaux de prolifération, d'échappement aux signaux d'arrêt et au système immunitaire, de dérégulation des voies métaboliques et énergétiques, de résistance à la mort cellulaire, d'induction de l'angiogenèse et d'activation des phases d'invasion et de dissémination métastatique. Seule la capacité de réplication à l'infini n'a pas fait la preuve du besoin de cellules de soutien stromales <sup>44</sup>.

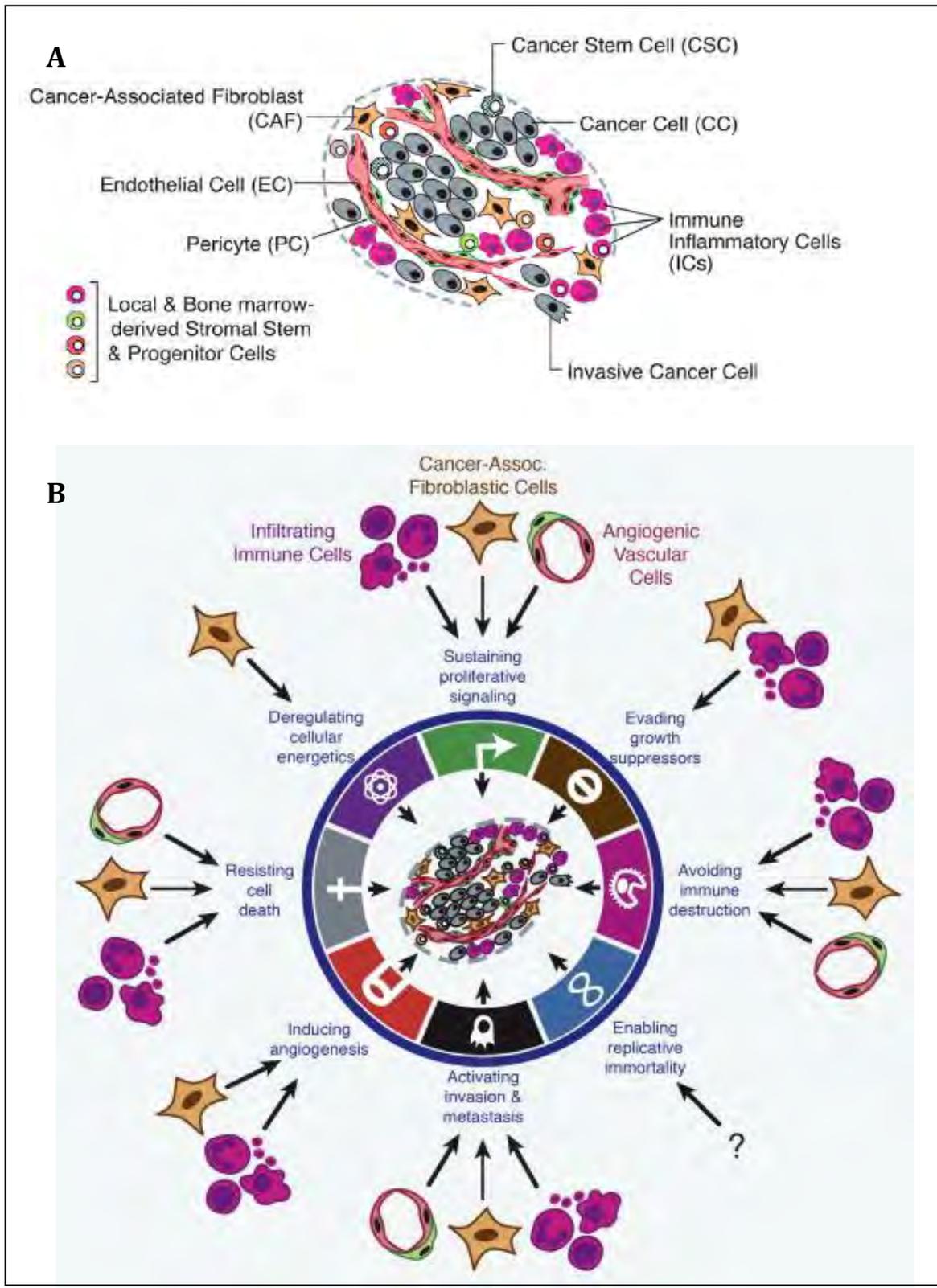
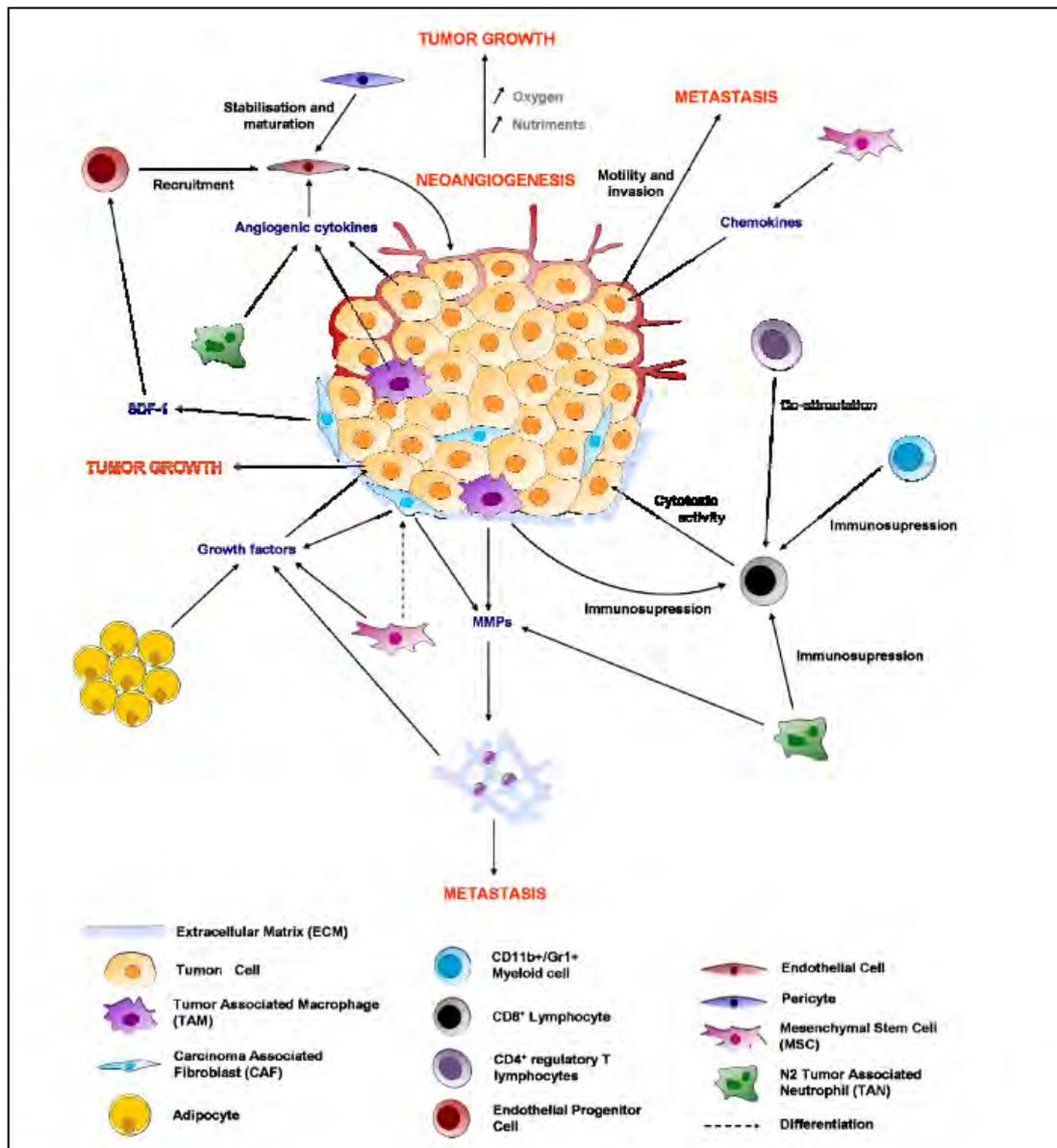


Figure 7 : Microenvironnement tumoral et implication dans les étapes de la cancérogénèse, d'après Hanahan et al 2011 et 2012 <sup>44,45</sup>

Sous l'influence de divers facteurs, cytokines, acides gras, contact cellulaire direct, ces deux compartiments dialoguent et sont responsables de transformations réciproques. Les cellules du microenvironnement peuvent ainsi permettre l'acquisition par les cellules tumorales de diverses propriétés telles que la prolifération, l'angiogénèse, l'invasion, l'échappement au système immunitaire, la chimiorésistance 41,46,47.



**Figure 8: Interaction entre cancer et son microenvironnement, d'après Castells et al, IJMS 2012<sup>41</sup>**

Comme preuve de concept de l'importance du microenvironnement, des études récentes montrent l'intérêt de le prendre comme cible dans les cancers solides en

association aux cytotoxiques conventionnels. Récemment, le bevacizumab (anticorps anti-VEGF), ciblant l'angiogénèse a obtenu l'autorisation de mise sur la marché dans le cancer ovarien après 2 essais de phase 3 montrant une amélioration en terme de survie sans progression en 1<sup>ère</sup> ligne en association au platine et au paclitaxel <sup>26,27</sup> .

## 2.2 Le microenvironnement des tumeurs ovariennes

Le cancer ovarien est un excellent modèle d'étude du microenvironnement. Son mode de dissémination est principalement locorégional au sein de la cavité péritonéale, souvent accompagné et privilégié par la présence d'ascite <sup>48</sup>. Plusieurs équipes ont bien décrits l'existence d'agrégats multicellulaires au sein de l'ascite carcinomateuse ovarienne <sup>47,49</sup>. Ces agrégats sont constitués de cellules tumorales épithéliales mais également de cellules inflammatoires telles que des macrophages, des lymphocytes, des fibroblastes et des cellules mésenchymateuses. Elles confèrent aux cellules tumorales des propriétés diverses telles que chimiorésistance <sup>47</sup>, néoangiogénèse et progression tumorale <sup>46</sup>. Les interactions au sein du microenvironnement sont complexes et font intervenir les cellules stromales directement mais également, des cytokines sécrétées au contact des cellules tumorales ainsi que la liaison à la matrice extracellulaire,...

### 2.2.1 Les cellules du stroma

Tous les différents sous types évoqués plus haut peuvent être impliqués dans les cancers ovariens (progression ou résistance aux traitements) :

#### - Les cellules vasculaires

- La vascularisation tumorale est essentielle à la croissance tumorale via l'apport de nutriments et d'oxygène. Seule cette voie a pour l'instant, démontré sa validité en clinique avec les études citées antérieurement impliquant les antiangiogéniques <sup>26,27,38</sup>.

#### - Les cellules de type fibroblastiques

- Les fibroblastes associés aux tumeurs (TAF) :

La littérature est très abondante à ce sujet, les fibroblastes constituant un des composants principal du tissu conjonctif et étant recrutés durant les phénomènes de

réparation. Leur phénotype est modifié au contact des cellules tumorales avec l'expression de marqueurs myofibroblastiques, actine musculaire lisse ( $\alpha$  SMA) et la protéine d'activation fibroblastique (FAP : fibroblast activation protein).

- Les adipocytes dérivés de l'épiploon
- Les cellules souches mésenchymateuses :

Beaucoup de preuves solides sont en faveur d'un recrutement des MSC issues de la moelle osseuse au sein du microenvironnement tumoral, notamment ovarien <sup>50</sup>. Notre équipe ainsi que d'autres ont caractérisé leur implication dans la chimiorésistance dans des tumeurs ovariennes ou autres types. Nous y reviendrons plus en détail.

#### - **Les cellules immunitaires :**

Ces cellules, retrouvées fréquemment en clinique (dans l'ascite ou les infiltrats inflammatoires) jouent un rôle ambivalent, anti tumoral ou immunotolérant. Elles peuvent être distinguées selon leur nature :

- Les macrophages associés aux tumeurs ou TAM (tumour associated macrophages) :

Ils semblent plutôt pro tumoraux surtout le phénotype M2 : phénotype immunosuppresseur, induit par LIF, IL6 et CSF1 dans la majorité des études<sup>51</sup>.

Des études ont prouvé le caractère péjoratif d'une surexpression de CSF1 dans les cellules tumorales. La trabectidine (Yondelis®) qui a l'AMM dans les cancers ovariens en association avec le Caelyx® en 2<sup>e</sup> ligne, est connue pour agir par interaction avec l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire mais pourrait également agir par inhibition de la différenciation des monocytes en macrophages <sup>52</sup>.

- Les infiltrats lymphocytaires (LT) sont différents selon la nature des LT.

Les LT CD8+ (cytotoxiques) sont plutôt corrélés à un bon pronostic ainsi qu'un haut ratio CD8+/lymphocytes T régulateurs chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. A l'inverse, les LT régulateurs (Helper) CD4+, CD25+ sont corrélés à un mauvais pronostic en entraînant une tolérance vis-à-vis des cellules carcinomateuses.

- Les cellules dendritiques

joueraient plutôt un rôle pro tumoral en présentant des antigènes tumoraux comme antigènes du soi et en inhibant les LTCD8.

### **2.2.2 Les cytokines inflammatoires**

Elles semblent particulièrement impliquées et peuvent être sécrétées par différents composants du stroma tumoral: le TNF $\alpha$  qui est exprimé de manière constitutive dans les tumeurs ovariennes et les cellules du stroma telles que les macrophages. Des anticorps antagonistes sont en cours d'évaluation en phase I. L'interleukine 6 est également une des cibles prometteuse avec des essais de phase II (testant le siltuximab) chez les patientes présentant un cancer de l'ovaire résistant<sup>53</sup> mais chez des patients atteints de myélome. Plusieurs travaux ont démontré qu'un taux élevé d'IL 6 dans l'ascite ou dans le sang était corrélée à un mauvais pronostic<sup>53,54</sup>.

## **2.3 Le cas particulier des cellules souches mésenchymateuses**

Les MSC (cellules souches mésenchymateuses) sont des cellules progénitrices multipotentes partageant des caractéristiques morphologiques communes avec les fibroblastes et sont capables de se différencier en de nombreux types cellulaires comme les ostéoblastes, les chondrocytes et les adipocytes<sup>55</sup>. Leur rôle physiologique est le maintien de la structure et de la fonction des tissus conjonctifs, ainsi que de leur réparation en cas de lésion. Leur intérêt est devenu croissant en cancérologie ces dernières années car les cellules tumorales peuvent les recruter au sein de leur stroma où elles acquièrent alors de nouvelles propriétés<sup>56</sup>. L'équipe de Marini a publié récemment sur la nature du stroma tumoral ovarien : provenant pour 50% de cellules de la moelle osseuse dont les MSC et pour 50% du recrutement de cellules locales (dont les adipocytes)<sup>57</sup>. Plusieurs études ont pu démontrer le tropisme de ces MSC pour les tumeurs de diverses origines, dont les tumeurs ovariennes notamment par des techniques de bioluminescence avec co-localisation des MSC et des sites tumoraux dans des modèles murins (par greffe syngénique ou xénogénique)<sup>50</sup>. De nombreuses études sur différents types de cancers témoignent majoritairement d'un rôle pro tumoral favorisant la croissance tumorale, l'angiogénèse, l'apparition de métastases avec

transition épithélio-mésenchymateuse ou encore un effet immunosuppresseur<sup>56,58,59</sup>. L'équipe de Mc Lean a récemment confirmé la présence de MSC au sein du stroma tumoral ovarien (à partir d'ascite de patientes) et les a nommées « Carcinoma Associated MSC » (CA-MS)<sup>60</sup>. Ces cellules n'ont pas de pouvoir oncogénique propre, mais sont capables de stimuler la croissance tumorale in vitro et in vivo.

A ce jour, peu d'études se sont intéressées au rôle des MSC dans l'acquisition d'une chimiorésistance. Pour d'autres tumeurs, il a été montré que les MSC pouvaient protéger les cellules de leucémie myéloïde chronique de l'entrée en apoptose due à l'action de l'imatinib<sup>61</sup>, protéger les cellules de cancer de la tête et du cou contre le paclitaxel<sup>62</sup> et même induire l'apparition de cellules souches cancéreuses chimioresistantes<sup>63</sup>. Concernant l'adénocarcinome ovarien, un article récent a démontré l'induction de chimiorésistance via les MSC activées par les sels de platine in vitro et in vivo (modèles murins) dans des lignées de cancer bronchique, colique et mammaire<sup>64</sup>. Les MSC sécrètent des acides gras polyinsaturés de façon dépendante des voies COX1 (cyclooxygénase) et TXAS (thomboxane synthase). L'association d'inhibiteurs de ces voies et de chimiothérapie permet de retrouver une réponse anti tumorale in vivo dans des modèles de xénogreffes murines de tumeur mammaire humaine. Notre équipe à l'aide de travaux collaboratifs a contribué aux avancées de cette question avec notamment la démonstration de résistance par échange de matériel membranaire, par modification de la vascularisation et de l'angiogenèse ou de l'apoptose<sup>46,47,65</sup>.

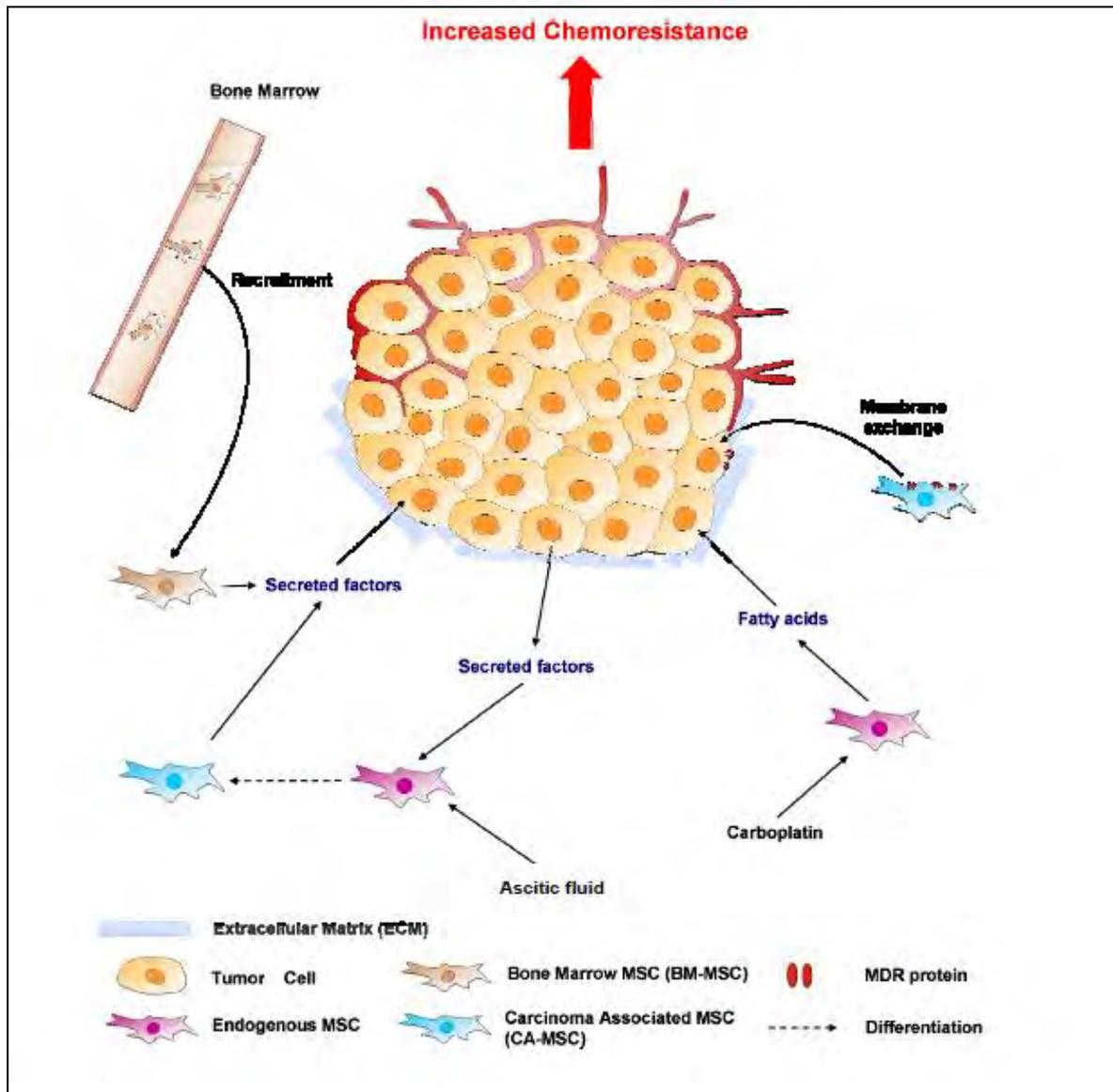


Figure 9 : Les effets chimio protecteurs des MSC dans les cancers ovariens, Castells, IJMS 2012 <sup>41</sup>

Suite à ces travaux, j'ai pu étudier durant mon master 2 le rôle des MSC issues de la moelle osseuse (BM-MSC) dans l'acquisition d'une chimiorésistance au platine. La première partie, in vitro, a conforté les résultats de travaux antérieurs de l'équipe menés sur les CA-MSC (cancer associated MSC), à savoir que les BM-MSC tout comme les CA-MSC étaient capables de donner un phénotype résistant à des lignées cellulaires tumorales ovariennes. Nous avons pu montrer que les CA-MSC entraînaient une diminution de l'activation des caspases effectrices (3 et 7) et une activation d'Akt, protéine clé de la voie de survie cellulaire, et de X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), protéine anti-apoptotique de la famille des inhibitor of apoptosis proteins

(IAPs), dans les cellules tumorales ovariennes traitées au carboplatine (Castells et al, en cours de publication dans Cell Death and Disease) <sup>66</sup>.

La deuxième partie de mes travaux a consisté à rechercher la présence de ces cellules au sein du microenvironnement tumoral, « in situ », à partir de tumeurs ovariennes de patientes et de corrélérer leur présence au statut de résistance. Devant l'absence de marqueur spécifique de ces cellules pluripotentes, nous avons étudié un panel reconnu : CD105, CD73, CD 44. Ces travaux préliminaires suggèrent que la présence de cellules stromales, exprimant le CD44 soit corrélée à un phénotype résistant. Nous avons donc voulu explorer cette piste, en recherchant une valeur pronostique propre, ainsi qu'une meilleure caractérisation de son expression.

Une étude récente réalisée à partir de cellules d'ascite de patientes renforce notre hypothèse. A partir d'une cohorte de 11 patientes chimionaïves et 14 chimiorésistantes, les auteurs ont pu séparer 2 types cellulaires : les cellules adhérentes et non adhérentes en culture. De façon intéressante, les cellules adhérentes présentaient une morphologie de cellules mésenchymateuses avec des profils antigéniques de fibroblastes et de cellules souches mésenchymateuses. Une expression supérieure de CD44, MMP9 et Oct4 était observée dans le groupe des patientes chimiorésistantes <sup>67</sup>.

Nous avons donc voulu nous pencher davantage sur ce marqueur, réalisable en routine par IHC et pouvant constituer une cible thérapeutique (in vivo et phase I, en cours).

**CD44**

## **1 Généralités**

La protéine CD44 a été décrite pour la première fois en 1983 comme antigène de surface lymphocytaire<sup>68</sup>. Depuis elle est classiquement décrite comme marqueur de surface macrophagique, des cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses.

Cette glycoprotéine transmembranaire est codée par un seul gène mais a de nombreux variants, après épissage alternatif ou glycosylation (figure 8). L'isoforme la plus fréquente et la plus petite est la forme dite standard (CD44s) présente à la surface des membranes de la plupart des cellules vertébrées. Il a comme rôle principal d'être un récepteur de l'acide hyaluronique. Cette molécule est impliquée dans l'adhésion cellule/cellule et cellule/matrice extra cellulaire <sup>69</sup>. Elle participe à de nombreux processus biologiques tels le recrutement lymphocytaire, l'hématopoïèse, l'embryogénèse et la cicatrisation. Ses fonctions peuvent être mises en jeu par 3 voies principales de signalisation moléculaire. Le CD44 peut agir comme récepteur à des substrats solubles ou directement avec la matrice extra cellulaire. L'affinité du CD44 avec l'acide hyaluronique peut être modulée par glycosylation du domaine extracellulaire ou phosphorylation de sérines intracellulaires. Cette affinité variable permet notamment des phénomènes de « rolling » pour le recrutement leucocytaire notamment. Elle peut fonctionner comme co récepteur et moduler l'activation de récepteur de facteurs de croissances tels FGF R4 ou la famille des ERBB (1,2,3). Pour finir, le CD44 est l'un des organisateurs du cytosquelette via son interaction avec l'actine.

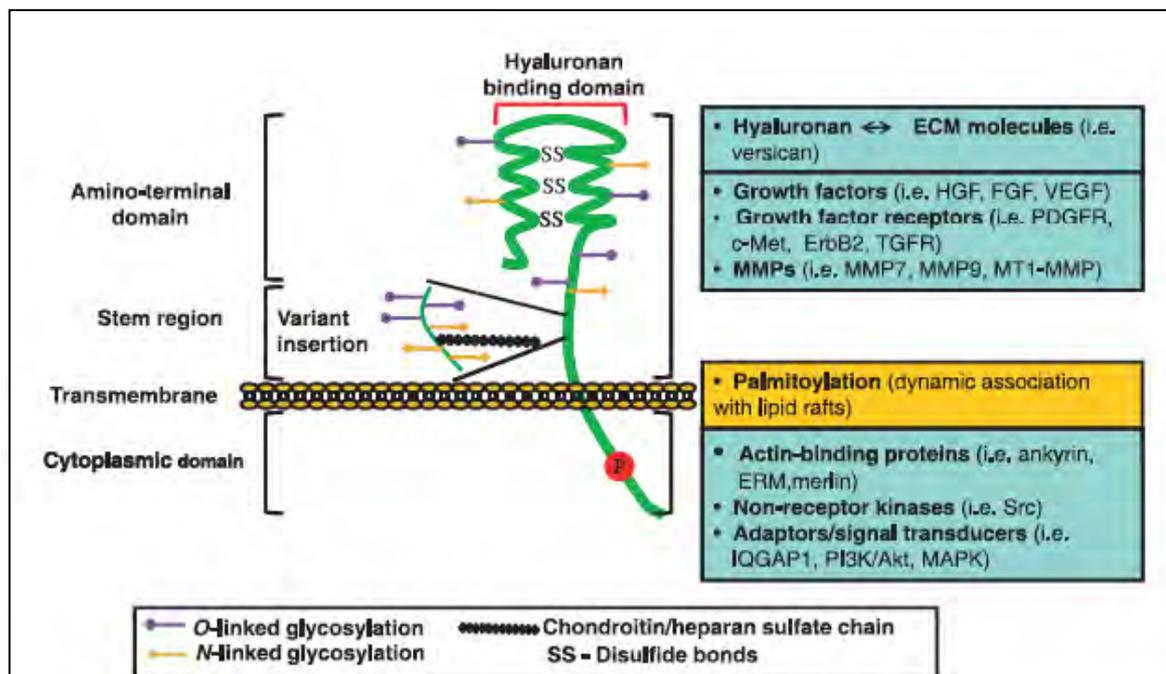


Figure 10 : Structure du CD44, d'après Misra, FEBS 2011 <sup>69</sup>

Son intérêt s'est ensuite accru en oncologie, tout d'abord comme marqueur de cellules souches tumorales <sup>70,71</sup>. Ensuite, des études sur lignées tumorales pancréatiques

et mammaires ont isolé des variants (CD44v) capables d'induire un phénotype métastatique <sup>72</sup>.

## 2 En oncologie

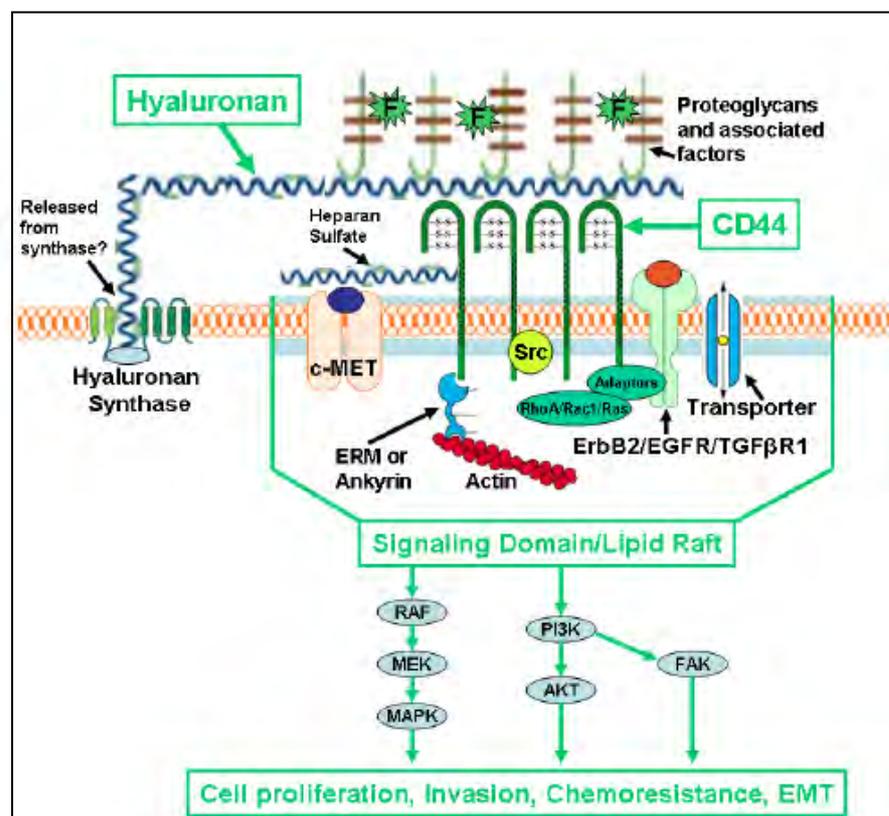
L'expression de CD44 et de ses variants aberrants est impliquée dans l'initiation, la progression et la rechute de plusieurs types de cancers<sup>70</sup>. Il serait acteur de voies nécessaires à la prolifération cellulaire, à l'invasion, à la transition épithélio mésenchymateuse (EMT) ou encore la chimiorésistance (figure 9) <sup>73</sup>. Il a été ainsi suggéré son rôle pronostic dans plusieurs types de cancers solides comme le cancer mammaire, colorectal, ou pulmonaire <sup>70,71,73,74</sup>.

Dans plusieurs types de cancers, la liaison de l'acide hyaluronique au CD44 déclenche l'activation de récepteurs clés de la signalisation cellulaire tels ErbB2, EGFR, et TGF-beta R <sup>70,73</sup> (figure 9) . Bien qu'il ne possède pas d'activité catalytique propre, il initie une transduction de signaux par association avec des kinases transmembranaires ou cytosoliques et des protéines linker. Il peut également intervenir dans la voie des Src kinases, de Ras, des MAP kinases et de la voie des PI3K/ Akt aboutissant à une majoration de la prolifération, de la survie, de la motilité, de l'invasion et de la chimiorésistance tumorale <sup>73</sup>. Ce rôle de co récepteur de CD44 semble être lié à sa localisation dans des micro domaines lipidiques (raft).

En complément de son rôle de co-récepteur et de co-activateur membranaire, il renforce les propriétés d'invasion, de motilité et de prolifération tumorale via son association au cytosquelette d'actine.

Les cellules exprimant le CD44 sont souvent des cellules avec des propriétés de cellules souches telles la résistance aux thérapies et de cellules capables de transition épithélio mésenchymateuse (TEM). Il appartient ainsi aux marqueurs les plus reconnus des cellules souches cancéreuses (avec le CD20, CD24, CD34, CD90, CD117, CD133, aldéhyde déshydrogénase). Il permet, par exemple, d'identifier les cellules souches cancéreuses des cancers du sein, du pancréas et du colon <sup>69</sup>. Parmi ses propriétés, le CD44 peut contribuer à l'activation de gènes régulateurs de cellules souches et peut lui même être la cible de ces gènes (voie Wnt, nanog) <sup>70,75</sup>. Concernant son rôle dans la TEM,

des études dans le cancer du sein notamment ont montré que l'inhibition du CD44 par un anticorps spécifique permettait de bloquer l'invasion de cellules cancéreuses mammaires ayant un phénotype de TEM <sup>76</sup>. Plusieurs travaux ont soutenus son rôle dans la résistance à l'apoptose des cellules souches cancéreuses. Certains ont démontré son rôle dans l'activation de certains récepteurs à activité tyrosine kinase tels ErbB2,3,4, MET ou de certaines protéases (MMP7) connus pour leur implication dans la chimiorésistance <sup>70</sup>. D'autres travaux ont montré qu'il pouvait réguler positivement l'inhibiteur de l'apoptose (IAP) et la protéine MDR1 (P-glycoprotein)<sup>75</sup>. Il s'associe ensuite à MDR1 pour le stabiliser et ainsi pourra être responsable de chimiorésistance.



**Figure 11 : Voies de signalisation du CD44 et implication en oncologie, d'après Bryan P. Toole <sup>73</sup>**

Du fait de son implication dans des voies clés de l'oncogenèse démontrée *in vitro* de nombreuses études se sont développées afin de déterminer si le CD44 (ou ses variants) pouvaient être utilisés comme facteur pronostic en clinique. Bien que les

résultats de ces études soient souvent contradictoires, des preuves existent en faveur de son expression dans de nombreuses tumeurs humaines <sup>71</sup>. Dans le cancer colorectal, l'expression de ses variants est de mauvais pronostic (CD44 v6)<sup>77</sup> ainsi que sa co-expression avec un autre marqueur souche, le CD133 <sup>78</sup>. De même il semble associé à la rechute et à un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du rein<sup>79</sup>. Dans d'autres types de tumeurs solides, les résultats des études sont plus contradictoires. Les travaux princeps concernant les tumeurs prostatiques et cérébrales le décrivaient comme un gène suppresseur de tumeur tandis que des publications récentes sont en faveur d'un rôle pro métastatique dans des modèles murins <sup>74</sup>. Concernant le cancer du sein, la revue récente de Louderbough et Schroeder résume bien cette dualité de CD44 avec une expression pouvant être corrélée à devenir favorable comme défavorable<sup>74</sup>. In vitro, il est capable de médier à la fois des signaux pro ou anti tumoraux et in vivo, il inhibe ou favorise la progression métastatique. En comparant les résultats des diverses études réalisées par immunohistochimie sur tumeurs mammaires, les auteurs expliquent les divergences par des séries hétérogènes. Les principales différences sont dues à la population étudiée (stade, sous type histologique et le traitement) et aux techniques utilisées (anticorps divers). Ils suggèrent que l'expression de CD44 est souvent corrélée avec un bon pronostic dans les cancers du sein localisés, porteur alors d'une activité anti tumorale. Au stade avancé (au moins locorégional), le CD44 est souvent surexprimé mais n'est relié à un pronostic défavorable que dans 6 des 11 études analysées ne permettant pas de conclure sur son rôle dans la progression métastatique.

Concernant les cancers ovariens, les résultats sont également très contradictoires selon les publications.

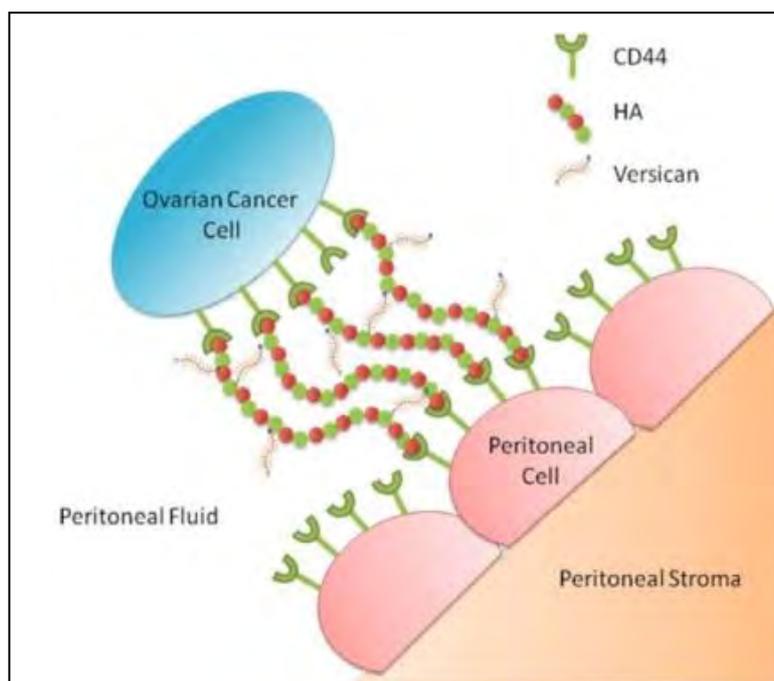
### **3 Dans le cancer de l'ovaire**

L'équipe de Cannistra a effectué des travaux précliniques importants depuis plus de 20ans et a démontré que l'inhibition de CD44 empêchait l'adhésion de cellules tumorales ovariennes (lignées cellulaires) au mésothélium <sup>80</sup>. Leurs données ont été confirmées in vivo sur des modèles murins avec une diminution du nombre d'implants péritonéaux lors de la greffe de cellules tumorales ovariennes en présence d'anticorps antiCD44 <sup>81</sup>. Cependant, lors du transfert de ces données dans des séries cliniques, ils

n'ont pas trouvé de relation entre l'expression du CD44 (standard ou variant) et de la survie (ni par RT-PCR ni par IHC)<sup>82</sup>. Cette étude est rapidement remise en cause par les travaux d'une équipe autrichienne qui corrèle l'expression du CD44v à un pronostic moindre (en termes de survie sans maladie et de survie globale)<sup>83</sup>. A l'inverse, des travaux finlandais impliquant 307 patientes sont en faveur d'un bon pronostic<sup>84</sup>.

Depuis, d'autres études sont parues dans les cancers ovariens mais leurs résultats restent divergents et difficilement comparables (population, sous type histologique, stade, traitement, techniques...) Plusieurs études suggèrent une survie sans progression plus courte pour les patientes porteuses d'une tumeur exprimant le CD44<sup>81,83,85</sup>. D'autres ne retrouvent pas d'effet, telle l'étude princeps de Cannistra<sup>82,86,87</sup>. C'est devant cette hétérogénéité que nous avons voulu étudier ce marquage dans notre série.

Par ailleurs, l'un des versants très intéressant et peu étudié est l'étude de la nature des cellules stromales interagissant avec les cellules ovariennes tumorales exprimant le CD44. En effet, parmi les nombreuses études citées ci-dessus analysant l'expression du CD44, aucune n'a précisé l'expression du CD44 par le stroma alors que nous avons vu son importance (partie2). Le CD44 et l'acide hyaluronique (HA) sont non seulement impliqués dans l'interaction cellules-MEC et donc l'adhésion, mais également les interactions cellules - cellules. Une revue récente décrit les rôles respectifs du versican, de l'acide hyaluronique et du CD44 dans le cancer de l'ovaire<sup>88</sup>. La même équipe a mis en évidence de façon originale une co-localisation ainsi qu'un fort marquage du stroma pour le versican, HA et le CD44 dans les tissus de carcinome séreux ovarien (en comparaison au tissu sain)<sup>89</sup>. Ils ont ensuite proposé un modèle dans le cancer ovarien où les cellules ovariennes cancéreuses exprimant CD44 se lieraient aux cellules péritonéales du stroma exprimant également CD44 via HA et le versican. Les cellules cancéreuses seraient alors protégées des forces mécaniques de la cavité péritonéale et pourraient adhérer fortement aux cellules péritonéales, expliquant ainsi un des mécanismes d'implantation péritonéale (figure 12).



**Figure 12: Modèle d'interaction entre cellules tumorales ovariennes et cellules péritonéales via l'expression du CD44, d'après Ween et al.<sup>88,89</sup>**

En résumé, nous avons pu constater que les cancers ovariens sont généralement considérés comme un cancer de mauvais pronostic, caractérisés par leurs rechutes fréquentes. Ces rechutes sont principalement liées à l'importance de la maladie résiduelle, qui dépend essentiellement de la qualité de la résection chirurgicale et de la chimiosensibilité. Un des objectifs de la recherche des cancers ovariens est donc de mieux comprendre les mécanismes de chimiorésistance, dont ceux médiés par le microenvironnement. Notre équipe de recherche a pu caractériser que certains de ces mécanismes de résistance faisaient intervenir des cellules mésenchymateuses (CA-MSC ou BM-MSC). Nous avons voulu transcrire ces résultats à la clinique et à nos patientes avec l'étude par immunohistochimie de l'infiltration de ces cellules dans des tumeurs résistantes ou sensibles (par un triple marquage CD44, 90 et 73). Des résultats préliminaires obtenus pendant mon master 2 suggéraient un rôle de l'expression stromale de CD44. L'analyse de la littérature ne retrouve que peu de travaux sur cette donnée. En revanche, les données concernant l'expression de CD44 par les cellules tumorales est abondante et discordante. Nous avons donc voulu conduire notre propre étude de l'expression de CD44, tumorale et stromale et son influence sur la survie et la résistance pour les cancers ovariens.

## **PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS**

Nous avons mené cette étude rétrospective afin d'identifier des facteurs prédictifs de chimiorésistance dans le microenvironnement dans des perspectives de cibles thérapeutiques.

### **1 Objectifs :**

#### **1.1 Objectif principal:**

L'objectif de ce travail était de rechercher une corrélation entre l'expression de CD44 au sein du stroma et la chimiorésistance.

#### **1.2 Objectifs secondaires :**

Les objectifs 2<sup>nd</sup> sont la recherche d'autres facteurs pronostiques, notamment clinico biologiques et anatomopathologiques avec l'expression CD44 par la tumeur.

### **2 Matériel et méthodes**

#### **2.1 Patientes**

Quatre-vingt-neuf patientes traitées à l'ICR de janvier 2002 à décembre 2011 par chirurgie première pour un cancer ovarien ou péritonéal primitif ont été incluses. Les patientes ne devaient pas avoir reçu de chimiothérapie en pré opératoire. Elles devaient recevoir une chimiothérapie à base de sels de platine en suivant la chirurgie.

Deux patientes n'ont finalement pas eu de chimiothérapie (complications post opératoire). Quatre patientes ont dues être exclues des analyses pour manque de matériel anatomopathologique. Les analyses ont donc été basées sur 83 patientes.

## 2.2 Recueil des données anatomopathologiques

Tous les cas ont été relus en présence d'une anatomopathe experte en gynécologie (Dr E. Mery) avec la réalisation d'étude immunohistochimique complémentaire en cas de discordance avec le diagnostic initial. Nous avons confirmé ainsi le type histologique et le grade des tumeurs (modification des classifications selon les années). Ainsi, nous avons évalué le degré d'atypies nucléaires ainsi que l'index mitotique (nombre de mitoses évalué au fort grossissement sur 10 champs), afin de classer les adénocarcinomes séreux en haut grade ou bas grade selon la classification du MD Anderson<sup>9</sup>.

## 2.3 Etude immunohistochimique

Lors de la relecture systématique des cas, nous avons sélectionné un bloc (inclusion en paraffine) pour chaque tumeur primitive et un bloc pour des localisations à distance (épiploon si disponible ou autre localisation péritonéale). Pour chacun de ces blocs, des lames blanches ont été ensuite réalisées (épaisseur de coupe de 5µm).

Quatre-vingt patientes ont pu avoir les analyses supplémentaires (les autres ont dû être exclues pour manque de matériel disponible). Parmi elles, 52 (63%) ont pu avoir une double immunohistochimie sur le contingent tumoral primaire et sur une localisation à distance.

Après traitement (Low Flex), les échantillons ont été incubés 30 minutes en présence d'anticorps anti CD44 (anticorps murin dirigé contre l'antigène CD44 humain, clone DF1485, DAKO) à la concentration (1/50<sup>e</sup>) puis révélé par polymère couplé peroxydase.

Le marquage de CD44 a été étudié à la fois au niveau du stroma et des cellules épithéliales tumorales sur la tumeur primitive et sur les localisations à distance (lorsque celles-ci étaient disponibles). Les immunomarquages CD44 du stroma ont été difficiles d'interprétation, notamment pour le pourcentage de cellules marquées. Notre lecture n'a permis de retenir comme seul critère l'intensité de fixation (nulle, faible, modérée, forte de 0 à 3+). L'immunomarquage des cellules carcinomateuses a été semi quantitatif considérant l'intensité de fixation (0 à 3+) mais également le pourcentage de cellules

marquées (0 à 100%). L'IRS (ImmunoReactive Score) a ensuite pu être calculé pour le contingent tumoral selon la formule (intensité marquage X pourcentage de cellules marquées). Nous avons également pris en compte un autre score utilisé pour le recrutement des patients en phase I testant un anticorps thérapeutique dirigé contre le CD44 (« score phase I »).

<b>Score IRS</b>				
<b>Intensité de marquage</b>	<b>Aucune 0 point</b>	<b>Légère 1 point</b>	<b>Modérée 2 points</b>	<b>Forte 3 points</b>
<b>Pourcentage de cellules marquées</b>				
<b>Aucune=0</b>	0	0	0	0
<b>&lt; 10% =1</b>	0	1	2	3
<b>10-50= 2</b>	0	2	4	6
<b>51-80%= 3</b>	0	3	6	9
<b>&gt;80% =4</b>	0	4	8	12

**Tableau 4 : Définition du score IRS . Score positif >2 (cases grisées)**

L'IRS est considéré comme positif quand il est > 2 (tableau 4 ci-dessus)

<b>Score phase I</b>		
<b>Intensité de marquage</b>	<b>score</b>	<b>positivité</b>
<b>Aucune=0</b>	0	non
<b>1+ dans &lt; 30% cellules</b>	1 (focal)	non
<b>1+ dans &gt; 30% cellules</b>	1	oui
<b>2 ou 3+ dans &lt; 30% cellules</b>	2 (focal)	oui
<b>2+ dans &gt; 30% cellules</b>	2	oui
<b>3+ dans &gt; 30% cellules</b>	3	oui

**Tableau 5 : Définition du score phase I**

Notre série s'étendant des années 2002 à 2011, plusieurs fixateurs ont été utilisés : de l'AFA jusqu'en aout 2007, suivi de RCL2 (formol free) jusqu'en novembre 2010 puis de formol tamponné 10% toujours utilisé actuellement.

## 2.4 Analyse de la chimiorésistance

Les patientes ont été classées en différents groupes en accord avec les recommandations du NCCN (National Comprehensive Cancer Network) de 2013<sup>34</sup>. La définition de la chimiorésistance retenue a été l'intervalle <6 mois entre la rechute et le dernier cycle de chimiothérapie par platine.

Les patientes ont été classées en plusieurs sous-groupes : réfractaires, résistantes, intermédiaires, sensibles ou indemnes de rechute.

## 2.5 Analyse statistique

### 2.5.1 Critère de jugement

La date d'origine pour définir les délais de survie est la date de diagnostic.

Le diagnostic de rechute et la réponse au traitement sont basés sur les critères biologiques (ascension CA125 selon les critères GCIG), critères RECIST ou sur les données anatomopathologiques <sup>90</sup>.

Les patientes avec progression pendant la chimiothérapie ou dans les 6 mois suivant le dernier cycle ont été considérées comme résistantes <sup>91</sup>.

**La survie globale (SG)** est définie par le décès toutes causes confondues. Elle correspond au délai entre la date d'origine et le décès, ou la date de dernières nouvelles (données censurées).

**La survie sans rechute (SSR)** est définie par les récurrences locales, lymphatiques et les métastases à distance. Elle correspond au délai entre la date d'origine et la date du premier événement selon la définition, et la date de dernières nouvelles (Données Censurées).

## 2.5.2 Méthodes statistiques

### 2.5.2.1 Partie descriptive

Les variables qualitatives seront présentées pour la population globale: nombre de données manquantes, nombre et pourcentage pour chaque modalité de la variable. Les données quantitatives seront présentées pour la population globale ou par groupe de la façon suivante : nombre de données manquantes, moyenne, variance, écart-type, minimum, maximum, médiane, quartiles.

L'accord entre les données prises sur la tumeur primaire et les métastases (épiploon ou péritoine) sera testé à l'aide du Kappa. L'accord observé entre des variables qualitatives résulte de la somme d'une composante «aléatoire» et d'une composante d'accord «véritable». La qualité de l'accord réel entre des jugements qualitatifs appariés sera chiffrée en utilisant le coefficient du Kappa. L'interprétation du coefficient de Kappa peut être faite selon le tableau suivant :

$\kappa$	Interpretation
< 0	Désaccord
0.0 — 0.20	Accord très faible
0.21 — 0.40	Accord faible
0.41 — 0.60	Accord modéré
0.61 — 0.80	Accord fort
0.81 — 1.00	Accord presque parfait

Pour tester la stabilité du coefficient une méthode bootstrap sera utilisée. Un intervalle de confiance à 95% sera aussi donné.

### 2.5.2.2 Survie

Les données de survie sont résumées par la méthode Kaplan-Meier et présentée pour la population globale puis par groupe avec les intervalles de confiance à 95%.

## 3 Résultats

### 3.1 Description de la population

La population de notre étude est assez représentative des patientes suivies pour un cancer ovarien (tableau 6). L'âge médian au diagnostic est de 59.5 ans, avec pour l'ensemble des patientes en bon état général. Vingt-deux d'entre elles ont bénéficié d'une consultation d'oncogénétique, avec 13 cas (14%) de mutation BRCA. Ce taux un peu plus élevé que dans la littérature, avec un effet « centre » possible. Il s'agissait de patientes en bon état général (97% présentant un score OMS 0 ou 1 et un score ASA I ou II).

<b>Population globale n=83</b>	
<b>Age</b>	
médian(Range)	59.5 (16.0: 84.0)
nd	1
<b>Score OMS</b>	
0	51 (73,9%)
1	16 (23,2%)
2	2 (2,9%)
nd	14
<b>IMC</b>	
median (Range)	23.2 ( 17.0: 37.9)
nd	6
<b>Atcd personnels cancer sein :</b>	
Non	68 ( 82.9%)
Oui	14 ( 17.1%)
nd	1
<b>Atcd familiaux cancer sein :</b>	
Non	50 ( 69.4%)
Oui	22 ( 30.6%)
nd	11
<b>Atcd familiaux cancer ovarien :</b>	
Non	62 ( 86.1%)
Oui	10 ( 13.9%)
nd	11

**Tableau 6 : Description de la population**

### 3.2 Caractéristiques tumorales :

Soixante-six patientes (soit 79,5%) ont été diagnostiquées à un stade locorégionalement évolué III ou IV (tableau 7). Les tumeurs sont principalement de type séreux de haut grade (63 patientes) soit 75,9% avant relecture. Après relecture et grading selon le MD Anderson, on ne retrouve que 58 tumeurs séreuses de haut grade (soit 71,6%). On rappelle que les sous types mucineux, les tumeurs borderline et les tumeurs germinales ont été exclues de cette étude en raison des voies d'oncogénèse et de leur pronostic différents.

Population totale n=83		
Stade FIGO		
<b>I</b>	10 (12.0%)	
<b>II</b>	7 (8.4%)	
<b>III</b>	60 (72.3%)	
<b>IV</b>	6 (7.3%)	
Type histologique	Avant relecture	Après relecture
<b>Séreux bas grade</b>	4 (4.8%)	10 (12,3%)
<b>Séreux haut grade</b>	63 (75.9%)	58 (71,6%)
<b>Endométrioïde</b>	7 (8.4%)	6 (7,4%)
<b>Cellules Claires</b>	6 (7.2%)	6 (7,4%)
<b>Autres (mixtes)</b>	3 (3.6%)	3 (3,6%)

**Tableau 7 : Caractéristiques anatomopathologiques**

### 3.3 Type de traitement reçu

#### Chirurgie :

Toutes les patientes ont eu une chirurgie première. Cinquante-trois (63,9%) ont pu avoir une évaluation cœlioscopique préalable afin de juger la résecabilité. Près de la moitié des patientes (n=41) avait de l'ascite au diagnostic. La chirurgie a été considérée comme optimale pour 77 patientes ; 66 (79,5%) sans aucun résidu, 11 avec des résidus infra centimétriques et 6 avec des résidus supra centimétriques. Considérant le type de chirurgie, il s'agissait de chirurgie majeure avec une splénectomie réalisée dans 13,3% des cas, des résections digestives dans 47% ainsi que 30% de résections de coupoles

diaphragmatiques. L'obtention d'une chirurgie optimale a également nécessité une pancréatectomie pour 4 patientes.

### **Chimiothérapie :**

La majorité des patientes (68 soit 81,9%) ont reçu 6 cycles (1-9) de carboplatine taxol. Huit patientes ont été traitées par voie intrapéritonéale (cisplatine et taxol) avec une médiane de 5 cycles. Les 11 autres ont toutes reçues une chimiothérapie à base de platine. Quatre d'entre elles ont reçu du carboplatine associé au docetaxel du fait de contre-indications neurologiques (n=3) ou du diagnostic concomitant d'une double pathologie mammaire et ovarienne (n=1). Six autres ont été traitées par du carboplatine en monothérapie à cause de leur âge ou de leur comorbidité. La dernière patiente a eu du carboplatine VP16 devant le sous type histologique (à petites cellules). On peut également noter que 7 patientes ont bénéficié d'une association à du bevacizumab dans le cadre d'essais (ROSIA, OCTAVIA).

## **3.4 Données immunohistochimiques :**

### **3.4.1 Description CD44**

<b>Type de matériel (n=83)</b>	
Tumeur primaire seule	24 (28.9%)
Epiploon seul	2 ( 2.4%)
Peritoine seul	2 ( 2.4%)
Tumeur primaire + epiploon	42 (50.6%)
Tumeur primaire + peritoine	10 (12.0%)
Matériel non exploitable	3 ( 3.6%)

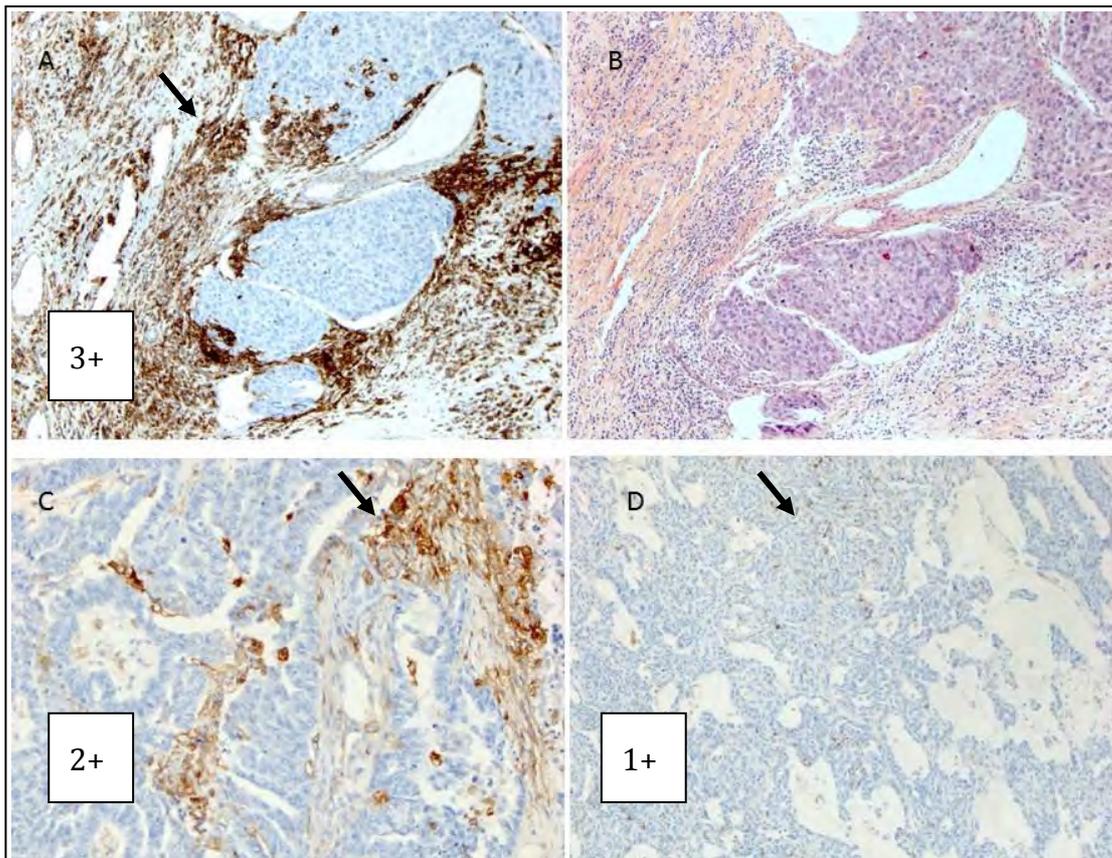
**Tableau 8 : Localisation du matériel anatomopathologique disponible pour analyse IHC**

Quatre-vingt patientes ont un matériel histologique disponible pour la recherche du marqueur CD44 dont 76 sur de la tumeur primaire et 52 sur l'association tumeur primitive et métastase (tableau 8). Nous avons cherché à étudier le marquage CD44 à la fois sur la tumeur primaire et les métastases, en intensité de fixation et de pourcentage de cellules marquées. Le pourcentage médian de cellules carcinomateuses marquées est de 10% (0-90%) pour les tumeurs primaires ou les localisations épiploïques. Il n'est que de 7,5% (0-50%) pour les 12 localisations péritonéales. Nous n'avons pas réussi à

mesurer un pourcentage de cellules marquées pour le stroma (plus difficile de lecture) et les résultats ne seront donc donnés que pour la variable intensité.

### 3.4.2 CD 44 « stromal »

Nous avons considéré d'après les quelques données de la littérature sur le marquage du stroma, la positivité du CD44 quand l'intensité était  $\geq$  à 2+ (figure 13).



**Figure 13 : Marquage stromal de CD44 par IHC . A : marquage stromal 3+ (fort) grossissement X10, B :HES patiente 26, C : stroma 2+, D : stroma 1+**

Le récepteur CD44 stromal est considéré comme surexprimé chez 32 patientes (41,6%) dans les tumeurs primaires analysées contre 32 (72,7%) dans l'épiploon et 7 (58,4%) dans le péritoine. Il semble donc que le CD44 soit davantage surexprimé dans le stroma des localisations à distance notamment les localisations épiploïques (tableau 9).

Intensité du CD44 : Cellules « stromales » (n=80)		
<b>Tumeur primaire (n= 76)</b>		
0	4 ( 5.3%)	<i>Marquage négatif</i>
1+	40 ( 52.6%)	44 (57,9%)
2+	24 ( 31.6%)	<i>Marquage positif</i>
3+	8 ( 10.5%)	32 (42,1%)
<b>Épiploon (n= 44)</b>		
0	0	<i>Marquage négatif</i>
1+	12 ( 27.3%)	12 (27,3%)
2+	25 ( 56.8%)	<i>Marquage positif</i>
3+	7 ( 15.9%)	32 (72,7%)
<b>Péritoine (n= 12)</b>		
0	2 ( 16.7%)	<i>Marquage négatif</i>
1+	3 ( 25.0%)	5 (41,7%)
2+	2 ( 16.7%)	<i>Marquage positif</i>
3+	5 ( 41.7%)	7 (58,4%)

Tableau 9 : Intensité du CD44 pour les cellules « stromales » selon leur localisation (tumeur primaire, épiploon ou péritoine)

### 3.4.3 CD44 des cellules carcinomateuses

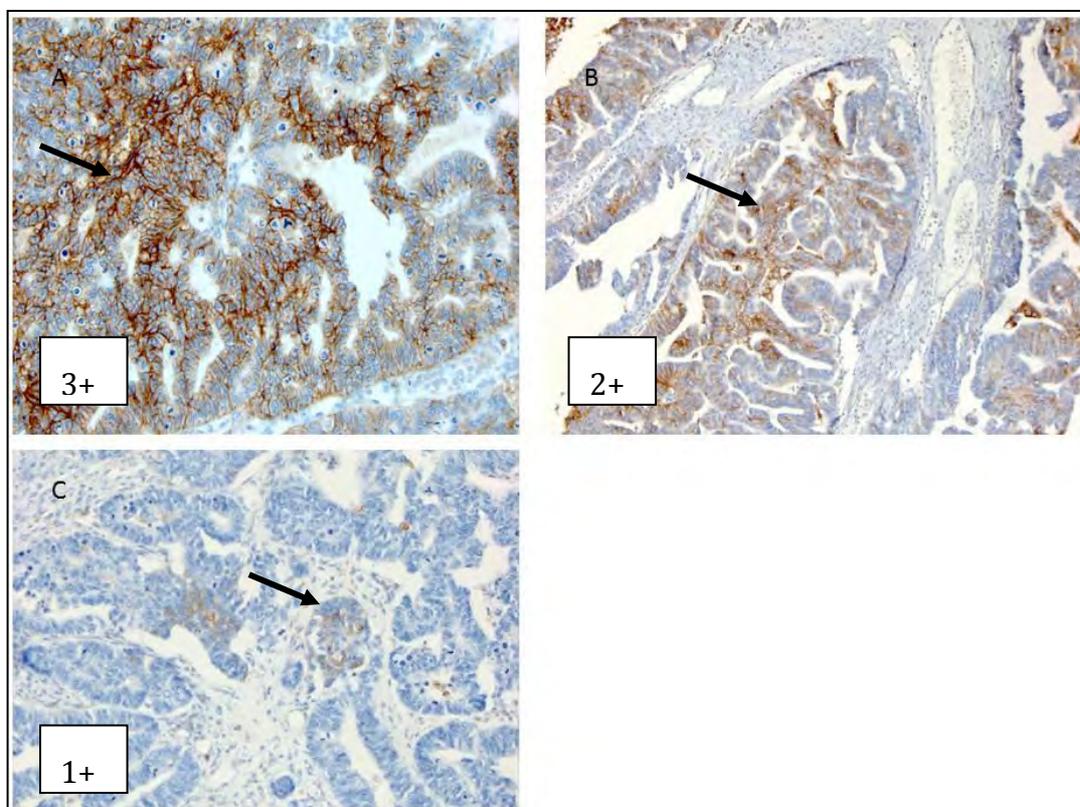


Figure 14: Marquage CD44 cellules carcinomateuses (X 20) ; A : intensité 3+, B : 2+, C : 1+

Pour la composante des cellules carcinomateuses, nous avons effectué 2 scores semi quantitatifs basés sur l'intensité et le pourcentage de marquage afin d'affiner nos 1ères données. Les résultats sont très similaires entre eux et à ceux obtenus à l'aide de l'intensité seule. On retrouve une sur expression du CD44 au niveau de la tumeur primaire et l'épiploon dans près de 45% des cas pour le score phase I contre 36,8% pour la tumeur primaire, 34% pour l'épiploon et 25% pour le péritoine en se basant sur le score IRS (tableau 10).

<b>SCORE CD44 cellules carcinomateuses</b>			
<b>Score Phase I</b>		<b>Score IRS</b>	
Tumeur primaire (n= 76)			
Négatif	42 ( 55.3%)	Négatif	48 ( 63.2%)
Positif	34 ( 44.7%)	Positif	28 ( 36.8%)
Epiploon (n= 44)			
Négatif	24 ( 54.5%)	Négatif	29 ( 65.9%)
Positif	20 ( 45.5%)	Positif	15 ( 34.1%)
Péritoine (n= 12)			
Négatif	9 ( 75.0%)	Négatif	9 ( 75.0%)
Positif	3 ( 25.0%)	Positif	3 ( 25.0%)

**Tableau 10 : SCORE CD44 cellules carcinomateuses**

#### 3.4.4 Concordance entre les données CD44 selon la localisation (primaire ou à distance)

Pour 52 de nos patientes, le matériel était disponible à la fois pour la tumeur primitive et les localisations à distance. Nous avons voulu tester si ces 2 localisations présentaient le même comportement vis-à-vis du CD44.

### 3.4.4.1 En terme d'intensité sur le stroma

Concordance marquage stromal			
Primitif	Métastase		
Intensité	intensité		
	Négatif	positif	total
Négatif	13	18	31
Positif	2	19	21
Total	15	37	52

Tableau 11 : Concordance du marquage CD44 stromal selon le site (en intensité de fixation)

La concordance entre le marquage de CD44 entre tumeur primitive et à distance est faible (Kappa (95% CI) = **0.289** (0.084 - 0.493) (tableau 11).

Cela concorde avec l'impression lors de la lecture immunohistochimique d'une grande hétérogénéité de l'expression de CD44 au sein du stroma avec pour une même tumeur des zones sur exprimant fortement ce marqueur alors que d'autres ne l'expriment pas.

### 3.4.4.2 En terme de marquage des cellules carcinomateuses

Le degré de corrélation entre marquage de la tumeur primitive et des localisations à distance est plus fort pour la composante épithéliale (que du stroma). Lors de l'analyse de l'intensité, la corrélation est modérée et devient forte lors de l'utilisation du score de phase I (tableaux 12 et 13).

<b>Concordance marquage cellules carcinomateuses (intensité)</b>			
<b>Primitif</b>	<b>Métastase</b>		
<b>Intensité</b>	<b>intensité</b>		
	<b>Négatif</b>	<b>positif</b>	<b>total</b>
<b>Négatif</b>	27	4	31
<b>Positif</b>	6	15	21
<b>Total</b>	33	19	52

L'accord est modéré (Kappa (95% CI) = **0.594** (0.370 - 0.818))

**Tableau 12 : Concordance du marquage CD44 des cellules carcinomateuses selon le site (intensité)**

### **3.4.4.3 En terme de scores IRS ou phase I**

<b>Concordance marquage cellules carcinomateuses (scores)</b>						
<b>Primitif</b>	<b>Métastase</b>					
<b>score</b>	<b>Score IRS</b>			<b>Score phase I</b>		
	<b>Négatif</b>	<b>Positif</b>	<b>total</b>	<b>Négatif</b>	<b>positif</b>	<b>total</b>
<b>Négatif</b>	31	5	36	27	4	31
<b>positif</b>	5	11	16	5	16	21
<b>total</b>	36	16	52	32	20	52
<b>Kappa 95% (IC)</b>	<b>0.549 (0.302 - 0.795)</b>			<b>0.638 (0.423 - 0.852)</b>		
<b>Accord</b>	<b>modéré</b>			<b>fort</b>		

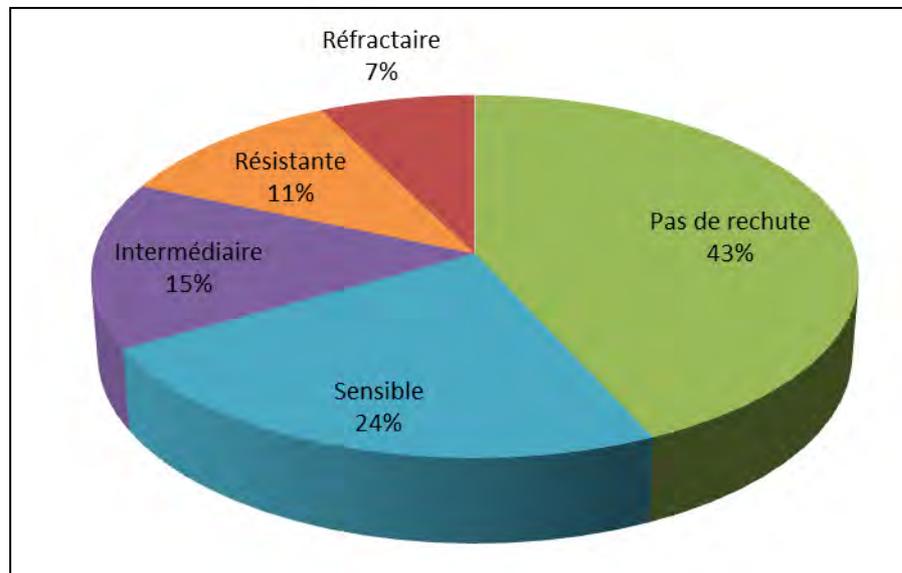
**Tableau 13 : Concordance du marquage CD44 des cellules cancéreuses selon le site (score IRS et phase I)**

La surexpression de CD44 est davantage homogène et comparable dans la composante carcinomateuse, surtout lorsqu'elle est évaluée par le score « phase I ».

## 3.5 Survie

### 3.5.1 Survie sans récidive :

Le suivi médian est de 51,7 mois [38.87;59.89] : 46 patientes (57%) ont présenté une récidive, dont 15 (18%) dans les 6 mois suivant la fin de leur chimiothérapie. Ces 15 patientes ont été considérées comme réfractaires ou résistantes (figure 15). La survie sans récidive médiane est de 26,34 mois. Deux patientes dont le suivi est inférieur à 6 mois ont donc dû être exclues de notre analyse. Les analyses de survie se feront par la suite sur 81 patientes (15 ayant rechuté précocement et 66 sans récidive ou avec des rechutes après 6 mois).



**Figure 15: Répartition des patientes selon leur devenir et leur sensibilité au platine (n=81)**

### 3.5.2 La survie globale :

La survie globale médiane est de 51,35 mois. En date des dernières nouvelles, 38 patientes (45,8%) sont décédées dont 35 de leur cancer ovarien.

## 3.6 Chimiorésistance et CD44

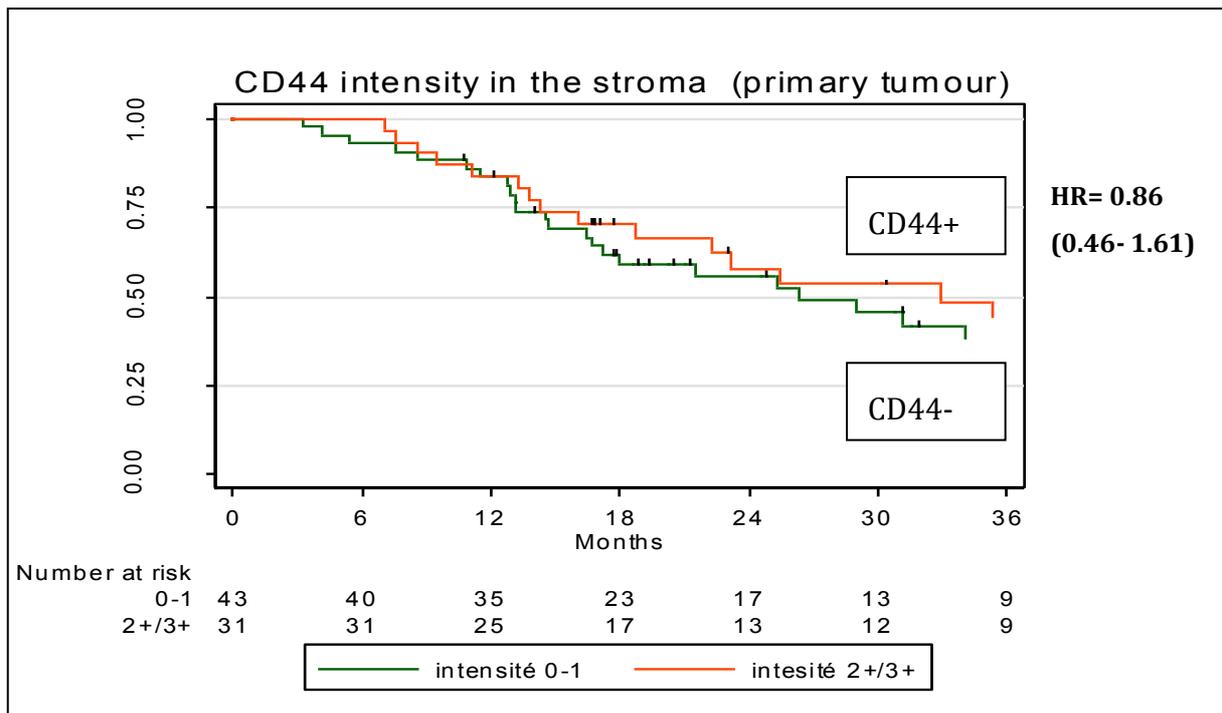
### 3.6.1 CD44 des cellules stromales

Notre hypothèse principale est que les tumeurs sur exprimant le CD44 au niveau du stroma sont enrichies en MSC et présentent une chimiorésistance supérieure à celles pauvres en CD44 du stroma. Nous avons donc voulu tester cette hypothèse par deux méthodes. Nous avons d’abord comparé les deux groupes (celui des tumeurs dites résistantes avec celui des patientes n’ayant pas rechuté ou après 6 mois) en terme de marquage CD44. Les résultats ne confirment pas notre hypothèse et ne mettent pas en évidence de différence significative entre les 2 groupes, ni sur la tumeur primaire ni sur la métastase (tableau 14).

<b>Sensibilité platine selon le marquage CD44 « stromal »</b>			
	Pas de rechute ou rechute >6 mois (n=66)	Rechute <6 mois (n=15)	
<b>Intensité sur le stroma de la tumeur primaire (n=74)</b>			p= 0.7316
<b>Négatif</b>	36 ( 59.0)	7 ( 53.8)	
<b>Positif</b>	25 ( 41.0)	6 ( 46.2)	
<b>Intensité sur le stroma de la métastase (n=55)</b>			p = 0.3263
<b>Négatif</b>	10 ( 25.0)	6 ( 40.0)	
<b>Positif</b>	30 ( 75.0)	9 ( 60.0)	

**Tableau 14 : Sensibilité au platine selon le marquage CD44 « stromal »**

Dans notre cohorte, l’intensité du CD44 stromal n’est pas un facteur prédictif de rechute avec des courbes de Survie sans progression superposables et un HR à 0,86 (0,46-1,61) (figure 16).



**Figure 16 : Survie sans progression selon l'intensité de CD44 dans le stroma**

### 3.6.2 CD 44 des cellules carcinomateuses

Parmi nos objectifs secondaires, nous voulions rechercher l'impact du marquage CD44 des cellules carcinomateuses sur la résistance et le pronostic. L'analyse de la littérature montre que la surexpression de CD44 est un facteur de mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers solides ou hématologiques via le marquage de cellules souches tumorales.

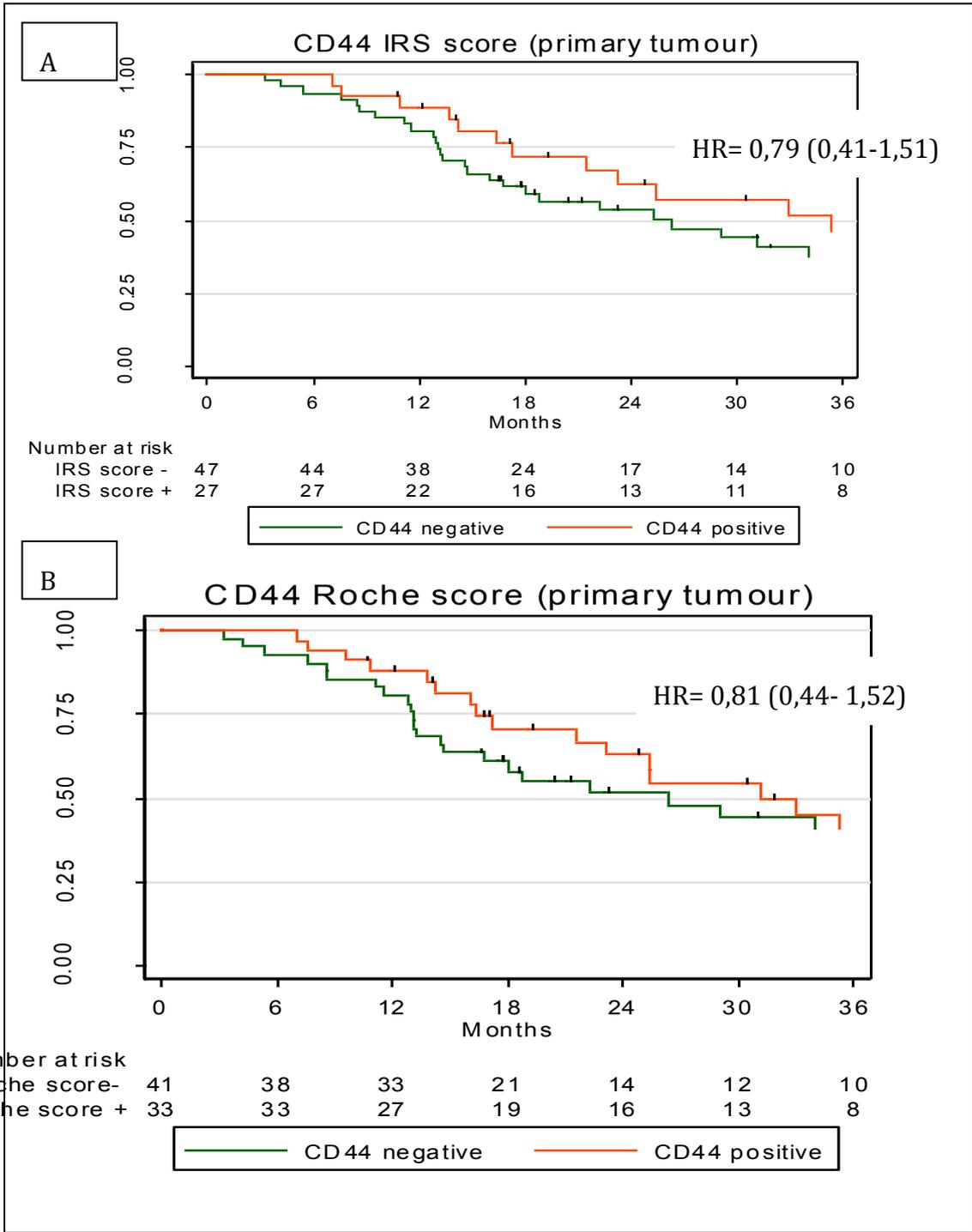
Nous avons donc comparé nos deux sous-groupes pour le marquage tumoral avec les deux scores précédemment décrits. Là encore, la différence entre les deux sous-groupes n'apparaît pas significative avec 60,7% des tumeurs chimiosensibles CD44 négatives mais seulement 23,1% des tumeurs chimiorésistantes CD44 positives (tableau 15). Les résultats sont identiques avec les deux scores, pour la tumeur primaire ou les localisations à distance.

<b>Sensibilité platine selon le marquage CD44 tumoral</b>			
	pas Rechute ou >6 mois n=66	Rechute <6 mois n=15	
<b>CD44 IRS score évalué sur la tumeur primaire</b>			p = 0.3510
<b>Négatif</b>	37 ( 60.7)	10 ( 76.9)	
<b>Positif</b>	24 ( 39.3)	3 ( 23.1)	
<b>CD44 IRS score évalué sur la métastase</b>			p = 1.0000
<b>Négatif</b>	27 ( 67.5)	10 ( 66.7)	
<b>Positif</b>	13 ( 32.5)	5 ( 33.3)	
<b>CD 44 phase I évalué sur la tumeur primaire</b>			p = 0.2694
<b>Négatif</b>	32 ( 52.5)	9 ( 69.2)	
<b>Positif</b>	29 ( 47.5)	4 ( 30.8)	
<b>CD 44 phase I évalué sur la métastase</b>			p = 1.0000
<b>Négatif</b>	24 ( 60.0)	9 ( 60.0)	
<b>Positif</b>	16 ( 40.0)	6 ( 40.0)	

**Tableau 15: Sensibilité au platine selon le marquage CD44 des cellules carcinomateuses**

De façon similaire, les courbes de SSP sont superposables avec un HR= 0,79 (0,41-1,51) pour le score IRS (figure 17 A).

En conclusion, dans notre série, aucun des deux scores n'est ni discriminant pour la sensibilité au platine, ni pronostic pour la rechute (figure 17, tableau 15).



**Figure 17 : Survie sans progression selon le marquage CD44 exprimé par les cellules tumorales épithéliales selon score IRS (A) et score phase I (B)**

### 3.7 Facteurs clinico-biologiques

Parmi nos objectifs, nous voulions rechercher l'existence d'autres facteurs pronostiques, en particulier clinico biologiques.

Nous avons réalisé une première analyse univariée qui indique une corrélation entre pronostic et un état général altéré (OMS  $\geq 1$ ), un IMC  $> 25$ , la présence de résidus chirurgicaux, un stade avancé (FIGO III-IV), un volume d'ascite  $\geq 500$  ml (tableau 16).

	Evènements/N	HR (ic 95%)	
<b>OMS</b>			<b>p = 0.0018</b>
0	23/51	1	
1-2	15 /18	2.76 [ 1.42; 5.37]	
<b>IMC</b>			<b>P=0,0015</b>
<25	42/74	1	
>25	3/3	5,74 (1,7-19,39)	
<b>Résidus</b>			<b>P&lt;0,0001</b>
aucun	31/66	1	
R1/R2	15/17	4,85 (2,56-9,21)	
<b>FIGO</b>			<b>P=0,0002</b>
I-II	2/17	1	
III-IV	44/66	9,16 (2,21-37,91)	
<b>Volume d'ascite au diagnostic</b>			<b>P=0,0133</b>
<500ml	16/35	1	
$\geq 500$ ml	14/22	2,43 (1,18-5,03)	

**Tableau 16 : Etude de facteurs clinico-chirurgicaux-biologiques comme facteurs pronostiques**

En revanche, notre série ne permet pas de mettre une différence selon le taux initial de CA 125, de la lymphocytose, de la thrombocytose, l'existence d'une anémie ou du pourcentage de perte de poids.

En analyse multi variée, les deux seules variables significatives indépendantes sont l'IMC et les résidus tumoraux.

### 3.8 Sous population des patientes stade avancé, III IV avec un adénocarcinome séreux de haut grade

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les cancers ovariens peuvent être très différents et nous avons voulu effectuer les mêmes analyses sur le sous-groupe le plus fréquent et de pronostic le plus sévère, celui des adénocarcinomes séreux de haut grade, pris en charge à un stade avancé.

La population reste semblable avec 51 patientes, d'âge médian 60 ans (38-84), d'IMC médian de 23,4 (17-37,9), principalement OMS 0 ou 1 pour 95,2% d'entre elles. Concernant les antécédents personnels: 15,7% avaient des antécédents personnels de cancer du sein. Sur les facteurs de risque familiaux, 11,1% avaient des antécédents de cancer ovarien et 31,1% des antécédents de cancer du sein.

L'étude du CD44 a été effectuée sur l'ensemble de ces patientes, avec 50 analyses possibles sur la tumeur primaire et 40 sur le couple tumeur primaire et localisation à distance (tableau 17).

<b>Localisation tumorale (Type de bloc)</b>	
Tumeur primaire	10 (19.6%) ;
Épiploon	1 (2.0%)
Tumeur primaire + épiploon	33 (64.7%)
Tumeur primaire + péritoine	7 (13.7%)
<b>Score IRS CD44 évalué sur la tumeur primaire</b>	
Négatif	37 (74.0%)
Positif	13 (26.0%)
<b>Score CD44 phase I évalué sur la tumeur primaire</b>	
Négatif	32 (64.0%)
Positif	18 (36.0%)
<b>Intensité évalué sur le stroma de la tumeur primaire</b>	
Négatif	25 (50.0%)
Positif	25 (50.0%)

**Tableau 17 : Données pour la sous-population des carcinomes séreux, haut grade de stade évolué.**

De façon attendue, la médiane de survie sans récurrence est inférieure dans ce sous-groupe de moins bon pronostic, avec une estimation de 25,33 mois (versus 26,34 mois). La survie globale médiane est de 47,11 mois (versus 51,35).

Là encore, la surexpression du CD44 n'est pas significativement différente selon le sous-groupe chimiorésistant ou non et ne semble pas modifier la SSP.

Le seul facteur pronostic retrouvé est celui indiscutable du résultat de la chirurgie avec une meilleure survie chez les patientes sans aucun résidu visible.

## 4 DISCUSSION

### 4.1 Caractéristiques générales de la cohorte :

Nos données sont conformes aux données de la littérature avec une majorité de patientes présentant des carcinomes séreux papillaires de haut grade (71,6% après relecture), diagnostiqués à un stade avancé (79,5%)<sup>34</sup>.

Les données concernant la survie globale et la survie sans progression sont également en concordance avec les études publiées. La survie sans récurrence médiane est de 26,3 mois avec 51,7 mois de suivi médian, ce qui est plutôt une bonne moyenne pour des patientes traitées de 2002 à 2011<sup>27</sup>. La survie globale médiane est à peine supérieure à 4 ans (51,7 mois), ce qui est dans les normes depuis le traitement par platine et taxanes.

Le taux retrouvé de 18,5% pour les patientes réfractaires ou résistantes est comparable aux autres séries (autour de 25% pour des stades évolués (III-IV))<sup>91</sup>.

### 4.2 Marquage CD44 et pronostic

Nos travaux ont été exhaustifs, avec l'une des rares séries comparant l'expression de la tumeur ovarienne à une autre localisation péritonéale à distance.

L'originalité de ce travail est l'étude du marquage stromal de CD44. La littérature concernant son expression par le microenvironnement tumoral reste très restreinte. Or on connaît le rôle du CD44 dans les interactions cellules/cellules et cellules/matrice extracellulaire. Bien qu'il soit principalement utilisé pour son marquage des lymphocytes, macrophages, il est également connu pour marquer les lignées des cellules souches mésenchymateuses et des fibroblastes. Toutes ces cellules peuvent être modifiées au sein de la tumeur et lui venir en soutien (par développement de la prolifération, d'accroissement de son potentiel métastatique ou encore de l'acquisition d'une chimiorésistance).

#### 4.2.1 Marquage des cellules stromales

Très peu de travaux ont étudié l'expression de CD44 par les cellules stromales, se focalisant sur les cellules tumorales. Nous avons pu mettre en évidence :

- que les cellules stromales expriment également CD44 (taux de tumeurs primaires positives 41,6%)
- que l'expression de CD44 entre tumeur primitive et métastase est faiblement corrélée. On a l'impression d'une plus forte expression au niveau épiploïque notamment.

Parmi les quelques équipes s'étant déjà intéressées à ce sujet, l'équipe de Ween a décrit un marquage fort du CD44 par les cellules du stroma dans des cancers ovariens en comparaison à des adénomes ovariens ou du tissu ovarien sain <sup>88</sup>. Son rôle pronostic n'était pas recherché dans cette étude.

Une étude plus ancienne s'est appliquée à évaluer le CD44 (isoforme CD44s ou CD44v) au niveau primitif et métastatique à la fois sur le stroma et sur la tumeur. Leur analyse suggère que l'expression de CD44s par le stroma tumoral est associée à une survie prolongée ( $p < 0,0001$ ) indépendamment de son site d'expression (primitif ou métastatique). Cependant, en analyse multi variée, seul le CD44-v10 reste un facteur pronostic indépendant. Il a la particularité d'être corrélé à un bon pronostic lors de son expression sur le site primitif (où il faciliterait l'adhésion et empêcherait la dissémination péritonéale). A l'inverse, sa ré expression au niveau des métastases est un facteur prédictif important de mauvais pronostic (croissance des implants métastatiques par adhésion des cellules entre elles ?) <sup>87</sup>. Cependant, des données sont manquantes. Les auteurs ne décrivent pas les traitements réalisés après ou avant la chirurgie (pourcentage de chimiothérapie ?). De plus, la méthode de calcul du score et de la positivité n'est pas précisée pour la composante stromale. Le pourcentage de positivité de l'expression stromale n'est pas publié non plus, rendant difficile la comparaison avec notre étude.

Ces constatations peuvent être expliquées par plusieurs hypothèses. Le CD44 est un marqueur ubiquitaire. D'autres auteurs ont précisé que leurs résultats avaient pu être gênés par la réaction inflammatoire lymphocytaire, fortement marquée par le CD44<sup>84</sup>. Nous avons nous aussi constaté l'intense marquage lié à la présence de cellules immunitaires, lymphocytes ou macrophages au sein du stroma, souvent présents au niveau épiploïque. Le CD44 stromal n'est donc probablement pas un bon marqueur pronostic, de par son manque de spécificité. Son marquage de cellules inflammatoires

anti tumorales comme certains macrophages (M1) ou lymphocytes pourraient marquer un microenvironnement plutôt défavorable à la progression tumorale et donc signer un bon pronostic. Alors que son marquage de cellules de type mésenchymateuses et fibroblastiques ou immunitaires mais pro tumorales (macrophages M2, lymphocytes) seraient de mauvais pronostic.

#### 4.2.2 Marquage des cellules carcinomateuses

Nos données concernant le marquage de CD44 sont en accord avec les travaux antérieurs avec une positivité globale de 44,7% (ou de 36,8%) selon le score utilisé, phase I ou IRS pour la tumeur primitive. L'analyse de la littérature retrouve un pourcentage très variable selon les travaux avec une positivité allant de 23 à 91% (tableau 18 pour synthèse).

Nos résultats démontrent que l'expression du CD44 (après utilisation de 2 scores différents) n'apparaît corrélé ni à la SSP ni à la chimiorésistance. C'est l'une des rares études ayant appliqué deux scores avec un seuil de positivité établi dès le départ et non sur le calcul du score médian.

Comme nous l'avons vu en introduction, d'autres études ont déjà cherché à évaluer l'expression du CD44 tumoral et le pronostic dans les cancers ovariens avec des résultats divergents<sup>82-87,92-94</sup>. Ces études sont difficiles à comparer et les résultats difficiles à extrapoler car elles sont pour la plupart rétrospectives, avec des techniques de score différentes pour l'immunohistochimie, des populations étudiées hétérogènes (type histologique, stade, traitement reçu). Notre série reste cependant cohérente avec les précédentes. Nos résultats sont similaires à ceux publiés par d'autres équipes qui ne retrouvent pas d'effet de CD44 sur la survie globale ou la survie sans progression en analyse multi variée <sup>82,86,87,92,93</sup> ( tableau 18).

**Les populations** étudiées sont aussi hétérogènes selon les travaux : par exemple, la large cohorte finlandaise de Sillanpaa, indiquant le CD44 comme facteur de bon pronostic (survie sans récurrence à 5 ans de 70% vs 34%) ne comporte que 36% de carcinomes séreux, ce qui ne correspond pas à la réalité clinique <sup>84</sup>. Parmi les autres sources de confusion, les traitements ne sont pas systématiquement précisés <sup>83,85,86,94</sup>. Les travaux de Kayastha, le corrélant à un mauvais pronostic (survie globale de 24 vs 48

mois) sont difficilement transposables à nos patientes car ils excluaient les patientes recevant de la chimiothérapie adjuvante, alors que 87% de ces patientes présentaient un cancer ovarien de stade au moins régionalement évolué <sup>85</sup>. Notre série ne concernait que des patientes en 1<sup>ere</sup> ligne thérapeutique, primo traitées par chirurgie et donc considérées comme chimio naïves sur les pièces étudiées. Cela nous permettait d'avoir une série plus pure, non biaisée par les remaniements de la chimiothérapie. On pouvait donc particulièrement étudier les phénomènes de résistance primaire des patientes rechutant dans les 6 mois après la fin du primo traitement.

Par ailleurs, les études sur le CD44 par *technique* d'immunohistochimie sont difficilement comparables car les *anticorps* utilisés sont différents, et pratiquement toutes les études définissent leur propre *score de positivité du CD44*. Le « cut off » pour la positivité du CD44 est très variable et souvent déterminé après lecture, en choisissant sa valeur médiane, sans validation secondaire. Ces différences majeures méthodologiques peuvent expliquer les conclusions divergentes des études impliquant le CD44, aucune recommandation n'étant établie pour l'heure. Nous avons choisi de nous baser sur 2 scores de référence utilisés en oncologie pour diverses tumeurs et marquage (IRS) ainsi qu'un score utilisé pour l'inclusion de nos patients en phase I. Nous avons pu constater que le marquage (intensité et pourcentage de positivité) est très hétérogène au sein d'une même tumeur. Cela peut aussi restreindre les résultats des études sur TMA concernant ce marqueur.

Certaines études présentent des faiblesses *statistiques*, avec l'absence de présentation des résultats en analyse multi variée (ou la négativité du marquage de CD44 lors ces analyses). L'étude de Chen, novatrice par ses résultats (co-expression de CD44 et de MDR1 notamment) associant le CD44 à un mauvais pronostic reste critiquable car beaucoup de données ne sont pas publiées, notamment, l'analyse multi variée concernant le pronostic. Les auteurs concluent à une corrélation entre progression et expression de CD44. Mais les tumeurs exprimant le CD44 sont également celles de stades plus avancés, de plus haut grade, et avec un résidu tumoral plus important. Ces facteurs étant également pronostiques, une analyse multi variée est nécessaire pour conclure sur le CD44. D'autre part, cette étude est marquée par la sévérité des tumeurs avec 82% des patientes présentant une ascite > 500ml et plus de la moitié n'étant pas en résection complète après chirurgie <sup>94</sup>.

Une autre étude chinoise parue en 2013 a comparé le statut CD44 en fonction du stade (rechute ou stade initial) par diverses méthodes. Lors de l'analyse par RT PCR des transcrits de CD44s et CD44v6 et leur dosage plasmatique (par ELISA), ils ont noté l'absence de différence entre tumeur primitive et rechute pour CD44s, mais un nombre de transcrits supérieurs et une concentration plasmatique supérieure au stade de rechute pour le CD44v6. Par ces 2 méthodes, ils ont également retrouvé des taux supérieurs dans les localisations métastatiques, en comparaison à la tumeur primitive (toujours pour CD44v6). L'étude par IHC n'a été réalisée que pour la forme variante CD44v6. Elle suggère une corrélation entre l'expression de ce variant et le grade élevé sans valeur pronostic <sup>95</sup>.

Nos résultats sont cependant critiquables sur plusieurs points. Comme la majorité des études citées ci-dessus, nous avons travaillé sur une cohorte rétrospective, d'un effectif limité pouvant manquer de puissance. Nous avons choisi de travailler sur un anticorps pan antiCD44, les résultats sur les formes variantes étant très discutables et discordants dans les cancers ovariens. Nos données ont pu être « artéfactées » par un contingent inflammatoire trop important. Le marquage en IHC de CD44 au sein du stroma semble être davantage relié à la présence de cellules lymphocytaires et non mésenchymateuses ou fibroblastiques. Or toutes ces cellules peuvent avoir un rôle ambivalent sur la tumeur (se conférer à l'introduction sur le rôle du microenvironnement). Une des explications peut aussi tenir à la faible proportion de cellules souches mésenchymateuses au sein du stroma tumoral ovarien. Des études antérieures mettant en évidence des cellules de type CA-MSC associées aux tumeurs ovariennes par méthode de dissection mécanique retrouvaient seulement 0,3% de cellules de type MSC sur blocs tumoraux et 6% dans le liquide d'ascite<sup>60</sup>. Il semble donc intéressant d'identifier plus précisément la nature de ces cellules marquées (lymphocytaires, macrophagiques ?). En effet, des travaux récents de notre équipe ont démontré la coopération des macrophages de type M2 ou TAM (macrophage associé aux tumeurs) aux cellules mésenchymateuses associées aux tumeurs <sup>65</sup>. De manière très originale, ces travaux ont non seulement prouvé la coopération entre cellules du microenvironnement et cellules tumorales mais également un dialogue triple. Les CA-

MSC entraînent le recrutement de macrophages au sein des tumeurs ovariennes. Elles peuvent, par un facteur sécrété, polariser les monocytes/macrophages en un phénotype pro-tumoral de macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et entraîner la sécrétion par ces cellules d'IL-6, IL-8, VEGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ), MCP-1. Ces molécules favorisent la prolifération et la dissémination tumorale de manière reconnue <sup>41,65</sup>.

Une autre critique possible est la décision de travailler sur différents types anatomopathologiques (séreux, endométrioïdes, cellules claires). Nous avons choisi ces types histologiques car ils ont des caractéristiques moléculaires communes et des voies d'oncogènes proches <sup>10,12,13</sup>. Afin d'avoir des données plus robustes, nous avons voulu analyser secondairement le groupe homogène des carcinomes séreux de haut grade traités à un stade avancé. Nous avons retrouvé exactement les mêmes résultats. Par ailleurs, la population des autres études était semblable à la nôtre avec plusieurs types histologiques, tout stade confondu (dont la majorité reste des stades avancés et des sous types séreux).

Nos résultats confortent ainsi les conclusions de travaux antérieurs ne retenant pas CD44 comme marqueur fiable pronostic dans les cancers ovariens (tableau 18) <sup>71,74</sup>.

Auteurs	Pop (n)	Technique	Iso_ formes	Ac CD44	% CD44+	Traitement	Corrélation et conclusions
Uhl <sup>83</sup>	44	IHC	CD44, CD44v	Polyclonal	nd	nd	CD44v mauvais pronostic (DFS et OS)
Cannistra <sup>82</sup>	31 (+6 témoins)	RT-PCR et IHC	CD44, CD44v	clone 25.32 (RetD)	82%	nd	pas de corrélation
Kayastha <sup>85</sup>	56	IHC	CD44s, P21, P53	monoclonal, Bender	39%	pas de chimio	CD44 mauvais pronostic pour SG(24 vs 42mois), ns pour SSP
Saegusa <sup>86</sup>	115	IHC, Southern, RT PCR	CD44s, CD44 v3, CD44 v6	monoclonal, dako	score	nd	pas de corrélation pour CD44s (ni CD44-v6) en terme de survie, CD44-v3 mauvais pronostic
Berner <sup>92</sup>	67 (58 ép, 23 If, 44 méta)	IHC	CD44s, CD44v 3-10	monoclonal, Bender	64%	nd	pas de corrélation
Ross	64	IHC	CD44	A3D8 mono sigma	23%		pas de corrélation SG en multivariée
Rodriguez <sup>87</sup>	142 If (+ 265 meta)	IHC	CD44s, CD44v	R et D	51%	nd	pas de corrélation pour CD44s mais bon pronostic de CD44v10 If et mauvais pour CD44v10 méta (SSP)
Sillanpaa <sup>84</sup>	307 (+44 M+)	IHC	CD44, acide hyaluronique	clone 2C5 RetD, UK	51%	53% chimio à base de platine	pas de corrélation en multivarié pour OS, mais corrélation bon pronostic pour RFS à 5 ans (70% vs 34%)
Chen <sup>94</sup>	120 (+40M+)	IHC	uPA, MDR1, MRP2	ab51037	83% (85% M+)	nd	corrélation mauvais pronostic (OS et DFS)
Hu <sup>93</sup>	92	IHC	CD44	clone F4 de santa cruz	52% à 91%	100% CT	pas de corrélation pour CD44 et survie, corrélation à la chimiorésistance (CD44+ dans 91% patientes chimiorésistantes, 52% patientes sensibles)
Shi <sup>95</sup>	45 (+ 20 rechutes)	RT-PCR et WB + IHC + Elisa (sang)	CD44s, CD44v6	ab119863 (WB)	60%	nd (exclusion CT néoadj)	pas de recherche CD44s/v6 en terme survie, Expression CD44-v6 supérieure dans rechute que tumeur primaire (idem pour CD44s)
thèse	80 (52 M+)	IHC	CD44 (stroma et tumeur)	clone dako	37% (score IRS) à 45% (score phase I)	100% CT	pas de corrélation survie ou chimiorésistance

**Tableau 18 : Revue bibliographique CD44 et cancer ovarien**

### 4.3 Concordance du marquage entre tumeur primitive et métastatique

Comme les rares études ayant comparé le marquage entre tumeur primitive et à distance, le marquage reste comparable quel que soit sa localisation <sup>84,92,94</sup>.

### 4.4 Marquage CD44 et chimiorésistance

Plusieurs études ont déjà mis en évidence un rôle du CD44 dans la chimiorésistance par CAM-DR pour d'autres tumeurs solides comme les CHC. *In vitro*, des lignées cellulaires de cancers pulmonaires non à petites cellules, transfectées par le gène CD44s, sont plus résistantes au platine en présence d'acide hyaluronique. Un des mécanisme mis en jeu serait une induction de l'expression de la Multidrug resistance protein2 (MRP2) tel que le montre la restauration de la sensibilité au platine lors de l'inhibition de MRP2<sup>96</sup>. Peu d'études ont cherché à analyser la chimiorésistance dans le cancer de l'ovaire. L'une d'entre elle a mis en évidence la co-localisation de CD44 et de MDR1 (protéine d'efflux) dans des tumeurs ovariennes (série rétrospective de 120 patientes en immunofluorescence) et suggère un rôle de CD44 dans la chimiorésistance des cancers ovariens <sup>94</sup>.

Une étude chinoise très récente a décrit une relation entre CD44 et la chimiorésistance des cancers ovariens <sup>93</sup>. Cette étude rétrospective a inclus 92 patientes dont 34 ayant des tumeurs résistantes et 58 ayant des tumeurs sensibles ou partiellement sensibles. Cette étude portait sur 58 carcinomes séreux, 8 mucineux, 4 endométrioïdes et 6 cellules claires. L'hyperexpression du CD44 était significativement différente ( $p=0,0005$ ) entre les carcinomes séreux résistants (positivité de 95,83%) et les carcinomes séreux sensibles (53,33%). En analyse multi variée, le stade, la taille du résidu tumoral et la valeur de CD44 sont retrouvés comme des facteurs indépendants associés à la chimiorésistance. En revanche, aucune association entre CD44 et la survie n'a été mise en évidence de façon significative. Les principaux facteurs différents de notre étude sont, l'anticorps, le score utilisé (score proche de l'IRS basé sur le pourcentage de cellules marquées et l'intensité de fixation) qui retrouve une positivité

bien plus élevée que dans le reste de la littérature. Le pourcentage de patientes présentant des tumeurs résistantes (37%) est également très élevé en comparaison à notre série ou à la littérature. L'étude de Shi, publiée cette année, n'a pas validé d'impact pronostic de CD44s ni CD44-v6 mais a retrouvé un pourcentage d'isoforme variant supérieur dans des cancers ovariens en rechute (n=20) par rapport à des cancers ovariens en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement (n=45). De plus, ils corrèlent l'expression de CD44-v6 au haut grade et au stade avancé <sup>95</sup>.

Pour conclure, notre étude ne retient pas le CD44 comme une technique fiable de marquage du microenvironnement tumoral. Le CD44 est un composant cellulaire impliqué et présent dans les tumeurs (exprimé par les cellules cancéreuses et les cellules constituant leur microenvironnement). La technique de mise en évidence reste difficile en immunohistochimie qualitativement et quantitativement. La fixation de CD44 n'est pas assez discriminante avec la visualisation de nombreuses cellules dont les macrophages, les fibroblastes et les cellules souches mésenchymateuses.

## 5 Perspectives

Les perspectives peuvent être développées à deux niveaux :

### 5.1 Une meilleure compréhension des mécanismes de chimiorésistance par le microenvironnement et CD44

Les mécanismes impliquant CD44 et la chimiorésistance sont mal élucidés. Les travaux de Lakshman in vitro et in vivo sur des lignées de cancer colique ont démontré l'influence de CD44 dans la résistance à l'apoptose (notamment par la voie mitochondriale)<sup>97</sup>. Plus récemment, une autre équipe a montré qu'en inhibant la voie de CD44 (par shARN), le nombre de cellules en apoptose était augmentée tandis que la prolifération, la migration étaient inhibées<sup>98</sup>. Des travaux complémentaires mettent en avant la voie PI3K/AKT dans des cancers ORL<sup>75</sup> et ovariens (Castells, sous presse)<sup>66</sup>.

De plus, une étude réalisée par l'équipe de Slomiany a démontré que l'inhibition de l'interaction CD44 et acide hyaluronique dans des lignées de cancers ovariens (par oligomères de l'acide hyaluronique) permet de restaurer une chimiosensibilité<sup>99</sup>.

### 5.2 Améliorer la caractérisation des différents composants du micro environnement :

En effet, le CD44 est un pan marqueur, exprimé sur les macrophages, les cellules mésenchymateuses, les lymphocytes, les cellules souches hématopoïétiques et cancéreuses qui n'ont pas le même impact sur la chimiorésistance et la progression tumorale. Il faut donc rechercher d'autres marqueurs pour affiner l'identification des intervenants du microenvironnement et leur rôle respectif. Ainsi, on pourrait sur notre série étudier le rôle des macrophages (CD163, 68), le rôle des fibroblastes associés aux tumeurs (SMA, FAP). Ces anticorps combinés au CD44 nous permettraient alors de distinguer des acteurs majeurs de l'oncogénèse. Par exemple, nous pourrions étudier l'implication des macrophages M2 (pro tumoraux) dans les infiltrats tumoraux ovariens avec un marquage combiné CD44, CD163 et CD68. Nous pourrions à l'inverse étudier les macrophages M1 (anti tumoraux) et rechercher si l'importance de leur infiltration est

protectrice et de bon pronostic. Pour d'autres cancers solides, des travaux ont démontré l'importance du ratio macrophage M1/M2.

De façon similaire, des marquages lymphocytaires et CD44 permettraient de suivre une autre composante immunitaire du stroma et son rôle.

Dans l'idéal, un travail prospectif sur les marqueurs environnementaux serait plus robuste. Un modèle intéressant serait de comparer la nature du microenvironnement à différents stades chez les mêmes patientes. Par exemple, au stade initial (sur les biopsies) avant tout traitement puis après chimiothérapie et à la rechute. On pourrait alors réellement suivre l'apparition de résistances afin d'en décrypter les mécanismes.

## **CONCLUSION**

Notre série a confirmé les résultats d'autres études, qui ne retrouvent pas de rôle de l'expression de CD44 carcinomateux en terme de pronostic. Nous n'avons pas mis en évidence de rôle plus spécifique du stroma exprimant cette molécule. Elle ne semble donc pas un bon bio marqueur immunohistochimique pour distinguer les cancers ovariens sensibles ou résistants ou susceptibles de progresser rapidement. Son rôle est encore mal connu avec une hétérogénéité des travaux devant l'absence de consensus pour son utilisation en pratique (anticorps, score). Les perspectives sont de s'orienter sur d'autres marqueurs plus spécifiques ou une combinaison de marqueurs permettant d'identifier les cellules actrices de la chimiorésistance et de la progression au sein du microenvironnement tumoral.

**Professeur Jean-Pierre Vinel,  
Doyen de la Faculté de Médecine de Purpan**

**Professeur Henri Roché,  
Président du Jury**

## BIBLIOGRAPHIE

1. INCa, I. *et Projection de l' incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011.* (2011).
2. CépiciDC No Title. <http://www.cepidc.vesinet.inserm.fr/>
3. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. *Cancer Statistics*, 2013. **63**, 11–30 (2013).
4. Cannistra, S. a *Cancer of the ovary. The New England journal of medicine* **351**, 2519–29 (2004).
5. Agarwal, R. & Kaye, S. B. *Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. Nature reviews. Cancer* **3**, 502–16 (2003).
6. Coleman, R. L., Monk, B. J., Sood, A. K. & Herzog, T. J. *Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. Nature reviews. Clinical oncology* (2013).doi:10.1038/nrclinonc.2013.5
7. Gates, M. a, Rosner, B. a, Hecht, J. L. & Tworoger, S. S. *Risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic subtype. American journal of epidemiology* **171**, 45–53 (2010).
8. Silverberg, S. G. *Histopathologic Grading of Ovarian Carcinoma : A Review and Proposal.* 7–15 (2000).
9. Malpica, A. *et al.* *Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. The American journal of surgical pathology* **28**, 496–504 (2004).
10. Kurman, R. *Molecular Pathogenesis and Extraovarian Origin of Epithelial Ovarian Cancer. Shifting the Paradigm. Human pathology* **42**, 918–931 (2011).
11. Chêne, G. *et al.* [Ovarian carcinogenesis: recent and past hypotheses]. *Gynécologie, obstétrique & fertilité* **39**, 216–23 (2011).
12. Jr, R. C. B., Hennessy, B. & Mills, G. B. *The biology of ovarian cancer : new opportunities for translation.* **9**, 1–28 (2010).

13. Chene, G., Dauplat, J., Radosevic-Robin, N., Cayre, a & Penault-Llorca, F. Tu-be or not tu-be: That is the question... About serous ovarian carcinogenesis. *Critical reviews in oncology/hematology* (2013).doi:10.1016/j.critrevonc.2013.03.004
14. Fathalla, M. F. INCESSANT OVULATION—A FACTOR IN OVARIAN NEOPLASIA ? *The Lancet* **Vol. 298**, 163
15. Karst, A. M. & Drapkin, R. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *Journal of oncology* **2010**, 932371 (2010).
16. Piek, J. M. *et al.* Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of pathology* **195**, 451–6 (2001).
17. Vaughan, S. *et al.* Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nature reviews. Cancer* **11**, 719–25 (2011).
18. Vergote, I. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *The New England journal of medicine* **363**, 943–53 (2010).
19. Polterauer, S. Titre: Prognostic value of residual tumor size in patients with epithelial ovarian cancer FIGO stages IIA-IV: analysis of the OVCAD data. *International journal of gynecological cancer [1048-891X]* **22**, 380 –385 (2012).
20. Raja, F. a, Chopra, N. & Ledermann, J. a Optimal first-line treatment in ovarian cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23 Suppl 1**, x118–27 (2012).
21. Mc Guire, W. PATIENTS WITH STAGE III AND STAGE IV OVARIAN CANCER. *N Engl J Med* **334**, 1–6 (1996).
22. Du Bois, a. A Randomized Clinical Trial of Cisplatin/Paclitaxel Versus Carboplatin/Paclitaxel as First-Line Treatment of Ovarian Cancer. *CancerSpectrum Knowledge Environment* **95**, 1320–1329 (2003).
23. Ozols, R. F. *et al.* Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **21**, 3194–200 (2003).

24. Armstrong, D. K. *et al.* Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *The New England journal of medicine* **354**, 34–43 (2006).
25. Katsumata, N. *et al.* Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* **374**, 1331–8 (2009).
26. Burger, R. a *et al.* Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *The New England journal of medicine* **365**, 2473–83 (2011).
27. Perren, T. J. *et al.* A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *The New England journal of medicine* **365**, 2484–96 (2011).
28. Stark, D. *et al.* Standard chemotherapy with or without bevacizumab in advanced ovarian cancer: quality-of-life outcomes from the International Collaboration on Ovarian Neoplasms (ICON7) phase 3 randomised trial. *The lancet oncology* **14**, 236–43 (2013).
29. Vergote IB, Joly F, Katsaros D, Coens C, Reinthaller A, Hall M, et al. Randomized phase III study of erlotinib versus observation in patients with no evidence of disease progression after first-line platin-based chemotherapy for ovarian carcinoma: a GCIIG and EORTC-GCG study. *J Clin Oncol.* **30**, LBA5000 (2012).
30. Audeh, M. W. *et al.* Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* **376**, 245–51 (2010).
31. Tutt, A. *et al.* Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* **376**, 235–44 (2010).
32. Markman, M. *et al.* Duration of response to second-line, platinum-based chemotherapy for ovarian cancer: implications for patient management and clinical trial design. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 3120–5 (2004).
33. Heintz, A. P. M. *et al.* Carcinoma of the Ovary. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* **Volume 95**, 161–192

34. Comprehensive, N. & Network, C. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Ovarian Cancer. (2013).
35. Markman, M. A. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *Journal of clinical oncology* **Vol. :9**, 389–393 (1991).
36. Hanker, L. C. *et al.* The impact of second to sixth line therapy on survival of relapsed ovarian cancer after primary taxane/platinum-based therapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**, 2605–12 (2012).
37. Poveda, a *et al.* Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in relapsed ovarian cancer: outcomes in the partially platinum-sensitive (platinum-free interval 6-12 months) subpopulation of OVA-301 phase III randomized trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **22**, 39–48 (2011).
38. Pujade-Lauraine, E. *et al.* AURELIA: A randomized phase III trial evaluating bevacizumab (BEV) plus chemotherapy (CT) for platinum (PT)-resistant recurrent ovarian cancer (OC). *J. Clin. Oncol.* **30 (Suppl.,**
39. Meads, M. B., Gatenby, R. A. & Dalton, W. S. minimal residual disease. **9**, 665–674 (2009).
40. Fraser, M. *et al.* Chemoresistance in human ovarian cancer : the role of apoptotic regulators Ovarian Cancer and Chemoresistance : A. **13**, 1–13 (2003).
41. Castells, M., Thibault, B., Delord, J.-P. & Couderc, B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *International journal of molecular sciences* **13**, 9545–71 (2012).
42. Paget, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet* **133**, 571–573 (1889).
43. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
44. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* **21**, 309–22 (2012).
45. Hanahan, D. & Weinberg, R. a Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).

46. Pasquet, M. *et al.* Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **126**, 2090–101 (2010).
47. Rafii, A. *et al.* Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PloS one* **3**, e3894 (2008).
48. Musrap, N. & Diamandis, E. P. Revisiting the complexity of the ovarian cancer microenvironment--clinical implications for treatment strategies. *Molecular cancer research : MCR* **10**, 1254–64 (2012).
49. Leinster, D. A. *et al.* The peritoneal tumour microenvironment of high-grade serous ovarian cancer. *The Journal of pathology* **227**, 136–45 (2012).
50. Kidd, S. *et al.* Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**, 2614–23 (2009).
51. Zhang, Q.-W. *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS one* **7**, e50946 (2012).
52. Germano, G. *et al.* Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer cell* **23**, 249–62 (2013).
53. Coward, J. *et al.* Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 6083–96 (2011).
54. Lane, D., Matte, I., Rancourt, C. & Piché, A. Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients. *BMC cancer* **11**, 210 (2011).
55. Nombela-Arrieta, C. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 126–131 (2012).
56. Cuiffo, B. G. & Karnoub, A. E. Mesenchymal stem cells in tumor development Emerging roles and concepts. **6**, 220–230 (2012).
57. Kidd, S. *et al.* Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PloS one* **7**, e30563 (2012).

58. Karnoub, A. E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557–63 (2007).
59. Spaeth, E. L. *et al.* Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS one* **4**, e4992 (2009).
60. Mclean, K. *et al.* Human ovarian carcinoma – associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. **121**, (2011).
61. Vianello, F. *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* **95**, 1081–9 (2010).
62. Scherzed, A. *et al.* BMSC enhance the survival of paclitaxel treated squamous cell carcinoma cells in vitro. *Cancer Biology & Therapy* **11**, 349–357 (2011).
63. Houthuijzen, J. M., Daenen, L. G. M., Roodhart, J. M. L. & Voest, E. E. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *British journal of cancer* **106**, 1901–6 (2012).
64. Roodhart, J. M. L. *et al.* Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer cell* **20**, 370–83 (2011).
65. Castells, M. *et al.* Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer letters* **326**, 59–68 (2012).
66. Magali Castells, delphine Milhas, cecile gandy, Benoit Thibault, arash Rafii, jean pierre delord and bettina couderc Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation.". *Cell death and Disease* (2013).
67. Latifi, A. *et al.* Isolation and characterization of tumor cells from the ascites of ovarian cancer patients: molecular phenotype of chemoresistant ovarian tumors. *PLoS one* **7**, e46858 (2012).
68. Gallatin WM, Weissman IL, B. E. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* **304**, 30–4

69. Misra, S. *et al.* Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *The FEBS journal* **278**, 1429–1443 (2011).
70. Zöller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Reviews Cancer* **11**, 254–267 (2011).
71. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. a CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 33–45 (2003).
72. Günthert, U. *et al.* A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**, 13–24 (1991).
73. Toole, B. P. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin Cancer Res* **15(24)**, 7462–7468.
74. Louderbough, J. M. V & Schroeder, J. a Understanding the dual nature of CD44 in breast cancer progression. *Molecular cancer research : MCR* **9**, 1573–86 (2011).
75. Bourguignon, L. Y. W. Stem Cell Marker (Nanog) and Stat-3 Signaling Promote MicroRNA-21 Expression and Chemoresistance in Hyaluronan/ CD44-activated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Oncogene* **31**, 149–160 (2012).
76. Uchino, M. *et al.* Nuclear beta-catenin and CD44 upregulation characterize invasive cell populations in non-aggressive MCF-7 breast cancer cells. *BMC cancer* **10**, 414 (2010).
77. Wielenga, V. J. M. *et al.* Expression of CD44 Variant Proteins in Human Colorectal Cancer Is Related to Tumor Progression. *Cancer Research* 4754–4756 (1993).
78. Galizia, G. *et al.* Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* **147**, 18–24 (2012).
79. Jeong, B.-J. *et al.* CD44 is associated with tumor recurrence and is an independent poor prognostic factor for patients with localized clear cell renal cell carcinoma after nephrectomy. *Experimental and therapeutic medicine* **3**, 811–817 (2012).
80. Cannistra, S. a *et al.* Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H. *Cancer Research* **53**, 3830–3838 (1993).

81. Strobel, T., Swanson, L., Cannistra, S. A. & Implantation, P. In Vivo Inhibition of CD44 Limits Intra-Abdominal Spread of a Human Ovarian Cancer Xenograft in Nude Mice : A Novel Role for CD44 in the Process of Peritoneal Implantation Spread of a Human Ovarian Cancer Xenograft in Nude Mice : A Novel Role for CD44 in . 1228–1232 (1997).
82. Cannistra SA, Abu-Jawdeh G, Niloff J, Strobel T, Swanson L, Andersen J, O. C. CD44 variant expression is a common feature of epithelial ovarian cancer: lack of association with standard prognostic factors. *J Clin Oncol.* **13**, 1912–21
83. Uhl-Steidl M, Müller-Holzner E, Zeimet AG, Adolf GR, Daxenbichler G, Marth C, D. O. Prognostic value of CD44 splice variant expression in ovarian cancer. *Oncology.* **52**, 400–6
84. Sillanpää, S. *et al.* CD44 Expression Indicates Favorable Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer CD44 Expression Indicates Favorable Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. 5318–5324 (2003).
85. Kayastha, S. *et al.* Expression of the Hyaluronan Receptor , CD44S , in Epithelial Ovarian Cancer Is an Independent Predictor of Survival Expression of the Hyaluronan Receptor , CD44S , in Epithelial Ovarian Cancer Is an Independent Predictor of Survival. 1073–1076 (1999).
86. MAKOTO SAEGUSA\*, DAISUKE MACHIDA, M. H. A. I. O. CD44 EXPRESSION IN BENIGN , PREMALIGNANT , AND MALIGNANT OVARIAN NEOPLASMS : RELATION TO TUMOUR DEVELOPMENT AND PROGRESSION. *JOURNAL OF PATHOLOGY* **337**, 326–337 (1999).
87. Rodríguez-Rodríguez L, Sancho-Torres I, Mesonero C, Gibbon DG, Shih WJ, Z. G. The CD44 receptor is a molecular predictor of survival in ovarian cancer. *Med Oncol.* **20**, 255–63 (2003).
88. Ween, M. P., Oehler, M. K. & Ricciardelli, C. Role of Versican, Hyaluronan and CD44 in Ovarian Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 1009–1029 (2011).
89. Ween, M. P., Hummitzsch, K., Rodgers, R. J., Oehler, M. K. & Ricciardelli, C. Versican induces a pro-metastatic ovarian cancer cell behavior which can be inhibited by small hyaluronan oligosaccharides. *Clinical experimental metastasis* **28**, 113–125 (2011).
90. Rustin, G. Definitions for response and progressio. (2011).

91. Braicu, E. I. *et al.* Preoperative HE4 expression in plasma predicts surgical outcome in primary ovarian cancer patients: Results from the OVCAD study. *Gynecologic oncology* **128**, 245–51 (2013).
92. Berner HS, Davidson B, Berner A, Risberg B, Kristensen GB, Trope CG, Van de Putte G, N. J. Expression of CD44 in effusions of patients diagnosed with serous ovarian carcinoma--diagnostic and prognostic implications. *Clin Exp Metastasis*. **18**, 197–202 (2000).
93. Hu, Z. *et al.* High expression of Lewis y antigen and CD44 is correlated with resistance to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *PloS one* **8**, e57250 (2013).
94. Chen, H., Hao, J., Wang, L. & Li, Y. Coexpression of invasive markers (uPA, CD44) and multiple drug-resistance proteins (MDR1, MRP2) is correlated with epithelial ovarian cancer progression. *British journal of cancer* **101**, 432–40 (2009).
95. Shi, J., Zhou, Z., Di, W. & Li, N. Correlation of CD44v6 expression with ovarian cancer progression and recurrence. *BMC cancer* **13**, 182 (2013).
96. Ohashi, R. *et al.* Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer letters* **252**, 225–34 (2007).
97. Lakshman, M., Subramaniam, V., Wong, S. & Jothy, S. CD44 promotes resistance to apoptosis in murine colonic epithelium. *Journal of cellular physiology* **203**, 583–8 (2005).
98. Park, Y. S., Huh, J. W., Lee, J. H. & Kim, H. R. shRNA against CD44 inhibits cell proliferation, invasion and migration, and promotes apoptosis of colon carcinoma cells. *Oncology reports* **27**, 339–46 (2012).
99. Slomiany, M. G. *et al.* Inhibition of Functional Hyaluronan-CD44 Interactions in CD133-positive Primary Human Ovarian Carcinoma Cells by Small Hyaluronan Oligosaccharides. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 7593–7601 (2009).

---

## **INFLUENCE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL SUR LA CHIMIORESISTANCE DES CANCERS OVARIENS**

---

### **Résumé**

Les cancers ovariens restent de mauvais pronostic avec l'émergence d'une résistance aux traitements par platine et taxane. Le microenvironnement tumoral dont les cellules souches mésenchymateuses participent à cette résistance. Ces cellules stromales expriment de nombreux marqueurs de surface dont CD44. Notre objectif était de rechercher une corrélation entre le degré d'expression de CD44 par immunohistochimie et la chimiorésistance tumorale. A partir de 89 patientes primotraitées par chirurgie puis par chimiothérapie à base de platine, 80 ont pu être retenues pour les analyses finales. Nos résultats montrent une indépendance entre CD44, la résistance au traitement et la survie. Il n'est donc pas un marqueur immunohistochimique à utiliser en routine. Des travaux futurs devront intégrer des comarquage afin de distinguer les composants du microenvironnement afin de mieux comprendre ces mécanismes d'échappement thérapeutique.

---

**TITLE:** Impact of ovarian cancer microenvironment on chemoresistance

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** MEDECINE SPECIALISEE CLINIQUE

---

**MOTS-CLES :** cancer ovarien, microenvironnement, CD44, chimiorésistance

---

Université Toulouse III-Paul Sabatier

Faculté de médecine Toulouse-Purpan, 35 Allées Jules Guesde BP 7202 31073 Toulouse  
Cedex 7

---

**Directeur de thèse :** Pr Jean-Pierre DELORD