



**HAL**  
open science

# Etude de deux chimiokines CXCL12/SDF-1 et fractalkine (FKN)/CX3CL1 dans le cancer épithélial des ovaires

Salam Nasreddine

## ► To cite this version:

Salam Nasreddine. Etude de deux chimiokines CXCL12/SDF-1 et fractalkine (FKN)/CX3CL1 dans le cancer épithélial des ovaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T019 . tel-00718600

**HAL Id: tel-00718600**

**<https://theses.hal.science/tel-00718600>**

Submitted on 17 Jul 2012

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

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



**UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11  
FACULTÉ DE MEDECINE PARIS-SUD**

**ECOLE DOCTORALE :**

**INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ**

*PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES*

**DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE**

**THÈSE DE DOCTORAT**

Présentée et soutenue publiquement le 6 juin 2011

par

**Salam NASREDDINE**

**ETUDE DE DEUX CHIMIOKINES CXCL12/SDF-1 ET  
FRACTALKINE (FKN)/CX<sub>3</sub>CL1 DANS LE CANCER  
EPITHELIAL DES OVAIRES**

**Directeur de thèse : Véronique MACHELON**

**Composition du jury :**

**Président :**

**Pr. Pierre GALANAUD**

**Rapporteurs :**

**Dr. Dominique BERREBI**

**Pr. Pascal GAUDUCHON**

**Examineurs :**

**Dr. Véronique MACHELON**

**Dr. Philippe DETERRE**

« Nul ne peut atteindre l'aube sans passer par le chemin de la nuit »

**Khalil Gibran**

« Quand la cause est juste, l'avenir n'est pas insulté »

**Boualem Bessaih**

**A mes parents**

**A Mazen**

**A mes amis**

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Pr. Dominique EMELIE (que son âme soit en paix), pour m'avoir accueilli au sein de l'unité Inserm 996. J'aurais tant aimé que vous soyez présent le jour de ma soutenance.

Je remercie Dr. Dominique BERREBI et Pr Pascal GAUDUCHON pour avoir accepté d'être les rapporteurs et surtout Dr. Dominique BERREBI pour ses conseils qu'elle m'a offerts.

Je remercie Dr. Véronique Machelon et Dr. Philippe DETERRE pour avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse. Merci pour votre disponibilité.

Je remercie mon encadrante Dr. Véronique MACHELON pour m'avoir accueilli, pour son enseignement et pour sa disponibilité.

Je remercie tous les membres de mon équipe. Je tiens à remercier vivement Mme Laurence DELBOS pour son aide, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie Dr. Karl BALABANIAN pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour son aide, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie Pr. Marc PALLARDY, pour m'avoir accueilli dans l'école doctorale 425.

A tous les membres de l'unité 996 pour leur soutien.

Je remercie ma Mère, mon Père, mon chéri Mazen, Soumaya, Hedia, Najjat, mes amis du premier étage dans la maison du LIBAN et tous mes amis pour leur support et pour les moments inoubliables qu'on a passés.

## Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

ADAM-10 : A Disintegrin And Metalloprotease 10

ADAM-17: A Disintegrin And Metalloprotease 17

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AJCC : American Joint Committee on Cancer

AL : Aldostérone

AP-1 : Activated Protein-1

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

Ca<sup>++</sup> : Calcium

CEO : Cancers épithélial de l'ovaire

DAG : DiAcylGlycérol

DEX : Dexaméthasone

ECM : Extracellular matrix protein

EGF: Epidermal growth factor

ENaC : Epithelial Na<sup>+</sup> channel

EPCAM : Epithelial cell adhesion molecule

ERK1/2 : Extracellular signal Regulated Kinase 1/2

ESO : Epithélium de surface de l'ovaire

FAK : Focal Adhesion Kinase

FIGO : Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

FKN : Fractalkine

GAG : Glycosaminoglycane

GC : Glucocorticoïde

GDP : Guanosine diphosphate

GILZ: Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper

GR : Glucocorticoid Receptor

GRK : G-protein coupled receptor

GTP : Guanosine triphosphate

HER-2 : Human epidermal growth factor receptor 2

HNPCC : Hereditary non polyposis colorectal cancer

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ICAM-1 : Inter-Cellular Adhesion Molecule 1

IL : Interleukine

INF  $\gamma$  : Interféron-gamma

IP3 : Inositol triphosphate

I-TAC : Interferon-inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MEK : MAPK Kinase

MMP : Métalloprotéinase (ou protéase) de matrice

MMR : Mismatch Repair genes

NFAT : Nuclear Factor of Activated T Cell

NF- $\kappa$ B : Nuclear factor  $\kappa$ B

NK : Natural killers

OMS : L'organisation Mondiale de la santé

p-AKT : Phospho-Akt

PBSF : Pre-B cell growth Stimulating Factor

PF4 : Platelet Factor 4

PGK1 : Phosphoglycérate kinase 1

PI : Phosphatidylinositol

PI3-K: Phosphatidylinositol 3 kinase

PKB : Protéine Kinase B

PKC : Protéine Kinase C

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PTX : Pertussis toxine

Pyk2 : Proline rich kinase 2

Rb : Rétinoblastome

RC : Récepteurs aux chimiokines

RCPG : Récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G

RDC1 : Receptor Dog ADNc

RGS : Régulateur de la signalisation des protéines G

SDF-1 : Stromal cell Derived Factor 1

siRNA : small interfering RNA

SNC : Système nerveux central

TACE : Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme

TCL-1 : Proto-oncogène T cell leukemia 1

TCR : T-Cell Receptor

TGF $\beta$  : Transforming growth factor  $\beta$

THS : Traitement hormonal substitutif

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

Treg : Lymphocyte T régulateur

VACAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VIH : Virus d'immunodéficience humaine

WHIM : Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, and Myelokathexis



## TABLE DES MATIERES

<b>I- LE CANCER EPITHELIAL DE L'OVAIRE .....</b>	<b>5</b>
I.1. GENERALITES.....	5
I.1.1. Définition et épidémiologie.....	5
I.1.2. Anatomopathologie .....	6
I.1.2.a. Rappel histologique de l'ovaire normal.....	6
I.1.2.b. Classification histologique des tumeurs ovariennes .....	8
I.1.3. Extension de tumeur ovarienne .....	17
I.1.4. Causes et facteurs de risque .....	18
I.1.4.a. L'âge.....	18
I.1.4.b. Facteurs génétiques .....	18
I.1.4.c. Facteurs hormonaux.....	20
I.1.4.d. Facteurs environnementaux .....	21
I.1.4.e. Facteurs inflammatoires.....	23
I.1.5. Diagnostic .....	23
I.1.5.a. Symptomatologie .....	23
I.1.5.b. Examen clinique .....	24
I.1.5.c. Examens complémentaires.....	24
I.1.6. Prise en charge thérapeutique.....	28
I.1.6.a. Traitement chirurgical .....	28
I.1.6.b. Chimiothérapie.....	29
I.1.6.c. Surveillance.....	30
I.1.7. Prévention et Dépistage.....	30
I.1.8. Signalisation cellulaire du CEO .....	30
I.1.9. Rôle du microenvironnement tumoral.....	34
I.1.9.a. Le système immunitaire et le CEO.....	35
I.1.9.b. Angiogenèse, invasion et métastases .....	36
I.1.10. Modèle animaux du CEO.....	37
I.1.10.a. Modèles murins du CEO .....	37
I.1.10.b. Modèles de souris transgéniques.....	38

<b>II- LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS .....</b>	<b>40</b>
II.1. LES CHIMIOKINES .....	40
II.1.1. Généralités .....	40
II.1.2. Nomenclature.....	41
II.1.3. Classification structurale et fonctionnelle.....	42
II.1.3.a. Classification structurale .....	42
II.1.3.b. Classification fonctionnelle .....	46
II.1.4. Structure tridimensionnelle.....	47
II.2. LES RECEPTEURS DES CHIMIOKINES .....	48
II.2.1. Classification des récepteurs des chimiokines .....	48
II.2.2. Structure.....	50
II.2.3. La liaison des chimiokines à leur(s) récepteur (s) .....	51
II.2.3.a. Le modèle d'interaction chimiokine-récepteur.....	51
II.2.3.b. Signalisation des récepteurs de chimiokines .....	52
II.2.3.c. Internalisation.....	55
<b>III. LA CHIMIOKINE SDF-1 (CXCL12) ET SES DEUX RECEPTEURS, CXCR4 ET CXCR7 .....</b>	<b>58</b>
III.1. GENERALITES A PROPOS DE LA CHIMIOKINE SDF-1/CXCL12.....	58
III.1.1. Historique et caractéristique .....	58
III.1.2. Sites de production de SDF-1 .....	60
III.2. LES RECEPTEURS DE LA CHIMIOKINE SDF-1 .....	61
III.2.1. Le récepteur de chimiokine, CXCR4 .....	61
III.2.1.a. Historique et caractéristique.....	61
III.2.1.b. Site de production du récepteur CXCR4.....	62
III.2.1.c. Signalisation induite par CXCR4.....	63
III.2.2. Le récepteur de chimiokine, CXCR7 .....	64
III.2.2.a. Historique et caractéristique.....	64
III.2.2.b. Site de production du récepteur CXCR7.....	66
III.2.2.c. Signalisation du récepteur CXCR7.....	67
III.2.3. L'effet de l'inactivation des gènes codant pour SDF-1, CXCR4 et CXCR7 .....	68
III.2.4. Rôles du couple SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 dans certaines pathologies .....	68
III.2.5. Rôles du couple SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 dans la tumorigenèse.....	68

<b>IV. LA CHIMIOKINE FRACTALKINE (FKN)/CX<sub>3</sub>CL1 ET SON RECEPTEUR, CX<sub>3</sub>CR1 .....</b>	<b>74</b>
IV.1. GENERALITES A PROPOS DE LA CHIMIOKINE FRACTALKINE (FKN).....	74
IV.1.1. Historique et caractéristique de la fractalkine (FKN).....	74
IV.1.2. Site de production de la FKN.....	76
IV.1.3. Régulation de l'expression membranaire de la FKN .....	76
IV.1.3.a. Régulation d'expression membranaire de la FKN par le clivage enzymatique .....	76
IV.1.3.b. Régulation de la synthèse de la FKN .....	77
IV.1.3.c. Régulation de l'expression membranaire de la FKN par l'endocytose.....	78
IV.2. LE RECEPTEUR DE LA FKN, CX <sub>3</sub> CR1 .....	79
IV.2.1. Historique et caractéristiques .....	79
IV.2.2. Site de production du récepteur CX <sub>3</sub> CR1.....	80
IV.2.3. Régulation d'expression du CX <sub>3</sub> CR1.....	80
IV.3. SIGNALISATION ET FONCTIONS INDUITES PAR LA FKN .....	81
IV.4. L'EFFET DE L'INVALIDATION DES GENES CODANT POUR LA FKN ET POUR LE RECEPTEUR CX <sub>3</sub> CR1 .....	85
IV.5. ROLES DU COUPLE FKN/CX <sub>3</sub> CR1 DANS CERTAINES PATHOLOGIES .....	85
IV.6. LE ROLE DU COUPLE FKN/CX <sub>3</sub> CR1 DANS LA TUMORIGENESE.....	86
IV.6.1. La FKN et les effets anti-tumoraux.....	86
IV.6.2. La FKN et les effets pro-tumoraux.....	88
<b>V. LE GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER (GILZ).....</b>	<b>92</b>
V.1. CARACTERISTIQUES GENETIQUES ET PROPRIETES BIOCHIMIQUES.....	92
V.2. SITES DE PRODUCTION DE GILZ ET REGULATION DE SON EXPRESSION .....	95
V.3. FONCTIONS DE GILZ .....	96
V.3.1. Propriétés biochimiques de GILZ.....	96
V.3.2. GILZ et la survie des cellules T.....	99
V.3.3. GILZ et réponse anti-inflammatoire/immunosuppressive.....	100
V.4. GILZ ET CANCERS.....	101

<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>103</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>105</b>
<b>I. Article 1: CXCL12 EXPRESSION BY HEALTHY AND MALIGNANT OVARIAN EPITHELIAL CELLS .....</b>	<b>105</b>
<b>II. Expression et rôle du récepteur CXCR7 dans le cancer épithélial de l'ovaire.....</b>	<b>106</b>
<b>III. Article 2: Identification of the chemokine CX<sub>3</sub>CL1 as a new mediator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian.....</b>	<b>118</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>120</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>131</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>133</b>

# **INTRODUCTION**

# **LE CANCER EPITHELIAL DE L'OVAIRE**

## I- LE CANCER EPITHELIAL DE L'OVAIRE

### I.1. GENERALITES

#### I.1.1. Définition et épidémiologie

On désigne par cancers de l'ovaire, les tumeurs malignes développées aux dépens des constituants spécifiques de l'ovaire. On exclue de cette définition les métastases de cancers d'autres origines (digestifs, mammaire, lymphomes...). Les cancers épithéliaux de l'ovaire (CEO) sont les plus fréquents et représentent plus de 85% des cancers de l'ovaire (Berkowitz, Rim et al. 2010) et 3% à 4% de tous les cancers chez les femmes (Gomez-Raposo, Mendiola et al. 2010).

En France, le réseau français des registres des cancers FRANCIM (France-Cancer-Incidence et Mortalité) estime à 4 375 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en 2005. Ils représentent 3,2% de l'ensemble des nouveaux cancers chez les femmes. Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 8,1/100 000 femmes par an. Le cancer de l'ovaire est essentiellement une tumeur de la femme ménopausée avec un âge médian de 65 ans au diagnostic. Seulement 5% des cas des cancers de l'ovaire surviennent avant 40 ans sur l'année 2005. Il existe également une disparité géographique du taux des cancers de l'ovaire en France, puisqu'on note un léger gradient Nord/Sud avec les taux d'incidence les plus élevés pour les départements du Nord et les plus bas dans la plupart des départements du Sud (Tretarre, Remontet et al. 2005).

Avec 3180 décès par an observés en France en 2005, le cancer de l'ovaire se situe au 5<sup>e</sup> rang des décès par cancer chez la femme. Le taux de mortalité standardisé sur la population mondiale est de 4.6/100 000 femmes par an. La mortalité élevée de cette tumeur est due au fait que la majorité des patientes (75%) ont une maladie avancée (stades III et IV) au moment du diagnostic (Dinh, Harnett et al. 2008). En effet, la survie dépend essentiellement du stade d'extension de la tumeur au moment du diagnostic: la survie à cinq ans au stade I de la maladie est supérieure à 90% contre 25% dans les stades III et IV (Argento, Hoffman et al. 2008).

Une étude récente par le service français de la haute autorité de santé (HAS) estime à 4430 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en 2008 en France avec 3000 décès par an. Cette

étude montre que le taux d'incidence et de mortalité par le cancer de l'ovaire est à peu près constant entre l'année 2005 et 2008.

Au niveau mondial, 204 000 nouveaux cas et 125 000 décès par cancer de l'ovaire par an sont estimés (Permuth-Wey and Sellers 2009).

### **I.1.2. Anatomopathologie**

#### ***I.1.2.a. Rappel histologique de l'ovaire normal***

Les ovaires normaux sont des organes ovoïdes et aplatis qui mesurent, pendant la période d'activité génitale de la femme, 3 cm de long, 2 cm de large et 1 cm d'épaisseur et pèse entre 2 et 4 g. Après la ménopause, ils s'atrophient. Les ovaires sont situés dans la cavité péritonéale pelvienne. Les ovaires sont des glandes mixtes ayant pour fonction de sécréter des hormones stéroïdiennes (fonction endocrine) et donner naissance à des ovocytes (fonction exocrine).

L'ovaire normal est formé de l'épithélium, de la zone corticale et de la zone médullaire (Figure 1).

#### **L'épithélium**

L'ovaire normal est recouvert d'un épithélium pavimenteux ou cubique unistratifié, appelé épithélium de surface ovarien (ESO). Cet épithélium est également référencé dans la littérature sous le nom de mésothélium ovarien ou d'épithélium ovarien normal.

L'épithélium de l'ovaire est séparé du stroma ovarien par une basale et une structure dense: *la tunica albuginea*, qui joue un rôle de barrière pour la diffusion d'agents actifs. La faible adhésion des cellules épithéliales à la basale constitue une autre caractéristique originale. Cet attachement peut être rapidement perdu, par exemple au cours d'une intervention chirurgicale, ou spontanément à la périphérie des ovaires de personnes âgées.

Avec l'âge, l'ovaire humain présente un contour de plus en plus irrégulier, accompagné de la formation d'invaginations de son épithélium et de kystes. Les cellules de l'épithélium tendent à former des colonnes dans ces invaginations et dans ces kystes, perdant leur caractère de tissu unistratifié.



On assigne à l'ESO deux rôles principaux: le transport d'éléments entre la cavité péritonéale et l'ovaire, et la rupture, suivie de la réparation de la surface de l'ovaire lors de l'ovulation. Son fonctionnement varie selon la période du cycle, laissant supposer une hormono-dépendance. La rupture de l'épithélium semble être effectuée naturellement sous l'influence de lysosomes. La perte de l'épithélium à cet endroit permet l'ovulation. Les cellules épithéliales ont la capacité de se contracter car elles contiennent des myofibrilles. Elles sont ainsi susceptibles d'induire la cicatrisation après ovulation (Auersperg, Edelson et al. 1998).

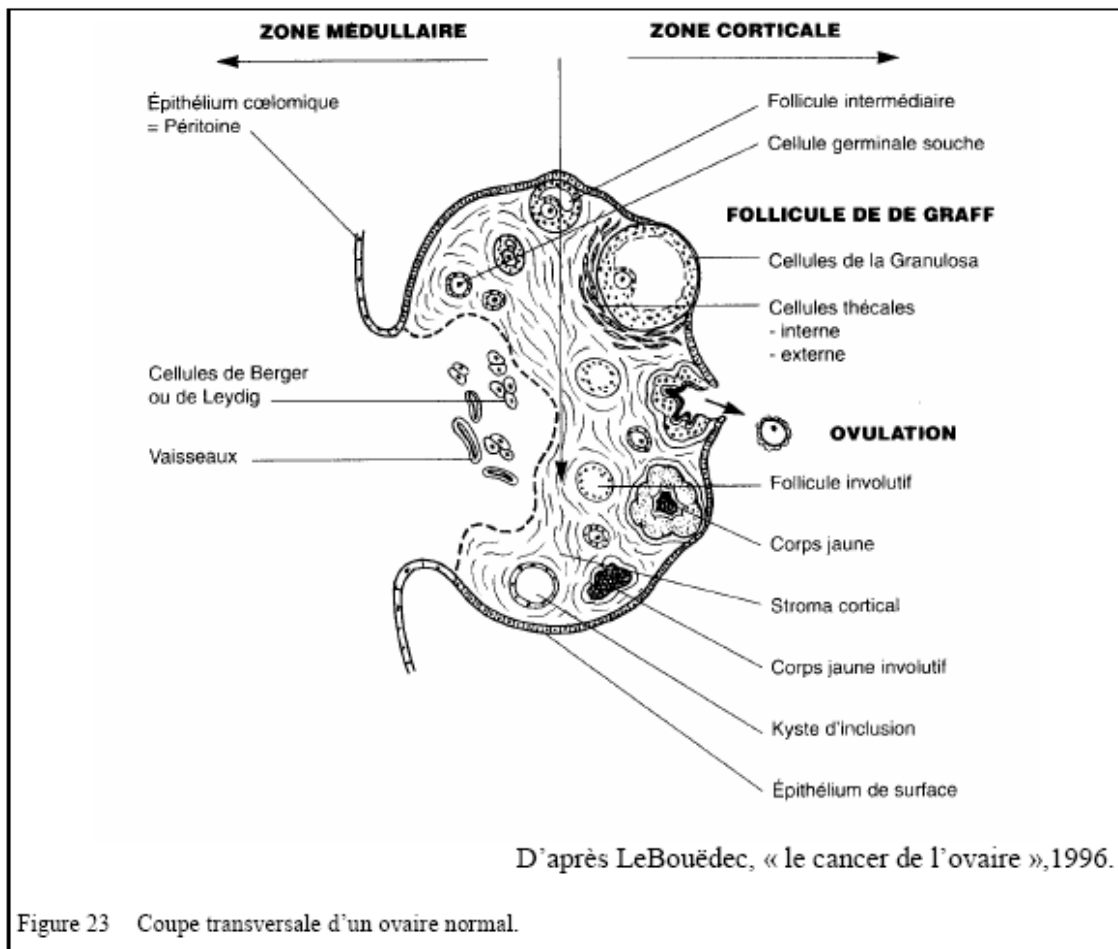


Figure 23 Coupe transversale d'un ovaire normal.

**Figure 1 : Coupe Transversale d'un ovaire normal humaine:** L'ovaire est constitué de deux régions: l'une superficielle, la corticale et l'autre profonde, la médullaire. La corticale est faite de cellules stromales et d'ovocytes entourés des cellules folliculaires de la granulosa et de la thèque interne. Le stroma cortical contient des follicules à des stades différents de leur évolution (follicules primordiaux, intermédiaires, follicule de de Graff, follicules involutifs, corps jaunes). La médullaire comprend deux zones distinctes: une zone spongieuse parenchymateuse conjonctivo-vasculaire, contiguë au stroma cortical, et une zone hilare fibreuse, parcourue de gros vaisseaux.

### **La zone corticale et la zone médullaire**

La zone corticale, épaisse, est située à la périphérie; elle comporte des follicules ovariens contenant les ovocytes et le stroma ovarien. La zone médullaire située au centre de l'ovaire est plutôt spongieuse et très vascularisée. Elle est composée du tissu conjonctif lâche, des nerfs et des vaisseaux sanguins.

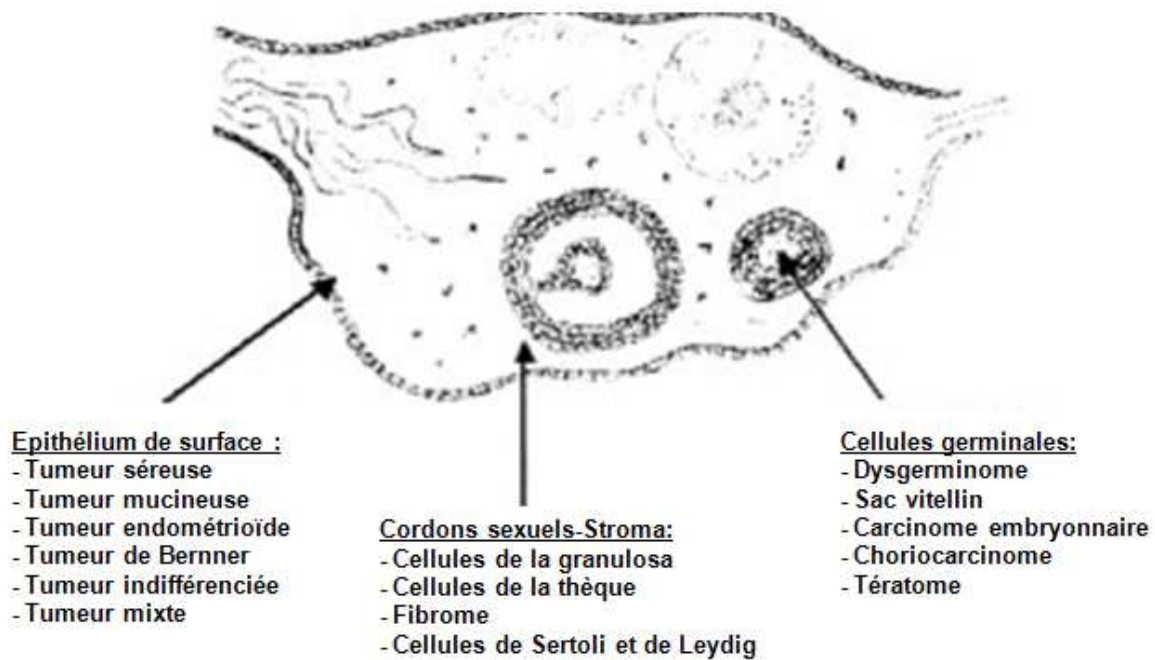
#### ***1.1.2.b. Classification histologique des tumeurs ovariennes***

Le diagnostic histologique de la tumeur de l'ovaire repose sur l'examen macroscopique et microscopique de la lésion ovarienne et de ses atteintes péritonéales éventuelles. Seule l'exploration chirurgicale permet d'établir correctement le stade d'évolution de la maladie, en précisant l'extension et la taille des résidus laissés en place.

La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) distingue plusieurs tumeurs primitives ovariennes en se basant sur les corrélations morphologiques existantes entre l'aspect histologique de la tumeur et l'aspect histologique des constituants de l'ovaire normal. Elle distingue trois grands types histologiques: les tumeurs épithéliales, les tumeurs des cordons sexuels/stroma et les tumeurs des cellules germinales (Figure 2) (Chen, Ruiz et al. 2003).

#### **Tumeurs des cordons sexuels/stroma**

Les tumeurs des cordons sexuels sont des tumeurs qui dérivent des cellules folliculaires de la granulosa, de la thèque, et d'autres cellules stromales (fibromes). Dans ce groupe, les tumeurs des cellules de la granulosa représentent la majorité des tumeurs malignes des cordons sexuels et du stroma. Les tumeurs des cordons sexuels comptent 8% de toutes les tumeurs ovariennes et environ 7% des tumeurs malignes de l'ovaire (Chen, Ruiz et al. 2003).



**Figure 2 : L'origine des principaux types de tumeurs ovariennes (Chen, Ruiz et al. 2003).**

### **Tumeurs germinales**

Les tumeurs germinales de l'ovaire représentent 3 à 7% des cancers de l'ovaire. Ce sont des tumeurs à croissance rapide qui se développent à partir des cellules germinales primordiales issues de la gonade embryonnaire. Ces tumeurs sont peu fréquentes et bénignes chez la femme adulte, alors qu'elles représentent plus de la moitié des tumeurs ovariennes se développant chez les fillettes et les adolescentes (Chen, Ruiz et al. 2003). Environ 95% des tumeurs germinales sont représentées par des tératomes (dérivent des trois feuilletts embryonnaire) kystiques bénins. Les 5% restants constituent les tumeurs germinales malignes, on distingue deux groupes histologiques: les dysgerminomes (45%) (équivalents des séminomes testiculaires) et les tumeurs non dysgerminomateuses (non séminomateuses). Ces dernières regroupent : les tumeurs vitellines, les tératomes, les choriocarcinomes (Chen, Ruiz et al. 2003).

### **Tumeurs épithéliales et classification**

Les tumeurs épithéliales représentent environ 65% de toutes les tumeurs de l'ovaire et près de 90% des tumeurs malignes ovariennes (Chen, Ruiz et al. 2003). L'origine la plus probable de ces tumeurs est l'épithélium de surface de l'ovaire (Auersperg, Wong et al. 2001). En

outre, certaines études ont montré que les tumeurs épithéliales de l'ovaire pourraient aussi dériver des trompes de Fallope (Levanon, Ng et al. 2010).

Ces tumeurs peuvent être classées selon plusieurs critères: la classe tumorale (potentiel évolutif), le type histopathologique, le grade histologique et le stade.

### **Classification tumorale**

Les tumeurs épithéliales de l'ovaire peuvent être classées selon leur potentiel évolutif : tumeurs bénignes (60%), tumeurs à la limite de la malignité ou « borderline » qui se définissent par la présence de critères cytologiques de malignité et par l'absence de signes objectifs d'invasion du stroma (10 à 15%) ou tumeurs malignes, carcinomes infiltrants de comportement plus agressif (25 à 35%) (Chen, Ruiz et al. 2003).

### **Grade**

Les tumeurs de l'ovaire peuvent aussi être classées en fonctions du grade (G), c'est-à-dire selon le degré de différenciation des cellules tumorales. Plusieurs systèmes de gradation ont été évalués par les pathologistes parmi lesquels :

- Le grade de BRODERS (1951) : il s'agit d'un grade cytologique. Ce grade individualise quatre groupes selon le pourcentage de cellules indifférenciées présentes au sein de la tumeur :
  - Grade 1, 0-25% de cellules indifférenciées
  - Grade 2, 25-50% de cellules indifférenciées
  - Grade 3, 50-75% de cellules indifférenciées
  - Grade 4, 75-100% de cellules indifférenciées

Les cellules indifférenciées sont caractérisées par l'abondance des ribosomes, par un noyau occupant la plus grande partie du volume cellulaire et par une diminution du volume des nucléoles.

- Le grade de Dauplat et Nieberg (1988) : il s'agit d'un grade mixte cytologique et architectural, qui prend en compte 8 critères, pondérés de 1 à 4. La somme des scores

obtenus par chaque critère architectural ou cytologique donne un score total de 7 à 29 qui est divisé en quatre groupe : Grade I, score 7 à 12, bien différenciée ; Grade II, score 13 à 18, moyennement différencié ; Grade III, score 19 à 24, peu différencié ; Grade IV, score 25 à 29 indifférencié.

- Le Grade de la FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) (Mikuta 1993): ce grade est basé sur l'architecture de la prolifération tumorale. Il est basé sur le pourcentage de zones solides au sein de la tumeur :
  - Grade 1, < 5% de tumeur solide
  - Grade 2, < 50% de tumeur solide
  - Grade 3, > 50% de tumeur solide

Enfin, l'étude la plus récente est le grade de Silverberg (Silverberg 2000). Silverberg a proposé un nouveau système de gradation qui s'appliquerait uniquement aux carcinomes, indépendamment du type de différenciation histologique. Trois paramètres indépendants sont évalués en attribuant un score de 1 à 3 : l'activité mitotique qui varie de 1 à 3, le polymorphisme nucléaire qui varie également de 1 à 3 et enfin l'architecture histologique (où 1=morphologie glandulaire prédominante, 2= papillaire, 3= solide). Par la suite les scores sont additionnés ; un résultat compris entre 3 et 5 correspond à un G1 (tumeur bien différenciée), un score de 6 ou 7 est équivalent à un G2 (tumeur moyennement différenciée) et enfin, un résultat final de 8 ou 9 est égal à un G3 (tumeur peu différenciée). Le grade G0, appelé également GB correspond aux tumeurs borderline.

### **Stades**

La stadification du cancer de l'ovaire est basée sur l'étendue ou l'extension de la maladie. Elle est déterminée par des biopsies que le chirurgien prend au cours de la chirurgie, ainsi que par la présence ou non de cellules cancéreuses dans le liquide de lavage abdominal. La classification de l'extension du cancer de l'ovaire peut utiliser généralement les stades FIGO, soit le système AJCC (American Joint Committee on Cancer)/TNM (**Tableau 2**) (Chen, Ruiz et al. 2003).

Le AJCC/ système de classification TNM comprend trois catégories de cancer de l’ovaire, T, N et M. :

- La catégorie T va de 1 à 3 ou 4 et tient compte de l’extension tumorale constatée par l’examen anatomopathologique de la pièce opératoire;
- la catégorie N va de N0 à N3 selon la taille et le siège des adénopathies. N- et N+ sont utilisés en l’absence ou en présence d’un envahissement ganglionnaire à l’analyse anatomopathologique des ganglions;
- la catégorie M correspond à l’existence (M1) ou non (M0) de métastases.

**Tableau 2 : Classification FIGO et AJCC/TNM de l’extension des tumeurs de l’ovaire.**

(Chen, Ruiz et al. 2003).

Stades FIGO	Classification AJCC/TNM	Extension
I	T1	Tumeur limitée aux ovaires
IA	T1a	Tumeur limitée à un seul ovaire avec capsule intacte
IB	T1b	Tumeurs des deux ovaires avec capsule intacte
IC	T1c	Rupture capsulaire ou tumeur à la surface d’un ovaire ou cellules malignes dans le liquide d’ascite ou de lavage péritonéal
II	T2	Tumeur ovarienne étendue au pelvis
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

Stades FIGO	Classification AJCC/TNM	Extension
IIIA	T3a	Métastases péritonéales microscopiques
IIIB	T3b	Métastases macroscopiques $\leq 2$ cm
IIIC	T3c et/ou N1	Métastases macroscopiques $> 2$ cm et/ou adénopathies métastatiques régionales
IV	M1	Métastases à distances (autres que métastases péritonéales)

### Types histologiques

On distingue plusieurs types morphologiques de tumeur épithéliale de l'ovaire qui peuvent être classés selon le type de différenciation épithéliale : tumeurs séreuses, tumeurs mucineuses, tumeurs endométrioïdes, tumeur à cellules claires, tumeurs de Brenner et tumeurs indifférenciées.

#### Tumeurs séreuses

Les tumeurs séreuses de l'ovaire contiennent un liquide séreux, clair, et elles sont formées de cellules ayant l'architecture de la paroi interne des trompes de Fallope. Ce type histopathologique est le plus fréquent et est retrouvé dans environ 55% des tumeurs épithéliales. La plupart des tumeurs séreuses sont bilatérales, c'est-à-dire survenant sur les deux ovaires simultanément.

Les tumeurs séreuses bénignes représentent 65% des tumeurs séreuses, sont appelées cystadénomes séreux. Les cystadénomes séreux bénins sont bilatéraux dans environ 20% des cas et dans ce cas la chirurgie est un traitement curatif. Cette tumeur survient fréquemment chez les femmes dans la quarantaine et la cinquantaine.

L'adénofibrome est une tumeur bénigne assez voisines, tantôt solide, tantôt kystique, elle est constituée de structures épithéliales séreuses et de cellules stromales.

Les tumeurs séreuses peuvent également être borderline (tumeur située à la frontière entre la bénignité et malignité) dans 10% des cas. Elles sont bilatérales dans environ 30% des cas. Les

tumeurs borderline sont souvent diagnostiquées chez la femme dans la cinquantaine. Ces tumeurs sont généralement retirées par chirurgie et la survie à 5 ans des patientes est de 70-95%.

Les tumeurs séreuses malignes représentent 25% des tumeurs séreuses, sont appelées cystadénocarcinomes séreux. Ce groupe représente plus de la moitié de toutes les tumeurs malignes de l'ovaire confondues. Elles sont bilatérales dans environ deux tiers des cas. Ce type de tumeur est détectée fréquemment chez des femmes âgées post-ménopausées. Elles sont traitées par chirurgie et chimiothérapie, la majorité de ces tumeurs sont déjà à un stade avancé lors du diagnostic. Ainsi, la survie à 5 ans des patients avec un stade I de la maladie est de 76%, pour diminuer à 56% en présence d'un stade II, à 25% avec un stade III et même chuter drastiquement à 9% avec un stade IV de la maladie (Chen, Ruiz et al. 2003).

### **Tumeurs mucineuses**

Les tumeurs mucineuses de l'ovaire sont en générale multiloculaires, caractérisées par une abondante quantité de mucus (mucine) intracytoplasmique, et elles sont formées de cellules ressemblant à celles de l'épithélium endocervical et intestinal. Les tumeurs mucineuses représentent 10% des cancers de l'ovaire et sont rarement bilatérales. Les tumeurs mucineuses s'accompagnent rarement de localisation péritonéale.

Les tumeurs mucineuses bénignes représentent 80% des tumeurs mucineuses. Les cystadénomes mucineux bénins sont bilatéraux dans environ 5% des cas. Les tumeurs bénignes surviennent généralement chez les femmes entre 30 et 50 ans.

Les tumeurs mucineuses borderlines représentent 10% des cas. Les tumeurs mucineuses borderlines formées de l'épithélium endocervical et intestinal sont bilatérales dans environ 40% et 10% des cas respectivement. Les tumeurs borderline sont souvent diagnostiquées chez la femme entre 40 et 60 ans. Ces tumeurs sont généralement retirées par chirurgie et la survie à 5 ans des patientes est de 51-92%.

Les tumeurs mucineuses malignes représentent 10% des tumeurs mucineuses, sont appelées cystadénocarcinomes mucineux de l'ovaire. Elles sont bilatérales dans environ 6 à 20% des cas. Les tumeurs mucineuses malignes s'observent souvent au-delà de 60 ans et sont diagnostiquées dans 80% des cas à un stade I. Ainsi, la survie à 5 ans des patients avec un stade I de la maladie est de 76%, pour diminuer à 56% en présence d'un stade II, à 25% avec



un stade III et même chuter drastiquement à 9% avec un stade IV de la maladie. Chez ce type de tumeur les récurrences tumorales après une chirurgie et les métastases sont très rares, alors que les récurrences extra-péritonéale en particulier dans les poumons, sont des caractéristiques des tumeurs mucineuses malignes (Chen, Ruiz et al. 2003).

### **Tumeurs endométrioïdes**

Les tumeurs endométrioïdes de l'ovaire sont en général malignes, et souvent bilatérales et elles sont formées de cellules ayant l'aspect de celles qui recouvrent la paroi de l'utérus, plus précisément de l'endomètre. Elles sont moins fréquentes que les deux variétés précédentes et s'observent volontiers dans un contexte d'endométriose extra-utérine, voire d'adénocarcinome de l'endomètre.

Les tumeurs endométrioïdes bénignes sont rares. Elles sont principalement unilatérales, le traitement utilisé est la chirurgie curative

Les tumeurs endométrioïdes borderlines représentent 20% des cas. Comme les formes bénignes, elles sont principalement unilatérales. Le traitement de ces tumeurs est la chirurgie avec de bon pronostic.

Les tumeurs endométrioïdes malignes représentent 80% des tumeurs endométrioïdes et représentent 10-25% des tumeurs épithéliales malignes des ovaires des carcinomes. Ces tumeurs occupent le deuxième rang parmi les autres tumeurs malignes de l'épithélium ovarien. Elles sont bilatérales dans environ 13% à 28% des cas, sont kystiques et principalement solides. Il est à noter que les tumeurs endométrioïdes malignes sont considérées comme ayant un meilleur pronostic que les tumeurs malignes séreuses et mucineuses. Les tumeurs endométrioïdes bénignes, borderlines et malignes sont tous diagnostiquées chez la femme dans la soixantaine. Ainsi, la survie à 5 ans des patients avec un stade I de la maladie est de 78%, pour diminuer à 63% en présence d'un stade II, à 24% avec un stade III et même chuter drastiquement à 6% avec un stade IV de la maladie (Chen, Ruiz et al. 2003).

### **Tumeurs à cellules claires**

Les tumeurs à cellules claires sont des tumeurs rares caractérisées par des cellules épithéliales volumineuses, polygonales ayant un cytoplasme clair riche en glycogène et contenant des quantités variées de lipides. Les tumeurs bénignes et borderline à cellules

claires sont assez rares, la majorité des tumeurs de ce type histopathologique étant maligne. Les adénocarcénomes à cellules claires représentent environ 4 à 5% des tumeurs malignes de l'ovaire. Dans 40% des cas, celles-ci sont bilatérales. L'adénocarcénome à cellules claires est détecté fréquemment chez la femme dans la cinquantaine. Les taux de survie pour les patientes ayant une tumeur à cellules claires sont beaucoup moins bons que dans les autres types histopathologique. La survie à 5 ans des patients avec un stade I de la maladie est de 69%, pour diminuer à 55% en présence d'un stade II, à 14% avec un stade III et même chuter drastiquement à 4% avec un stade IV de la maladie (Chen, Ruiz et al. 2003). La tumeur à cellules claires est le type le plus résistant à la chimiothérapie, elle est de mauvais pronostic (Cannistra 2004).

### **Les tumeurs à cellules transitionnelles ou de Brenner:**

Les tumeurs de Brenner sont rares, ne représentant pas plus de 2% des tumeurs de l'ovaire dont la grande majorité est bénigne, et plus souvent bilatérale. Les cellules qui composent ce tumeur ont un aspect voisin de celui des cellules urothéliales ou transitionnelles qui tapissent la vessie (Chen, Ruiz et al. 2003).

Les tumeurs de Brenner bénignes surviennent généralement chez les femmes entre 50 et 60 ans, le traitement utilisé est la chirurgie curative.

Les tumeurs de Brenner borderlines sont principalement unilatérales, surviennent généralement chez les femmes entre 60 et 70 ans.

Les tumeurs de Brenner malignes sont principalement unilatérales. C'est le type de tumeur de l'ovaire qui répond le plus à la chimiothérapie parmi toutes les tumeurs épithéliales de l'ovaire (Kourda, Elloumi et al. 2008).

### **Les tumeurs mixtes:**

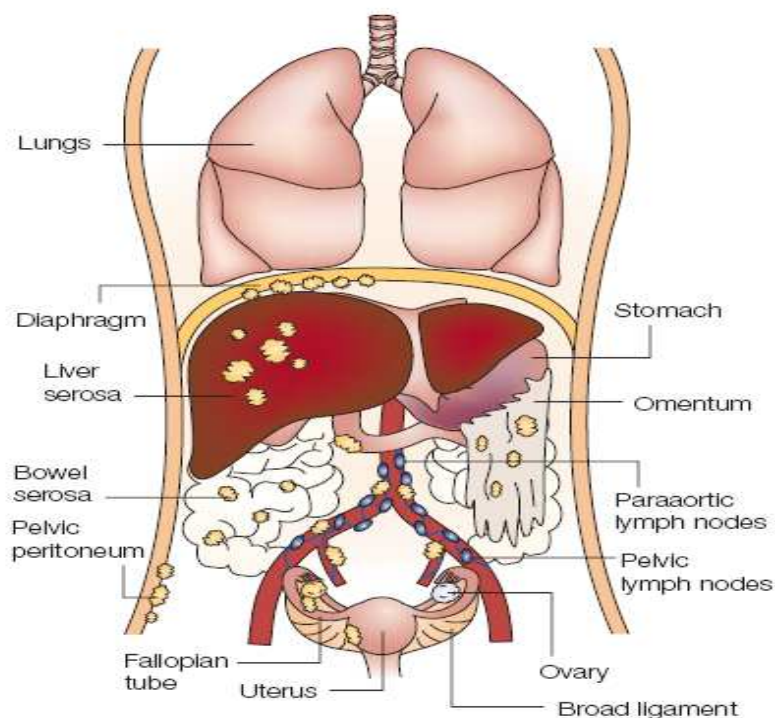
Ce sont des tumeurs très rares qui contiennent au moins deux parmi les cinq types histologiques précédents (chaque composante devant représenter au moins 10% de l'ensemble de tumeur).

**Les tumeurs indifférenciées:**

Environ 5% des cancers ovariens sont des cancers indifférenciés, elles n'ont pas de signe de différenciation clairement identifiable. La moitié d'entre elles sont bilatérales et plus des trois quarts présentent une extension au-delà du pelvis au moment du diagnostic. Cette tumeur est détectée fréquemment chez la femme dans la cinquantaine. La survie à 5 ans des patients avec un stade I de la maladie est de 68%, pour diminuer à 40% en présence d'un stade II, à 17% avec un stade III et même chuter drastiquement à 6% avec un stade IV de la maladie (Chen, Ruiz et al. 2003).

**I.1.3. Extension de tumeur ovarienne**

Dans le cancer de l'ovaire, environ 70-75% des patientes ont déjà une extension au pelvis au moment du diagnostic. La dissémination du cancer de l'ovaire peut se répandre de trois manières : la dissémination par voie péritonéale, par vaisseaux lymphatiques et par veines vers d'autres organes (Figure 3).



**Figure 3 : Dissémination du cancer épithélial de l'ovaire (Naora and Montell 2005).**

- la dissémination par voie péritonéale est la plus souvent rencontrée (Naora and Montell 2005).

Lorsque la capsule de l'ovaire se rompt, les cellules tumorales peuvent se disperser dans la cavité péritonéale. Du fait de la situation intra-péritonéale des ovaires et de l'origine commune avec la séreuse péritonéale, les cellules malignes diffusent spontanément dans la cavité abdomino-pelvienne, se greffent sur le péritoine et peuvent aller envahir différents organes dans cette cavité (Cul-de-sac de Douglas, grand épiploon, gouttière pariéto-coliques, coupes diaphragmatiques et le tractus intestinal).

- la dissémination par voie lymphatique peut toucher l'ensemble des ganglions locorégionaux ; ganglions lombo-aortiques, pelviens et inguinaux.

- la dissémination métastatique en dehors de la cavité abdominale est plus rare, elle peut toucher le poumon, la plèvre, le cerveau, le foie et le sein (Colombo, Van Gorp et al. 2006; Klein, Brown et al. 2010; Sun, Chao et al. 2010).

### **I.1.4. Causes et facteurs de risque**

Les événements biologiques qui mènent au cancer de l'ovaire restent mal connus. Les études scientifiques ont permis de distinguer différents types de facteurs de risque du cancer de l'ovaire dont l'âge, les facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux, pathologiques et inflammations.

#### ***I.1.4.a. L'âge***

Pour la plupart des cancers, l'âge constitue le principal facteur de risque. Le risque de développer un cancer de l'ovaire augmente régulièrement avec l'âge. La fréquence maximale se situe entre 60 et 70 ans (Colombo, Van Gorp et al. 2006).

#### ***I.1.4.b. Facteurs génétiques***

Il est admis aujourd'hui que 5 à 10% de l'ensemble des cancers de l'ovaire ont une origine génétique avec une transmission autosomique dominante.

Les femmes ayant des antécédents familiaux de cancer du sein et du côlon, peuvent avoir un plus grand risque de développement de cancer de l'ovaire. Les prédispositions génétiques au

cancer de l'ovaire et leurs corrélations avec autres tumeurs pourraient suggérer trois principaux syndromes:

- Les formes familiales spécifiques de cancer de l'ovaire
- Les formes familiales de cancer du sein et de l'ovaire
- Les formes familiales de cancer du colon héréditaire non polyposique (HNPCC) ou syndrome de lynch II

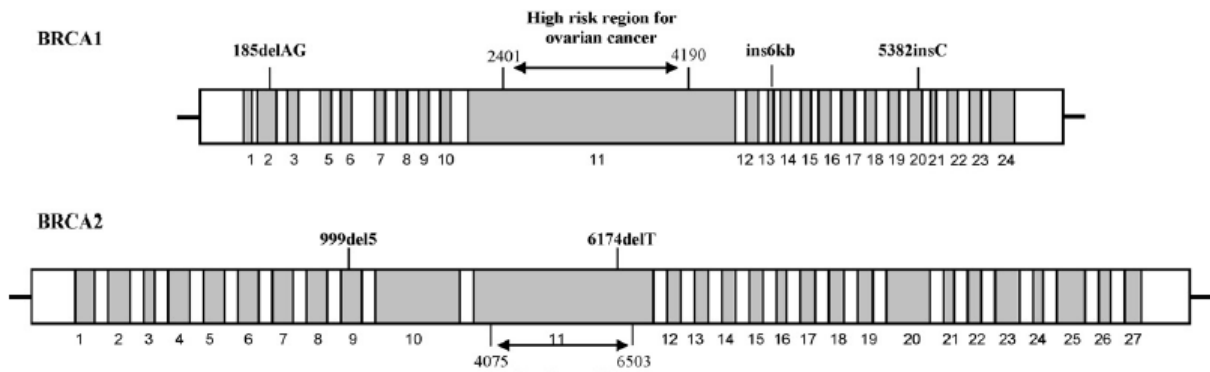
Il existe encore des rares syndromes qui sont responsables de 1% de prédisposition génétique au cancer de l'ovaire comme le syndrome de Goblin, Ollier et Peutz-Jeghers (Russo, Calo et al. 2009).

Les mutations dans les gènes BRCA1 et ou BRCA2 sont impliquées dans les formes familiales des deux premiers syndromes et sont responsables de 90% des cancers de l'ovaire héréditaires. BRCA1 et BRCA2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs. Ils contrôlèrent la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Les risques de développement de cancer de l'ovaire ou du sein dépendent de la localisation des mutations sur ces deux gènes avec une moyenne d'âge au diagnostic de 45 ans pour BRCA1 et plus de 50 ans pour BRCA2 (Figure 4). Les mutations de BRCA1 sont détectées dans 75% des familles qui ont des antécédents familiaux de cancer de l'ovaire, tandis que le risque de cancer d'ovaire chez les femmes porteuses d'une anomalie de BRCA2 est d'environ 10 à 20% et de cancer du sein de 35%. Les femmes ayant les mutations de BRCA1 et BRCA2 ont 3 à 12% de risque de développer un cancer de l'ovaire (Russo, Calo et al. 2009).

Les altérations des gènes de réparations des appariements de l'ADN lors de leur réplication (ou DNA mismatch repair genes MMR, tels que hMSH2 et hMLH1 « dans 70% des cas », hPMS1, hPMS2, hMSH6) sont impliquées dans le syndrome HNPCC. Ces altérations sont généralement détectées chez les femmes jeunes de 45 ans (Russo, Calo et al. 2009). Ainsi les patientes atteintes de ce syndrome ont une probabilité de 40-60% de développer un cancer du côlon et de l'endomètre, en plus d'avoir 10-12% de chance de développer un cancer de l'ovaire (Hanna and Adams 2006).

Concernant l'histologie des tumeurs, les patientes porteuses de mutations BRCA1 et BRCA2 présentent plus fréquemment des adénocarcinomes séreux invasifs de haut grade, et exceptionnellement des carcinomes mucineux invasifs. Tandis que les patientes porteuses de

mutations dans les gènes MMR sont réparties dans les différents histotypes de cancers de l'ovaire (Russo, Calo et al. 2009).



**Figure 4 : Localisation des mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 qui sont associées avec le risque de cancer de l'ovaire (Russo, Calo et al. 2009).**

#### *1.1.4.c. Facteurs hormonaux*

Le cancer de l'ovaire partage avec le cancer du sein certains facteurs liés à la fertilité et à la reproduction. En effet, le risque de cancer de l'ovaire augmente chez les femmes nullipares (qui n'ont pas eu d'enfant), ainsi que chez celles ayant eu une puberté précoce et une ménopause tardive (cependant les résultats sont discordants) (Argento, Hoffman et al. 2008). Il est en revanche clairement établi que le risque de cancer de l'ovaire diminue à chaque nouvelle grossesse (Whittemore, Harris et al. 1992) et avec un âge plus avancé à la première naissance ou à la dernière naissance (Whiteman, Siskind et al. 2003). Le risque du cancer de l'ovaire diminuerait également avec l'allaitement (Colombo, Van Gorp et al. 2006; Hanna and Adams 2006), ainsi qu'après une hystérectomie ou une ligature des trompes. Cet effet protecteur pourrait s'expliquer par l'arrêt de l'ovulation et la diminution du taux d'hormones gonadotropes.

L'effet des hormones synthétiques exogènes a été beaucoup étudié. Il est maintenant reconnu que les femmes qui ont utilisé des contraceptifs oraux pendant plus de 5 ans diminuent le risque de cancer de l'ovaire de 30 à 50%. Cet effet serait expliqué par le blocage de l'ovulation entraîné par ce traitement (Pelucchi, Galeone et al. 2007). L'effet favorable a été observé dix à quinze ans après la fin de la prise de pilule et la protection persiste plus longtemps, au-delà de 20-25 ans. En revanche certaines études montrent qu'un traitement hormonal substitutif (TSH) prolongé (plus de cinq ou dix ans) de la ménopause associant l'estrogène augmente le risque de cancer de l'ovaire par 1,5 à 2 et par 1,58 pour les femmes

sous traitement TSH associant l'estrogène et la progestérone (Colombo, Van Gorp et al. 2006). Ainsi une étude réalisée au Royaume-Uni auprès d'un échantillon d'un million de femmes ménopausées ayant suivi un TSH pendant cinq à sept ans, a montré un risque accru de 20% de développer un cancer de l'ovaire quel que soit le TSH utilisé : estrogènes seul, combinaisons d'estrogène et de progestérone (Beral, Bull et al. 2007).

Ces données renforcent la théorie de « l'ovulation incessante » posée par Fathalla en 1971 (Fathalla 1971). Celui-ci a émis l'hypothèse selon laquelle la rupture répétée de l'épithélium de surface, au cours des cycles ovulatoires, suivie d'une prolifération active des cellules épithéliales nécessaires à la cicatrisation, pourrait être à l'origine de la transformation maligne de ces cellules. En effet, ces lésions cellulaires renouvelées aboutissent à une augmentation du nombre d'erreurs lors des réparations de l'ADN et à une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs susceptibles de conduire à une mutagenèse. Ces données sont à mettre en parallèle avec « l'hypothèse des gonadotropines » émise par Stadel selon laquelle des taux élevés de gonadotropines hypophysaires augmenteraient le risque du cancer, en stimulant l'épithélium ovarien de surface (Stadel 1975).

### ***1.1.4.d. Facteurs environnementaux***

On note des variations géographiques de l'incidence du cancer de l'ovaire, à l'échelle européenne comme à l'échelle nationale avec un gradient croissant du sud au nord. L'incidence est plus élevée dans les pays industriels de l'Amérique du Nord et de l'Europe. Ceci suggère une influence du mode de vie sur la survenue des cancers.

Le mode de vie pourrait intervenir par la consommation alimentaire plus riche en graisses animales et avec une consommation calorique plus élevée. Plusieurs études sur les femmes asiatiques ayant immigré aux Etats-Unis, en Australie ou au Canada ont montré qu'elles-mêmes et leur descendance développent plus fréquemment un cancer de l'ovaire que les femmes restées en Asie, même si les risques restent moins importants que ceux des femmes américaines. Cette hypothèse a été confortée par des études cas-témoins mettant en évidence une consommation plus forte de graisses d'origine animale et de produits laitiers (Whittemore, Harris et al. 1992). L'excès de poids entraîne un risque modérément élevé de cancer de l'ovaire (Calle, Rodriguez et al. 2003), en particulier à l'adolescence ou chez l'adulte jeune (Lukanova, Toniolo et al. 2002). L'acrylamide qui a été toujours considéré comme une substance potentiellement cancérigène pour les humains, peut être formée dans

les aliments riches en glucides cuits à haute température. Au contraire, une étude récente sur des femmes suédoises, a montré qu'il n'y a aucune association entre la consommation d'acrylamide alimentaire à long terme et l'incidence du cancer épithélial de l'ovaire (Larsson, Akesson et al. 2009).

En revanche, quelques études ont montré le rôle important de certains aliments dans la réduction de cancer de l'ovaire par exemple :

- le caroténoïde (en particulier le carotène) est un pigment naturel qui se retrouve dans les aliments jaunes, orange et légumes verts tel que les tomates et les carottes.
- Les fibres, fruits, légumes, poissons, huile d'olive, calcium et phytoestrogène (qui se trouve dans les produits de soya, les grains entiers, les haricots).

De nombreuses études suggèrent que la consommation de vitamines pourrait avoir un effet protecteur contre le cancer ovarien (Hanna and Adams 2006). Toutefois les études restent contradictoires. Néanmoins, une étude (Jordan, Whiteman et al. 2006) suggère que fumer de manière régulière multiplie le risque de développer une tumeur mucineuse de l'ovaire alors que l'arrêt de la cigarette permettra un retour au risque basal.

Une étude faite pour étudier l'effet de la caféine sur le cancer d'ovaire, montre que les femmes ménopausées qui ont déclaré avoir bu cinq ou plus tasses de café par jour ont augmenté le risque de déclenchement de cancer d'ovaire par rapport aux femmes non consommatrices de café (Lueth, Anderson et al. 2008).

Plusieurs études montrent le rôle délétère de certaines substances comme les herbicides, les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques, l'amiante et le talc (Argento, Hoffman et al. 2008). L'amiante et le talc, comme d'autres poussières industrielles, pourraient induire un processus cancéreux par l'inflammation chronique. En effet, l'inflammation produit des oxydants toxiques qui peuvent causer des dommages à l'ADN, et mènent également à l'augmentation du taux de prolifération ce qui peut augmenter le risque de mutagenèse (Colombo, Van Gorp et al. 2006).

### ***1.1.4.e. Facteurs inflammatoires***

Il a été suggéré que l'inflammation pourrait être un facteur contribuant au développement des cancers ovariens, suggérant que les maladies inflammatoires pelviennes peuvent aboutir



au développement du cancer de l'ovaire (Ness and Cottreau 1999). En revanche la ligature des trompes et l'hystérectomie (ablation de l'utérus) agissent comme des facteurs protecteurs en prévenant le passage des initiateurs environnementaux de l'inflammation (Auersperg, Wong et al. 2001).

Il a été noté que l'activité physique pourrait réduire le risque de cancer d'ovaire (Cottreau, Ness et al. 2000).

### **I.1.5. Diagnostic**

Environ, 75% des cancers sont diagnostiqués à un stade tardif, souvent au stade III. Les stades précoces sont le plus souvent asymptomatiques et diagnostiqués de façon fortuite lors d'une chirurgie pour une pathologie bénigne pelvienne.

#### ***I.1.5.a. Symptomatologie***

Le cancer de l'ovaire ne produit pas de symptômes spécifiques. Dans les formes précoces de la maladie, le patient peut se plaindre de troubles urinaires (envie fréquente d'uriner), de constipation et parfois d'une distension ou d'une douleur en bas du ventre comme des conséquences de la croissance tumorale (Colombo, Van Gorp et al. 2006).

C'est souvent à un stade avancé de la maladie que les symptômes apparaissent, ces symptômes sont liés à l'extension de la maladie dans et en dehors du pelvis et ont la particularité d'être non spécifiques:

- Douleurs pelviennes et ou/abdominales
- Troubles gynécologiques : métrorragies spontanées, leucorrhées (très suspectes chez une femme ménopausée)
- Troubles digestifs : syndrome occlusif, épreinte, ténésme traduisant une compression rectale
- Troubles urinaires : pollakiurie, dysurie
- Troubles liés à la compression des veines iliaques : œdème des membres inférieurs, thrombose veineuse profonde
- Symptômes pulmonaires : dyspnée évocatrice d'un épanchement pleural

- Altération de l'état général, amaigrissement

Le diagnostic peut être également évoqué à l'occasion d'un examen radiologique pour une autre indication ou en cas de complication ovarienne aigüe (torsion, abcès, hémorragie intra-kystique) qui survient de façon plus habituelle dans le cadre des tumeurs bénignes de l'ovaire.

### ***1.1.5.b. Examen clinique***

Il est possible, au toucher vaginal, de mettre en évidence les signes d'une masse annexielle: masse arrondie, bien limitée, rénitente, séparée du corps de l'utérus. Cet examen peut tout à fait correspondre à un carcinome ovarien à un stade précoce.

D'autres signes en revanche font plutôt suspecter une extension abdominale de la maladie à un stade avancé: on retrouve une distension abdominale (causée par la taille de la tumeur, l'ascite ou l'obstruction des intestins) et un envahissement des ganglions (inguinaux, axillaires ou supra-claviculaires) (Colombo, Van Gorp et al. 2006).

### ***1.1.5.c. Examens complémentaires***

Des examens complémentaires sont nécessaires pour réunir le maximum d'informations avant la prise en charge thérapeutique proprement dite.

### **Imagerie**

La première technique utilisée en général, lorsqu'il existe une symptomatologie clinique, ou permettant une découverte fortuite, est l'échographie.

L'échographie se fait toujours en deux temps : échographie pelvienne (du bas du ventre) et échographie endovaginale (transduction d'une sonde dans le vagin). Les deux voies permettent de confirmer la présence d'une tumeur ovarienne, sa nature (solide, liquide ou les deux), sa taille, et de vérifier l'état des organes voisins. Elle permet également d'orienter le gynécologue sur le caractère bénin ou malin afin de définir la conduite à tenir, allant de la surveillance à la laparotomie en passant par la coelioscopie. Cependant, la certitude de la bénignité ou de la malignité ne peut être affirmée que par une analyse histologique. Un Doppler couleur peut être couplé à l'échographie pour évaluer la vascularisation dans les zones tumorales.

D'autres examens peuvent être effectués tels que le scanner abdomino-pelvien qui est indiqué en cas de malignité pour évaluer les nœuds lymphatiques pelviens et lombo-aortique, l'IRM (Imagerie à Résonance Magnétique) qui donne une iconographie en 3 dimensions et sa sensibilité quant au diagnostic de malignité est supérieure à l'échographie vaginale, elle précise l'extension de la tumeur aux organes de voisinage, et le degré de nécrose de la tumeur, le pourcentage liquide/solide, le caractère rigide des parois. Le diagnostic de la cœlioscopie est de toute première importance si les éléments cliniques et l'imagerie ne sont pas formellement en faveur de la malignité : elle permet la biopsie pour l'étude histologique. En plus, une radiographie au niveau des poumons peut être réalisée pour déterminer la présence de métastases pulmonaires et pleurales (Colombo, Van Gorp et al. 2006).

### Les marqueurs tumoraux

Les marqueurs tumoraux sont des substances protéiques qui sont produites principalement par les cellules cancéreuses et que l'on retrouve dans le sérum (marqueurs tumoraux sériques) ou dans les tissus (marqueurs tumoraux tissulaires). Le marqueur idéal doit être capable de détecter la maladie encore asymptomatique et ne devrait pas s'observer chez le sujet sain. Les marqueurs tumoraux sont considérés comme des facteurs pronostiques qui permettent de prévoir le devenir d'un patient, sa réponse à un traitement ou le risque de récurrence (Gadducci, Cosio et al. 2009).

### Les marqueurs tumoraux sériques

#### **CA125**

Mise en évidence depuis 1981, l'antigène CA125 est le marqueur tumoral sérique essentiel utilisé pour le cancer épithélial de l'ovaire (Bast, Feeney et al. 1981; Bast, Klug et al. 1983).

CA125 est une glycoprotéine de haut poids moléculaire de type mucine, sa concentration est élevée dans près de 80% des patients avec des cancers épithéliaux de l'ovaire. C'est un facteur pronostic de l'évolution de la maladie et de la réponse à la chimiothérapie (Markmann, Gerber et al. 2007). Lors du diagnostic chez les patients au stade I de la classification FIGO, 50% ont une concentration élevée de CA125 et 90% chez les patientes avec un stade avancé (Bast, Xu et al. 1998). Cependant, le CA125 est exprimé par les cellules cancéreuses et non cancéreuses, il peut être augmenté chez les patients atteints de cancer du poumon, du sein, de l'endomètre, du tractus gastro-intestinal, en cas d'inflammation ou d'endométriose, mais aussi

avec une tumeur bénigne de l'ovaire ou de l'utérus (Meden and Fattahi-Meibodi 1998). Dans des conditions physiologiques, le CA125 peut être augmenté modérément pendant les règles et lors du premier trimestre de la grossesse (Grover, Koh et al. 1992). CA125 doit être dosé avant la chirurgie et avant le début de chaque cure de chimiothérapie. Ce marqueur n'est cependant pas assez spécifique pour suivre seul de dépistage mais il est utile dans la suivie de la patiente.

Chez une patiente ménopausée avec une masse pelvienne, un taux élevé du CA125 accroît la possibilité d'une tumeur maligne de l'ovaire. Le niveau absolu du CA125 avant traitement est un facteur pronostique important (van der Burg, Lammes et al. 1988). Dans une étude récente évaluant le CA125 comme facteur pronostique, Obermain montre qu'un CA125  $\leq 30$  U/ml en préopératoire est un facteur de bon pronostic majeur dans les cancers de stade I dominant les autres facteurs de risque comme le type histologique et le grade (Obermair, Fuller et al. 2007).

Après la première chirurgie complète, la demi-vie du CA125 est d'environ 6 jours, plusieurs études ont montré que les patientes avec une demi-vie de plus de 20 jours avaient un moins bon pronostic. Pendant une chimiothérapie, la décroissance du marqueur est un signe d'efficacité thérapeutique, alors que son augmentation peut être le signe de développement d'une résistance pouvant entraîner des modifications du traitement ou l'arrêt d'un traitement inefficace. Le taux de CA125 est prédictif de la réponse à long terme, un taux sérique supérieur à 70 unités/ml avant la troisième cure de chimiothérapie initiale est l'un des meilleurs signes prédictifs de rechute ou de décès (Fayers, Rustin et al. 1993).

### **Cytokératine soluble**

Les formes solubles de fragments de cytokératines sont des éléments importants dans la structure de cytosquelette cellulaire et ils ont été identifiés dans le sérum de patients atteints de différentes tumeurs malignes, y compris des CEO. En effet, il a été montré que la cytokératine 19, semble être un facteur prédictif de réponse à la chimiothérapie (Gadducci, Cosio et al. 2009).

### **Les kallicroéines humaines**

Les kallicroéines humaines, sont une famille de 15 enzymes qui forment un sous-groupe de la famille des sérine-protéases. Certaines de ces protéases sont impliquées dans plusieurs processus liés au cancer, y compris la croissance cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase. Diamandis et al., montrent que lorsque la quantité de kallicroéine 6 est élevée (>4,4 µg/l) chez les patientes avec CEO qui ont une courte survie par rapport à celles qui ont un taux normal de la kallicroéine 6. En outre, Luo et al., ont rapporté que la concentration élevée du sérum humain par la kallicroéine 10 était significativement liée au stade avancé de tumeur, à l'histotype séreux, grade avancé, l'absence de réponse à la chimiothérapie, et taux de survie très bas (Gadducci, Cosio et al. 2009).

### **Cytokines**

Selon les données indiquées dans la revue de Gadducci et al., des études ont montré que l'interleukine 6 (IL-6) produite par les cellules tumorales, est un indicateur de mauvais pronostic dans les stades avancés de CEO. Des taux élevés d'IL-6, IL-8 et IL-10 sont associés à des moyennes de survie très courtes. Le facteur PDFG (Platelet-derived growth factor) est un puissant mitogène pour les cellules de CEO. Des analyses faites sur 314 patients indiquent que la haute expression de VEGF (vascular endothelial growth factor) dans le sérum préopératoire est liée à des moyennes de survie plus courtes et une augmentation du risque de décès liés au cancer (Gadducci, Cosio et al. 2009).

L'interféron- $\gamma$  qui est un activateur des cellules NK et des lymphocytes T, est considéré comme un facteur pronostic favorable pour les patients atteints du CEO à cause de son activité anti-tumorale (Moser and Willimann 2004) et anti-proliférative sur les cellules du CEO (Gadducci, Cosio et al. 2009).

### **Les marqueurs tumoraux tissulaires**

De nombreux marqueurs tissulaires ont été proposés. Il s'agit notamment de régulateurs moléculaires de la progression du cycle cellulaire (exemple cycline D1) et de l'apoptose (exemple p53), et de facteurs pro-oncogènes comme HER-2/neu (epidermal growth factor receptor 2).

La perte de l'expression de différentes protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, comme p2<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, associée à la surexpression de la cycline D1, présente

une valeur pronostique défavorable (Bali, O'Brien et al. 2004).

La surexpression de HER-2/neu est très variable dans la littérature selon les méthodes de détection utilisées (immunohistochimie ou IHC, hybridation fluorescente *in situ*, hybridation chromogénique *in situ*), les différentes sources de matériel (blocs de tumeur ou tissu micro-array). Dans un essai multicentrique du groupe GINECO, le statut de human EGF receptor 2 (HER-2) a été évalué chez 117 patientes ayant un cancer de l'ovaire de stade III/IV. Toutes les patientes recevaient la même combinaison de chimiothérapie et étaient suivies sur une médiane de 68 mois. Les auteurs ont montré que la surexpression de HER-2 était associée à un mauvais pronostic (Camilleri-Broet, Hardy-Bessard et al. 2004).

L'EPCAM/CD326 (*Epithelial cell adhesion molecule*) a été identifié comme un marqueur du cancer d'origine épithéliale. Les études ont montré que la surexpression de EPCAM est associée à une croissance rapide des cellules cancéreuses épithéliales et donc à un mauvais pronostic de survie (Baeuerle and Gires 2007; Munz, Baeuerle et al. 2009).

### **I.1.6. Prise en charge thérapeutique**

Le traitement classique du cancer de l'ovaire est d'abord chirurgical, suivi dans la plupart du temps d'une chimiothérapie puis d'une surveillance.

#### ***I.1.6.a. Traitement chirurgical***

La chirurgie occupe une place importante à toutes les étapes de la prise en charge des cancers de l'ovaire: pour le diagnostic, pour la détermination du stade, pour le thérapeutique et l'évolution de la réponse au traitement.

En générale, la chirurgie s'accompagne d'un lavage péritonéal et d'un examen du liquide d'ascite. La chirurgie est adaptée au stade de l'évolution de la tumeur.

Dans le cas de cancers ovariens précoces (stade I-II), l'intervention chirurgicale comporte une annexectomie bilatérale (ablation des deux côtés des trompes de fallope et des ovaires) avec hystérectomie totale (ablation de l'utérus et du col de l'utérus), une omentectomie (ablation d'une partie de péritoine) et une appendicectomie (ablation de l'appendice) systématiques ainsi qu'une exploration complète de la cavité péritonéale et des chaînes ganglionnaires.

Chez la femme jeune sans enfant en présence d'une lésion unilatérale (de bon pronostic, stade IA), le traitement peut être conservateur (annexectomie unilatérale et exploration) pour préserver la fécondité.

Dans les cas de cancers ovariens avancés (stade III-IV), la chirurgie a avant tout un rôle de réduction tumorale. En effet, moins le résidu tumoral est important, plus la survie est prolongée. L'exérèse doit donc être la plus complète possible. Elle comporte les ablations effectuées en présence d'un cancer de l'ovaire de stade I-II, complétées par une lymphadénectomie (ablation de certains ganglions lymphatiques) et une résection des nodules tumoraux péritonéaux.

Dans les cas d'extension tumorale étendue, il est parfois nécessaire de réaliser des résections complémentaire: rectum, côlon, grêle, rate, vessie (Colombo, Van Gorp et al. 2006).

Toutes les chirurgies ont des effets secondaires, les effets secondaires les plus fréquentes de la chirurgie de la tumeur de l'ovaire sont :

- Il arrive qu'un hématome ou une infection apparaisse au niveau de la plaie. Afin d'éviter ces hématomes et ces infections, des drains sont posés près de la plaie. Ils restent en place quelques jours pour évacuer les liquides biologiques (sang, lymphe, ect.);
- chez les jeunes femmes, lorsque la chirurgie a dû être totale (les ovaires et l'utérus ont été enlevés), cette chirurgie entraîne une ménopause artificielle (arrêt des règles) qui s'accompagne d'autres effets secondaires liés à la ménopause comme les bouffées de chaleur;
- parfois la chirurgie est suivie d'un rétrécissement du vagin;
- les ovaires ayant été enlevés, il n'y a plus d'hormones produites. Il se peut que le manque d'hormones provoque une rétraction des muqueuses (atrophie) et une mauvaise lubrification du vagin. Ceci peut entraîner des douleurs lors des rapports sexuels.

### ***1.1.6.b. Chimiothérapie***

Les médicaments actifs sur le carcinome ovarien sont généralement une combinaison d'agents de la catégorie des taxanes, tel que le paclitaxel ou le docetaxel, et d'agents de la catégorie des sels de platines comme le carboplatine ou le cisplatine. Les taxanes ont un effet stabilisateur sur les microtubules cellulaires. Cela empêche leur réorganisation et inhibe ainsi le déroulement de la mitose, ce qui conduit à la mort cellulaire. Les sels de platines

empêchent les brins d'ADN de se séparer, ce qui prévient la réplication de l'ADN et donc la division cellulaire (Colombo, Van Gorp et al. 2006). Ces médicaments sont injectés par voie intraveineuse, soit par voie intrapéritonéale.

La chimiothérapie est utilisée systématiquement dans les cancers de l'ovaire (à l'exception des stades IA et IB, grade 1 ou 2 qui sont de bon pronostic) et utilisée dans plusieurs circonstances : chimiothérapie préparatoire à la chirurgie, chimiothérapie adjuvante après exérèse chirurgicale incomplète ou complète et chimiothérapie palliative en situation d'échec.

### ***I.1.6.c. Surveillance***

La surveillance d'un cancer de l'ovaire traité a comme but principal la détection précoce d'une récurrence chez les femmes. Elle permet d'évaluer également l'efficacité des traitements utilisés en cas de maladie évolutive. La surveillance repose sur un examen clinique complet, les méthodes d'imagerie et le dosage des marqueurs tumoraux (dosage du CA 125). Ces méthodes permettent de mettre en évidence une éventuelle masse résiduelle. Bien que les taux de réponse à la chimiothérapie soient proches de 80%, les trois quarts des patientes, initialement sensibles au traitement, rechutent et développent une chimiorésistance. Le traitement est souvent une reprise de la chimiothérapie (Colombo, Van Gorp et al. 2006).

### **I.1.7. Prévention et Dépistage**

Le consensus établi ne préconise aujourd'hui un dépistage que chez les femmes à haut risque de cancer ovarien (porteuses d'une mutation sur le gène BRCA1 ou BRCA2). Il comprend un examen régulier par échographie endovaginale avec dosage du marqueur sérique du CA 125 recommandée à partir de 35 ans, et voire plus tôt s'il existe une notion de forme familiale précoce (Laframboise, Nedelcu et al. 2002), avec cependant une efficacité médiocre. Il peut être proposé une ovariectomie bilatérale systématique chez celles-ci si elles ont plus de 40 ans et l'absence de désir d'enfant

### **I.1.8. Signalisation cellulaire du CEO**

Les cellules tumorales présentent des altérations dans les voies de signalisation qui contrôlent la prolifération, la réparation des anomalies génomiques, et l'apoptose.



Dans les cancers de l'ovaire, un certain nombre de voies sont activées dans plus de 50% des cas. Parmi elles la voie des PI3K(Phosphatidylinositol 3-Kinase), NF- $\kappa$ B, Src et Ras (Bast, Hennessy et al. 2009).

Plusieurs études ont démontré que la voie des PI3K est la plus fréquemment dérégulée dans les cancers (Engelman 2009). Elle est activée (de manière constitutive) dans environ 70% des cancers ovariens (Bast, Hennessy et al. 2009). AKT, une serine-threonine kinase qui est directement activée en réponse à PI3K, est l'effecteur majeur des PI3Ks dans les cancers.

### **Voie de signalisation AKT**

AKT est une sérine thréonine protéine kinase (également connu comme "la protéine kinase B", PKB), joue un rôle clé dans la régulation de multiples processus cellulaires (survie, progression du cycle cellulaire, synthèse protéique). Elle existe sous 3 isoformes (AKT 1, 2 et 3). Son dysfonctionnement est impliqué dans la pathogenèse de nombreux cancers (Altomare and Testa 2005). AKT est généralement activée par phosphorylation en réponse à des facteurs de croissance. En effet, lors de la fixation du ligand (facteur de croissance) à son récepteur spécifique, le PI3K est activé, ce qui va conduire à la production de Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) par phosphorylation des PI-4-P et PI-4,5-P2. Cette réaction peut être reversée par la PIP3 phosphatase PTEN, un inhibiteur de la voie des PI3Ks (Figure 5).

L'activation de AKT/PKB nécessite de multiples événements de phosphorylation. La phosphorylation consécutives de Thr (308) et Ser (473) de AKT par les phosphatidylinositol-dependent kinase (PDK1 et PDK2) est nécessaire pour l'activation complète de AKT. Par la suite, la kinase AKT/PKB active se dissocie du lipide et peut initier plusieurs voies de signalisation.

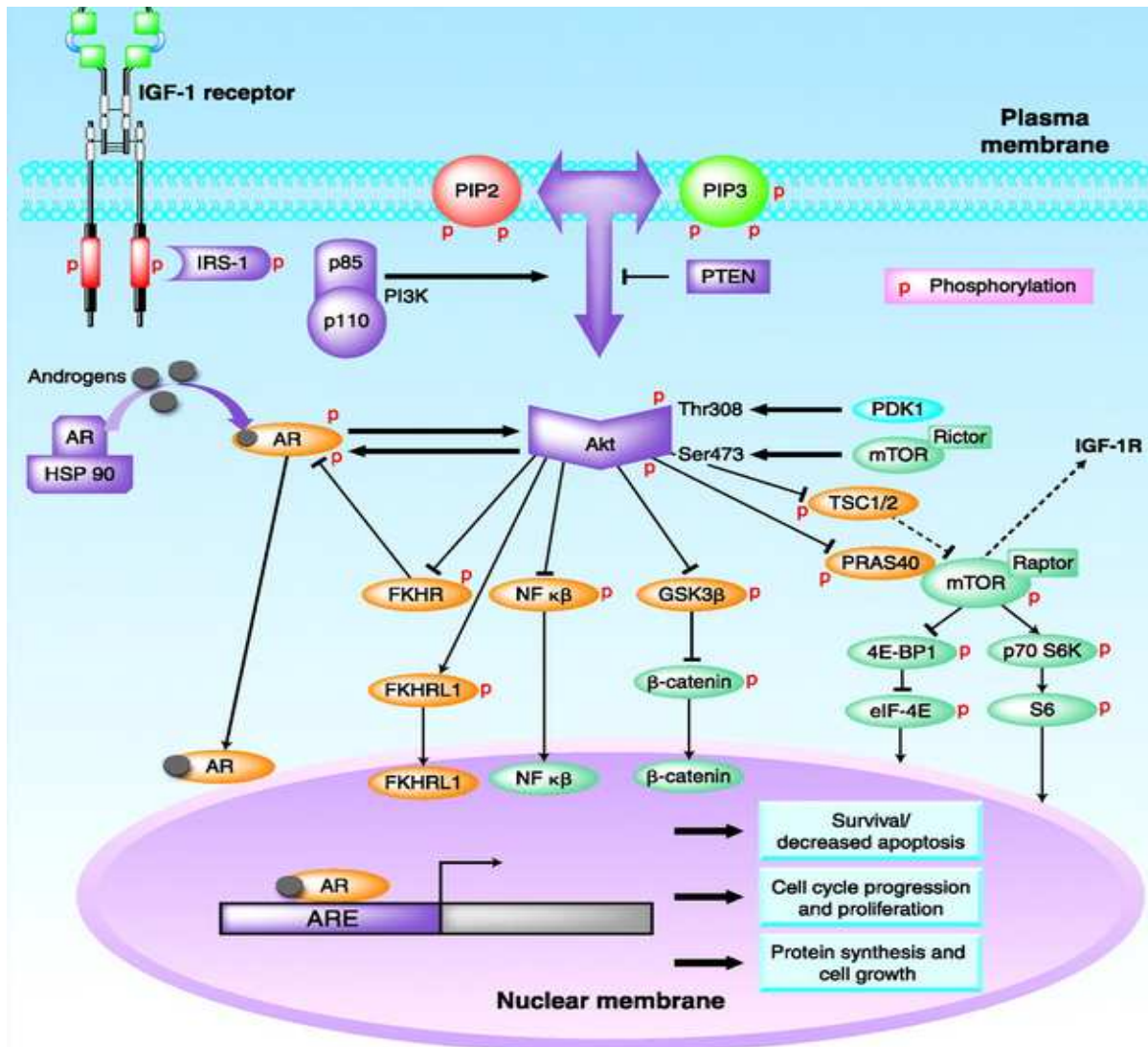


Figure 5 : Voie de signalisation des PI3K/AKT (Sarker, Reid et al. 2009).

La régulation négative de l'activation d'AKT peut se faire directement par une phosphatase spécifique du résidu Ser473, la PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) (Franke 2008). En revanche, la TCL-1 (*proto-oncogène T cell leukemia 1*) qui se lie à l'AKT, augmente son activité kinase (Noguchi, Ropars et al. 2007). Il agirait comme un coactivateur de l'activité kinase d'AKT. Le TCL-1 est surexprimé dans certaines maladies (lymphomes des cellules B) et pourrait contribuer à la pathogénèse en favorisant l'activation d'AKT (Noguchi, Ropars et al. 2007).

### Voie de signalisation AKT dans les cancers de l'ovaire

Des altérations dans l'expression et/ou l'activation d'AKT ont été observées dans plusieurs types de cancers (sein, endomètre, thyroïde, prostate et les mélanomes) et contribueraient au développement et/ou à la progression tumorale (Altomare and Testa 2005).

Dans les cancers ovariens, une hyperactivation d'AKT est fréquemment observée (Altomare, Wang et al. 2004). Cette hyperactivation peut être une conséquence d'anomalies dans des régulateurs de l'activité d'AKT. Ce sont surtout des mutations dans le gène suppresseur de tumeurs *PTEN* (Schondorf, Gohring et al. 2003) et/ou une amplification du gène codant pour la sous-unité catalytique p110 $\alpha$  des PI3Kinases (Shayesteh, Lu et al. 1999).

De nombreuses études ont rapporté un rôle d'AKT dans la pathogenèse du cancer de l'ovaire. *In vivo*, Orsulic et al. ont montré qu'une expression de l'AKT activé dans des cellules de l'épithélium de surface de l'ovaire, en combinaison avec un autre oncogène (*K-ras* ou *c-myc*), est suffisante pour induire la formation de tumeur dans des souris déficientes en *p53* (Orsulic, Li et al. 2002). *In vitro*, il a été montré que l'inhibition de l'AKT par des petits ARN interférants (siRNA) dans des cellules d'adénocarcinome ovarien entraîne une diminution de la migration, l'invasion et la prolifération (Meng, Xia et al. 2006; Noske, Kaszubiak et al. 2007). Arboleda et al. ont démontré par des expériences *in vitro* et *in vivo* que la surexpression d'AKT2 dans des cellules cancéreuses ovariennes entraîne une augmentation de l'invasion et des métastases tumorales (Arboleda, Lyons et al. 2003).

Une activité kinase augmentée de AKT1 a également été rapportée dans environ 80% des tumeurs malignes ovariennes de haut grade et de stades avancés (III/IV) (Sun, Wang et al. 2001). Alors qu'une augmentation d'activité d'AKT2 a été observée dans environ 36% des tumeurs ovariennes et il s'agissait surtout de tumeurs ovariennes de type indifférenciée (Yuan, Sun et al. 2000).

Un rôle d'AKT dans la chimiorésistance a également été rapporté. En effet, les cellules cancéreuses ovariennes surexprimant AKT étaient plus résistantes au paclitaxel que les cellules avec des faibles niveaux d'expression d'AKT (Page, Lin et al. 2000). De plus, l'inhibition des PI3K et donc par conséquent d'AKT par un inhibiteur pharmacologique, le LY294002 augmente l'apoptose induite en réponse au paclitaxel *in vitro* et *in vivo* dans les cellules tumorales ovariennes (Hu, Hofmann et al. 2002).

### I.1.9. Rôle du microenvironnement tumoral

L'environnement dans lequel se trouvent les cellules cancéreuses a une influence majeure sur le développement de la tumeur. Le micro-environnement tumoral est notamment constitué d'une composante vasculaire, de fibroblastes, de cellules immunitaires et d'une matrice extracellulaire (Figure 6). Le développement des tumeurs épithéliales de l'ovaire implique l'établissement d'un dialogue moléculaire et cellulaire permanent entre les cellules cancéreuses, les cellules stromales et l'environnement protéique. Ces interactions sollicitent notamment des cytokines, des molécules d'adhésion (intégrines, cadhérines...) et des systèmes protéolytiques (métalloprotéases, matrix metalloproteinases ; MMPs...). Ce développement tumoral consiste en une série complexe d'événements : invasion de nouveaux sites, formation de nouveaux vaisseaux, et échappement à la surveillance immunitaire (O'Hayre, Salanga et al. 2008).

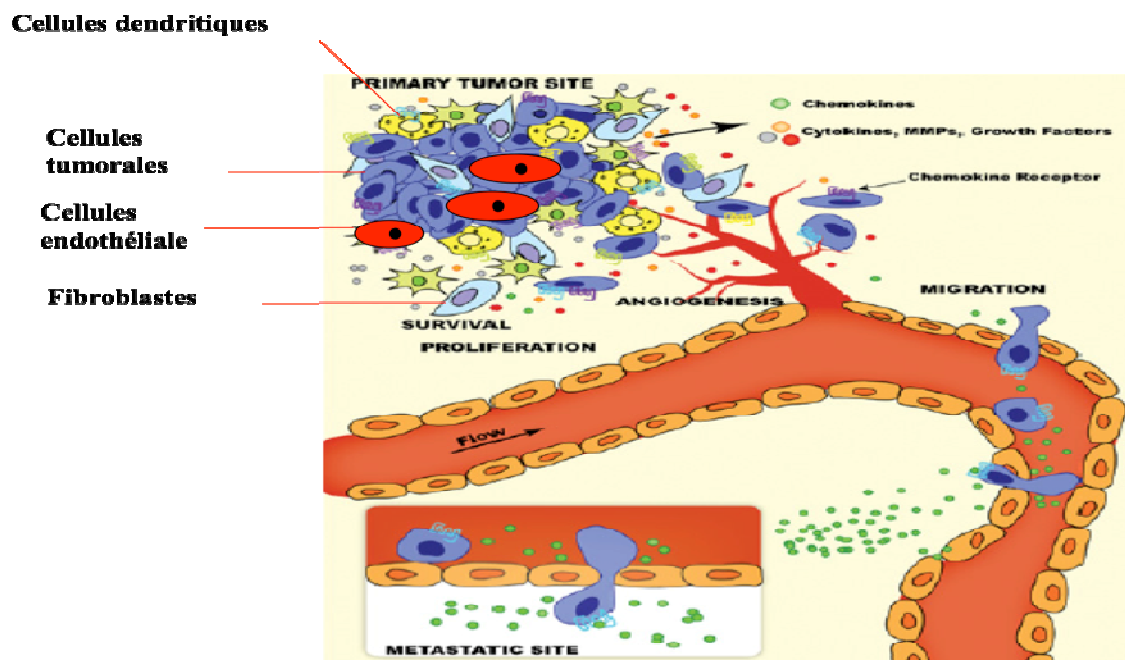


Figure 6 : Microenvironnement tumoral (O'Hayre, Salanga et al. 2008).

### *1.1.9.a. Le système immunitaire et le CEO*

Le système immunitaire joue un rôle important dans la régulation de la progression tumorale. Certaines études ont démontré le rôle de l'immunité de l'hôte dans les cancers de l'ovaire. Zhang et al. étaient les premiers à rapporter l'association entre l'infiltrat de cellules T et le pronostic du cancer de l'ovaire (Zhang, Conejo-Garcia et al. 2003). Ils ont démontré que la densité de cellules T CD3+ dans la tumeur était corrélée à la survie dans les CEOs. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude (Raspollini, Castiglione et al. 2005). Ainsi, les tumeurs avec un infiltrat important de cellules T CD3+ CD8+ sont fortement associées à des résultats cliniques favorables (Nelson 2008).

Le microenvironnement tumoral contient des cellules immunes inefficaces qui ont été reprogrammées par des processus actifs médiés par la tumeur pour faire échouer la réponse immunitaire spécifique anti-tumorale. Parmi les mécanismes majeurs inducteurs de tolérance : l'expression des molécules inhibitrices de cellules T et le recrutement de cellules T régulatrices (Tregs) (Zou 2005; Wei, Curiel et al. 2008).

### **Suppression de la réponse immunitaire dérivant des tumeurs et de leur microenvironnement**

L'échappement au système immunitaire est nécessaire pour la survie des cellules cancéreuses. L'environnement local ou des facteurs provenant de la tumeur peuvent empêcher l'efficacité de la réponse effectrice. Cette importance de l'environnement local tumoral est très bien illustrée avec les études chez la souris dans lesquelles des tumeurs sont implantées sur un site et grossissent de manière incontrôlée alors que des tumeurs prélevées sur ce site et réimplantées à distance dans les mêmes souris sont contrôlées par le système immunitaire et rejetées (Kurt, Park et al. 2000; Blohm, Roth et al. 2002). On peut citer quelques éléments pouvant expliquer cette inhibition de la réponse effectrice. Par exemple, certaines cellules T, infiltrant le microenvironnement tumoral local ont été décrites comme étant régulatrices ou suppressives. Parmi elles, les lymphocytes T Reg CD4+CD25+ qui sont associées à un mauvais pronostic dans le CEOs. Curiel et al., ont montré que la production de chimiokine CCL22 par les macrophages et les cellules tumorales permet le recrutement des cellules T régulatrices CD4+ CD25+ (Treg), qui expriment le récepteur de CCL22 le CCR4, au sein du foyer cancéreux. Les cellules Treg induiraient une tolérance immunitaire par la suppression de cellules T effectrices (Curiel, Coukos et al. 2004).

D'autre part, la tumeur peut directement échapper au système immunitaire en exprimant des molécules inhibitrices des cellules T comme par exemple B7-H1 (Dong, Strome et al. 2002) ou HLA-G (Tripathi and Agrawal 2006) ou encore en diminuant l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à sa surface (Campoli, Chang et al. 2002). La tumeur peut aussi relarguer des cytokines immunosuppressives comme le transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) ou l'Interleukine 10 (IL10) (Elgert, Alleva et al. 1998).

Il a été montré que la chimiokine CXCL12/SDF-1 produite par les tumeurs contribue au trafic des cellules dendritiques plasmacytoïdes et à leur accumulation dans le microenvironnement tumoral (Zou, Machelon et al. 2001). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes présentes dans le microenvironnement tumoral induisent une production importante d'IL-10 par les cellules T qui supprime les fonctions effectrices des lymphocytes T spécifiques de tumeur.

### ***1.1.9.b. Angiogenèse, invasion et métastases***

L'interaction des cellules tumorales avec leur microenvironnement est importante dans l'initiation et la progression tumorale pouvant stimuler la prolifération cellulaire, l'invasion, les métastases et l'angiogenèse.

La formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux pré-existants (angiogenèse) sont nécessaires pour amener l'oxygène et les nutriments aux cellules cancéreuses ou bénignes. Le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A) apparaît comme un des principaux médiateurs de l'angiogenèse tumorale, qui est connu pour augmenter la perméabilité vasculaire, stimuler la prolifération des cellules endothéliales et les protéger de l'apoptose (Landen, Birrer et al. 2008). D'autres médiateurs de l'angiogenèse comme l'IL-8 joue également un rôle important dans la néovascularisation et la croissance du cancer de l'ovaire (Xu and Fidler 2000).

L'invasion à travers la membrane basale et la migration des cellules endothéliales pour l'angiogenèse nécessitent l'interaction entre les cellules tumorales et le stroma et nécessitent encore la dégradation de la matrice extracellulaire par des métalloprotéases de la matrice (MMPs). Ces MMPs sont une famille d'endopeptidases dépendantes du zinc qui digère le collagène et d'autres composants de la matrice extracellulaire (Landen, Birrer et al. 2008). Les tumeurs de l'ovaire expriment MMP2 et MMP9 et cette expression augmentée corrèle avec l'invasion des cellules tumorale (Yan, Lin et al. 2010) et la survie des patients (Kamat,

Fletcher et al. 2006). Les MMPs jouent également un rôle dans le développement de tumeurs de l'ovaire, Huang et al. ont montré que la production de MMP-9 par les macrophage (infiltrants la tumeur) jouerait un rôle critique dans l'angiogenèse et la croissance des tumeurs ovariennes humaines chez les souris (Huang, Van Arsdall et al. 2002).

Le rôle des chimiokines dans le microenvironnement des tumeurs de l'ovaire a été rapporté. Il s'agit surtout d'un effet sur la métastase de cellules tumorales. C'est le cas de la chimiokine CXCL12 qui est trouvée dans 91% des cancers de l'ovaire. Son récepteur CXCR4 est exprimé dans 59% des cancers ovariens et est associé à une diminution de la durée de survie globale et la survie sans récurrence (Bast, Hennessey et al. 2009). Dans un modèle de xénogreffe, il a été montré que l'inhibition de CXCR4 inhibe la dissémination intrapéritonéale du cancer de l'ovaire (Kajiyama, Shibata et al. 2008).

### **I.1.10. Modèle animaux du CEO**

Les modèles animaux de cancer, sont couramment utilisées pour étudier la biologie des tumeurs et développer de nouvelles approches thérapeutiques. Plusieurs modèles expérimentaux du CEO sont développés. Ces modèles sont essentiellement murins.

#### ***I.1.10.a. Modèles murins du CEO***

Le développement de modèles murins a contribué à la compréhension de l'oncogenèse des tumeurs épithéliales de l'ovaire et au développement des thérapies ciblées. Ces modèles ont été très utiles pour démontrer l'implication d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs dans la carcinogenèse ovarienne. Ils ont également permis d'évaluer le rôle ou la contribution de molécules de voie de signalisation dans la pathogenèse et de tester l'efficacité de molécules inhibitrices (l'inhibiteur de MEK, PD98059, l'inhibiteur des mTOR, rapamycin, et/ou des inhibiteurs d'AKT) de voies de signalisation activées par des oncogènes tels que AKT, K-RAS, ou c-Myc (Chien, Aletti et al. 2007).

Les modèles murins les plus utilisés actuellement dans la recherche sont les modèles de xénogreffes. Les modèles de xénogreffes utilisant des lignées cellulaires permettent d'évaluer le développement et l'invasion de la tumeur à la suite de l'inoculation sous-cutanée ou intrapéritonéale de cellules cancéreuses humaines à des souris immuno-déficientes (souris nude). Plusieurs lignées cellulaires humaines de CEO ont été étudiées par la xénogreffe dans

des souris athymiques dites « nude ». La lignée cellulaire OVCAR-3 forme un adénocarcinome séreux faiblement différencié, la lignée SKOV-3 forme des carcinomes à cellules claires ; les deux lignées A2780 et H134 forment des tumeurs de type indifférencié. Ces différents sous-types histologiques nécessitent des approches thérapeutiques différentes. Le choix du traitement avec des thérapeutiques ciblées doit tenir compte de l'histologie et les profils d'expression de gène de la lignée cellulaire.

La capacité d'isoler et de cultiver des cellules de l'épithélium de surface de l'ovaire à permis de modifier génétiquement ces cellules normales afin de définir les conditions pour la transformation tumorigénique. Orsulic et al. ont utilisé une transduction rétrovirale pour exprimer une combinaison d'oncogènes dans l'épithélium de surface de l'ovaire murin (MOSE) (Orsulic, Li et al. 2002). Les cellules ovariennes transgéniques exprimant de manière ectopique un récepteur pour un rétrovirus aviaire TVA, de souris sauvages ou déficientes pour *p53* furent infectées avec les oncogènes *c-myc*, *K-ras*, *AKT* seuls ou en combinaison, puis réinjectées à des souris dans le sac bursal qui entoure l'ovaire. Ces auteurs rapportent que la transformation en cancer de l'ovaire nécessite, dans ce modèle, l'absence de *p53* et l'augmentation de l'expression d'au moins de 2 oncogènes (*c-myc* et *K-ras*, *K-ras* et *Akt*, ou *Akt* et *c-myc*). Dinulescu et al. montrent que l'inactivation de l'oncogène *PTEN* et l'augmentation de l'expression de *K-ras*, induit l'apparition de tumeurs malignes endométrioïdes (Dinulescu, Ince et al. 2005). Flesken-Nikitin et al. rapportent que l'inactivation des deux gènes suppresseurs de tumeur clés, le *p53* et le rétinoblastome (*Rb*) dans les cellules de l'épithélium de surface de l'ovaire (ESO) entraînait une prévalence élevée (33 sur 34 souris) de tumeurs de l'ovaire dans ces souris, avec la présence également d'une ascite abdominale dans 24% des souris; alors que l'inactivation de l'un des deux gènes *p53* ou *Rb* a donné lieu à beaucoup moins d'incidence de carcinogénèse ovarienne (Flesken-Nikitin, Choi et al. 2003). Ces modèles ont montré que l'oncogénèse des tumeurs de l'ovaire répond à un modèle multi-étapes où la transformation en cancer est le fait de l'accumulation d'altérations génétiques.

### ***1.1.10.b. Modèles de souris transgéniques***

Le développement de modèles transgéniques de cancer de l'ovaire a été difficile en raison du manque de promoteurs tissu-spécifique appropriés qui conduisent à une expression exclusive du transgène au niveau de l'ESO.



Connolly et al. sont les premiers qui ont caractérisé le modèle transgénique de CEO (Connolly, Bao et al. 2003). Après avoir démontré que le MOSE exprimait des transcrits de Mullerian inhibiting substance receptor type II (MISIIR), ils ont généré des souris transgéniques exprimant la région transformante du SV40 (T-antigen) sous le contrôle du promoteur de MISIIR (tgMISIIRTA<sub>g</sub>). Environ 50% des souris transgéniques femelles ont développé des tumeurs ovariennes bilatérales. Ces tumeurs étaient fréquemment associées à une dissémination péritonéale et à la présence d'ascite. Cependant ces tumeurs ont été également trouvées dans les ovaires de souris nouveau-nées tgMISIIRTA<sub>g</sub>. Ce qui rend le modèle tgMISIIRTA<sub>g</sub> inapproprié pour les analyses des lésions précoces du développement du cancer de l'ovaire et pour la modulation de facteurs qui pourraient influencer l'initiation de la maladie (Garson, Shaw et al. 2005) ; mais il pourrait être utilisé pour étudier des facteurs qui influenceraient la progression dans le cas d'une maladie établie ou pour des essais thérapeutiques. Malbuchi et al. ont utilisé ce modèle de souris transgénique pour tester l'effet de RAD001 (Everolimus), un inhibiteur des mTOR. Ils montrent que le RAD001 retarde l'apparition ainsi que la progression de la tumeur (Malbuchi, Altomare et al. 2007).

# **LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS**

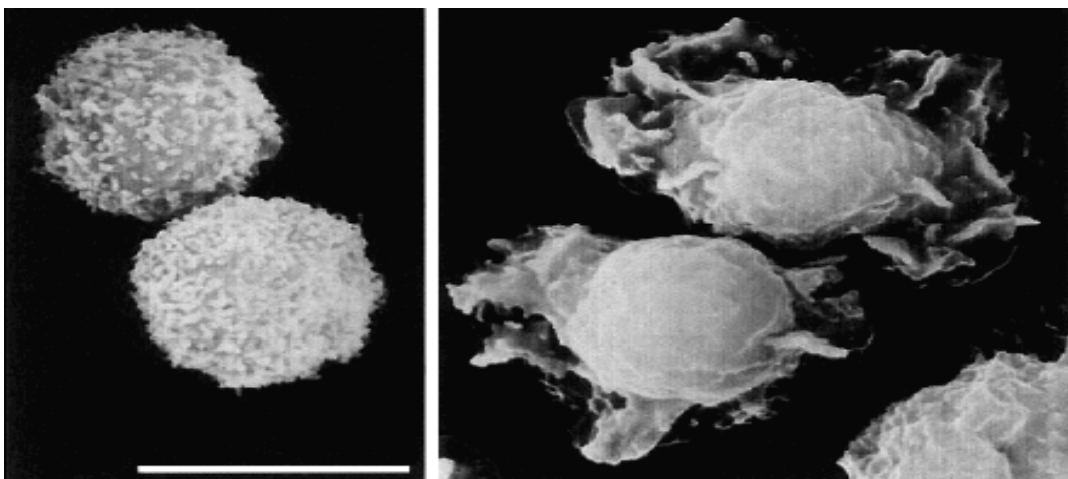
## II- LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS

### II.1. LES CHIMIOKINES

#### II.1.1. Généralités

Les chimiokines constituent une famille structurale de cytokines chimiotactiques et souvent pro-inflammatoires. Elles forment la plus grande famille de protéines qui orchestrent les processus immunologiques et inflammatoires. Cette famille de protéines est constituée de plus de 50 membres (Horuk 2001), dont la taille varie entre 8 et 10 kDa. Elles sont produites de manière abondante au niveau des sites d'inflammation, et contrôlent l'activation et le chimiotactisme des monocytes, lymphocytes, NK, basophiles, éosinophiles et neutrophile (Figure 7) (Mackay 2001). Les chimiokines dirigent donc la migration cellulaire, vers les sites inflammatoires, entre les compartiments intra- et extra-vasculaires, et vers les organes lymphoïdes. En plus des rôles d'activation, de chimiotaxie, certaines chimiokines jouent un rôle dans l'angiogenèse, l'embryogenèse, le développement des lymphocytes et l'hématopoïèse (Honczarenko, Le et al. 2002).

Les chimiokines exercent leur action par interaction avec des récepteurs à sept domaines transmembranaires.



**Figure 7 : Stimulation de neutrophiles par des chimiokines.** Image obtenue par microscopie électronique. a. Neutrophiles au repos. b. Neutrophiles activés en présence de chimiokines.

### II.1.2. Nomenclature

Les premières chimiokines ont été caractérisées vers les années 70 avec la découverte du PF4 (Platelet Factor 4) (Levine and Wohl 1976). Ce n'est qu'une quinzaine d'année plus tard que différentes molécules apparentées ont été découvertes, la plus connue étant IL-8 (Baggiolini, Walz et al. 1989). Ces molécules ont été connues sous d'autres noms comme la famille SIS (Small Inducible Secreted) des cytokines, la famille scy (small cytokine) des cytokines ou encore les intercrines. Le nom de chimiokines a été adopté définitivement en 1992 lors du troisième congrès international sur les cytokines en tant que néologisme pour cytokine chimioattractante « *cytokines chimio-attractantes* ».

De nombreuses chimiokines avaient été identifiées auparavant et dénommées en fonction de leur localisation tissulaire ou de leur rôle physiologique. En 1995, le comité NC-IUPHAR a organisé la nomenclature des chimiokines. Même si le terme de chimiokines est communément accepté et retrouvé dans la littérature, la nomenclature officielle des chimiokines l'est elle beaucoup moins, et l'ancienne nomenclature reste communément utilisée dans les publications scientifiques (**Tableau 1**).

Famille	Nom officiel	Nom commun	Famille	Nom officiel	Nom commun
CXC	CXCL1	GRO $\alpha$	CC	CCL1	I-309
	CXCL2	GRO $\beta$		CCL2	MCP-1
	CXCL3	GRO $\gamma$		CCL3	MIP-1 $\alpha$
	CXCL4	PF-4		CCL4	MIP-1 $\beta$
	CXCL5	ENA-78		CCL5	RANTES
	CXCL6	GCP-2		CCL6	C10
	CXCL7	NAP-2		CCL7	MCP-3
	CXCL8	IL-8		CCL8	MCP-2
	CXCL9	MIG		CCL9	MIP-1 $\gamma$
	CXCL10	IP-10		CCL10	CCL10
	CXCL11	I-TAC		CCL11	Eotaxine
	CXCL12	SDF-1		CCL12	MCP-5
	CXCL13	BCA-1		CCL13	MCP-4
	CXCL14	BRAK		CCL14	CC-1
	CXCL15	Lungkine		CCL15	Leukotactine-1
	CXCL16	CXCL16		CCL16	LEC
XC	CL1	Lymphotactine $\alpha$		CCL17	TARC
	CL2	Lymphotactine $\beta$		CCL18	PARC
CX3C	CX3CL	Fraktaline/Neurotactine		CCL19	ELC
				CCL20	LARC
				CCL21	SLC
				CCL22	MDC
				CCL23	MPIF-1
				CCL24	MPIF-2
				CCL25	TECK
				CCL26	Eotaxine-3
				CCL27	ESkine
				CCL28	MEC

**Tableau 1 : Nomenclature des chimiokines humaines.** Classification IUPHAR et nomenclature usuelle (Laing and Secombes 2004).

### II.1.3. Classification structurale et fonctionnelle

#### II.1.3.a. Classification structurale

Les chimiokines se caractérisent par un motif commun N-terminal de quatre (ou deux) cystéines (Cys) en position conservée. La formation de deux ponts disulfures entre les cystéines 1 et 3 (Cys1-Cys3) et les cystéines 2 et 4 (Cys2-Cys4) confère une structure tertiaire caractéristique des chimiokines. La position des deux premières Cys les plus proximales de l'extrémité N-terminale ainsi que le nombre d'acides aminés (AA) variables (X) séparant ces deux premières Cys permettent de distinguer 4 sous-familles de chimiokines (Figure 8): deux sous-familles majeures, les CXC-chimiokines (groupe  $\alpha$ ) et les CC-chimiokines (groupe  $\beta$ ), selon qu'un acide aminé sépare ou non les deux premières cystéines amino-terminales (Rollins 1997), et deux familles mineures, les C-chimiokines (groupe  $\gamma$ ) n'a qu'une cystéine et les CX3C-chimiokines (groupe  $\delta$ ) dont les résidus cystéines sont séparés par trois acides aminés (Figure 9) (Baggiolini, 1998).

- Les chimiokines du groupe CXC (ou  $\alpha$ ) sont caractérisées par la présence d'un acide aminé entre les deux premières cystéines conservées. Ce groupe peut être divisées en CXC-chimiokines ELR<sup>+</sup> et ELR<sup>-</sup> selon qu'elles possèdent ou non une séquence glu-leu-arg en amont de la première cystéine. Les chimiokines ELR<sup>+</sup> (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 et CXCL15) sont produites par une grande variété de cellules et leur principal rôle est de promouvoir l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales ayant pour conséquence leur migration vers les sites inflammatoires. Ces chimiokines sont dites spécifiques des neutrophiles. Ce motif confère à cette famille de chimiokines leurs propriétés angiogéniques. En facilitant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ces chimiokines pourraient être impliquées dans le développement embryonnaire, la cicatrisation, le développement de tumeurs solides ou l'inflammation chronique. Les chimiokines ELR<sup>-</sup> (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 et CXCL16) attirent les leucocytes et les monocytes, mais présentent une faible capacité à attirer les neutrophiles (Laing and Secombes 2004).

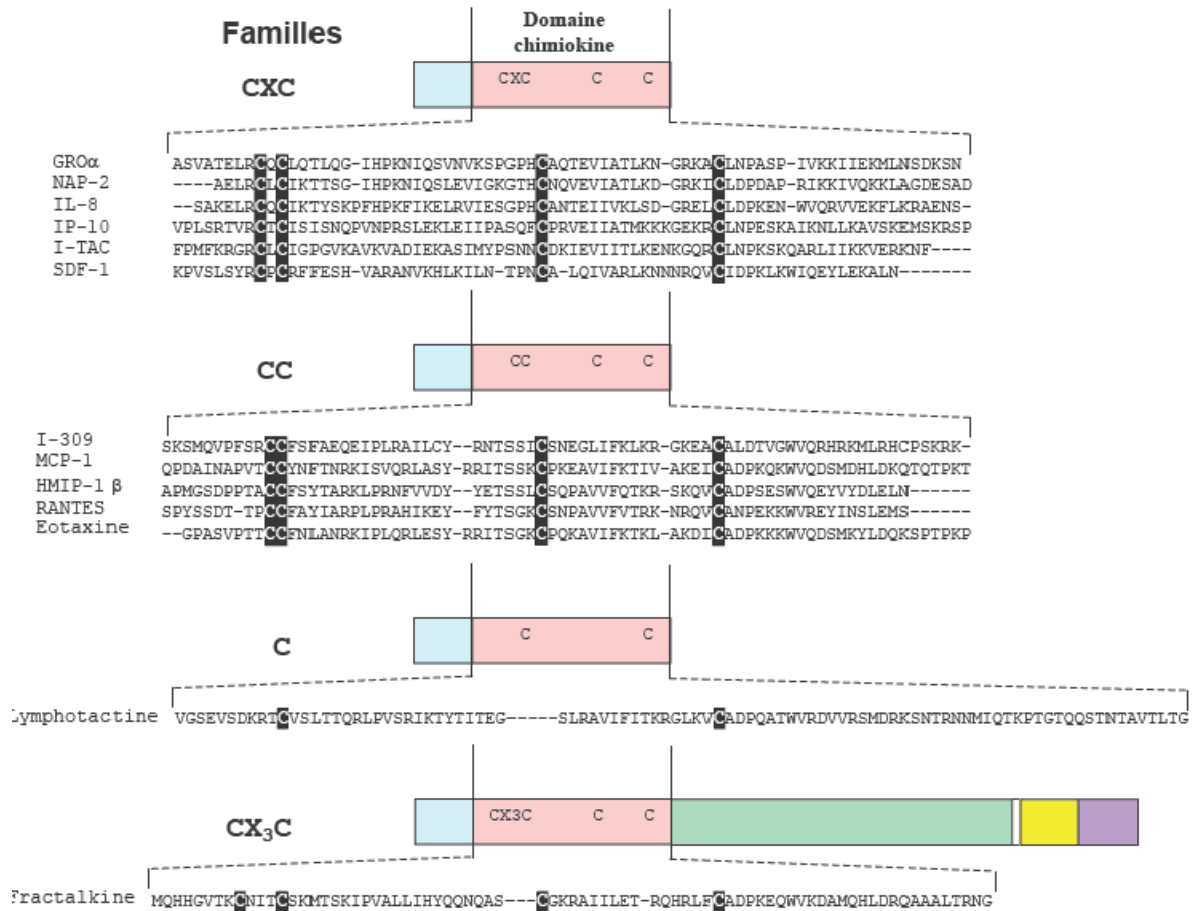


Figure 8 : Exemples illustrant la structure primaire des 4 familles de chimiokines

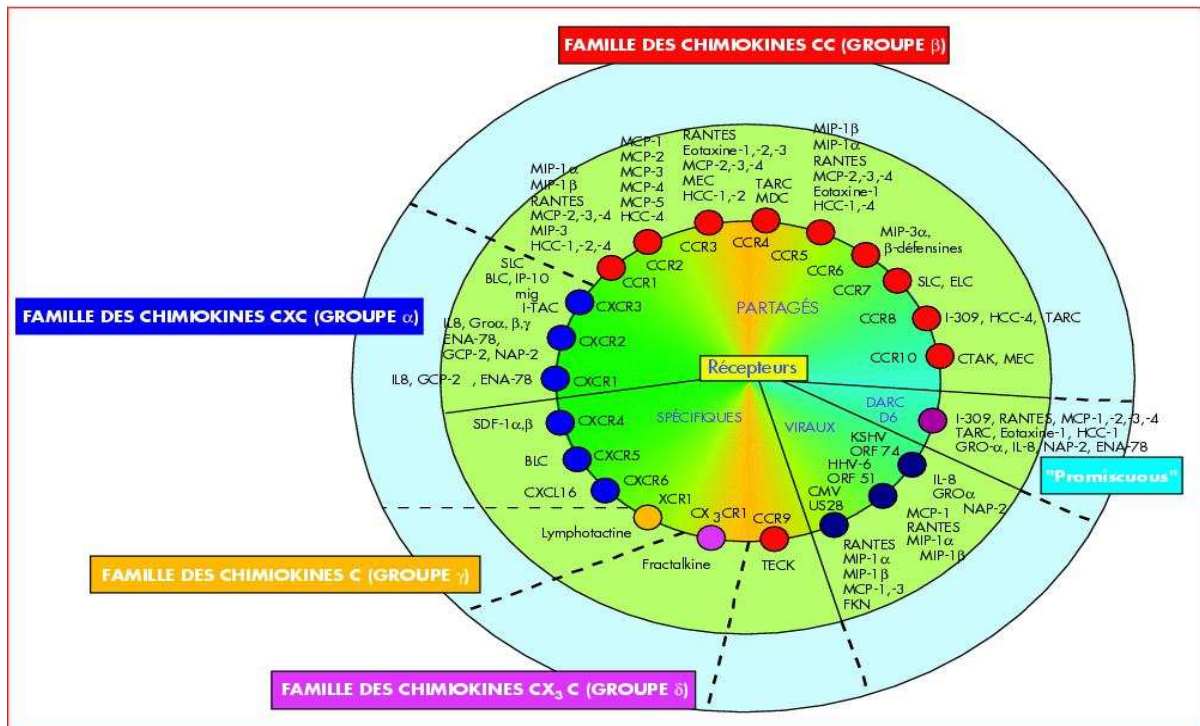


Figure 9 : Redondance et spécificité au sein du système chimiokine(s)/récepteur(s).

- Lorsque les deux cystéines sont adjacentes, on parle de chimiokines du groupe CC (ou  $\beta$ ). Ces chimiokines exercent principalement leur action sur les lymphocytes, les monocytes, les basophiles et les éosinophiles. On dénombre également un petit groupe de CC chimiokines qui possèdent six cystéines conservées, les deux cystéines supplémentaires formant également un pont disulfure (CCL1, CCL15, CCL21, CCL23 et CCL28). En tenant compte des réponses induites ou de similarités de séquences, les CC chimiokines peuvent être divisées en 5 sous-groupes :

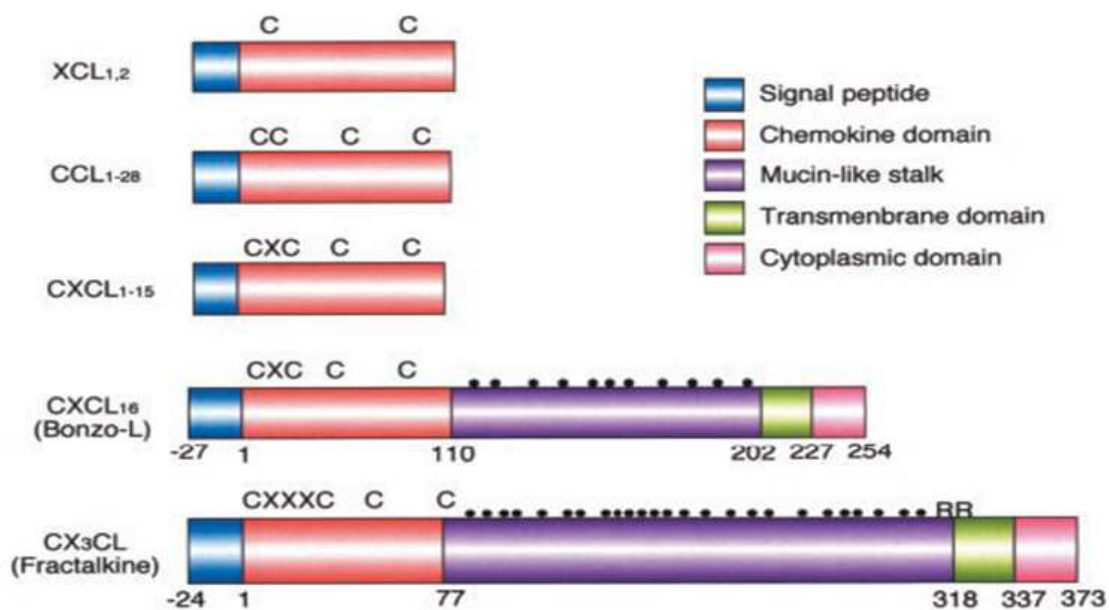
- Le sous-groupe des chimiokines allergéniques, appelé aussi MCP, regroupe des chimiokines structurellement apparentées : CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL12, CCL13, CCL24 et CCL26. Elles possèdent une activité pléiotropique, mais sont capables principalement d'activer les éosinophiles et les basophiles.
- Le sous-groupe des CC chimiokines pro-inflammatoires, compte cinq membres : CCL3, CCL4, CCL5, CCL6 et CCL18 ayant une activité pro-inflammatoire
- Le sous-groupe HCC (Haemofiltrate CC chemokine), compte quatre membres : CCL14, CCL15, CCL16 et CCL23. Elles ont un rôle fondamental dans les processus inflammatoires.
- Le sous-groupe des chimiokines impliquées dans le développement regroupe les chimiokines CCL17, CCL22 et CCL25.
- Le sous-groupe des chimiokines homéostatiques compte CCL19, CCL20 et CCL21. Ces trois chimiokines sont produites de façon constitutive par les tissus lymphoïdes et dirigent les lymphocytes T et les cellules dendritiques vers les sites spécifiques au travers du tissu lymphoïde.

CCL27 est unique au vu de sa structure et de sa régulation. Le gène codant pour CCL27 peut générer deux produits distincts résultants d'un épissage différentiel et ayant une localisation tissulaire différente : ESkinine est principalement exprimé dans le placenta et possède un peptide signal lui permettant d'être sécrété, alors que PESKY qui est principalement exprimé dans le cerveau, semble être transloqué vers le noyau.

- Dans le groupe CX<sub>3</sub>C (ou  $\gamma$ ) qui ne compte qu'un membre, les résidus cystéines sont séparés par trois acides aminés. On connaît néanmoins deux formes distinctes de cette chimiokine : la forme soluble présente une activité chimioattractante pour les lymphocytes T et les monocytes, alors que la forme liée à la membrane induit une forte adhésion des leucocytes.

- Les chimiokines du groupe C (ou  $\delta$ ) ne possèdent que deux cystéines conservées, correspondant aux deuxième et quatrième cystéines des trois premiers groupes. La C chimiokine n'agit que sur les lymphocytes T. Cette famille compte deux membres très similaires XCL1 et XCL2 qui ne diffèrent que par la nature des acides aminés 7 et 8. XCL1 a la capacité d'induire le chimiotactisme des lymphocytes (Laing and Secombes 2004).

En générale, les chimiokines sont libérées sous forme soluble, tandis que la CX<sub>3</sub>CL1/Fractalkine est la seule chimiokine avec CXCL16 à exister sous forme membranaire (Figure 10) (Bazan, Bacon et al. 1997; Matloubian, David et al. 2000).



**Figure 10 : Les différentes familles de chimiokine** (XCL<sub>1,2</sub>, CCL<sub>1-28</sub> et CXCL<sub>1-15</sub> sont sous forme soluble, tandis que CXCL<sub>16</sub> et CX<sub>3</sub>CL1 ils existent sous forme transmembranaire).



### *II.1.3.b. Classification fonctionnelle*

Les chimiokines peuvent également être classées selon leur profil d'expression et leur fonction. La classification fonctionnelle subdivise les chimiokines en deux groupes : les chimiokines pro-inflammatoires (ou inductibles) et les chimiokines constitutives (ou homéostatiques) (Brandes, Legler et al. 2000).

- Les chimiokines pro-inflammatoires (ou inductibles) sont exprimées dans les tissus inflammés par les cellules épithéliales ou stromales, ainsi que par les leucocytes résidents ou recrutés, activés par des cytokines pro-inflammatoires ou après contact avec un agent pathogène. Le LPS, l'IL-1 $\beta$ , INF  $\gamma$  (interféron-gamma) et le TNF  $\alpha$  (tumor necrosis factor) font partie des molécules capables d'induire l'expression de chimiokines pro-inflammatoires comme les CCL5, CCL3 et CCL4. Leurs récepteurs sont exprimés sur les cellules phagocytaires comme les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les cellules dendritiques immatures. Les chimiokines pro-inflammatoires jouent normalement un rôle dans l'immunité innée, c'est-à-dire la défense de l'organisme face à un agent pathogène rencontré pour la première fois, ainsi que dans l'inflammation (Moser and Willimann 2004).

- Les chimiokines constitutives, quant à elles, sont exprimées de manière constitutive dans les organes lymphoïdes et dans certains organes non-lymphoïdes tels que la peau et les muqueuses. Par exemple CXCL12/SDF-1 est une chimiokine constitutive. Le rôle de ces chimiokines est de réguler le trafic physiologique des cellules immunitaires durant l'hématopoïèse et la localisation des lymphocytes au sein de ces organes pendant la lymphopoïèse mais également pour maintenir l'immunosurveillance ; CXCL12/SDF-1, BCA-1, ELC et SLC en sont des exemples. Certaines de ces chimiokines semblent également être indispensables pour la formation de ces organes (Cyster 1999; Ngo, Korner et al. 1999). Leurs récepteurs sont exprimés sur les cellules T et B et les cellules dendritiques immatures. Ces chimiokines dirigent le positionnement des lymphocytes vers les zones spécifiques de cellules B et T dans les organes lymphoïdes secondaires. Ceci facilite l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T et les lymphocytes B et T à des endroits appropriés, nécessaires au développement de la réponse immunitaire. (Laing and Secombes 2004).

Cependant, la distinction entre chimiokines proinflammatoires et chimiokines constitutives n'est pas absolue, certaines chimiokines appartenant aux deux familles. La

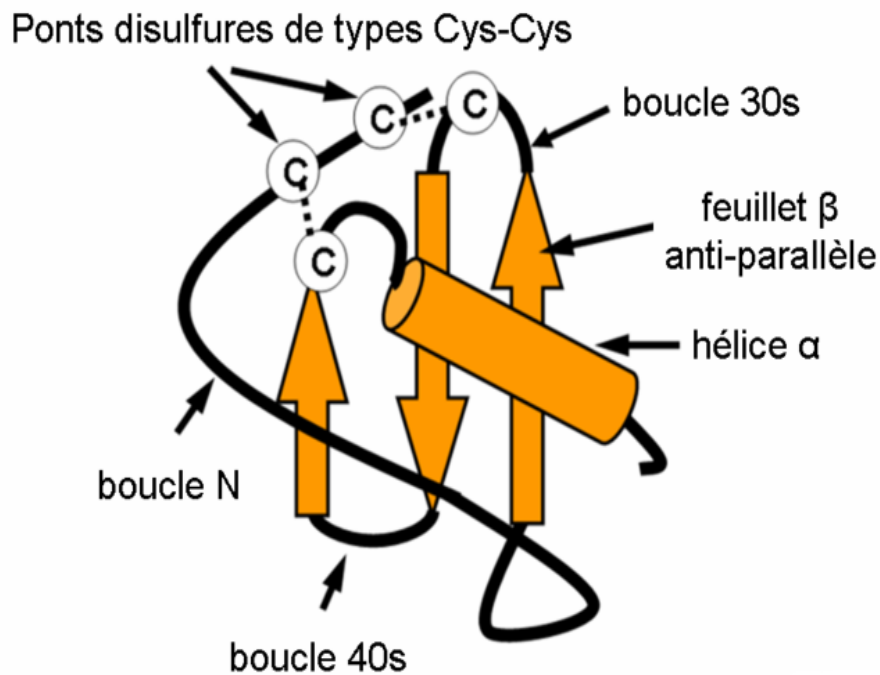
fractalkine/CX3CL1, fait partie de cette catégorie : elle est exprimée de façon constitutive au niveau du cerveau et elle peut également être exprimée par les cellules endothéliales suite à une stimulation par des cytokines inflammatoire (Bazan, Bacon et al. 1997). Il s'avère de plus en plus que cette distinction constitutive/inducible est peu adéquate pour les chimiokines et en conséquence peu employée.

### II.1.4. Structure tridimensionnelle

Des études de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire et de cristallographie par rayons X ont donné lieu à des structures de haute résolution pour un certain nombre de chimiokines, révélant une structure tridimensionnelle commune des différentes familles. Cette structure conservée est composée d'une région amino-terminale flexible structurellement désordonnée qui précède la première cystéine. Ce domaine est suivi d'une région en boucle appelée boucle N (N loop) suivie d'un feuillet constitué de trois brins  $\beta$  antiparallèles reliés entre eux par les boucles 30s, 40s et 50s. Ce motif en clé grecque fournit une base solide sur laquelle s'ancre le domaine carboxy-terminal organisé en hélice  $\alpha$  qui suit la dernière cystéine. La structure tridimensionnelle est stabilisée à la fois par les deux ponts disulfures mais également par des liaisons hydrophobes entre des résidus de l'hélice  $\alpha$  carboxyterminale et des résidus du feuillet  $\beta$  (Figure 11) (Crump, Gong et al. 1997; Nagasawa, Tachibana et al. 1999).

La plupart des analyses de structure montrent que les chimiokines sont associées en multimères dans les conditions requises pour la cristallisation. Dans le cas des chimiokines CXC, l'interface de dimérisation se situe au niveau de l'angle du premier brin  $\beta$  alors que dans le cas des chimiokines CC, l'interface se situe plutôt à proximité de l'extrémité amino-terminale d'où la formation de dimères non équivalents.

Malgré le fait qu'aux fortes concentrations nécessaires aux études cristallographiques on observe des dimères voire des multimères, les chimiokines semblent agir à l'état monomérique (Clark-Lewis, Kim et al. 1995; Baggiolini, Dewald et al. 1997). Néanmoins, il semblerait que la plupart des chimiokines se lient à des éléments de la surface cellulaire notamment les glycosaminoglycanes ce qui semblerait favoriser la dimérisation des chimiokines.



**Figure 11 : Structure tridimensionnelle des chimiokines** (Galzi, Hachet-Haas et al. 2010).

## II.2. LES RECEPTEURS DES CHIMIOKINES

### II.2.1. Classification des récepteurs des chimiokines

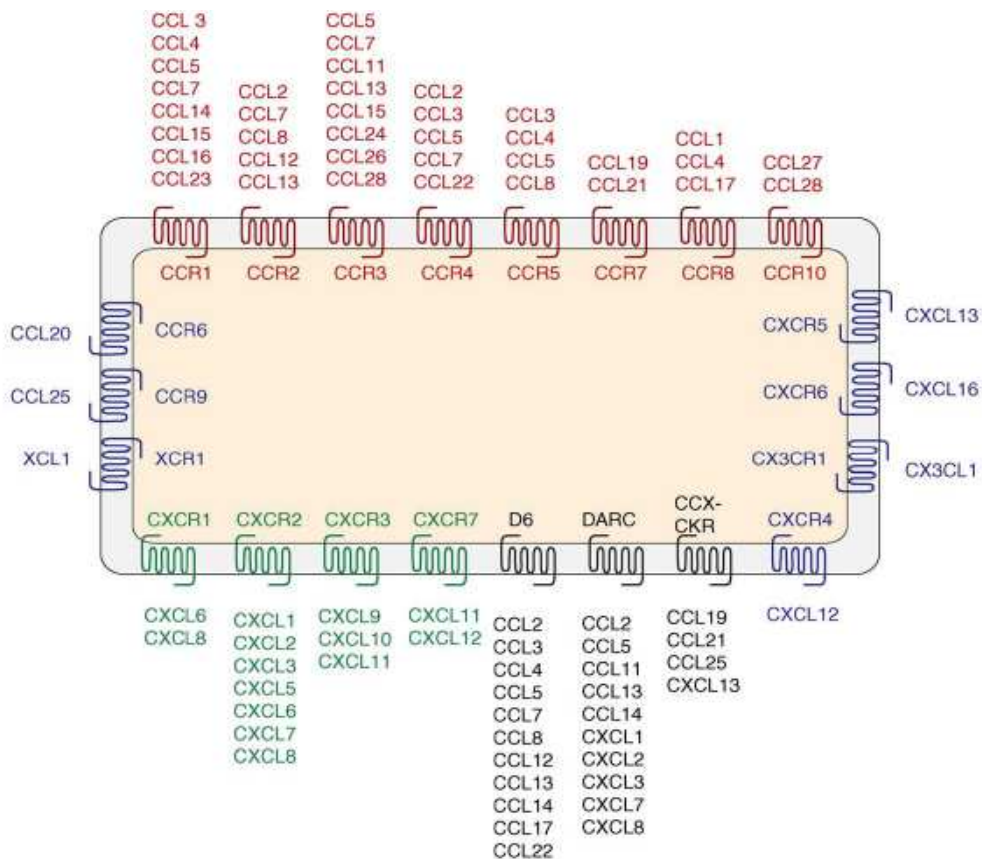
Les chimiokines exercent leur activité en interagissant avec des récepteurs de chimiokines, appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Ils présentent tous un couplage avec les protéines G de la famille Gi/Go (Bockaert 1991). La famille des RCPG est la plus grande famille de protéines membranaires trouvées dans la nature et présente environ 1% des gènes du génome des mammifères. Cette superfamille est divisée en 5 classes selon leur homologie de séquences. Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la classe 1 des RCPG similaire à la rhodopsine.

Les récepteurs de chimiokines sont dénommés d'après la classe de chimiokines qu'ils lient. Actuellement, une vingtaine de récepteurs a été caractérisée et regroupée en quatre sous-familles (Figure 12): CCR, CXCR, CX3CR et XCR. On compte actuellement sept récepteurs de la famille CXC (CXCR1 à CXCR7), onze récepteurs pour les chimiokines CC (CCR1 à CCR11), un récepteur pour la lymphotactine (XCR1) et le récepteur de la fraktaline (CX3CR1).

A ces récepteurs classiques on peut ajouter D6, CCX-CKR (Chemocentryx, chemokine receptor) et Duffy (Duffy antigen receptor for chemokine ou DARC), ces récepteurs sont en général classés parmi les récepteurs des chimiokines car ils présentent des similarités de structure et lient les chimiokines (Nibbs, Wylie et al. 1997). Cependant, ils ne semblent pas transmettre de signal intracellulaire. Il existe également des récepteurs « orphelins » pour lesquels aucun ligand n'a encore été identifié et inversement.

Certains virus contiennent dans leur cadre de lecture des gènes codant pour des récepteurs des chimiokines. Parmi les récepteurs codés par des génomes viraux, le cytomégalo virus humain possède dans son gène une séquence US28 qui code pour un récepteur qui est capable de lier les chimiokines humaines telles que CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8 et CX3CL1 (Murphy 2001).

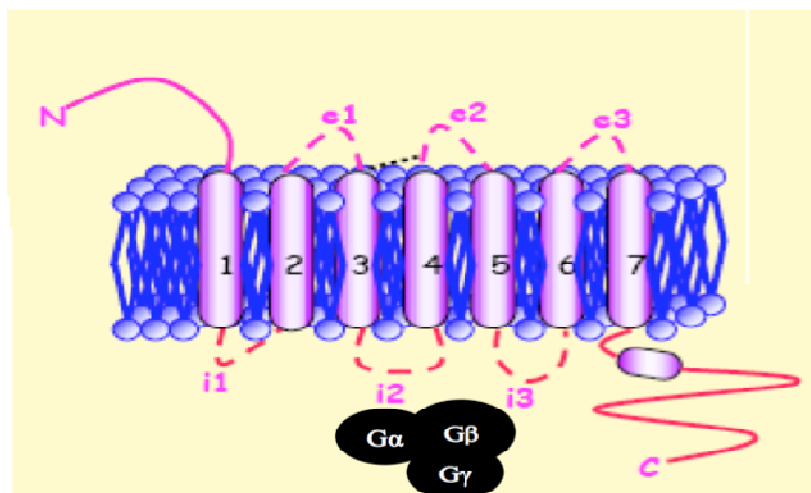
Chez l'homme, la plupart des récepteurs connus peuvent interagir avec plusieurs chimiokines d'un même groupe, et réciproquement une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs.



**Figure 12 : les récepteurs de chimiokines et leurs ligands correspondants**  
(Lazennec and Richmond 2010).

### II.2.2. Structure

Les récepteurs des chimiokines sont des protéines de 340 à 370 AA. Ils sont constitués de sept domaines riches en résidus hydrophobes sous forme d'hélice  $\alpha$  transmembranaire (TM1-TM7), reliées entre elles par 3 boucles hydrophiles extracellulaires (ECL1-ECL3) et 3 cytoplasmiques (ICL1-ICL3) (Bockaert and Pin 1999). Ils possèdent un domaine N terminal extracellulaire acide et relativement court (~40 AA), qui contient des sites de glycosylation et de sulfatation des résidus tyrosines et une séquence DRYLAIV (Asp-Arg-Tyr-Leu-Ala-Ile-Val) au niveau de la boucle ICL2 nécessaire à la liaison aux protéines G hétérotrimérique composées de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (Figure 13). Deux ponts disulfures extracellulaires permettent le maintien de la structure tertiaire. Le premier pont se situe entre la partie N-terminale et la troisième boucle, le deuxième entre la première et la deuxième boucle. Le domaine C terminal contient des sites de phosphorylation de résidus sérine et thréonine qui permettent la régulation de l'activité et de l'expression du récepteur.



**Figure 13 : Structure des récepteurs à 7 domaines transmembranaires.** L'extrémité N-terminale est extracellulaire alors que l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale) est intracellulaire. Il y a 3 boucles extracellulaires e1, e2 et e3 et 3 boucles intracellulaires nommées i1, i2 et i3.

Les récepteurs des chimiokines existent sous forme de monomères et pourrait dans certains cas former des oligomères et généralement des homo ou hétérodimères (Angers, Salahpour et al. 2002). Certaines études montrent que les récepteurs des chimiokines, tels que CCR2, CCR5 et CXCR4 forment des homodimères (Rodriguez-Frade, Vila-Coro et al. 1999). Une étude récente montre la formation d'hétéro-oligomère entre CCR2, CCR5 et CXCR4 (Sohy, Yano et al. 2009). Une hétérodimérisation est également possible suite à la fixation de ligand. La formation d'hétérodimères est possible entre CCR2 et CCR5 (Mellado, Rodriguez-Frade et

al. 2001) et entre CXCR4 et CXCR7 (Levoye, Balabanian et al. 2009).

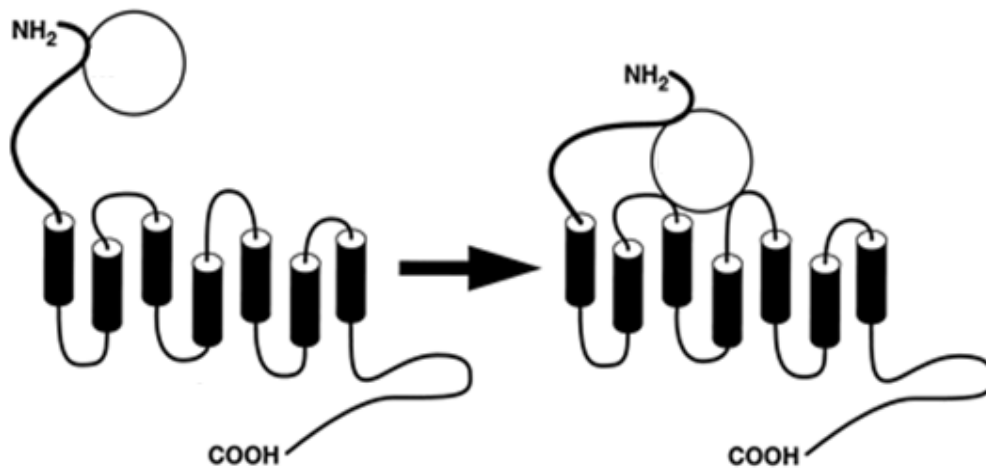
### **II.2.3. La liaison des chimiokines à leur(s) récepteur (s)**

Les chimiokines se lient à leurs récepteurs avec une affinité de l'ordre du nanomolaire qui varie toutefois selon le type de couple ligand/récepteur, et selon le type de cellules présentant le récepteur. La réponse de la cellule est la conséquence d'une suite d'évènements initiés par la reconnaissance du ligand qui génère une cascade d'évènements biologiques que l'on peut arbitrairement regrouper en signaux précoces (proximaux) et en signaux tardifs (distaux).

#### ***II.2.3.a. Le modèle d'interaction chimiokine-récepteur***

Dans la plupart des situations, les chimiokines agissent en tant que monomères. L'interaction chimiokine/récepteur est rendue possible par deux sites de liaisons : le premier est une boucle exposée dans la région située entre le deuxième et le troisième résidu cystéine de la chimiokine. Ce site est considéré comme une région d'interaction de faible affinité et se lie à l'extrémité amino-terminale extracellulaire du récepteur. Le second site de liaison n'est autre que la partie N-terminale de la chimiokine, située avant le premier résidu cystéine et interagissant avec une boucle extracellulaire du récepteur (Figure 14). Ce site de liaison est la partie la plus variable chez toutes les chimiokines et est donc déterminant pour l'affinité et la spécificité de la liaison ligand-récepteur. Il est également indispensable à l'induction d'un signal de transduction (Monteclaro and Charo 1996; Moser and Willmann 2004).

Un certain nombre d'acides aminés et de tyrosines sulfatées localisées au niveau du domaine N-terminal des récepteurs contribuent également à la haute affinité de liaison des chimiokines (Farzan, Mirzabekov et al. 1999; Fong, Alam et al. 2002).



**Figure 14 : Modèle d'interaction chimiokine-récepteur** (Monteclaro and Charo 1996).

Les chimiokines se lient à leurs récepteurs avec différentes affinités. Cette différence s'expliquerait en partie par la quantité de protéoglycanes exprimés à la surface de la membrane plasmique (Luster, Greenberg et al. 1995). En plus de leur fixation spécifique à leurs récepteurs, les chimiokines qui sont des protéines hautement basiques, peuvent se lier avec une forte affinité, par l'intermédiaire d'un motif BBXB (B=résidu basique), à des sucres chargés négativement à la surface cellulaire, en particulier les protéoglycanes (GAG) (Proudfoot, Fritchley et al. 2001). Cette fixation non spécifique induit la polarisation des chimiokines, ce qui augmente leur concentration locale et facilite leur fixation aux récepteurs exprimés sur les leucocytes (Ali, Palmer et al. 2000). La liaison aux GAG pourrait protéger les chimiokines contre la dégradation, permettre leur stockage ou leur présentation au récepteur, et favoriser l'activation cellulaire *in vivo*. Les chimiokines connues pour leurs fixations non spécifiques aux GAG sont CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, CXCL12, CX3CL1. Toutefois certaines chimiokines ne se fixent pas aux GAG.

### ***II.2.3.b. Signalisation des récepteurs de chimiokines***

En réponse à la liaison de l'agoniste, les récepteurs de chimiokines interagissent avec les protéines G hétérotrimériques et catalyse l'échange GDP/GTP et il semblerait que la dimérisation des récepteurs soit importante pour la transduction du signal (Vila-Coro, Rodriguez-Frade et al. 1999; Rodriguez-Frade, del Real et al. 2004; Springael, Urizar et al. 2005).

Les protéines G sont formées d'une sous-unité  $\alpha$  liée à un complexe  $\beta\gamma$ . Les protéines G sont inactives lorsque leurs sous-unités sont liées au GDP, et deviennent actives quand le

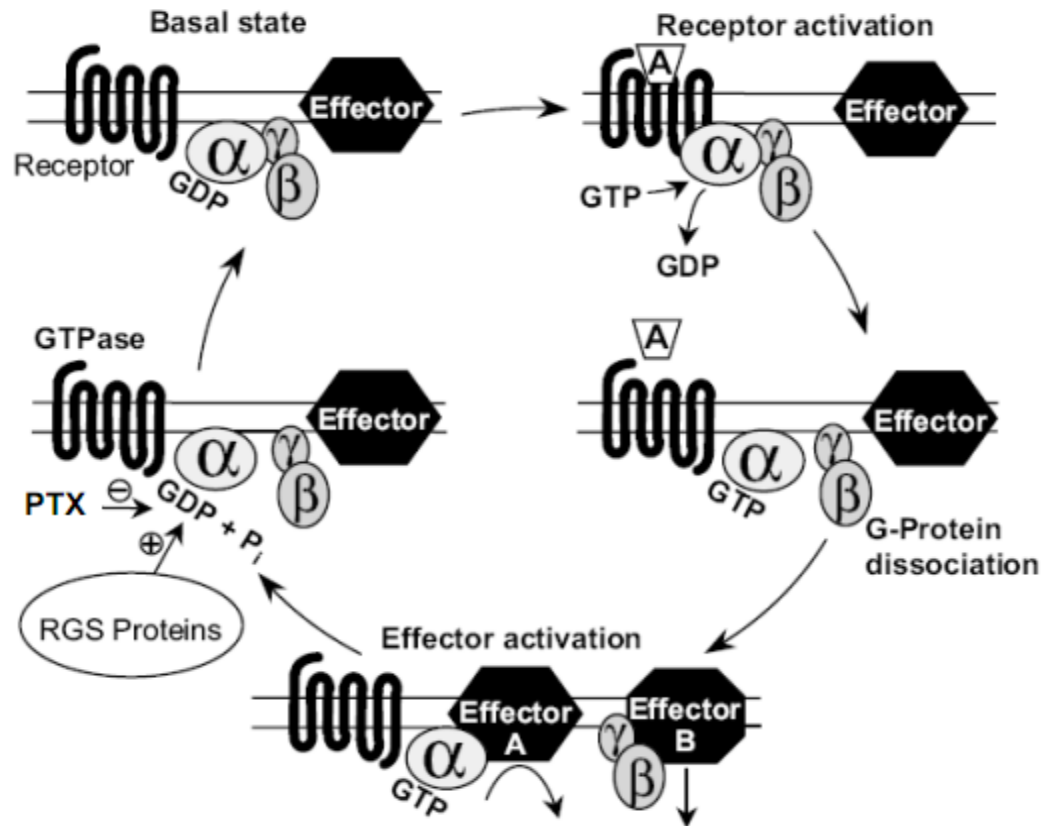
GDP est échangé pour du GTP. Sous forme active, la protéine G hétérotrimérique se dissocie alors en sous unité  $\alpha$  lié au GTP et en un dimère  $\beta\gamma$ . Les sous unités libres sont capables d'interagir avec différents effecteurs responsables de la réponse physiologique (Figure 15) (Offermanns 2003). La sélectivité de la signalisation est déterminée par la nature de la protéine G et par la nature des effecteurs activés. Il existe plus de 20 sous-unités  $\alpha$  regroupées en 4 familles:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_q$  et  $\alpha_{12/13}$  ainsi que, 6 sous-unités  $\beta$  et 12  $\gamma$  (Maghazachi 2000). Les récepteurs des chimiokines semblent s'associer le plus souvent à des protéines  $G_{\alpha i}$  sensibles à la toxine de Bordetella pertussis (PTX) ou à des membres de la famille des  $G_{\alpha q}$ . Les protéines G interagissent avec les récepteurs des chimiokines, en particulier au niveau du motif hautement conservé de la boucle ICL2 : DRY. Des mutations de ce motif entraînent une perte de réponse cellulaire. La boucle ICL3 serait impliquée dans la sélectivité de la protéine G. les domaines ICL2 et ICL3 agissent probablement de manière coopérative avec la région C terminale. En effet, la délétion de la partie C-terminale altère également la réponse cellulaire.

La fixation du ligand sur son récepteur induit une cascade d'évènements, dont l'effecteur le plus courant est la PLC. La sous-unité  $\beta\gamma$  interagit avec la phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ) qui, à partir du phosphatidylinositol (4,5)-bis phosphate (PI), génère de l'inositol (1,4,5)triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). L'IP3 induit le relargage de  $Ca^{2+}$  des stocks intracellulaires, permettant une augmentation de la concentration en calcium du cytoplasme. Le DAG, en présence de calcium, active différentes isoformes de protéines kinases (PKC). En plus, il a été montré que l'hétérodimère  $\beta\gamma$  induit l'activation de PI3K $\gamma$  qui à son tour active le PKB et la MAPK. La sous unité  $\alpha$  induit l'activation de src TPK et de FAK/Pyk-2. L'Src TPK induit l'activation de MAPK et de PI3K p85/p100 qui à son tour active le PKB (Figure 16) (Thelen 2001).

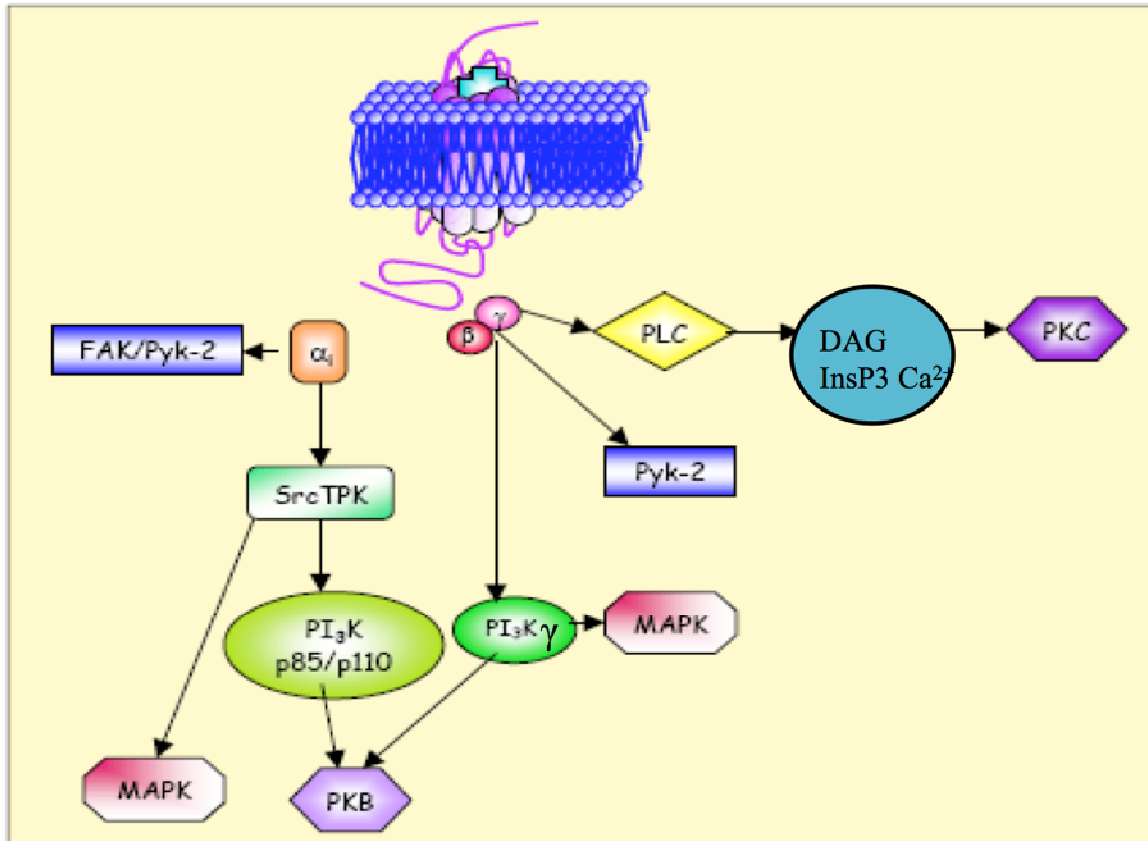
La signalisation des récepteurs des chimiokines peut être indépendante de la protéine G et dans certains cas, conduire au recrutement et à l'activation de la voie JAK-STAT (Ahr, Denizot et al. 2005).

Ces cascades de signalisation des récepteurs des chimiokines sont impliquées dans la régulation de différentes fonctions biologiques comme la migration, la survie, la différenciation, la prolifération cellulaire.





**Figure 15 :** Représentation schématique générale résumant l'activation des protéines G hétérotrimériques via les récepteurs à 7 domaines transmembranaires. A, agoniste, PTX, pertussis toxine, RGS, régulateur de la signalisation des protéines G. Figure modifié et tiré de (Offermanns 2003).



**Figure 16 : Principales voies de signalisation induites par la liaison des chimiokines sur leurs récepteurs.** PLC : PhosphoLipase C ; PKC : Protéine Kinase C ; PKB : Protéine Kinase B ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; FAK : Focal Adhesion Kinase p125 ; PI3K : PI3 Kinase ; DAG : DiAcylGlycérol ; IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate. (Thelen 2001).

### II.2.3.c. Internalisation

La transduction des signaux via les récepteurs des chimiokines est régulée soit par la désensibilisation du récepteur, qui concourt à limiter dans le temps le signal d'activation du récepteur, soit par l'internalisation de celui-ci. La remise en fonction des récepteurs peut avoir lieu soit par recyclage du récepteur suite à l'internalisation soit par résensibilisation.

Lorsque le ligand se lie à un récepteur, ce dernier interagit avec une protéine G trimérique qui se dissocie en sous-unités  $\alpha$ -GTP et  $\beta\gamma$ , capables d'activer des effecteurs cellulaires. Très rapidement les RCPG sont phosphorylés au niveau du domaine C-terminal par des kinases spécifiques (GRK) et cette phosphorylation a pour effet d'augmenter l'affinité pour la  $\beta$ -arrestine, cette étape est appelée l'étape de désensibilisation ou de phosphorylation. La liaison de la  $\beta$ -arrestine sur les RCPG favorise leur entrée dans la voie d'endocytose via les puits recouverts de clathrine. En effet, la  $\beta$ -arrestine interagit avec la sous-unité  $\beta$  d'AP-2 et cette

protéine adaptatrice établit un pont moléculaire entre le complexe récepteur- $\beta$ -arrestine et la principale protéine du manteau de la vésicule d'endocytose, la clathrine. Ce phénomène a été décrit pour plusieurs récepteurs tels que : le CXCR4, CCR2b, CXCR7 (Bhandari, Trejo et al. 2007; Berchiche, Gravel et al. 2010; Luker, Steele et al. 2010). Une fois le compartiment endosomique atteint, le devenir des récepteurs internalisés est variable. Le plus souvent, les récepteurs sont déphosphorylés au niveau des endosomes, conséquence du pH acide et la présence de phosphatases au niveau de ces vésicules, puis recyclés à la membrane plasmique, où ils peuvent à nouveau être stimulés. Certains récepteurs ne recyclent pas et sont dirigés vers le compartiment lysosomal pour y être dégradés (Figure 17) (Moore, Milano et al. 2007). Ils existent également une autre voie d'internalisation des récepteurs des chimiokines (comme le récepteur de CCR5) qui ne conduit pas à la formation de vésicules à clathrine. Cette voie fait intervenir les cavéoles qui sont des micro-domaines de la membrane plasmique, impliqués dans l'endocytose, la signalisation calcique et le transport de cholestérol (Mueller, Kelly et al. 2002).

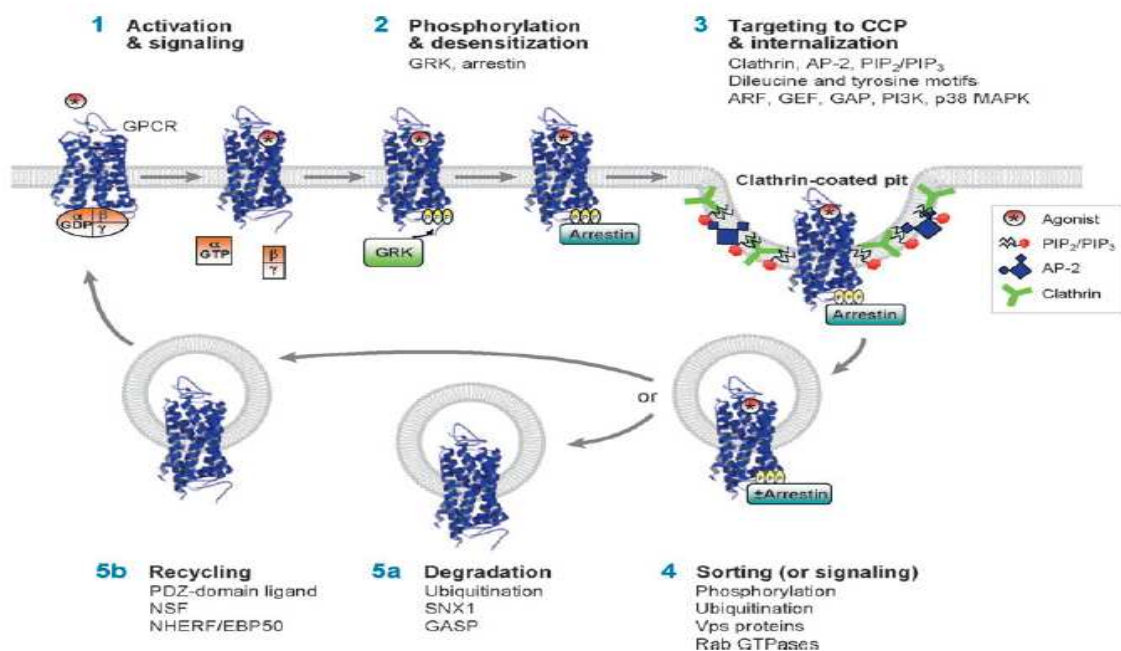
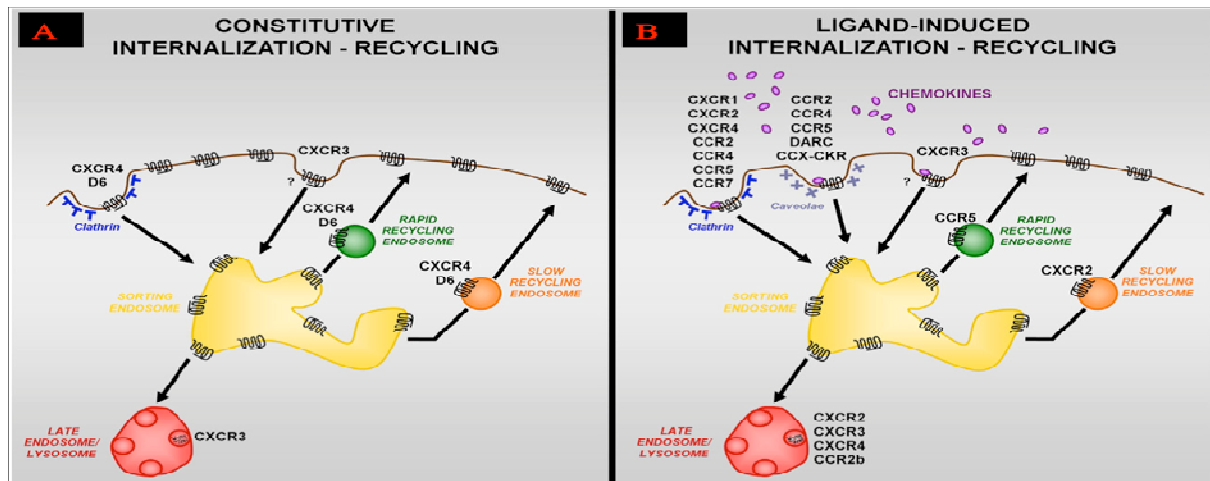


Figure 17 : Endocytose des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) après une activation de courte durée : mécanisme principal et devenir des récepteurs internalisés (Moore, Milano et al. 2007).

...Il existe également une internalisation constitutive : le récepteur s'internalise même en absence du ligand. Ce phénomène existe chez certains récepteurs par exemple : CXCR4, CX3CR1, D6 et CXCR7 (Figure 18) (Borroni, Mantovani et al. 2010; Luker, Steele et al. 2010).



**Figure 18 : Endocytose des récepteurs aux chimiokines.** A. Dans l'absence de ligand, certains récepteurs aux chimiokines (RC) subissent une internalisation constitutive, suivie par la dégradation (CXCR3) ou le recyclage (CXCR4 et D6) (Figure à gauche). La plupart des RC sont internalisés après la fixation de leurs ligands par l'intervention des voies dépendante de la clathrine ou des cavéoles. Certains CR utilisent les deux voies (CCR2, CCR4, et CCR5), tandis que d'autres CR utilisent une voie spécifique (clathrine-dépendante: CXCR1, CXCR2, CXCR4 et CCR7; cavéoles-dépendants: DARC, et CCXCKR). Suite à l'endocytose, les récepteurs peuvent être recyclés à la membrane l'endosome (CCR5, CXCR2) soit transportés aux lysosomes pour être dégradés (CCR2b, CXCR2, CXCR3 et CXCR4) (Figure à droite) (Borroni, Mantovani et al. 2010).

**LA CHIMIOKINE SDF-1 (CXCL12) ET SES  
DEUX RECEPTEURS, CXCR4 ET CXCR7**

### III. LA CHIMIOKINE SDF-1 (CXCL12) ET SES DEUX RECEPTEURS, CXCR4 ET CXCR7

#### III.1. GENERALITES A PROPOS DE LA CHIMIOKINE SDF-1/CXCL12

##### III.1.1. Historique et caractéristique

Les protéines SDF-1 $\alpha$  et SDF-1 $\beta$  (stromal cell derived factor 1) sont les premières chimiokines identifiées par clonage à partir d'une lignée de cellules stromales de la moelle osseuse murine (bone marrow stromal cell line, d'où son nom) (Tashiro, Tada et al. 1993), et généralement appelée chimiokine (motif CXC) ligand 12 (CXCL12).

Ces protéines ont ensuite été clonées à partir des cellules stromales humaines et ont été identifiées comme cytokines provoquant la prolifération des cellules B précurseur dépendantes des cellules stromales. Elles ont donc été appelées « facteurs stimulant la croissance des cellules B » (PBSF : Pre-B cell growth Stimulating Factor) (Shirozu, Nakano et al. 1995). SDF-1 existe sous forme soluble qui induit préférentiellement le recrutement des lymphocytes T et les monocytes et elle existe à la surface membranaire par leur liaison aux glycoprotéines qui peut jouer un rôle dans l'adhésion des lymphocytes et dans la transmigration (De La Luz Sierra, Yang et al. 2004; Janowski 2009).

SDF-1 $\alpha$ /CXCL12a (68 résidus) et SDF-1 $\beta$ /CXCL12b (72 résidus) sont codées par un seul gène qui subit un épissage alternatif, la différence entre ces deux variants se situant au niveau des 4 AA supplémentaires à l'extrémité carboxy-terminale de SDF-1 $\beta$ /CXCL12b. Les deux formes alternatives sont identiques, tant au niveau de l'expression que des fonctions (De La Luz Sierra, Yang et al. 2004). Quatre autres variantes de SDF-1 ont été identifiées qui contiennent respectivement 30 AA (SDF-1 $\gamma$ ), 31 AA (SDF-1 $\delta$ ), 1 AA (SDF-1 $\epsilon$ ) et 51 AA (SDF-1 $\phi$ ) supplémentaires à l'extrémité C-terminale par rapport à SDF-1  $\alpha$  (Yu, Cecil et al. 2006).

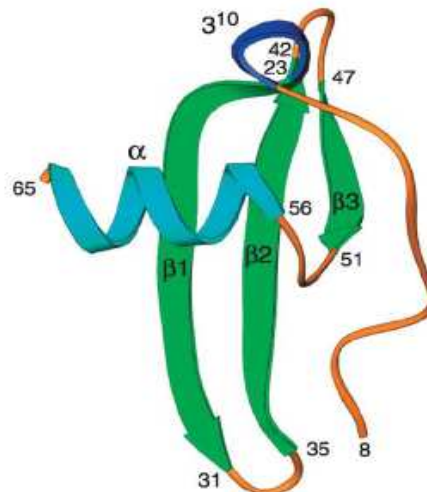
SDF-1 possède quelques caractéristiques remarquables :

- L'expression de SDF-1 est produite de façon constitutive par exemple, dans les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et dans d'autres types cellulaires (Pablos, Amara et al. 1999; Salvucci, Yao et al. 2002).

- Chez l'homme, le gène codant pour SDF-1 est localisé sur le chromosome 10, alors que les gènes codant pour toutes les autres chimiokines de type CXC sont portés par les chromosomes 4 et 5.

- Le pourcentage d'identité entre les chimiokines humaines et murines avoisine les 69 %, mais SDF-1 est identique entre ces deux espèces, hormis une unique modification en position 18 d'une valine en isoleucine, ce qui suggère un rôle fondamental de SDF-1 au vu de cette conservation à travers l'évolution (Shirozu, Nakano et al. 1995).

La structure de SDF-1 est caractéristique de la famille des chimiokines comprenant un feuillet  $\beta$  composé de trois brins antiparallèles (résidus 23 à 31, 35 à 42 et 47 à 51). Cet arrangement se termine avec un domaine carboxy-terminal organisé en hélice  $\alpha$  (résidus 56 à 64). Les ponts disulfures relient la boucle amino-terminale au brin  $\beta$ 2 (Cys9-Cys34) et au brin  $\beta$ 3 (Cys11-Cys50) (Figure 19). SDF-1 présente une caractéristique particulière à l'intérieur de la famille des CXC chimiokines au niveau de l'orientation des ponts disulfures qui est identique à celle des chimiokines de la famille CC. Cette différence résulte sans doute de l'existence d'une proline entre les cystéines 9 et 11 (Crump, Gong et al. 1997; Gozansky, Louis et al. 2005).



**Figure 19 : Structure tridimensionnelle de SDF-1**

Les brins  $\beta$  sont représentés en vert, l'hélice  $\alpha$  carboxy-terminale en bleu ciel, les boucles 30s, 40s et 50s en marron et la boucle N en bleu foncé (Gozansky, Louis et al. 2005).

CXCR4 a été longtemps considéré comme étant le seul récepteur de SDF-1 (Bleul, Farzan et al. 1996). En 2005, un second récepteur de SDF-1 a été identifié, le récepteur orphelin RDC1 de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires liés aux protéines G hétérotrimériques (comme CXCR4), renommé CXCR7 selon la nomenclature en vigueur (Balabanian, Lagane et al. 2005; Burns, Summers et al. 2006).

### **III.1.2. Sites de production de SDF-1**

L'expression transcriptionnelle de SDF-1 est constitutive dans de nombreux tissus hématopoïétiques ou non hématopoïétiques (Janowski 2009). SDF-1 est produite chez les fœtus, par les cellules épithéliales biliaires des plaques ductales au niveau du foie et par les cellules mésothéliales des cavités coelomiques (Coulomb-L'Hermin, Amara et al. 1999). Ceci suggère un rôle précoce de SDF-1 au cours du développement. Chez l'adulte, l'expression protéique de SDF-1 est détectée largement dans les cellules stromales, endothéliales, épithéliales et dendritiques (De La Luz Sierra, Yang et al. 2004). SDF-1 est exprimée dans différents tissus comme le foie, le poumon, la glande surrénale et la moelle osseuse (Raman, Baugher et al. 2007). SDF-1 $\alpha$  est la variante la plus répandue et qui est exprimée dans de nombreux tissus comme la moelle osseuse et le système nerveux central (SNC). SDF-1 $\beta$  est moins exprimé que le SDF-1 $\alpha$ . SDF-1 $\beta$  est surtout exprimé dans les organes très vascularisés comme le foie, la rate, la moelle osseuse, les reins et le cerveau. SDF-1 $\gamma$  est l'isoforme prédominante dans le cerveau de rats adultes, dans le cœur, et dans la vie embryonnaire. SDF-1 $\delta$ , SDF-1 $\epsilon$  et SDF-1 $\phi$  sont les variantes qui ont été décrites récemment dans les tissus humains. Elles sont toutes abondantes dans le pancréas. En plus SDF-1 $\epsilon$  et SDF-1 $\phi$  ont été trouvés dans le cœur et le foie, ainsi dans les reins du fœtus et des adultes. D'autre part SDF-1 $\delta$  a également été détecté dans la rate, le foie fœtal et les poumons. L'expression des variantes de SDF-1 est hétérogène dans différents tissus mais tous exerce le même effet fonctionnel (Janowski 2009).



## III.2. LES RECEPTEURS DE LA CHIMIOKINE SDF-1

### III.2.1. Le récepteur de chimiokine, CXCR4

#### *III.2.1.a. Historique et caractéristique*

En 1993, Herzog et collaborateurs, lors de recherche sur les récepteurs orphelins, clonent un gène bovin qu'ils identifient comme un récepteur à sept domaines transmembranaires et classent ce récepteur dans la famille des récepteurs du neuropeptide Y en lui donnant le nom de NPY Y3 (Herzog, Hort et al. 1993). L'équivalent humain est isolé à partir d'une banque de poumon. La séquence compte 1670 paires de bases et prédit une phase ouverte de lecture de 352 AA.

En 1994, Loetscher et collaborateurs mettent en évidence des similarités entre ce récepteur putatif Y3 et le récepteur de l'interleukine 8 au niveau de la taille mais surtout en ce qui concerne la présence d'un deuxième pont disulfure extracellulaire. Le groupe isole alors un ADNc codant pour une protéine de 352 AA compatible avec la séquence d'un RCPG à partir d'une banque de monocytes de sang humain (Loetscher, Geiser et al. 1994). Ils dénomment cette protéine LESTR (Leukocyte derived Seven Transmembrane domain Receptor).

En 1996, chez l'humain, Feng et collaborateurs ont entrepris la caractérisation du cofacteur spécifique permettant la fusion et l'infection par VIH (virus d'immunodéficience humaine) ils isolent un ADNc de 1.7 kb, possédant une phase ouverte de lecture de 352 codons prédisant un RCPG: ce récepteur identifié comme le cofacteur permettant la fusion de l'enveloppe du VIH et la pénétration dans la cellule hôte en association avec la molécule CD4. Du fait de son rôle dans la fusion et l'entrée du virus VIH il a été nommé Fusin (Feng, Broder et al. 1996). Enfin, lorsque le rôle protecteur de SDF-1 en matière d'infection à VIH a été mis en évidence, CXCR4 a été identifié comme étant le récepteur de SDF-1 et reclassé dans la famille des récepteurs de chimiokines. Dans la même année, l'homologue murin, «pre-B-cell-derived chemokine receptor» (PB-CKR/CXCR4), a été cloné et localisé sur le chromosome 9 par deux équipes à partir d'une banque d'ADNc de cellules péritonéales et cellules pré-B (CW34) (Heesen, Berman et al. 1996; Nagasawa, Nakajima et al. 1996). La forme protéique présente 86% et 96% d'identité de séquence avec les formes bovines et humaines, respectivement.

La protéine CXCR4 présente un poids moléculaire de 40 KDa et elle appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G $\alpha$ i. Il partage 32 à 38% d'homologie de séquence avec les autres récepteurs CXC (Murphy and Tiffany 1991). Deux isoformes de CXCR4 sont produites par épissages alternatifs, CXCR4-A et CXCR4-B,

lequel est tronqué en N-terminal (délétion de Val<sup>6</sup> et Ser<sup>7</sup>). Ces deux formes de CXCR4 coexistent naturellement, fixant SDF-1 et sont exprimées par les LT et les LB, les cellules péritonéales, les macrophages et les thymocytes (Heesen, Berman et al. 1997).

Sur le plan structural, la protéine CXCR4 murine diverge de la forme humaine au niveau des ectodomains (74 % d'identité), principalement au niveau de la seconde boucle extracellulaire (67% d'identité), qui présente une insertion de 7 AA (Q<sup>181</sup>-G<sup>187</sup>). Contrairement à la forme humaine qui possède deux sites de modifications post-traductionnelles, la protéine murine ne présente qu'un seul site de glycosylation, localisé à l'extrémité N-terminale. La région N-terminale et la dernière boucle extracellulaire, importante dans la fixation du ligand, présentent 80% d'identité de séquence. Les domaines transmembranaires et intracytoplasmiques présentent 96% d'identité de séquence, et conservent notamment le motif de liaison aux protéines G $\alpha$ i (DRYLAIV) dans la 2<sup>ème</sup> boucle intracellulaire et des motifs riches en Ser à l'extrémité C-terminale (Heesen, Berman et al. 1996; Roland, Murphy et al. 2003).

### ***III.2.1.b. Site de production du récepteur CXCR4***

CXCR4 est exprimé dans les tissus hématopoïétiques et non-hématopoïétiques, tels que le poumon, le cœur et le cerveau. CXCR4 est exprimé par un spectre de cellules hématopoïétiques relativement large incluant les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes B et T, les macrophages et les cellules dendritiques. Il est encore exprimé à des niveaux très élevés dans les cellules endothéliales du système vasculaire, cellules épithéliales, et dans les neurones du système périphérique ou central, dans la microglie et les astrocytes. De nombreux types cellulaires exprimant CXCR4 ont été identifiés au niveau des sites stratégiques de passage de VIH, à savoir les muqueuses génitales et digestives, les glandes salivaires, le placenta et le SNC.

CXCR4 est également exprimé sur les cellules dendritiques immatures, les progéniteurs des cellules B de la moelle osseuse et le cerveau embryonnaire.

CXCR4 été détecté dans 23 différents types de cancer (Balkwill 2004), y compris la leucémie, le cancer du sein, le cancer d'ovaire et récemment détecté dans le cancer de la prostate (Furusato, Mohamed et al. 2010).

### *III.2.1.c. Signalisation induite par CXCR4*

La stimulation du CXCR4 par la chimiokine SDF-1 permet d'activer diverses signalisations intracellulaires en fonction du type cellulaire. Comme la plupart des récepteurs de chimiokine, la forme active du CXCR4 induit son interaction avec les protéines G hétérotrimériques classiques, la protéine G $\alpha$ i qui est impliquée dans l'inhibition de l'adénylate cyclase et G $\alpha$ q qui induit la mobilisation de calcium (Murphy, Baggiolini et al. 2000). Busillo et al. montrent que CXCR4 est sensible à la toxine pertussis (PTX). La PTX catalyse l'ADP-ribosylation au niveau d'une cystéine située près de la partie C-terminale du récepteur et prévient l'activation de la protéine G, plus précisément la G $\alpha$ i (Busillo, Armando et al. 2010). Dans cet article, les auteurs montrent que le prétraitement à la PTX prévient l'activation de la protéine G nécessaire à la phosphorylation des sérines en partie C-terminale du récepteur. CXCR4 active entre autres la voie de la PI3-Kinase (phosphatidylinositol 3 kinase), la voie de la mobilisation calcique ainsi que les kinases telles que Pyk2 (proline rich kinase 2) et les kinases apparentées à la famille Src. L'effet résultant de la signalisation de CXCR4 sur le cytosquelette est médié par les petites GTPases représentées par Rho, Rac et Cdc 42 (Teicher and Fricker 2010). Indépendamment de la protéine G, la liaison de SDF-1 à CXCR4 induit son interaction avec différentes GRK «G-protein coupled receptor» soit GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6. Par la suite, les auteurs montrent que GRK3 et GRK6 phosphorylent le récepteur, ce qui induit le recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR4 (Busillo, Armando et al. 2010).

En plus de son rôle fonctionnel, la signalisation induite par le SDF-1 peut avoir un rôle transcriptionnel sur plusieurs gènes via la voie des MAPKs, NF $\kappa$ B et JAK/STAT. Cet effet régulateur de la transcription aurait un rôle dans la protection anti-apoptotique des cellules CD34+ et augmenterait l'expression des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP) (Murphy, Baggiolini et al. 2000). La désensibilisation du récepteur est médiée par sa phosphorylation au niveau C-terminal intra-cytoplasmique (Haribabu, Richardson et al. 1997).

La stimulation du CXCR4 par la chimiokine SDF-1 induit l'activation de différentes voies de signalisation, ce qui peut entraîner une variété de réponses comme le chimiotactisme, la survie cellulaire et / ou la prolifération, la régulation de la transcription des gènes. La figure 20 représente les principales voies de signalisation qui peuvent être impliquées dans la transduction du signal CXCR4 (Teicher and Fricker 2010).

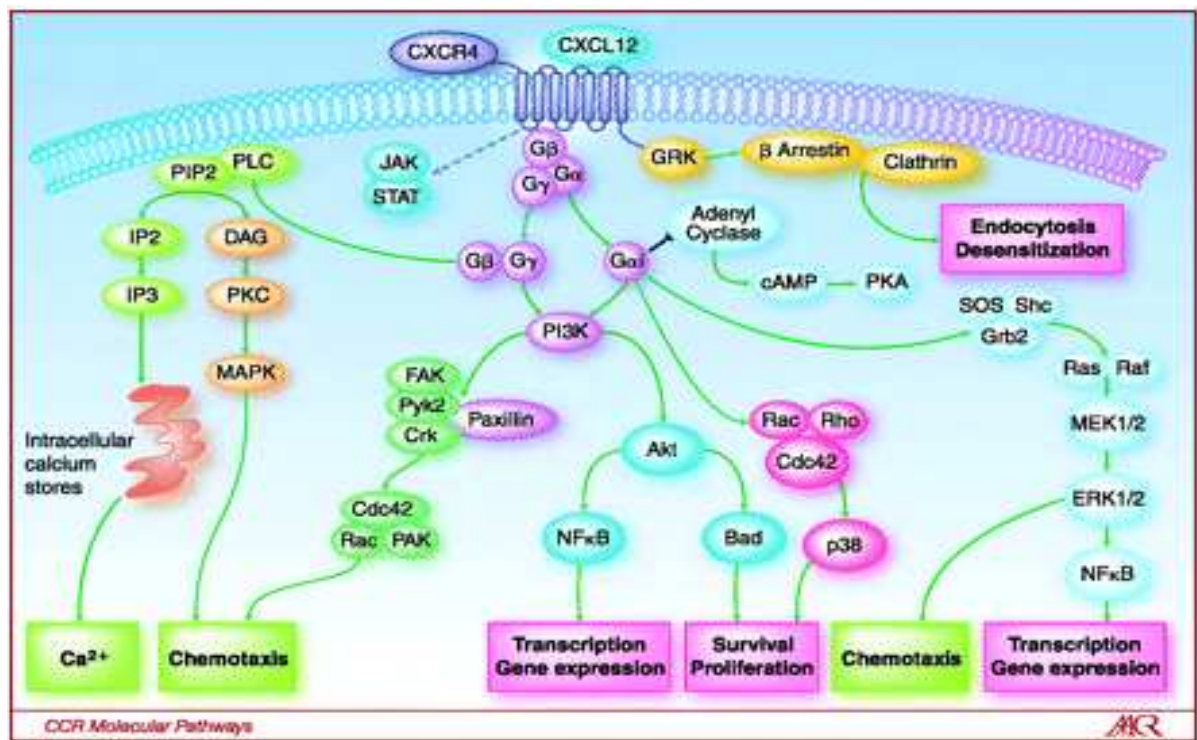


Figure 20 : voies de la signalisation intracellulaire du couple SDF-1/CXCR4 (Teicher and Fricker 2010).

### III.2.2. Le récepteur de chimiokine, CXCR7

#### III.2.2.a. Historique et caractéristique

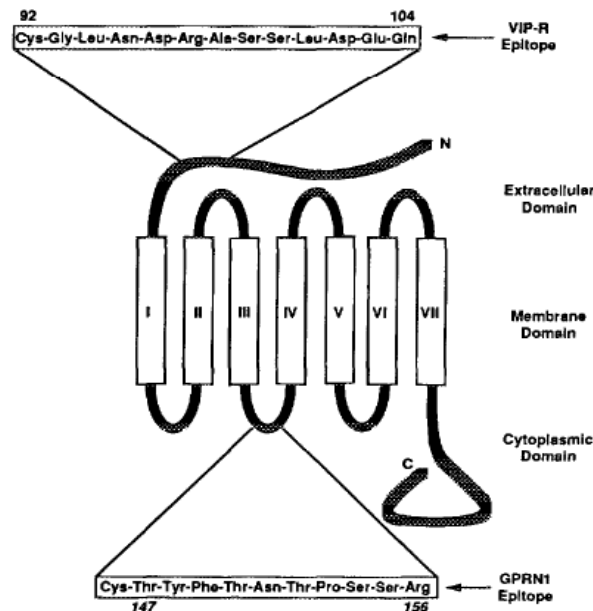
Le récepteur CXCR7 a été cloné depuis à peu près 20 ans à partir d'une banque d'ADNc de thyroïde de chien d'où son nom RDC1 « Receptor Dog ADNc » (Libert, Parmentier et al. 1989). Il était aussi connu sous d'autres noms tels que les GPCR 159, GPR159, GPRN1 (Figure 21), chimiokine orphelins receptor 1 (CMKOR1), AW541270 et chemocentric chemiokine receptor 2 (CCX-CKR2). En outre, CXCR7 présente une homologie avec le gène ORF74 viral qui code pour un récepteur de chimiokine qui suggère qu'il code pour un signal de manière constitutive en l'absence de ligand (Maksym, Tarnowski et al. 2009).

Depuis de nombreuses années, le récepteur CXCR7 a été identifié comme un récepteur orphelin pour lequel son ligand n'est pas encore identifié (Law and Rosenzweig 1994). En 2005, SDF-1 été identifié comme un ligand du CXCR7 (Balabanian, Lagane et al. 2005; Burns, Summers et al. 2006). Ce récepteur a été détecté comme un deuxième récepteur de SDF-1, quand ils ont remarqué que les cellules murines du foie fœtal de souris knock-out CXCR4, peuvent toujours se lier à SDF-1 (Burns, Summers et al. 2006). A noter que, SDF-1

a environ 10 fois plus d'affinités pour CXCR7 par rapport à CXCR4. De plus, CXCR7 se lie avec une forte affinité avec la chimiokine CXCL11/ITAC (I-TAC : interferon-inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant), ce qui peut perturber l'interaction de SDF-1/CXCR7 (Burns, Summers et al. 2006). En outre, CXCL11 peut également se lier à un autre récepteur de chimiokine : CXCR3 (Cole, Strick et al. 1998). Le gène CXCR7 de souris se situe sur le chromosome 1 et le gène CXCR7/RDC-1 humain se situe sur le chromosome 2, où les gènes codant pour CXCR1, CXCR2, et CXCR4 sont situés. Il existe actuellement deux isoformes de CXCR7 qui sont produites par épissages alternatifs (Lucchesi, Brady et al. 2008).

D'un point de vue évolutif, CXCR7 est hautement conservé à travers les mammifères; l'humain, le chien, la souris et le rat (Heesen, Berman et al. 1998).

Les récepteurs des chimiokines ont des caractéristiques communes comme leur liaison avec les protéines G $\alpha$ i et le fait qu'ils sont formés de 7 domaines transmembranaires (Zlotnik and Yoshie 2000). Cependant, le récepteur CXCR7 est formé de 7 domaines transmembranaires mais il n'est pas couplé aux protéines G. Cette caractéristique peut être due à des modifications dans la séquence DRYLAIV situé au niveau de la boucle ICL2 qui est nécessaire à la liaison aux protéines G hétérotrimériques (Figure 22) (Thelen and Thelen 2008).



**Figure 21 : Structure du récepteur GPRN1 (CXCR7) (Law and Rosenzweig 1994).**

CX3C1_HUMAN	T V I S I	D R Y L A	I V	L A A N S M N N	R T
XCR1_HUMAN	T I M T I	H R Y L S	V V	S P L S T L R V	P T
CCR1_HUMAN	I L L T I	D R Y L A	I V	H A V F A L R A	R T
CCR2_HUMAN	I L L T I	D R Y L A	I V	H A V F A L K A	R T
CCR3_HUMAN	I L L T I	D R Y L A	I V	H A V F A L R A	R T
CCR4_HUMAN	M L M S I	D R Y L A	I V	H A V F S L R A	R T
CCR5_HUMAN	I L L T I	D R Y L A	V V	H A V F A L K A	R T
CCR6_HUMAN	T C I S M	D R Y I A	I V	Q A T K S F R L	R S
CCR7_HUMAN	L C I S I	D R Y V A	I V	Q A V S A H R H	R A
CCR8_HUMAN	T L M S V	D R Y L A	V V	H A V Y A L K V	R T
CCR9_HUMAN	M C I S V	D R Y I A	I A	Q A M R A H T W	R E
CCR10_HUMAN	A C I S A	D R Y V A	I A	R A L P A G P R	P S
CCRL1_HUMAN	A C I S I	D R Y V A	V T	K V P S Q S G V	G P
CXCR1_HUMAN	A C I S V	D R Y L A	I V	H A T R T L T Q	K R
CXCR2_HUMAN	A C I S V	D R Y L A	I V	H A T R T L T Q	K R
CXCR3_HUMAN	A C I S F	D R Y L N	I V	H A T Q L Y R R	G P
CXCR4_HUMAN	A F I S L	D R Y L A	I V	H A T N S Q P R	K L
CXCR5_HUMAN	A C I A V	D R Y L A	I V	H A V H A Y R H	R R
CXCR6_HUMAN	T C I T V	D R F I V	V V	K A T K A Y N Q	Q A
CXCR7_HUMAN	T C M S V	D R Y L S	I T	Y F T N T P S S	R K
CCBP2_HUMAN	S C M S L	D K Y L E	I V	H A Q P Y H R L	R T
DUFY_HUMAN	G C H A S	L G H R L	G A	G Q V P G L T L	G L

**Figure 22 : Aligement de séquences des récepteurs des chimiokines.** La région encadrée représente l'extrémité N-terminale de la seconde boucle intracellulaire comprenant le motif DRYLAIV (Thelen and Thelen 2008).

### III.2.2.b. Site de production du récepteur CXCR7

L'expression de CXCR7 a été trouvée dans les tissus embryonnaires et adultes. Cependant, CXCR7 est mal exprimé dans les cellules somatiques normales, son expression est plus élevée dans les cellules transformées et pendant le développement embryonnaire dans les deux tissus humains et murins (Thelen and Thelen 2008). CXCR7 est exprimé par les cellules B et T, les monocytes, les neutrophiles (Balabanian, Lagane et al. 2005) et par les cellules dendritiques. L'expression du CXCR7 est en corrélation avec la capacité des cellules B à se différencier en cellules plasmiques lors de l'activation, ce qui suggère que CXCR7 est un marqueur des cellules B mémoire, qui sont compétentes pour devenir des cellules sécrétrices d'anticorps (Sierro, Biben et al. 2007). CXCR7 est largement exprimé dans les cellules neuronales, dans les cellules vasculaires et gliales (Schonemeier, Kolodziej et al. 2008). CXCR7 est exprimé par de nombreuses lignées cellulaires tumorales (comme les cellules tumorales du sein, du poumon et du cerveau), par les cellules endothéliales activées, par les cellules du foie fœtal, par le placenta ainsi que par l'endothélium vasculaire (Sun, Cheng et al. 2010).

### *III.2.2.c. Signalisation du récepteur CXCR7*

Plusieurs études ont montré que CXCR7 n'active pas les protéines G hétérotrimériques classiques et n'induit pas de libération de calcium (contrairement au récepteur de chimiokine CXCR4) (Burns, Summers et al. 2006; Kalatskaya, Berchiche et al. 2009). Levoye et al. ont démontré que CXCR7 interagit de façon constitutive avec la sous-unité G $\alpha$ i sans toutefois engendrer son activation (Levoye, Balabanian et al. 2009). Tandis qu'une étude récente a montré que le récepteur CXCR7 était sensible à la toxine pertussis (PTX). La PTX prévient l'interaction de la sous-unité protéique G $\alpha$ i avec le récepteur. Grymula et al. ont observé que suite à un prétraitement des cellules tumorales du rhabdomyosarcome avec la PTX, la chimiotaxie ainsi que la phosphorylation des MAPK 42/44 induits par le couple SDF-1/CXCR7 étaient altérés voire absentes (Grymula, Tarnowski et al. 2010).

Il a été montré que la stimulation de CXCR7 par la chimiokine SDF-1 induit le recrutement de la  $\beta$ -arrestine (Kalatskaya, Berchiche et al. 2009; Rajagopal, Kim et al. 2010). Toutefois, le recrutement de la  $\beta$ -arrestine pourrait aussi se faire indépendamment de l'interaction du récepteur avec la protéine G hétérotrimérique et, à son tour, induire des cascades signalétiques menant à l'activation des MapKinases telles que les MAPK 42/44 (Wei, Ahn et al. 2003; Rajagopal, Kim et al. 2010). Rajagopal et al. montrent que l'activation des MAPK 42/44 via CXCR7 est uniquement médiée par le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, et non par son interaction avec les protéines G hétérotrimériques (Rajagopal, Kim et al. 2010).

Aussi, CXCR7 peut hétérodimériser avec le récepteur de chimiokine CXCR4 et, ainsi, affaiblir la signalisation des protéines G médiée par CXCR4 (Levoye, Balabanian et al. 2009). La modulation des diverses fonctions du récepteur de chimiokine CXCR4 a été suggérée comme un des principaux rôles de CXCR7 (Thelen and Thelen 2008). Or, plusieurs groupes de recherche ont considéré CXCR7 comme un récepteur «decoy», c'est-à-dire sans signalisation propre et qu'il est fonctionnel seulement lorsqu'il dimérise avec un autre récepteur de chimiokine (Haraldsen and Rot 2006; Thelen and Thelen 2008). Certaines études observent que CXCR7 joue le rôle d'adaptateur pour un groupe de molécules impliquées dans l'activation rapide des intégrines médiée par l'axe SDF-1/CXCR4. Dans leur modèle, CXCR7 se trouve plutôt emmagasiné dans des vésicules d'endosomes précoces situées sous la membrane basale et qu'il y a un recyclage constant de CXCR7 entre cette membrane et les vésicules d'endosomes. Ainsi, ceci assure un pool cytoplasmique de CXCR7 dans le but de provoquer une activation des intégrines sur une longue période de temps (Hartmann, Grabovsky et al. 2008; Thelen and Thelen 2008).

### **III.2.3. L'effet de l'inactivation des gènes codant pour SDF-1, CXCR4 et CXCR7**

Les importants rôles concernant SDF-1, CXCR4 et CXCR7 dans l'embryogenèse et dans le développement sont issus des animaux invalidés pour ces gènes.

Les souris invalidées pour le gène codant SDF-1 (SDF-1<sup>-/-</sup>) ou CXCR4 (CXCR4<sup>-/-</sup>) meurent généralement avant la naissance. Elles présentent d'importantes anomalies de l'hématopoïèse caractérisées par une diminution sévère de la lymphopoïèse B dans le foie fœtal et la moelle osseuse, une absence de myélopoïèse dans la moelle et une diminution de la myélopoïèse dans le foie fœtal. En plus, ces souris ont des anomalies du système vasculaire et gastro-intestinal et des malformations du tissu cérébelleux (Nagasawa, Hirota et al. 1996; Ma, Jones et al. 1998; Tachibana, Hirota et al. 1998; Zou, Kottmann et al. 1998). En revanche, deux études ont montré que les souris invalidées pour le gène CXCR7 (CXCR7<sup>-/-</sup>) ont un développement normal du système hématopoïétique et nerveux et développent uniquement des anomalies du système cardio-vasculaire ou des malformations des valves cardiaques (Sierro, Biben et al. 2007; Gerrits, van Ingen Schenau et al. 2008). 70% des souris CXCR7<sup>-/-</sup> meurent dans la première semaine après la naissance.

### **III.2.4. Rôles du couple SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 dans certaines pathologies**

Il a été suggéré que le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle dans diverses pathologies inflammatoires comme l'allergie, la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaque (Janowski 2009), la maladie WHIM (warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis) (Balabanian, Lagane et al. 2005). Les récepteurs CXCR4 et CXCR7 sont considérés comme des co-récepteurs d'entrées pour certaines souches du VIH (Feng, Broder et al. 1996; Shimizu, Soda et al. 2000). Plusieurs études ont montré le rôle protumoral du couple SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 dans différents types de cancers (Sun, Cheng et al. 2010).

### **III.2.5. Les Rôles du couple SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 dans la tumorigenèse**

Plusieurs études ont montré des rôles importants du couple SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 dans la métastase, la prolifération et l'angiogenèse des différentes variétés de cancers comme le cancer de la prostate, le cancer du poumon, le cancer pancréatique (Sun, Cheng et al. 2010).



### **Le cancer de la prostate**

Chez les souris NUDE, Sun et al. ont montré un rôle de SDF-1/CXCR4 dans la métastase et la croissance des cellules humaines du cancer de la prostate (CaP). Ils ont trouvé une corrélation positive entre les niveaux d'expression de SDF-1 et les tissus dans lesquels les cellules du CaP vont migrer. Les niveaux les plus élevés de SDF-1 sont dans le bassin, le fémur, le foie et les glandes surrénales / reins par rapport aux tissus qui produisent rarement SDF-1 comme les poumons, la langue et les yeux (Sun, Schneider et al. 2005). La neutralisation du CXCR4 par des anticorps spécifiques réduit la métastase et la croissance du cancer de la prostate (Sun, Schneider et al. 2005). En outre, SDF-1 augmente l'adhésion des cellules du cancer de la prostate (LNCaP) aux cellules endothéliales par l'augmentation d'expression des intégrines  $\alpha 5$  et  $\beta 3$  (Kukreja, Abdel-Mageed et al. 2005; Engl, Relja et al. 2006). Dans les cellules PC-3 du cancer de la prostate, SDF-1  $\alpha$  augmente l'expression du CXCR4 via la voie de signalisation MEK /ERK et l'activation de NF-kB, ce qui augmente l'adhésion et la migration des cellules PC-3 vers les cellules endothéliales (Kukreja, Abdel-Mageed et al. 2005). SDF-1 déclenche l'angiogenèse des cellules LNCap via CXCR4 par l'augmentation d'expression du VEGF et CXCL8 (Wang, Sun et al. 2005). Chez les souris, la surexpression de SDF-1 augmente l'angiogenèse en diminuant l'expression de l'enzyme glycolytique phosphoglycérate kinase 1 (PGK1), qui est un régulateur négatif de la VEGF et CXCL8 expression (Wang, Dai et al. 2007). Des études récentes ont rapporté que CXCR7 est fortement exprimé par les cellules du CaP, PC-3 et LNCap C4-2B (Wang, Shiozawa et al. 2008) et que leur expression est plus importante dans les tumeurs agressives. Une étude faite *in vivo* et *in vitro* sur les lignées PC-3 et LNCap C4-2B indique que l'expression du CXCR7 est associée à la prolifération, à la survie et à l'adhésion cellulaire et au chimiotactisme. En plus, la surexpression de CXCR7 augmente la neovascularisation *in vivo* par l'augmentation d'expression des facteurs proangiogéniques tels que l'IL-8 et le VEGF (Wang, Shiozawa et al. 2008).

### **Le cancer du sein**

Les deux équipes de Muller et de Liang, ont montré *in vivo* que SDF-1/CXCR4 déclenchent les métastases de cellules cancéreuses du sein vers les ganglions lymphatiques et le poumon (Muller, Homey et al. 2001). En outre, la neutralisation du CXCR4 par des anticorps spécifiques (Muller, Homey et al. 2001) ou l'inhibition de l'expression par des siRNA (Liang, Yoon et al. 2005), diminue la métastase des cellules du cancer du sein. Les myofibroblastes

associés au cancer du sein produisent des quantités importantes de SDF-1, qui favorisent la croissance des tumeurs par l'activation de la prolifération, la survie et l'angiogenèse des cellules cancéreuses (Orimo, Gupta et al. 2005). *In vitro*, Les cellules humaines du cancer du sein MDAMB-435s transfectées avec le plasmide-CXCR7 (MDA MB435S-CXCR7) montrent un rôle du CXCR7 dans l'augmentation de la prolifération et la survie cellulaire (Burns, Summers et al. 2006). Dans la même étude, ils ont montrés que les cellules transfectées par le plasmide-CXCR7 adhèrent aux cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) plus nettement que les cellules transfectées par le plasmide vide (Burns, Summers et al. 2006). De plus, cette étude a montré que l'expression du CXCR7 augmente par l'activation d'HUVEC par les TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Burns, Summers et al. 2006). De même, la surexpression de CXCR7 augmente la croissance tumorale des xénogreffes des souris SCID par les cellules MDA MB435S-CXCR7 par rapport aux souris injectées par les cellules MDA MB435s transfectées par le plasmide vide (Miao, Luker et al. 2007). Dans le modèle animal de souris injectée par les cellules murines de cancer du sein 4T1, CXCR7 augmente la métastase des cellules cancéreuses vers le poumon (Miao, Luker et al. 2007). Une autre étude faite sur 56 échantillons humains du cancer du sein, a montré que des niveaux élevés de CXCR7 vont augmenter les métastases cérébrales des cellules cancéreuses (Salmaggi, Maderna et al. 2009).

### **Le cancer du poumon**

Burger et al. ont démontré que les cellules du cancer bronchique à petites cellules (*SCLC*) expriment des niveaux élevés des récepteurs CXCR4. En outre, ils ont démontré que l'activation de récepteurs CXCR4 par leur ligand SDF-1 favorise la migration et l'adhésion des cellules SCLC aux cellules stromales de la moelle osseuse par l'intervention de l'intégrine. Plusieurs études ont montré que le couple SDF-1/CXCR4 favorise l'adhésion des cellules SCLC par l'intervention et l'activation des protéines de la matrice extracellulaire (ECM) comme la fibronectine, collagène I et Molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1 (VACAM-1) (Burger, Glodek et al. 2003; Hartmann, Burger et al. 2005; Burger and Kipps 2006). Alors que l'inhibition du récepteur CXCR4 par l'antagoniste T140 diminue l'adhésion cellulaire des cellules SCLC (Hartmann, Burger et al. 2005).

Ainsi, les cellules du cancer bronchique non à petites cellules (*CBNPC*) peuvent également exprimer CXCR4. Su et al. ont constaté que l'expression du CXCR4 est corrélée positivement avec le potentiel invasif/métastatique de ces cancers *in vitro* et *in vivo*, ce qui suggère que le

mouvement des cellules CBNPC vers les autres organes dépend des niveaux d'expression de ce récepteur (Su, Zhang et al. 2005). Une étude a montré que l'hypoxie (une oxygénation insuffisante) et le facteur de croissance épidermique (EGF) sont capable d'induire une importante augmentation du taux d'expression de récepteurs CXCR4 par les cellules NSCLC par l'augmentation d'expression HIF- $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1) via le voie PI3K/PTEN/AKT/mTOR (Phillips, Mestas et al. 2005).

Le récepteur CXCR7 est détecté dans des échantillons humains du cancer du poumon (Miao, Luker et al. 2007). CXCR7 est exprimé dans les cellules vasculaires endothéliales des échantillons humains du *cancer* du poumon (Miao, Luker et al. 2007). CXCR7 est également détecté à la surface des cellules cancéreuses murines du poumon (LLC : Lewis lung carcinoma cell lines). L'inhibition du CXCR7 par des siRNA ou par des antagonistes(CCX754) dans les cellules LLC, aboutit à une diminution de la croissance de la tumeur par rapport au contrôle (Burns, Summers et al. 2006; Miao, Luker et al. 2007). Ces données démontrent que CXCR7 possède des propriétés pro-tumorales dans le cancer du poumon. Récemment, des études sur des patients atteints d'un CPNPC au *stade* I, montrent que l'expression du récepteur CXCR4 et CXCR7 atteint des récives métastatiques après une opération sont significativement plus élevée que chez ceux sans récives. Ce qui suggère que les récepteurs CXCR4 et CXCR7 augmentent les récives métastatiques du CPNPC (Iwakiri, Mino et al. 2009).

### **Le cancer pancréatique**

Le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle important dans la progression du cancer du pancréas grâce à son rôle dans la migration cellulaire et l'angiogenèse tumorale (Marchesi, Monti et al. 2004). L'expression de SDF-1 est indétectable dans toutes les lignées cellulaires examinées du cancer du pancréas, en revanche l'expression de SDF-1 a été identifiée dans tous les tissus du cancer du pancréas. D'où l'hypothèse émise par le groupe de Gao et al. que SDF-1 exerce sa fonction par un mécanisme paracrine (Gao, Wang et al. 2010). Bien que la fonction du récepteur CXCR7 dans le cancer pancréatique reste mal étudiée, une étude récente montre que les patients avec CXCR7<sup>high</sup>/CXCR4<sup>high</sup> ont un taux de survie à 5 ans et une survie globale des patients plus courtes que les patients avec CXCR4<sup>low</sup> / CXCR7<sup>low</sup> (Marechal, Demetter et al. 2009).

### Le cancer de l'ovaire

Dans le CEO, plusieurs études ont montré le rôle clef de la chimiokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 dans la réponse anti-tumorale.

Les cellules épithéliales tumorales expriment fortement SDF-1 ce qui induit un recrutement des cellules dendritiques plasmacytoïdes fonctionnelles CD2s qui expriment son récepteur CXCR4. Une accumulation de cellules CD2s dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire ainsi que dans l'ascite associé a été montrée (Zou, Machelon et al. 2001). De plus, SDF-1 protège les cellules CD2s de l'apoptose. Les cellules CD2s présentes dans le microenvironnement tumoral induisent une production importante d'IL-10 par les cellules T qui supprime les fonctions effectrices des lymphocytes T spécifiques de tumeur induits par les cellules dendritiques myéloïdes (CD1). Ce qui suggère que SDF-1 contribue à réduire la réponse anti-tumorale en favorisant le recrutement de cellules CD2s. Une autre étude a montré que SDF-1 (avec VEGF) augmente la survie et la migration des macrophages dans le CEO. Les macrophages associés aux tumeurs peuvent avoir un rôle dans la progression tumorale suivant leur taux d'infiltration. L'IL-10 produite par les cellules tumorales, ainsi que par les macrophages associés à la tumeur, induit la différenciation des monocytes recrutés en macrophages matures et bloque leur différenciation vers les cellules dendritiques. Ces macrophages ont un profil M2 : ils sont peu cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales, favorisent la prolifération des cellules tumorales, et sont de mauvaises cellules présentatrices d'antigène. Ils produisent beaucoup d'IL-10, et peu d'IL-12. Ce profil d'expression des cytokines induit des cellules T de type Th2, qui produisent de l'IL-4, de l'IL-13, de l'IL-10, ce qui renforce la différenciation vers un phénotype M2 des monocytes (Mantovani, Sozzani et al. 2002). Le déséquilibre dans la distribution des différentes populations de cellules présentatrices d'antigène dans le microenvironnement tumoral contribuerait à un échappement tumoral (Zou 2005).

En outre, SDF-1 et son récepteur CXCR4 sont impliqués dans régulation de la prolifération, la migration et l'invasion des cellules du cancer de l'ovaire.

Une étude *in situ* démontre que la présence de SDF-1 et du CXCR4 contrôle la prolifération et la migration cellulaire par l'activation de la voie ERK1/2 et AKT (Porcile, Bajetto et al. 2005). L'activation de la prolifération par SDF-1 dépend de la transactivation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF). En fait, l'inhibition de la kinase phosphorylant

l'EGF-R (AG1478), bloque à la fois la prolifération cellulaire par SDF-1alpha et l'activation du voie ERK1/2 (Porcile, Bajetto et al. 2004).

*In vivo*, l'inhibition de l'activité du récepteur CXCR4 réduit la diffusion par voie intrapéritonéale de xénogreffes de cancer de l'ovaire. *In vitro*, SDF-1 induit la migration cellulaire et l'invasion des cellules de la tumeur ovarienne (IGROV). Les cellules mésothéliales du péritoine humain (CMPH) expriment la chimiokine SDF-1 ce qui crée un milieu extracellulaire pour la migration des cellules épithéliales de la tumeur de l'ovaire (COE) qui exprime le récepteur CXCR4 vers CMPH (Kajiyama, Shibata et al. 2008). En outre, des expériences de co-culture, en utilisant CMPH et COE, ont montré une forte production de SDF-1, ce qui suggère que certains facteurs tumoraux augmentent l'expression de SDF-1 dans l'ascite. TGFβ1 peut être un de ces facteurs qui augmente la production de SDF-1. L'utilisation de l'antagoniste de CXCR4 (AMD3100) réduit la métastase des cellules du cancer de l'ovaire. L'antagoniste de CXCR4 chez les souris NUDE ayant une xénogreffe du cancer de l'ovaire aboutit à une inhibition de la dissémination des cellules tumorales, ceci suggère le rôle important de SDF-1/CXCR4 dans l'invasion du cancer de l'ovaire (Kajiyama, Shibata et al. 2008). La métastase des cellules tumorales de l'ovaire se fait au niveau des ganglions lymphatiques locaux et dans le péritoine, contrairement aux cellules tumorales du sein qui migrent vers le poumon, le foie et la moelle osseuse.

Dans une condition d'hypoxie, l'expression du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) et l'expression de SDF-1 augmente. Ces deux facteurs vont jouer un rôle important dans l'angiogenèse du cancer de l'ovaire (Kryczek, Lange et al. 2005).

Une étude faite en 2002 par Scotton et al. montre que le taux de SDF-1 dans l'ascite est lié directement au stade avancé de la maladie (Scotton, Wilson et al. 2002).

Tandis que, le rôle du CXCR7 dans la tumeur de l'ovaire n'est pas encore étudié.

Le couple CXCR4/ SDF-1 joue également un rôle dans la tumorigenèse dans des autres variétés de cancers tels que le cancer neuronale et gliale, le cancer colorectal, le cancer du cerveau, le cancer d'œsophage, le cancer du sang, le cancer du rein (Sun, Cheng et al. 2010).

**LA CHIMIOKINE FRACTALKINE  
(FKN)/CX<sub>3</sub>CL1 ET SON RECEPTEUR,  
CX<sub>3</sub>CR1**

## IV. LA CHIMIOKINE FRACTALKINE (FKN)/CX<sub>3</sub>CL1 ET SON RECEPTEUR, CX<sub>3</sub>CR1

### IV.1. GENERALITES A PROPOS DE LA CHIMIOKINE FRACTALKINE (FKN)

#### IV.1.1. Historique et caractéristique de la fractalkine (FKN)

La chimiokine CX<sub>3</sub>CL1, plus communément appelée fractalkine (FKN), a été identifiée chez l'homme par l'équipe de Bazan en 1997 (Bazan, Bacon et al. 1997). La neurotactine, l'homologue murin de la FKN, a été clonée à partir d'une lignée de cellules de plexus choroïde (Pan, Lloyd et al. 1997). La chaîne protéique de la FKN est hautement conservée entre l'humain et la souris (Rossi, Hardiman et al. 1998). La FKN possède les 4 cystéines conservées qui signent son appartenance à la famille des chimiokines. Cependant, les deux premières cystéines sont séparées par 3 AA. Ce motif permet de classer la FKN dans une quatrième sous-famille de chimiokine, les CX<sub>3</sub>C ou  $\delta$  chimiokine dont elle constitue aujourd'hui encore le seul membre. Alors que la séquence peptidique de la plupart des chimiokines ne dépasse que rarement les 100 AA, la FKN se compose de 373 AA qui constituent 4 domaines (Bazan, Bacon et al. 1997) (Figure 23):

- Les 76 premiers acides aminés forment le domaine chimiokine contenant le motif CX<sub>3</sub>C.
  
- Un segment de 241 AA constitué de la répétition de 17 motifs de type mucine, riche en résidus sérine et thréonine, qui est le site potentiel de glycosylation. Cette tige mucine possède une forte homologie avec les protéoglycanes. Cependant, elle ne possède pas de site d'attachement pour des héparanes sulfate. Ce domaine mucine à une longueur de 26nm.
  
- Un segment transmembranaire de 18 AA hydrophobes
  
- Un segment intracellulaire de 37 AA.

Au niveau de leur structure tridimensionnelle, la FKN est formé d'un feuillet  $\beta$  composé de trois brins antiparallèles et une hélice  $\alpha$  en position C-terminale (Figure 24).

La FKN est exprimée sous deux formes: membranaire et soluble. La FKN est la seule chimiokine avec CXCL16 à exister sous forme membranaire (Matloubian, David et al. 2000). La chimiokine est présentée à la surface membranaire par un tronc mucine. Un site de clivage protéolytique extracellulaire à proximité de la membrane (Thr314, Arg315, Arg316, Gln317) permet à la FKN d'être clivée et relarguée sous forme soluble (Bazan, Bacon et al. 1997).

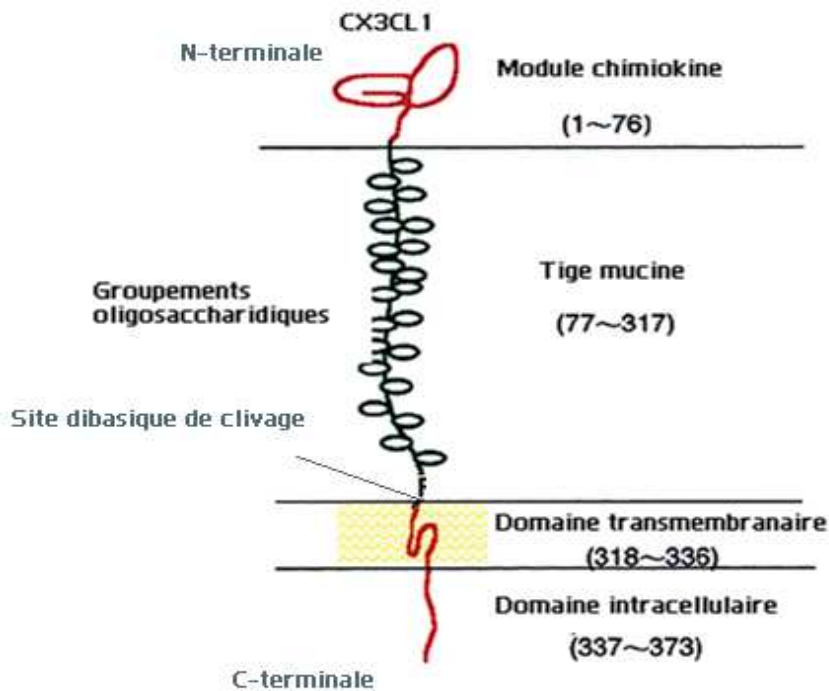


Figure 23 : Structure de la FKN (Umehara and Imai 2001).

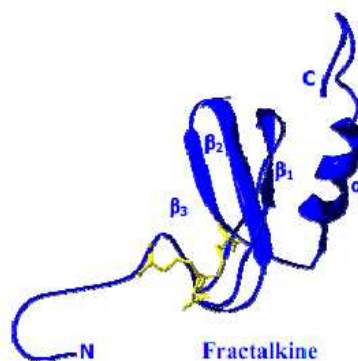


Figure 24 : Structure tridimensionnelle de la FKN



### **IV.1.2. Site de production de la FKN**

La FKN est exprimée au niveau de nombreux organes tels que le cœur, le rein, la peau, les poumons, les testicules, le muscle squelettique, le cerveau, les amygdales et les organes lymphoïdes secondaires (Legler, Loetscher et al. 1998; Nishiyori, Minami et al. 1998). Dans le cerveau, les neurones sont responsables de la production de FKN (Clark, Yip et al. 2009; Marchesi, Locatelli et al. 2010). Dans la peau, outre les cellules endothéliales, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les kératinocytes produisent cette chimiokine (Papadopoulos, Fitzhugh et al. 2000; Sugaya, Nakamura et al. 2003). La FKN est également exprimée par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et par les cellules dendritiques matures (Kikuchi, Andarini et al. 2005; Yang, Mattagajasingh et al. 2007). La FKN est également détectée dans différents types des tumeurs, y compris le neuroblastome, le carcinome hépatocellulaire, le mélanome et la tumeur du colon (Marchesi, Locatelli et al. 2010).

### **IV.1.3. Régulation de l'expression membranaire de la FKN**

La régulation de l'expression de la FKN peut se faire à plusieurs niveaux : celui du clivage de la forme membranaire et celui de la néosynthèse de la FKN (Bazan, Bacon et al. 1997), et elle peut être également régulée par l'endocytose (Huang, Su et al. 2009).

#### ***IV.1.3.a. Régulation d'expression membranaire de la FKN par le clivage enzymatique***

On connaît deux enzymes qui entrent dans le clivage de la FKN membranaire: le premier est le Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme, TNF- $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAMs 17) identifié en 2001 par deux équipes (Garton, Gough et al. 2001; Tsou, Haskell et al. 2001) et le deuxième appartient à la famille des métalloprotéases (ADAM-10) connues pour cliver le TNF  $\alpha$ . Le clivage de la FKN se fait principalement par ADAM10/TACE, tandis que l'augmentation de clivage de FKN dans des conditions inflammatoires est principalement médié par ADAM17 (Ludwig, Hundhausen et al. 2005). En outre, la protéase lysosomale cathepsine S peut induire le clivage de la FKN dans le cas de douleur neuropathique (Clark, Yip et al. 2007). Il a été également montré que le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et le lipopolysaccharide (LPS) augmentent le clivage de la FKN membranaire par l'activation des enzymes de clivage et surtout l'ADAM17. Récemment, il a été découvert que l'ionomycine agissait comme un facteur qui induit rapidement le clivage de la FKN membranaire par l'activation puissante de l'ADAM10 (Hundhausen, Schulte et al. 2007).

Il a été montré que l'hypoxie suivi de la réoxygénation des cellules HUVEC augmente le clivage de la FKN membranaire. Cette augmentation du clivage de la FKN membranaire après une réoxygénation est dû à l'augmentation de l'activation de l'ADAM10 et ADAM17 (Yang, Mattagajasingh et al. 2007).

Une étude récente sur des cellules neuronales corticales du cerveau du rat a montré pour la première fois que la chimiokine SDF-1 augmente la libération de la FKN soluble. L'inhibition d'ADAM17 par l'inhibiteur GM6001 montre que SDF-1 augmente l'expression et l'activité d'ADAM17, ce qui augmente le clivage de la FKN membranaire et sa libération sous forme soluble (Cook, Hippensteel et al. 2010).

Plusieurs inhibiteurs différents des métalloprotéases qui bloquent le clivage ont été identifiés comme le 10 phénanthroline, le GM6001, le GI254023X, GW280264X et le TAP1-2. Une étude récente a montré que le thiol isomérase peut diminuer le mécanisme de clivage par le maintien de l'ADAM17 sous forme inactive (Willems, Tape et al. 2010).

### ***IV.1.3.b. Régulation de la synthèse de la FKN***

L'expression de la FKN augmente généralement en présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , le INF- $\gamma$  (Ludwig, Berkhout et al. 2002). La synthèse de la FKN est régulée dans différents types cellulaires, tels que les cellules endothéliales, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales.

### **Régulation sur les cellules endothéliales**

La FKN est peu exprimée dans les cellules endothéliales (CEs) normales. Tandis que son expression augmente de façon marquée dans CEs activées par les agonistes pro-inflammatoires, tels que le lipopolysaccharide, le TNF- $\alpha$ , le INF- $\gamma$ , et l'interleukine-1 (IL-1) (Imaizumi, Yoshida et al. 2004). TNF- $\alpha$  et IL-1 augmentent l'expression de la FKN par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*), alors que l'INF- $\gamma$  utilise la voie JAK-Stat (Yang, Mattagajasingh et al. 2007). Une étude récente sur les cellules HUVEC montre que la combinaison des deux cytokines proinflammatoires, l'INF $\gamma$  et TNF $\alpha$ , jouent un rôle dans la régulation posttranscriptionnelle de la fractalkine et induisent la stabilité de l'ARNm de la FKN par l'activation de la voie de signalisation P38MAPK-MAPK-activated protein kinase-2 (Matsumiya, Ota et al. 2010).

Yang et al. ont montré que l'hypoxie suivie de la réoxygénation des cellules HUVEC augmente rapidement l'expression de la FKN membranaire. Cette augmentation de l'expression de la FKN après une réoxygénation est liée à l'activation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, qui à son tour régule l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires (Yang, Mattagajasingh et al. 2007).

L'expression de la FKN dans les cellules endothéliales est inhibée par la forme soluble du récepteur de l'IL-6-alpha et la 15-désoxy-Delta (12,14)-prostaglandine J (Imaizumi, Yoshida et al. 2004).

### **Régulation de l'expression sur les cellules dendritiques**

Plusieurs études montrent que la FKN est exprimée sur toutes les cellules dendritiques (CDs) quel que soit le stade de différenciation. Cependant cette expression augmente chez les cellules dendritiques matures (CD83+ ou CMH-II+). L'expression de la FKN par les DCs immatures est augmentée par des cytokines telles que le GM-CSF et le TGF $\beta$  et ou bien par le LPS (Papadopoulos, Fitzhugh et al. 2000; Nukiwa, Andarini et al. 2006).

### **Régulation de l'expression sur les cellules épithéliales**

La forme transmembranaire de la FKN est exprimée principalement par les cellules épithéliales par exemple les cellules épithéliales de la peau, de l'amygdale, du grand intestin (Lucas, Chadwick et al. 2001) et des poumons (Rimaniol, Till et al. 2003). L'INF- $\gamma$  augmente l'expression de la FKN dans les cellules épithéliales bronchiques. L'augmentation de l'expression de la FKN est remarquée chez les patients souffrant d'asthme (Fujimoto, Imaizumi et al. 2001; Rimaniol, Till et al. 2003). En outre, le TNF- $\alpha$  augmente l'expression de la FKN dans les cellules épithéliales des tubules rénaux (Chakravorty, Cockwell et al. 2002).

#### ***IV.1.3.c. Régulation de l'expression membranaire de la FKN par l'endocytose***

Une étude récente montre que l'expression membranaire de la FKN peut également être régulée par l'endocytose. La partie C-terminale de la FKN et l'intervention des deux protéines clathrine et dynamine sont essentielles pour l'endocytose de la FKN, ce qui protège son clivage par les métalloprotéases. Ce mécanisme d'internalisation n'est pas connu chez les autres chimiokines et il permet à la FKN d'être stockée et garde un équilibre entre leur compartiment intracellulaire et membranaire. Le stockage intracellulaire de la FKN est

important, au moment de l'inflammation qui permet une libération rapide de la FKN à la surface membranaire pour jouer un rôle dans l'adhésion des leucocytes (Huang, Su et al. 2009).

## IV.2. LE RECEPTEUR DE LA FKN, CX<sub>3</sub>CR1

### IV.2.1. Historique et caractéristiques

En 1994, Harrison et al. ont caractérisé chez le rat une molécule transmembranaire couplée aux protéines G (RBS11) et possédant les caractéristiques structurales des récepteurs de chimiokines (Harrison, Barber et al. 1994). Une année plus tard, deux groupes distincts identifient chez l'homme une protéine présentant plus de 80% d'homologie avec RBS11 et plus de 40% d'homologie avec les récepteurs aux chimiokines de type CCR, ils nomment cette molécule V28/CMKBRL1 (*chemokine beta receptor like 1*) (Combadiere, Ahuja et al. 1995; Raport, Schweickart et al. 1995). Ce récepteur est resté orphelin durant deux années jusqu'à ce que l'équipe de F. Bazan, cherchant à identifier de nouveaux membres de la famille des C chimiokines, découvre l'existence de la FKN (Bazan, Bacon et al. 1997). CX<sub>3</sub>CR1 est constitué de 355 AA. Deux isoformes fonctionnelles de CX<sub>3</sub>CR1 ont été découvertes et sont obtenues après l'épissage alternatif du gène. Ces isoformes diffèrent par leur partie N-terminale plus ou moins longue. Le récepteur CX<sub>3</sub>CR1 et ses deux nouvelles isoformes montrent la même activité en ce qui concerne la liaison à la FKN (Garton, Gough et al. 2001).

Les études biochimiques d'interaction de CX<sub>3</sub>CR1 à son ligand ont montré que la FKN se lie de façon spécifique avec une très forte affinité. Son domaine N-terminal contient plusieurs sites de sulfatations (Fong, Alam et al. 2002), par exemple la sulfatation de la tyrosine 14 augmente les capacités de capture et d'adhésion de CX<sub>3</sub>CR1. L'équipe de Harrison a montré que les AA K7 et R47 sont essentiels dans la liaison CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 (Harrison, Fong et al. 2001). Des mutations de ces résidus diminuent de 30 à 60 fois l'affinité pour CX<sub>3</sub>CR1 et empêchent l'arrêt de cellules CX<sub>3</sub>CR1+ dans des expériences d'adhésion sous flux.

CX<sub>3</sub>CR1 a longtemps été considéré comme le seul récepteur de la FKN. Toutefois une étude récente montre que la chimiokine Eotaxin/CCL26 peut être un autre ligand du récepteur CX<sub>3</sub>CR1. La CCL26 est un ligand pour le récepteur CCR3. Dans les maladies allergiques CCL26 peut jouer un double rôle en attirant les éosinophiles via CCR3 et les lymphocytes, les monocytes et les NK via CX<sub>3</sub>CR1 (Nakayama, Watanabe et al. 2010).

#### **IV.2.2. Site de production du récepteur CX<sub>3</sub>CR1**

L'ARN messager de CX<sub>3</sub>CR1 est retrouvé dans plusieurs organes tels que le cerveau et les poumons, et il est exprimé à des niveaux très élevés dans les leucocytes et plus spécialement au niveau des neutrophiles, des cellules NK, des monocytes et des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Combadiere, Ahuja et al. 1995; Imai, Hieshima et al. 1997; Foussat, Coulomb-L'Hermine et al. 2000). CX<sub>3</sub>CR1 est exprimé dans les mastocytes (Papadopoulos, Fitzhugh et al. 2000). Deux équipes ont montré que CX<sub>3</sub>CR1 est exprimé à la surface des cellules dendritiques matures ou immatures (Jung, Aliberti et al. 2000; Dichmann, Herouy et al. 2001). CX<sub>3</sub>CR1 est également exprimé par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les microgliales dans la moelle épinière, les cellules satellites des ganglions de la racine dorsale et par les cellules neuronales (Verge, Milligan et al. 2004; Janowski 2009). CX<sub>3</sub>CR1 a été détecté dans différents types de cancer, y compris le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du pancréas (Marchesi, Locatelli et al. 2010).

#### **IV.2.3. Régulation d'expression du CX<sub>3</sub>CR1**

L'expression du récepteur CX<sub>3</sub>CR1 augmente dans les cellules monocytaire (THP1) activé par la cytokine pro-inflammatoire INF- $\gamma$ , tandis que l'expression du CX<sub>3</sub>CR1 ne varie pas avec la stimulation par TNF- $\alpha$  (Apostolakis, Krambovitis et al. 2007).

Dans les cellules gliales (BV2), le lipopolysaccharide (LPS) diminue l'expression transcriptionnelle et protéique du CX<sub>3</sub>CR1 (Wynne, Henry et al. 2010). Tandis que, que le TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) et la cytokine anti-inflammatoire IL-10 augmentent l'expression du CX<sub>3</sub>CR1 (mRNA et protéine) (Chen, Luo et al. 2002; Kremlev and Palmer 2005; Wynne, Henry et al. 2010). En outre, TGF $\beta$  et IL-10 diminue l'activité du LPS (Kremlev and Palmer 2005; Wynne, Henry et al. 2010).

L'hypoxie augmente l'expression du CX<sub>3</sub>CR1 (mRNA et protéine) dans les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse (Hung, Pochampally et al. 2007).

### IV.3. SIGNALISATION ET FONCTIONS INDUITES PAR LA FKN

La signalisation induite par la FKN sur CX<sub>3</sub>CR1 engendre une multiplicité de signaux, variant selon la forme de la FKN et selon leur activité biologique (Figure 25) (White and Greaves 2009).

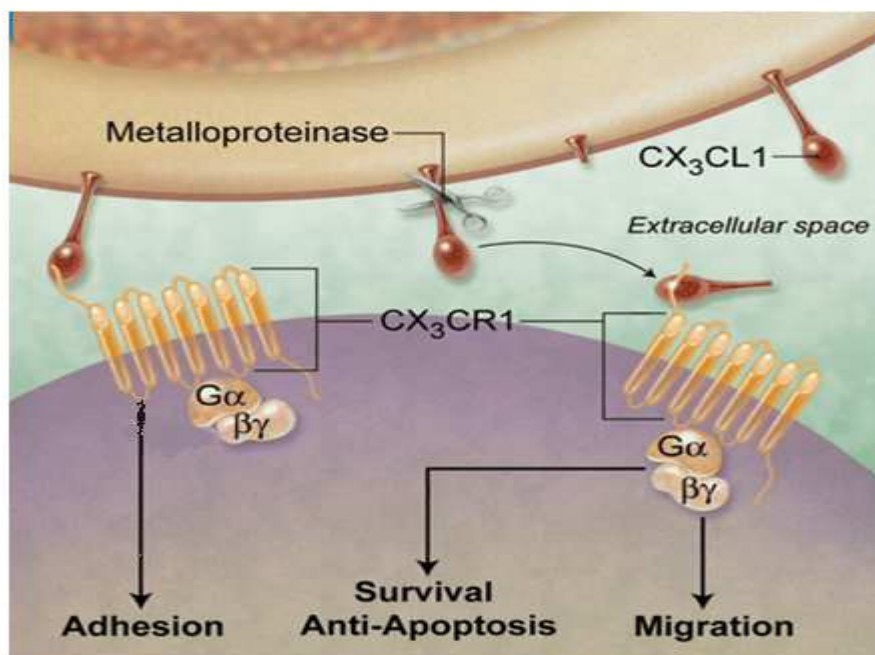


Figure 25 : Fonction de la forme soluble et membranaire de la FKN

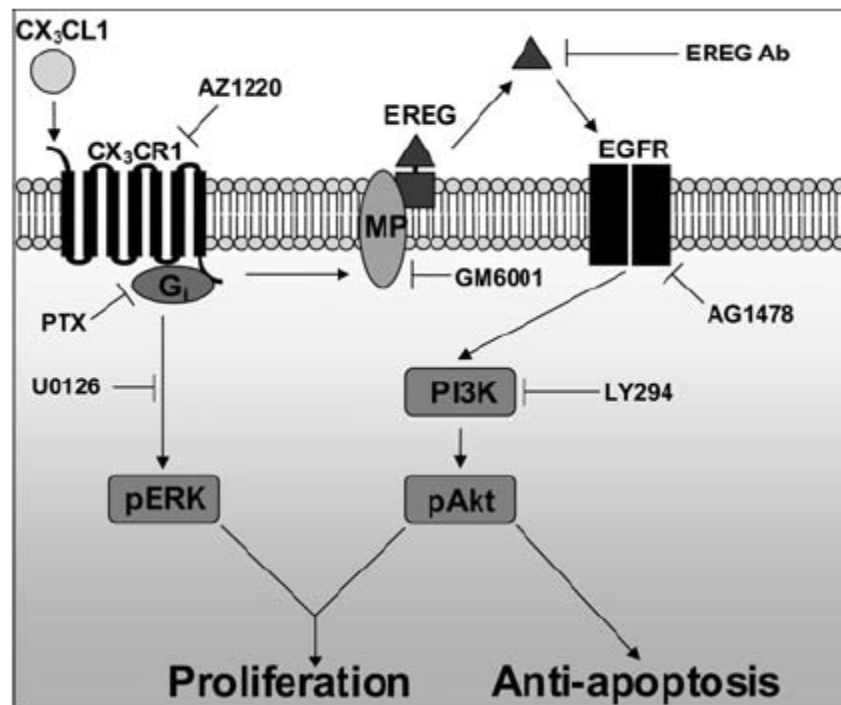
(White and Greaves 2009).

Sous sa forme soluble, la FKN a une puissante activité **chimiotactique** qui permet le recrutement des cellules exprimant le récepteur CX<sub>3</sub>CR1 aux sites d'inflammation par l'activation de différentes voies de signalisations p38 MAPK, JNK, ERK1/2 et AKT (Klosowska, Volin et al. 2009). De plus, la FKN soluble peut encore elle-même augmenter le pouvoir d'adhésion des leucocytes par l'augmentation de l'expression de l'ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) en activant le voie de signalisation JAK-STAT5 (Yang, Mattagajasingh et al. 2007). La FKN soluble peut aussi induire l'**adhésion** des monocytes à la fibronectine par l'activation des voies de signalisations SAPKs, ERKs et PI3Ks (Cambien, Pomeranz et al. 2001) et elle peut aussi induire l'adhésion des monocytes à l'ICAM-1 par l'intervention des voies de signalisation JAK et STAT5 (Yang, Mattagajasingh et al. 2007).

Chez le rat, Perros et al., ont montré que la FKN soluble augmente la **prolifération** des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire (PASMC) (Perros, Dorfmueller et al. 2007). Une étude récente, montre le rôle **prolifératif** et **anti-apoptotique** de la FKN dans les cellules musculaires lisses humaines de l'artère coronaire (HCASMC), ces deux effets sont médiés par les signalisations cellulaires induites par le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (White, Tan et al. 2010). L'effet prolifératif de la FKN dépend de l'activation de voies pERK et ou de l'activation la voie PI3K via l'activation de EGFR. Tandis que l'effet anti-apoptotique de la FKN dépend seulement de la voie de signalisation PI3K qui est activé par l'EGFR (Figure 26) (White, Tan et al. 2010). Plusieurs études, ont montré que les fonctions induites par la FKN soluble citées ci-dessus dépendent des signaux couplés à l'activation des protéines G d'où la libération du  $Ca^{++}$  intracellulaire. Le chimiotactisme, l'adhésion cellulaire, la prolifération et l'effet anti-tumoral induits par la FKN soluble sont inhibés ou réduits par la toxine Pertussis PTX, qui est un inhibiteur de la protéine G (Yang, Mattagajasingh et al. 2007; Klosowska, Volin et al. 2009; White, Tan et al. 2010).

Sous sa forme membranaire la FKN est une molécule **d'adhésion** qui favorise la rétention des monocytes et des lymphocytes T dans les tissus (Imai, Hieshima et al. 1997; Fong, Robinson et al. 1998; Combadiere, Potteaux et al. 2003; Lesnik, Haskell et al. 2003; Schwarz, Pruessmeyer et al. 2010). Cette adhésion s'effectue par une interaction de forte affinité entre le module chimiokine de la FKN et CX<sub>3</sub>CR1. La tige mucine n'interagit pas directement avec le récepteur mais paraît essentielle pour la fonction d'adhésion. En outre, l'adhésion médiée par la FKN est indépendante de la signalisation par les protéines G et ne passe pas par l'activation des intégrines leucocytaires. En effet, cette fonction est préservée lorsque le motif DRY de couplage aux protéines G de CX<sub>3</sub>CR1 est muté (Haskell, Cleary et al. 1999; Schwarz, Pruessmeyer et al. 2010) et en présence d'anticorps d'intégrines (Fong, Robinson et al. 1998; Haskell, Cleary et al. 1999). Puisque l'on sait que les sélectines interagissent avec un domaine mucine porté par leurs ligands (MadCAM, GlyCAM), la FKN possédant un tel domaine pourrait interagir non seulement avec son récepteur, mais aussi avec les molécules de la famille des sélectines participant activement à l'étape de roulement (Haskell, Cleary et al. 1999). Deux études récentes, ont montré que la FKN membranaire peut jouer encore un rôle dans le **recrutement** leucocytaires (Andrzejewski, Koelsch et al. 2010; Schwarz, Pruessmeyer et al. 2010). La première étude montre que le recrutement des leucocytes par la

FKN membranaire humaine est médié par le domaine DRY et C-terminal du récepteur CX<sub>3</sub>CR1. En outre, le recrutement des leucocytes est augmenté sous l'activité d'ADAM10 (Schwarz, Pruessmeyer et al. 2010). La deuxième étude montre que la partie extracellulaire de la FKN est responsable du recrutement cellulaire indépendamment de la partie C-terminal (Andrzejewski, Koelsch et al. 2010).

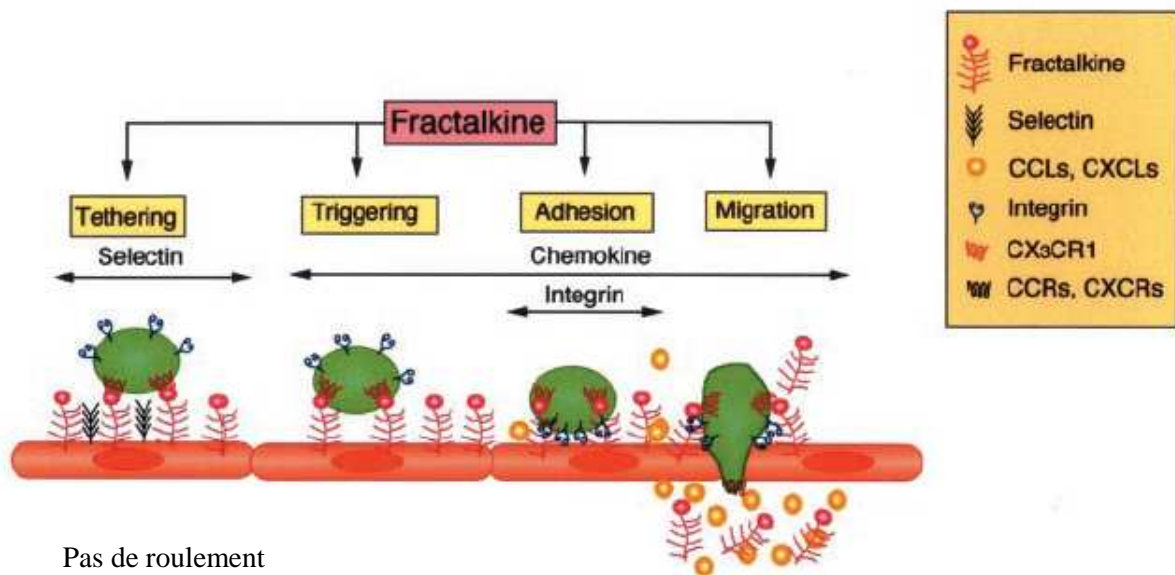


**Figure 26 : les voies de signalisations cellulaires de la FKN impliqués dans la prolifération et l'anti-apoptose des cellules musculaires lisses humaines de l'artère coronaire (HCASMC)** Abbreviations: AZ1220/AZ12201182 (inhibiteur de CX<sub>3</sub>CR1), PTX=pertussis toxin (inhibiteur du protein G), U01226 (inhibiteur de MEK), MP=metalloproteinase, EREG= epiregulin, EGFR= epidermal growth factor receptor, EGFR Ab= EGFR anticorps, AG1478 (inhibiteur de EGFR), LY294=LY294,002 (inhibiteur de PI3K) (White, Tan et al. 2010).

Les deux groupes Fong et al., 1998 et Haskell et al., 1999, ont décrit les caractéristiques de l'adhésion médiée par la FKN membranaire (Fong, Robinson et al. 1998; Haskell, Cleary et al. 1999) (Figure 27):



- L'étape de roulement, nécessaire à l'adhésion des leucocytes aux intégrines n'est plus requise en présence de FKN
- La capture des leucocytes est très rapide <60 millisecondes
- Stable dans le temps >10 minutes
- Stable au niveau des vaisseaux soumis à une forte pression sanguine comme c'est le cas dans les vaisseaux des glomérules du rein, dans les artères pulmonaires et dans les artères coronaires. Dans le cas d'inflammation au niveau de ces sites, la pression sanguine ne permettant pas le recrutement cellulaire via les interactions de faibles affinités entre les sélectines ou les intégrines avec leurs ligands, seule la FKN serait capable de médier une adhésion des leucocytes rapide et stable (Feng et al., 1999).



Pas de roulement

Capture rapide < 60 msec

Stable dans le temps > 10 minute

**Figure 27 : L'adhésion cellulaire des leucocytes par la fractalkine membranaire**

(Umehara, Bloom et al. 2004).

### **IV.4. L'EFFET DE L'INVALIDATION DES GENES CODANT POUR LA FKN ET POUR LE RECEPTEUR CX<sub>3</sub>CR1**

Les souris invalidées pour le gène codant pour la FKN et/ou pour CX<sub>3</sub>CR1, montrent un rôle important du couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 dans des différentes maladies inflammatoires (Umehara, Bloom et al. 2004).

L'inactivation du gène codant pour le récepteur CX<sub>3</sub>CR1 et pour la FKN suggère une implication importante de ce couple dans l'athérosclérose. En effet, l'invalidation de ces gènes entraîne une réduction de la lésion athérosclérotique par la diminution du recrutement des monocytes et des cellules dendritiques (Combadiere, Potteaux et al. 2003; Lesnik, Haskell et al. 2003; Liu, Yu et al. 2008; Saederup, Chan et al. 2008).

Le récepteur CX<sub>3</sub>CR1 est aussi impliqué dans les rejets de greffes cardiaques. L'absence de CX<sub>3</sub>CR1 diminue l'infiltration des cellules dendritiques et des leucocytes, essentiellement les cellules NK et les macrophages sur le site de la greffe et augmente le temps de survie du greffon (Haskell, Hancock et al. 2001; Ueno, Tanaka et al. 2009).

Les souris déficientes pour le gène CX<sub>3</sub>CR1 présente une perturbation de l'activité des cellules gliales. Cette perturbation est le résultat des sécrétions de molécules neurotoxiques par les cellules gliales. Cette étude montre que la FKN a un rôle neuroprotecteur dans différentes maladies neuronales par la réduction de sécrétion neurotoxique (Cardona, Pioro et al. 2006).

Dans certains types de tumeurs, CX<sub>3</sub>CR1 peut jouer rôle anti-tumoral. Les souris déficientes pour le gène CX<sub>3</sub>CR1 favorisent le développement du cancer du poumon par la réduction de recrutement des monocytes et des cellules NK aux sites tumoraux (Yu, Fong et al. 2007).

### **IV.5. ROLES DU COUPLE FKN/CX<sub>3</sub>CR1 DANS CERTAINES PATHOLOGIES**

La FKN et son récepteur CX<sub>3</sub>CR1 sont impliqués dans la pathogenèse des différentes maladies inflammatoires (D'Haese, Demir et al. 2010). Ainsi, la fractalkine favorise la migration des lymphocytes T et des monocytes vers les tissus inflammés (Klosowska, Volin et al. 2009; Andrzejewski, Koelsch et al. 2010) dans le cas de certaines maladies auto-immunes (maladie de Crohn, polyarthrite rhumatoïde) (Niess, Brand et al. 2005; Blaschke and Muller 2008), à l'athérosclérose (Combadiere, Potteaux et al. 2003), à l'insuffisance rénale (Durkan, Alexander et al. 2007) aux allergies (l'asthme) (Bisset and Schmid-Grendelmeier

2005) ou à l'hypertension pulmonaire (Balabanian, Foussat et al. 2002). Le récepteur CX<sub>3</sub>CR1 est considéré comme un co-récepteur d'entrées pour certaines souches du VIH (Combadiere, Salzwedel et al. 1998; Becker 2007). Plusieurs études ont montré le rôle important de la FKN dans les différents types de cancer, comme le cancer du pancréas, du sein et de la prostate (D'Haese, Demir et al. 2010).

### **IV.6. LE ROLE DU COUPLE FKN/CX<sub>3</sub>CR1 DANS LA TUMORIGENESE**

La FKN a des effets paradoxaux dans les tumeurs. Elle peut jouer deux rôles différents: un rôle anti-tumoral dans certains types de tumeurs et un rôle pro-tumoral dans d'autres types de tumeurs (D'Haese et al. 2010).

#### **IV.6.1. La FKN et les effets anti-tumoraux**

La FKN renforce l'effet anti-tumoral par deux mécanismes immunitaires: le recrutement des cellules NK (immunité innée) et le recrutement des lymphocytes T (immunité adaptative). Ainsi, la présence d'une concentration locale élevée de la FKN semble avoir un effet protecteur contre la croissance tumorale dans certaines tumeur (tumeur du poumon, tumeur du colon, neuroblastome...) (Marchesi, Locatelli et al. 2010).

L'injection sous cutanée dans des souris de cellules murines du **cancer du poumon (3LL) ou du lymphome (EL4)** transfectées par la plasmide-FKN induisent une réponse anti-tumorale importante. Cette réponse est consécutive à un fort effet chimioattractant pour les cellules NK aux sites tumoraux (Guo, Chen et al. 2003; Lavergne, Combadiere et al. 2003). Une étude à été faite sur des souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 (CX<sub>3</sub>CR1<sup>-/-</sup>) injectées par des cellules du mélanome B16-F10 dans la veine de la queue. Les résultats montrent que ces cellules tumorales métastasent vers le poumon. Le cancer du poumon est plus développé chez les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 à cause de la réduction du recrutement des monocytes et des cellules NK aux sites tumoraux (Figure 28) (Yu, Fong et al. 2007). Chez les souris, l'injection intra-tumorale par un vecteur adénoviral contenant l'ADNc de la FKN murine (AdFKN) ou par les cellules dendritiques avec une surexpression de FKN (cellules dendritiques transfectées par AdFKN), ont été capables de supprimer la croissance tumorale des cellules cancéreuses **du colon et du mélanome**. Cet effet anti-tumoral est expliqué par l'augmentation du recrutement des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> aux sites tumoraux (Xin, Kikuchi et al. 2005; Nukiwa, Andarini et al. 2006).

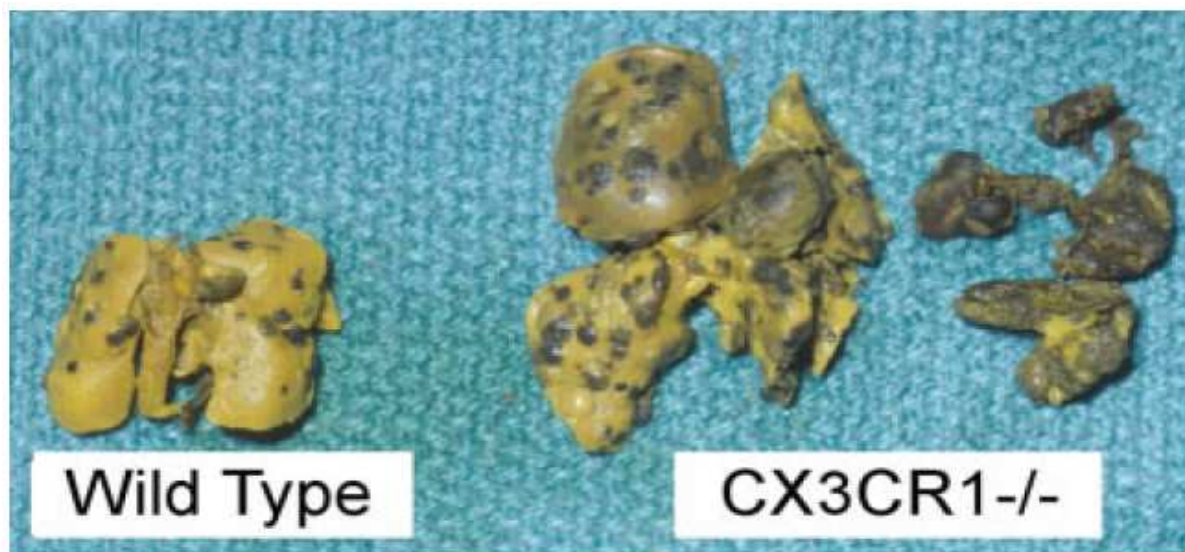


Figure 28 : la tumeur du poumon chez les souris déficientes en CX3CR1 (CX3CR1<sup>-/-</sup>)

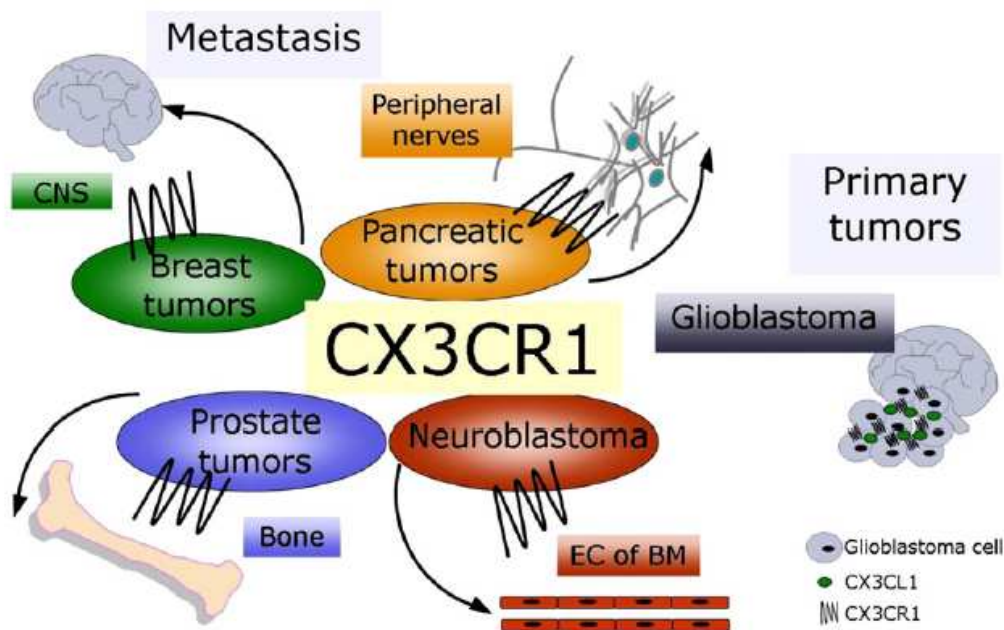
(Yu, Fong et al. 2007).

Chez les patients atteints de **carcinome hépatocellulaire**, une expression élevée de la FKN et de son récepteur CX<sub>3</sub>CR1 est associée à moins de récurrences hépatiques et à un meilleur pronostic (Matsubara, Ono et al. 2007). En outre, la transfection de lignée MM45T.Li (cellule murine de cancer hépatocellulaire) avec le vecteur d'expression de la FKN conduit à la suppression de la croissance tumorale grâce à une réponse spécifique de la tumeur aux cellules T (les cellules T CD4, et CD8). Au vu de ces observations, la FKN pourrait être une cible de la thérapie génique dans l'immunoprévention du cancer (Tang, Hu et al. 2007).

La FKN et son récepteur CX<sub>3</sub>CR1 sont exprimés par plusieurs lignées cellulaires de **neuroblastome**. L'expérience sur la souris, montre l'effet anti-tumoral de la FKN par la diminution de la croissance et de la métastase de la tumeur. Dans cette étude, l'effet anti-tumoral de la FKN a été amplifié en ciblant IL-2 (Zeng, Jiang et al. 2005).

#### IV.6.2. La FKN et les effets pro-tumoraux

Dans certaines tumeurs, la FKN est associée à un plus grand potentiel métastatique, à l'angiogenèse et à un risque de récurrence. Les effets pro-tumoraux de la FKN seraient la conséquence de l'adhésion et de la migration des cellules cancéreuses (exprimant le récepteur CX<sub>3</sub>CR1) vers les organes qui produisent de la FKN soluble (la moelle osseuse, le cerveau...). L'effet pro-tumoral de la FKN a été étudié dans différents types de tumeurs (tumeur du sein, tumeur de la prostate...) (Figure 29) (D'Haese, Demir et al. 2010; Marchesi, Locatelli et al. 2010).

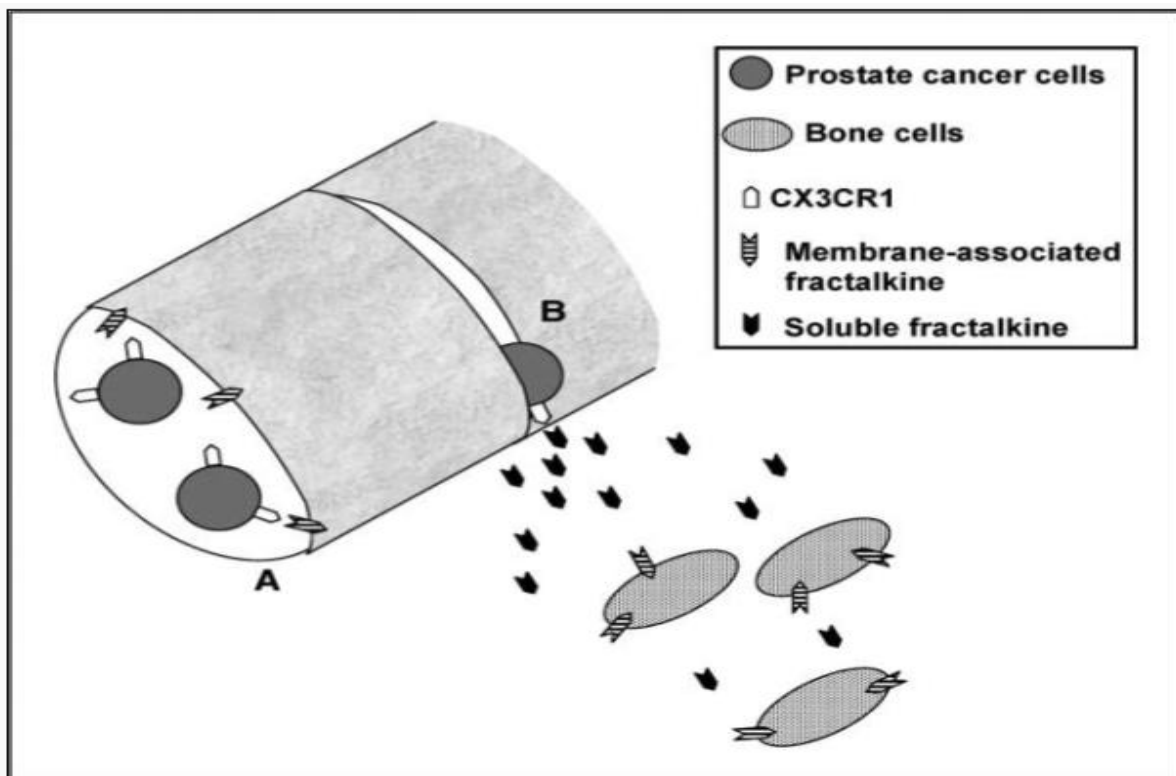


**Figure 29 : Les différentes tumeurs expriment le récepteur CX<sub>3</sub>CR1, ainsi que les organes ou les tissus qui sont le site de localisation secondaire de la tumeur**

(Marchesi, Locatelli et al. 2010).

Shulby et al., ont mis en évidence pour la première fois l'expression du récepteur CX<sub>3</sub>CR1 par les cellules humaines de **cancer de la prostate**, alors que la FKN est exprimée par les cellules endothéliales de la moelle osseuse et les ostéoblastes différenciés. La FKN semble être impliquée dans l'adhésion des cellules cancéreuses de la prostate aux cellules endothéliales de la moelle osseuse. Cette étude montre que les cellules PC3-ML (cellules de

cancer de la prostate) vont migrer vers les ostéoblastes qui produisent de la FKN soluble (Figure 30). La FKN favorise la survie des cellules cancéreuses de la prostate via PI3K/AKT (Shulby, Dolloff et al. 2004). Une étude récente montre que l'expression du CX<sub>3</sub>CR1 augmente dans le cancer de la prostate ce qui favorise leur adhésion et leur migration vers les cellules endothéliales de la moelle osseuse *in vivo* et *in vitro* (Jamieson, Shimizu et al. 2008). En outre, cette étude montre que l'androgène (dihydrotestostérone) favorise la stimulation des métalloprotéases qui à leur tour augmentent la libération de la FKN soluble par les cellules de la moelle osseuse. Par conséquent, l'inhibition du récepteur d'androgène réduit le clivage de la FKN et les métastases des cellules cancéreuses de la prostate vers la moelle osseuse (Jamieson, Shimizu et al. 2008). Une étude récente a montré que la récurrence tumorale du cancer de la prostate est associée à une expression importante de la FKN membranaire. Ce qui suggère que la FKN augmente la récurrence tumorale du cancer de la prostate, à l'inverse de son rôle au niveau du carcinome hépatocellulaire expliqué ci-dessus (Blum, Koyama et al. 2008).



**Figure 30 : La migration des cellules cancéreuses de la prostate exprimant le récepteur CX<sub>3</sub>CR1 vers les ostéoblastes qui produisent de la FKN soluble**

(Jamieson, Shimizu et al. 2008).

Une étude récente montre l'expression de la FKN membranaire et son récepteur CX<sub>3</sub>CR1 dans des échantillons de **gliome** humain. L'expression de la FKN dans cette tumeur est positivement corrélée avec les stades avancés de la tumeur, tandis qu'elle est inversement corrélée avec la survie des patients (Erreni, Solinas et al. 2010).

Une autre étude chez l'humain, montre que la FKN soluble favorise les métastases osseuses du **neuroblastome** par l'activation de la voie ERK1/2 et AKT. Les cellules du neuroblastome expriment le récepteur CX<sub>3</sub>CR1, ce qui joue un rôle important dans la migration de ces cellules vers l'endothélium de la moelle osseuse qui produit de la FKN (Nevo, Sagi-Assif et al. 2009).

Chez les patientes atteintes du **cancer du sein**, il a été prouvé que l'expression du CX<sub>3</sub>CR1 joue un rôle important dans les métastases des cellules cancéreuses du sein vers le cerveau (Andre, Cabioglu et al. 2006). Dans la lignée du cancer du sein MCF-7, la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  augmente l'expression du récepteur CX<sub>3</sub>CR1, ce qui favorise la migration des cellules MCF-7 vers les organes qui produisent de la FKN, surtout le cerveau. Ainsi, la neutralisation du récepteur CX<sub>3</sub>CR1 par des anticorps spécifiques, diminue la migration des cellules MCF-7 (Valdivia-Silva, Franco-Barraza et al. 2009).

La FKN recombinante favorise la migration et l'adhésion des cellules humaines **d'adénocarcinomes pancréatiques** (ADCP) par l'activation de la protéine G et de l'intégrine  $\beta$ . *In vivo*, chez la souris, les cellules de l'ADCP qui surexpriment le récepteur CX<sub>3</sub>CR1 vont infiltrer les sites des nerfs périphériques qui produisent de la FKN. Chez les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique, une expression élevée du CX<sub>3</sub>CR1 est associée à une récurrence tumorale plus rapide et à une infiltration péri-neurale de l'ADCP (Marchesi, Piemonti et al. 2008).

La FKN peut également jouer un rôle dans l'angiogenèse et la carcinogenèse du **carcinome hépatocellulaire**. L'inhibition de l'expression de la FKN dans la lignée de carcinome hépatocellulaire (HepG2) par des siRNA supprime la migration, la prolifération et la différenciation des cellules HUVEC (Li, Wang et al. 2010).

La FKN membranaire peut également jouer un rôle dans l'angiogenèse du **mélanome**. Les cellules du mélanome B16-F0 expriment largement la FKN membranaire. Chez la souris, l'inhibition de l'expression de la FKN par des siRNA est à l'origine d'une réduction de la croissance tumorale, qui est corrélée à la diminution de l'angiogenèse des tumeurs (Ren, Chen et al. 2007).



**LE GLUCOCORTICOID-INDUCED  
LEUCINE ZIPPER (GILZ)**

## V. LE GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER (GILZ)

### V.1. CARACTERISTIQUES GENETIQUES ET PROPRIETES BIOCHIMIQUES

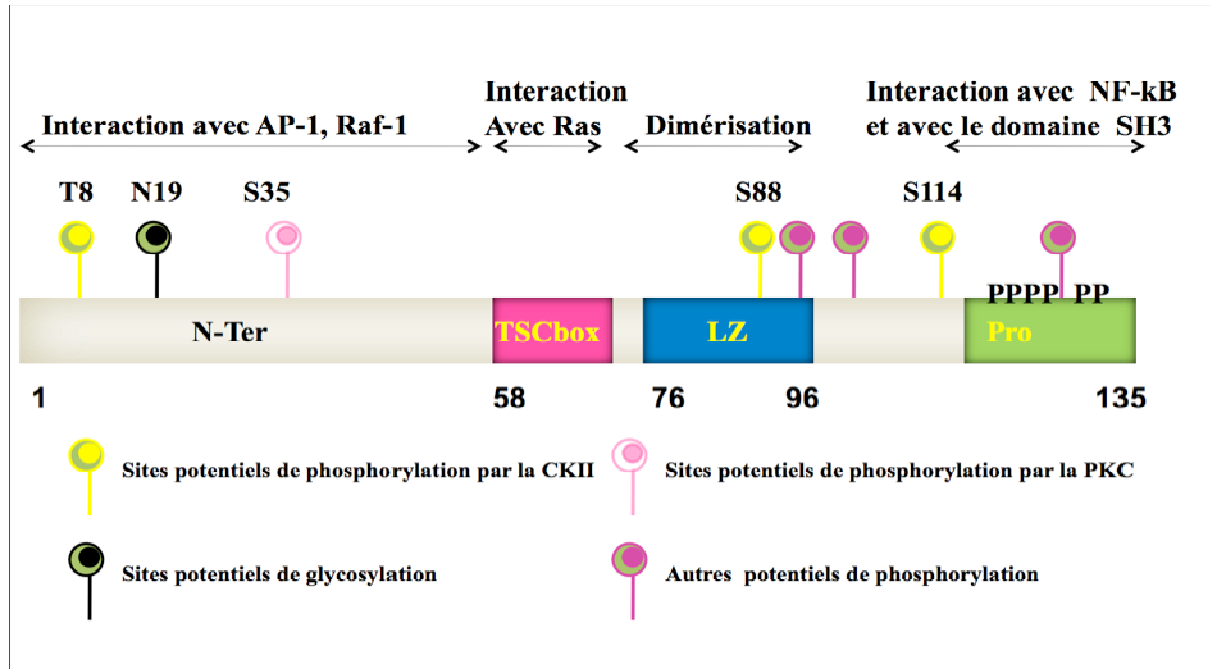
Le Glucocorticoid-induced Leucine Zipper est une protéine intracellulaire de 137 AA chez les souris (mGILZ) et de 135 AA chez l'humain (hGILZ), et d'environ 17 KDa. Le gène mGILZ a été isolé en 1997 par analyse soustractive d'ARNm messagers (ARNm) de thymocytes murins traités ou non par le dexaméthasone (DEX), un glucocorticoïde (GC) synthétique (D'Adamio, Zollo et al. 1997). La séquence du gène humaine a été publiée en 2001 (Cannarile, Zollo et al. 2001). Une homologie de 89% avec l'ARNm de *gilz* murin a été trouvée, soit 97% d'homologie dans la région codante. Le gène est organisé en 3 exons positionnés dans le locus q22.2 du chromosome X.

D'un point de vue structural, GILZ possède un domaine « **leucine zipper (LZ)** » situé entre les leucines 76 et 96. Il s'agit d'un motif structural d'interaction protéique et d'interaction directe avec l'ADN, consistant en une hélice alpha amphipathique. Cette hélice, qui contient des leucines répétées régulièrement (tous les 7 résidus), est capable d'interagir fortement avec la même hélice d'un autre monomère, forment ainsi une glissière. Il a été montré expérimentalement que GILZ formait des homodimères (Mittelstadt and Ashwell 2001).

La protéine GILZ appartient à la famille TSC (TGF $\beta$  stimulated clone) des protéines zipper. GILZ est appelé également Transforming Growth Factor- $\beta$ -1 stimulated clone 22 Domaine (TSC-22D3) car il présente une grande homologie avec les membres de la famille des protéines TSC-22D (TSC-22, TSC-22 homologous gene-1 ou THG-1, delta sleep inducing peptide immunoreactive peptide ou DIP, KIAA0669, shortsighted ou shc, et le Drosophila-bunched gene), par le motif structural appelé « **TSC box (Tuberous Sclerosis Complex box)** », et en particulier par son domaine leucine zipper, et avec lesquels il pourrait s'hétérodimeriser avec les autres membres de la famille des protéines leucine zipper (Ayroldi and Riccardi 2009).

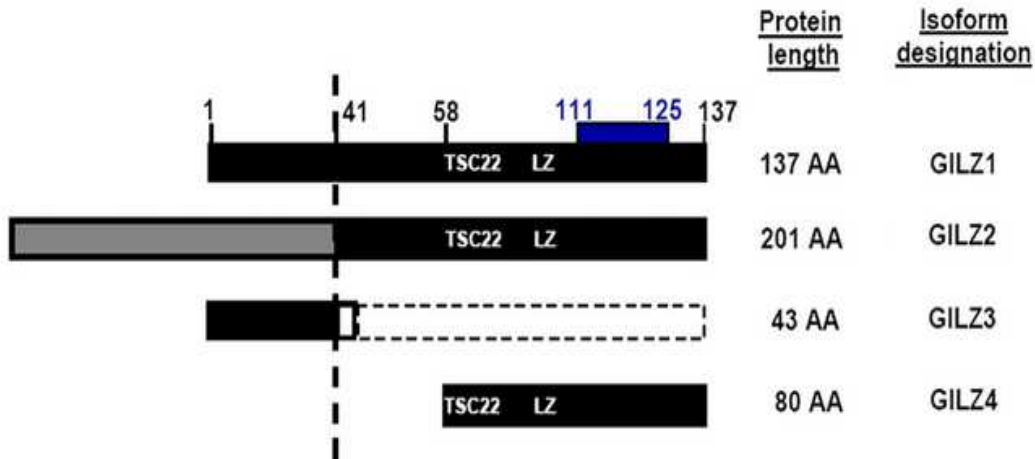
GILZ est caractérisé par une région **riche en résidus proline** en position C-terminale qui interagirait avec des protéines à domaines SH3 (Src Homology domain) et avec NF-kB. Des sites consensus potentiels de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) (Thr 8, Ser 88,

Ser 114), par la PKC (protéine Kinase C) (Ser 35), ainsi qu'un site consensus de glycosylation (Asparagine 19) ont été décrits (Figure 31) (Cannarile, Zollo et al. 2001).



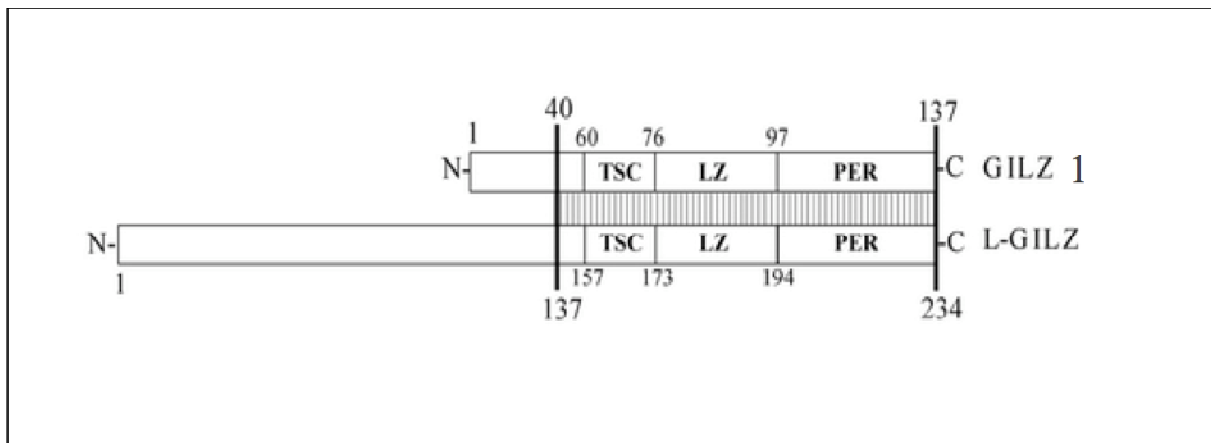
**Figure 31 : Structure de la protéine GILZ humaine.**

Soundararajan et al. ont caractérisé trois nouveaux isoformes de GILZ. Ces isoformes sont produits des épissages alternatifs de gène GILZ murin, et appelée selon l'ordre de leur découverte GILZ1 à 4. GILZ1 correspond variant original de 137 AA rapporté par D'Adamio et collaborateurs en 1997 (D'Adamio, Zollo et al. 1997). Les autres variants GILZ2, GILZ3 et GILZ4 ont, respectivement, une séquence protéique de 201 AA, 43 AA et 80 AA (Figure 32) (Soundararajan, Wang et al. 2007).



**Figure 32 : Structure des 4 isoformes de GILZ** (Soundararajan, Wang et al. 2007).

Une étude récente a caractérisé une nouvelle isoforme murin de GILZ, appelé Long-Gilz (L-GILZ). L-GILZ est une protéine de 234 AA avec un poids moléculaire de 28 KDa. GILZ1 et L-GILZ diffèrent par leur partie N-terminale (Figure 33) (Bruscoli, Donato et al. 2010).



**Figure 33 : Structure de isoforme L-GILZ** (Bruscoli, Donato et al. 2010).

### V.2. SITES DE PRODUCTION DE GILZ ET REGULATION DE SON EXPRESSION

GILZ s'exprime de manière constitutive dans de nombreux tissus murins et humains (Ayroldi and Riccardi 2009). Dans les cellules hématopoïétiques, GILZ est exprimé dans la moelle osseuse, les cellules souches CD34+, les lymphocytes B et T, les monocytes et les granulocytes (Cannarile, Zollo et al. 2001).

GILZ est également exprimé de manière induite : son expression est rapidement augmentée par les glucocorticoïdes (GCs) dans les thymocytes et les lymphocytes T murins (Riccardi, Cifone et al. 1999), dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (Eddleston, Herschbach et al. 2007) et dans les cellules souches mésenchymateuses (Shi, Shi et al. 2003). De plus, GILZ est induit par les GCs et l'interleukine 10 (IL-10) dans les mastocytes humains (Godot, Garcia et al. 2006), par les GCs et l'interleukine 15 (IL-15) dans les NK (Perez, Mahaira et al. 2005), par les GCs, l'érythropoïétin (Epo), et par SCF (*stem cell factor*) dans les progéniteurs érythroïdes primaires (Kolbus, Blazquez-Domingo et al. 2003), par les GCs, l'IL-10 et TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) dans les cellules dendritiques humaines (Cohen, Mouly et al. 2006). Récemment, il a été montré que GILZ était induit par les GCs dans les cellules embryonnaires de l'hypophyse de poulet, et qu'il régulait l'expression de certaines hormones hypophysaires (Ellestad, Malkiewicz et al. 2009). En 2010, Bruscoli et al. ont montré que l'expression de GILZ et de L-GILZ sont augmentées par les GCs dans la lignée cellulaire musculaire C2C12 (Bruscoli, Donato et al. 2010).

Bien que l'augmentation de l'expression du GILZ soit le plus souvent régulée par les GCs, plusieurs études ont rapporté une augmentation d'expression du GILZ en absence de GCs. GILZ est induit par déprivation en IL-2 dans les lymphocytes T (Asselin-Labat, David et al. 2004), par les minéralocorticoïdes dans les cellules épithéliales rénales (Cannarile, Fallarino et al. 2006), par IL-10 dans les macrophages murins (Berrebi, Bruscoli et al. 2003) et dans les cellules endothéliales humaines (Gleissner, Zastrow et al. 2007). La vasopressine et l'aldostérone (AL) stimulent son expression dans les cellules épithéliales isolées de reins de mammifères (Soundararajan, Zhang et al. 2005). Une augmentation de l'expression de GILZ en réponse aux œstrogènes a été rapportée dans les lignées cellulaires humaines de cancer du col de l'utérus Hela, dans les cellules tumorales cervicales et dans les cellules embryonnaires humaines de rein (Tynan, Lundeen et al. 2004).

Par ailleurs, l'expression de GILZ est diminuée dans les lymphocytes T activés par un anti-CD3 (Ayroldi, Migliorati et al. 2001) et dans les cellules épithéliales bronchiques humaines par les cytokines inflammatoires, IL-1, TNF- $\alpha$  et INF- $\gamma$  (Eddleston, Herschbach et al. 2007). Dans une étude récente, il a été montré que l'inhibition de la voie PI3K/AKT, par un inhibiteur pharmacologique, dans une lignée de cellules de myélome multiple entraînait une augmentation de l'expression de GILZ (Grugan, Ma et al. 2008). Cependant le mécanisme par lequel la voie PI3K/AKT inhiberait GILZ n'a pas été décrit.

Le clonage et la caractérisation du promoteur humain de *GILZ* ont permis d'identifier des sites pouvant jouer un rôle clé dans sa régulation (Asselin-Labat, David et al. 2004). Ce promoteur contient une boîte TATA en amont du site d'initiation de la transcription (+1), cinq Glucocorticoid responsive elements (GREs), trois éléments de réponse au nuclear factor of activated T cell (NFAT), trois sites de liaison aux facteurs de transcription forkhead appelés Fork Head Responsive Element (FHRE), des sites de liaison pour STAT6, OCT-1, c-myc (Asselin-Labat, David et al. 2004), cyclic AMP response elements-binding protein (CREB) (Tynan, Lundeen et al. 2004).

### **V.3. FONCTIONS DE GILZ**

GILZ a été surtout étudié dans le système immunitaire où il joue un rôle dans la tolérance immunitaire et dans la survie des lymphocytes T. Il exerce ses effets en agissant comme un régulateur de l'expression génique. En effet, GILZ module l'expression d'un certain nombre de gènes qui peuvent intervenir dans la réponse au T-Cell Receptor (TCR), dans la réponse anti-inflammatoire/immunosuppressive et dans la survie cellulaire.

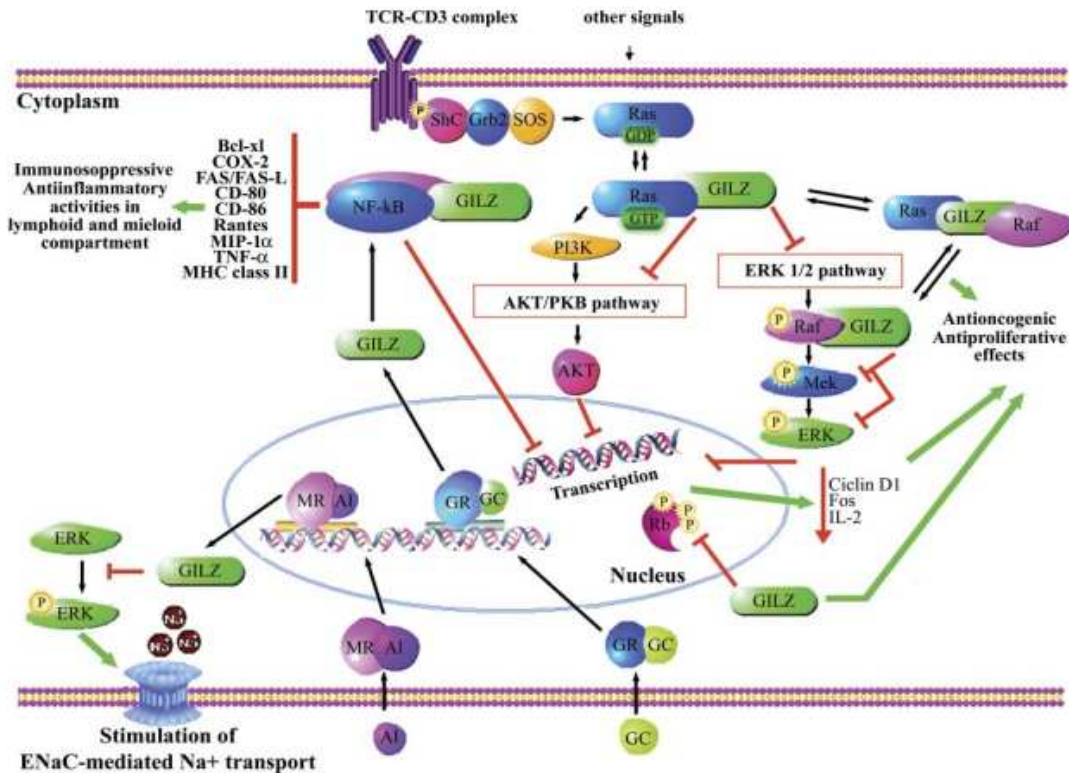
#### **V.3.1. Propriétés biochimiques de GILZ**

GILZ se comporte comme un régulateur de l'expression génique, soit en interagissant physiquement avec des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, Activated Protein-1 (AP-1) ou avec des molécules de la signalisation tels que Ras ou Raf (Figure 34), soit en se fixant à l'ADN au niveau des éléments de réponse CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) (Ayroldi and Riccardi 2009).

En 2001, Ayroldi et al. ont montré pour la première fois que la protéine de la signalisation NF- $\kappa$ B qui ne possède pas de domaine leucine zipper « non-LZ » a été retrouvée associée à GILZ. GILZ interagit avec la sous-unité P65 du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Ayroldi,

Migliorati et al. 2001). La caractérisation par la suite de l'interaction GILZ/NF- $\kappa$ B a révélé que les 29 premiers acides aminés de la région riche en proline (AA 98-127) en position C-terminale sont importants pour une transrépression fonctionnelle de NF- $\kappa$ B et que les AA 121-123 sont nécessaires pour la liaison GILZ/NF- $\kappa$ B (Di Marco, Massetti et al. 2007). Ces études ont montré que GILZ exerce un effet inhibiteur sur NF- $\kappa$ B. GILZ interagit avec NF- $\kappa$ B, le séquestrant ensuite dans le cytoplasme et inhibant sa translocation nucléaire et donc son activité transcriptionnelle de certains facteurs pro-inflammatoires (exemple Rantes, MIP- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , Bcl-xl, COX-2). Ce qui suggère que l'interaction de GILZ/NF- $\kappa$ B aboutit à une réponse anti-inflammatoire/immunosuppressive.

D'autres études, ont montré *in vivo* que GILZ interagissait par sa région N-terminale avec les composants du facteur de transcription AP-1, c-Fos et c-Jun (Mittelstadt and Ashwell 2001), inhibant ainsi leur liaison à l'ADN et leur activité transcriptionnelle. GILZ agit également en amont de la voie d'activation d'AP-1, en interagissant avec Raf-1 dans les thymocytes murins traités par la DEX (Ayroldi, Zollo et al. 2002). Cette interaction de type protéine-protéine impliquant les premiers 60 AA de la région N-terminale de GILZ inhibe la phosphorylation de Raf-1 (Ayroldi, Zollo et al. 2002). Récemment, cette interaction GILZ/Raf a été étudiée plus en détail après la constatation d'une interaction de GILZ avec Ras (Ayroldi, Zollo et al. 2007). Les résultats de cette étude rapportent que GILZ interagit principalement avec un Ras activé, par l'intermédiaire de sa région TSC box ; cependant Ras, Raf, et GILZ peuvent former un complexe ternaire (interaction physiologique), dans les lymphocytes T primaires de rate et dans les thymocytes, et dont la formation dépend de l'état d'activation de Ras. En effet, GILZ se lie à Raf lorsque Ras n'est pas activé ; mais quand l'activation de Ras augmente, l'affinité de Raf pour Ras est plus importante que celle de Raf pour GILZ, et en même temps l'affinité de GILZ pour Ras augmente. Donc les niveaux d'activation de Ras peuvent réguler les hétérodimères GILZ/Ras et GILZ/Raf mais également le complexe trimérique Ras/Raf/GILZ. De plus, cette interaction physique de GILZ avec le Raf ou l'interaction trimérique GILZ/Raf/Ras entraîne la suppression de la phosphorylation des mitogen activated proteine kinase kinase (MEK) et de extracellular signal regulated kinases-1/2 (ERK-1/2), tandis que l'interaction GILZ avec Ras entraîne une inhibition des voies AKT et ERK (Ayroldi, Zollo et al. 2007).



**Figure 34 : Représentation schématique du rôle de GILZ dans la transduction du signal** (Ayroldi and Riccardi 2009).

GILZ peut se fixer directement sur l'ADN. Plusieurs études ont montré que GILZ se fixe sur l'ADN au niveau des sites C/EBP (*tandem repeat of CCAAT/enhancer-binding protein*). Ces sites sont placés en tandem dans le promoteur du *peroxisome-proliférateur activated receptor 2* (*ppar $\gamma$ 2*) qui intervient dans l'adipogenèse. Cette fixation entraîne l'inhibition de l'activité de ce promoteur qui se traduit par une inhibition de la différenciation adipocytaire (Shi, Shi et al. 2003). De plus, l'expression de GILZ dans les cellules souches mésenchymateuses induit une différenciation ostéogénique en inhibant la transcription induite par C/EBP (Zhang, Yang et al. 2008).

Plusieurs études ont montré le rôle physiologique joué par GILZ dans la fonction rénale. La première étude, dans les cellules rénales différenciés de la souris, montre que l'aldostérone (Al) stimule l'expression transcriptionnelle et protéique de GILZ. L'augmentation d'expression de GILZ a été associée à une régulation de la sous-unité  $\alpha$  de l'ENaC (*epithelial Na $^+$  channel*) (Robert-Nicoud, Flahaut et al. 2001). D'autres études ont montré un lien entre l'expression de GILZ et le transport de sodium dans les cellules épithéliales. La même étude montre que GILZ inhibe la signalisation induite par ERK (par l'inhibition de la



phosphorylation), ce qui augmente l'expression membranaire de ENaC et stimule le transport de Na à travers ce canal (Muller, Parnova et al. 2003; Soundararajan, Zhang et al. 2005).

Une étude récente a montré que GILZ joue un rôle important dans la myogenèse (formation des muscles squelettiques). Les résultats de cette étude montre que GILZ et L-GILZ interagissent avec le facteur de transcription MyoD, une protéine régulatrice de la myogenèse qui induit la différenciation des cellules précurseurs du muscle squelettique, et inhibe son activité. Ce qui suggère que l'interaction de GILZ et L-GILZ avec MyoD aboutit à un effet anti-myogénique (Bruscoli, Donato et al. 2010).

### **V.3.2. GILZ et la survie des cellules T**

L'apoptose des lymphocytes T peut être induite de deux façons : soit par l'antigène à la suite de l'engagement du TCR on parle de Activated-induced Cell Death (AICD), soit par déprivation en facteurs de croissance. La stimulation répétée du TCR par l'antigène sensibilise les lymphocytes T activés à l'apoptose. L'AICD est un processus qui implique les récepteurs de mort Fas et qui est favorisé par l'expression de Fas Ligand (FasL). L'expression de FasL peut être régulée par différents facteurs de transcription. En effet, le promoteur de FasL contient des sites de liaison pour Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT), NF- $\kappa$ B, AP-1, Early Growth Factor (Egr), et FoxO3 (Brunet, Bonni et al. 1999). Il a été montré que les cellules T 3DO surexprimant GILZ présentent une résistance à l'apoptose induite par l'activation du TCR suggérant un rôle inhibiteurs de GILZ dans l'AICD (D'Adamio, Zollo et al. 1997). En effet, GILZ, s'oppose à l'apoptose induite par l'anti-CD3 et à l'augmentation de l'expression de Fas/FasL en se liant à NF- $\kappa$ B, le séquestrant ainsi dans le cytoplasme (Ayroldi, Migliorati et al. 2001). En inhibant AP-1, GILZ inhiberait la synthèse de *novo* des facteurs Erg 2 et Erg 3 responsables de l'activation du promoteur FasL. En effet, il a été rapporté une diminution de FasL dans les lymphocytes T Jurkat surexprimant GILZ (Mittelstadt and Ashwell 2001).

Lors de la stimulation antigénique, les lymphocytes T prolifèrent grâce à la présence de signaux extracellulaires générés par des facteurs solubles tels que l'IL-2 et le contact avec la cellule présentatrice d'antigène. A la fin de la réponse immunitaire, l'absence des cytokines dans le milieu extracellulaire interrompt les signaux de transduction nécessaires à la survie et induit l'apoptose des cellules par déprivation en facteurs de croissance. Asselin-Labat et al. ont démontré que GILZ est induit lors de la déprivation en IL-2 des cellules CTLL-2 (*murine IL-2-dependent T-cell line*), et qu'il s'oppose à l'apoptose de ces cellules via la régulation

négative de la protéines Bim (membre pro-apoptotique de la famille des Bcl-2) (Asselin-Labat, David et al. 2004).

### V.3.3. GILZ et réponse anti-inflammatoire/immunosuppressive

Les glucocorticoïdes jouent un rôle dans le développement du système immunitaire et dans la suppression de la réponse inflammatoire, à travers des mécanismes moléculaires impliquant l'activation du Glucocorticoid Receptor (GR) et l'inhibition de l'expression d'un certain nombre de gènes. La transrépression des gènes inflammatoires est le mécanisme le plus fréquent dans l'inhibition de l'inflammation. En effet, les glucocorticoïdes (GCs) réduisent l'expression d'enzymes pro-inflammatoires tels que la cyclooxygénase (COX)-2 et inhibent la production de médiateurs critiques pour la génération de la réponse immunitaire (Ayroldi and Riccardi 2009).

GILZ est constitutivement exprimé dans les macrophages humains et murins et dans les monocytes humains. Cette expression est augmentée *in vivo* et *in vitro* par les GCs (Cannarile, Zollo et al. 2001; Berrebi, Bruscoli et al. 2003). Les GCs induisent une expression de GILZ dans les monocytes de patients avec une hépatite alcoolique. En effet, GILZ diminue la sensibilité des macrophages au lipopolysaccharide (LPS) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels que TNF- $\alpha$  et RANTES (Hamdi, Bigorgne et al. 2007). Dans la lignée de cellules monocytaires THP-1, GILZ semble reproduire les effets des GCs par l'inhibition des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 et la production de chimiokines, RANTES et MIP-1. De plus, le traitement par la DEX augmente l'expression de GILZ dans le THP-1, qui exercerait ses effets inhibiteurs en interagissant à la sous-unité P65 NF- $\kappa$ B (Berrebi, Bruscoli et al. 2003). De même, dans les cellules dendritiques (CDs), les GCs, l'IL-10 et le Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  induisent l'expression de GILZ qui diminue l'expression des molécules costimulatrices et celles du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II alors qu'il augmente l'expression de B7-H1 et immunoglobulin-like transcript (ILT-3), empêchant ainsi l'action efficace des CDs dans la présentation antigénique (Cohen, Mouly et al. 2006). Ces CDs exprimant GILZ induisent également la génération de cellules Tregs, qui inhibent la réponse des cellules T spécifique de l'antigène (Hamdi, Godot et al. 2007). De plus, l'IL-10 a été montré nécessaire pour l'induction des Tregs par les CDs exprimant GILZ ainsi que pour les fonctions suppressive des Tregs (Hamdi, Godot et al. 2007). Ainsi la régulation de l'expression de GILZ est un facteur important dans

l'engagement des CD4 à se différencier en CD4 tolérogène ou immunogène, et pour la génération de Tregs spécifiques de l'antigène.

Le rôle de GILZ dans le contexte pathologique a été peu étudié. De plus, il s'agit surtout de maladies qui requièrent un traitement par les GCs. Les glucocorticoïdes ne modulent pas seulement l'activation/apoptose des lymphocytes mais régulent également la production de cytokines qui peuvent moduler la différenciation Th-1/Th-2. Dans un modèle de souris transgéniques où GILZ est sélectivement exprimé dans des cellules T CD4+, la réponse TH-2 est augmentée et la différenciation TH-1 est diminuée (Cannarile, Fallarino et al. 2006). Ces souris transgéniques sont aussi moins sensibles au développement d'une colite (maladie inflammatoire chronique du côlon) induite par le dinitrobenzene sulfonique acid (DNBS) (Cannarile, Cuzzocrea et al. 2009). Dans l'hépatite alcoolique (HA) l'induction de GILZ par les GCs diminue la sensibilité des macrophages au LPS et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Hamdi, Bigorgne et al. 2007).

#### **V.4. GILZ ET CANCERS**

Les effets de GILZ sur l'apoptose et son interaction avec des molécules clés de la signalisation (Ras, Raf, NK-kB....) suggèrent une implication possible de ce facteur dans le cancer. Cependant, la fonction de GILZ dans les cancers reste encore très peu caractérisée en raison du faible nombre d'études. De plus, ces travaux ont été effectués sur des lignées cellulaires et peu de données sont disponibles sur les tumeurs.

Un rôle de GILZ a été rapporté dans les mécanismes de résistance aux GCs observés dans les hémopathies malignes. Dans le myélome multiple, il a été montré que GILZ a un rôle dans l'apoptose induite par les GCs. L'augmentation de l'expression de GILZ par les GCs est observée uniquement dans les lignées de myélome multiple sensibles à la mort par GCs. De plus, la diminution de l'expression de GILZ dans ces cellules par des siRNA inhibe l'apoptose induite par les GCs (Grugan, Ma et al. 2008). Cette étude montre également que la voie des PI3K/AKT, qui est importante dans la progression du myélome multiple, inhibe l'expression de GILZ. Ceci suggère un mécanisme qui s'opposerait à l'apoptose induite par les GCs, impliquant l'inhibition de GILZ.

Tynan et al. ont démontré que l'expression du gène GILZ est induite par les œstrogènes dans une lignée de carcinome du col de l'utérus HeLa alors que dans les lignées de cancer du sein MCF-7 la stimulation par les œstrogènes inhibe l'expression de GILZ. Ces résultats

suggèrent que la régulation de l'expression de GILZ est dépendante du type cellulaire (Tynan, Lundeen et al. 2004).

Une étude récente faite par le groupe de V. Machelon, montre que GILZ joue un rôle prolifératif au niveau du cancer épithélial de l'ovaire. *In situ*, les niveaux d'expression de GILZ mesurés par immunohistochimie sur 50 échantillons de tumeur épithéliale de l'ovaire sont corrélés positivement à ceux de marqueurs utilisés pour caractériser les tumeurs : le marqueur de prolifération Ki-67 et l'AKT phosphorylé (p-AKT). Ces résultats ont été validés *in vitro* sur la lignée cellulaire de carcinome ovarien BG-1 dans laquelle GILZ a été surexprimé (transfection stable par un plasmide) ou invalidé par l'utilisation de siRNA. Les données montrent que GILZ augmente la prolifération cellulaire de BG-1 ainsi que l'activité d'AKT. De plus, GILZ régule l'expression des protéines associées au cycle cellulaire (augmente l'expression de cyclin D1 et diminue l'expression de p21) et favorise l'entrée en phase S. Ces résultats révèlent, pour la première fois, que le facteur GILZ s'exprime dans les cellules tumorales du CEO et qu'il contrôle leur prolifération (Redjimi, Gaudin et al. 2009).

# **OBJECTIFS**

---

## OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le cancer de l'ovaire se développe généralement à partir du revêtement de surface des ovaires. Il est en général de mauvais pronostic. Découvert souvent tardivement, il peut se développer lentement sans signes cliniques. Malgré de nombreuses études, l'étiologie du CEO et les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore peu élucidés. L'étude de facteurs contribuant à la croissance et à la progression tumorale est indispensable pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs études montrent les rôles des chimiokines et de leurs récepteurs dans le développement et les métastases de diverses tumeurs épithéliales primaires (Balkwill 2004; Lazennec and Richmond 2010). Ainsi, les chimiokines peuvent être considérés comme des candidates parmi les facteurs moléculaires jouant un rôle dans la carcinogenèse de la tumeur épithéliale de l'ovaire.

Notre projet concerne plus particulièrement les deux chimiokines, SDF-1 et FKN. Plusieurs études ont montré le rôle important de ces deux chimiokines dans la tumorigenèse (Lazennec and Richmond 2010).

Une production importante de SDF-1 par les cellules tumorales est une spécificité des tumeurs épithéliales de l'ovaire que l'on ne retrouve ni dans les cancers du sein, ni dans les cancers de la prostate (Zou, Machelon et al. 2001). D'où l'importance d'étudier la valeur pronostic de SDF-1 dans le CEO. Dans ce but, nous avons cherché l'expression de SDF-1 par immunohistochimie sur des prélèvements de tumeurs provenant de 183 patientes diagnostiquées pour un cancer épithélial de l'ovaire. Pour déterminer la valeur pronostic de SDF-1, nous avons corrélé l'expression de SDF-1 avec différents paramètres cliniques (les différents sous types histologiques, le stade FIGO, l'âge, l'indice de performance, la présence ou l'absence d'ascite, l'expression de HER2, récurrence tumorale après l'intervention chirurgicale), avec la survie sans progression tumorale et avec la survie globale des patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire.

L'activité biologique de SDF-1 est médiée par l'interaction avec ses deux récepteurs, CXCR4 et CXCR7 (Feng, Broder et al. 1996; Balabanian, Lagane et al. 2005). Plusieurs études ont montré le rôle protumoral du couple SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 dans différents types de cancers (cancer de la prostate, cancer du poumon, cancer pancréatique) (Sun, Cheng et al. 2010). Le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle important dans l'angiogenèse et dans la croissance des tumeurs épithéliales de l'ovaire (Kryczek, Lange et al. 2005; Porcile, Bajetto et al. 2005). Jusqu'à ce jour, rien n'a été publié concernant l'expression et l'impact de

CXCR7 dans les tumeurs ovariennes. Donc, il apparaît essentiel d'évaluer l'expression et l'impact de CXCR7 sur la croissance tumorale dans le cancer épithélial des ovaires.

CXCR4 et CXCR7 sont souvent co-exprimés par une même cellule et peuvent interagir via la formation d'hétérodimères au sein desquels CXCR7 module les voies de signalisation médiées par CXCR4 (Sierro, Biben et al. 2007; Levoe, Balabanian et al. 2009). D'où l'importance de rechercher les interactions entre CXCR4 et CXCR7 et l'impact de CXCR7 sur les propriétés biochimiques de CXCR4 dans les cellules tumorales.

La FKN est exprimée sous deux formes: membranaire et soluble (Matloubian, David et al. 2000). L'activité biologique de la FKN est médiée par l'interaction avec son récepteur CX<sub>3</sub>CR1 (Bazan, Bacon et al. 1997), et elle varie selon la forme de la FKN (la forme membranaire et la forme soluble) (White and Greaves 2009). Sous sa forme soluble, la FKN a une puissante activité chimiotactique qui permet le recrutement des cellules exprimant le récepteur CX<sub>3</sub>CR1 aux sites d'inflammation. La FKN membranaire est une molécule d'adhésion qui favorise la rétention des monocytes et des lymphocytes T dans les tissus. La FKN a des effets paradoxaux dans les tumeurs. Elle peut jouer deux rôles différents: un rôle anti-tumoral dans certains types de tumeurs (le cancer du poumon, lymphome..) par le recrutement des cellules NK et des lymphocytes T, et un rôle pro-tumoral dans d'autres types de tumeurs (le cancer de la prostate, le cancer du sein..) par l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses (exprimant le récepteur CX<sub>3</sub>CR1) vers les organes qui produisent de la FKN soluble (D'Haese, Demir et al. 2010). La fonction de la FKN dans le cancer de l'ovaire n'a pas encore été étudiée. L'objectif de cette étude a été de rechercher l'expression de la FKN et de son récepteur dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire et de caractériser sa fonction. Dans ce but, nous avons dans un premier temps recherché l'expression de la FKN par immunohistochimie sur des prélèvements de tumeurs provenant de 54 patientes diagnostiquées pour un cancer épithélial de l'ovaire. Puis, nous avons cherché la signification biologique de cette expression, en corrélant les niveaux d'expression de la FKN à ceux des marqueurs de prolifération utilisés pour caractériser les tumeurs: le marqueur de prolifération Ki-67 (utilisé en routine) et GILZ qui a été identifié récemment comme un facteur prolifératif des cellules du cancer épithélial de l'ovaire (Redjimi, Gaudin et al. 2009). Enfin, les expériences *in vitro* sur des lignées du cancer épithélial de l'ovaire ont validé et complété les données immunohistochimiques et permis de préciser le rôle de la FKN dans ces tumeurs.

# **RESULTATS**



# **Article 1**

## **CXCL12 expression by healthy and malignant ovarian epithelial cells**

Véronique Machelon\*, Françoise Gaudin, Sophie Camilleri-Broët, **Salam Nasreddine**,  
Laurence Bouchet-Delbos, Eric Pujade-Lauraine, Jérôme Alexandre, Laurence Gladiéff,  
Fernando Arenzana-Seisdedos, Dominique Emilie, Sophie Prévot, Philippe Broët, and  
Karl Balabanian

Accepté à BMC Cancer

---

## **I. Article 1: CXCL12 EXPRESSION BY HEALTHY AND MALIGNANT OVARIAN EPITHELIAL CELLS**

La chimiokine CXCL12/SDF-1 avec ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 constitue les couples de chimiokines/récepteurs qui attirent le plus grand niveau d'intérêt en oncologie. L'expression transcriptionnelle et protéique de CXCL12 a été détectée dans les cellules tumorales du CEO. CXCL12 a un effet immunosupresseur dans le CEO. En cas d'hypoxie, l'expression du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) et l'expression de CXCL12 par le CEO augmente. Ces deux facteurs jouent un rôle important dans l'angiogenèse du CEO. L'effet de CXCL12 médié par CXCR4 est impliqué dans la régulation de la prolifération, la migration et l'invasion des cellules du cancer épithélial de l'ovaire. CXCL12 exerce des activités autocrine et paracrine sur la progression du CEO. Des études récentes ont montré que la production de CXCL12 par le CEO n'a pas une valeur pronostique. Cependant, les résultats ont été obtenus sur une petite cohorte des patientes subissant une chimiothérapie via des protocoles hétérogènes.

L'objectif de ce travail a été d'étudier la valeur pronostique de la production de CXCL12 sur une grande cohorte de patientes atteintes du CEO traitées par le même type de chimiothérapie. Nous avons quantifié l'expression de CXCL12 par immunohistochimie sur des coupes de tissus provenant de 5 ovaires normaux, 8 tumeurs bénignes, 8 tumeurs borderline et 183 cancers épithéliaux de l'ovaire invasifs. CXCL12 est exprimé dans l'épithélium de surface de l'ovaire normal, dans la tumeur bénigne, borderline et maligne. CXCL12 est exprimée de manière hétérogène dans le CEO (allant de l'absence ou la faible expression à une forte expression). Les niveaux d'expression de CXCL12 dans les cellules tumorales n'a pas été corrélée avec aucun des paramètres cliniques (les différents sous types histologiques, le stade FIGO, l'âge, l'indice de performance, la présence ou l'absence d'ascite, l'expression de HER2, récurrence tumorale après l'intervention chirurgicale). Par ailleurs, la production de CXCL12 n'a pas de valeur pronostique sur la survie sans progression tumorale et sur la survie globale des patientes atteintes du CEO.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# CXCL12 expression by healthy and malignant ovarian epithelial cells

Véronique Machelon<sup>1\*</sup>, Françoise Gaudin<sup>1</sup>, Sophie Camilleri-Broët<sup>2,3</sup>, Salam Nasreddine<sup>1</sup>, Laurence Bouchet-Delbos<sup>1</sup>, Eric Pujade-Lauraine<sup>4</sup>, Jérôme Alexandre<sup>4</sup>, Laurence Gladieff<sup>5</sup>, Fernando Arenzana-Seisdedos<sup>6</sup>, Dominique Emilie<sup>1,7</sup>, Sophie Prévot<sup>8</sup>, Philippe Broët<sup>2</sup>, Karl Balabanian<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** CXCL12 has been widely reported to play a biologically relevant role in tumor growth and spread. In epithelial ovarian cancer (EOC), CXCL12 enhances tumor angiogenesis and contributes to the immunosuppressive network. However, its prognostic significance remains unclear. We thus compared CXCL12 status in healthy and malignant ovaries, to assess its prognostic value.

**Methods:** Immunohistochemistry was used to analyze CXCL12 expression in the reproductive tracts, including the ovaries and fallopian tubes, of healthy women, in benign and borderline epithelial tumors, and in a series of 183 tumor specimens from patients with advanced primary EOC enrolled in a multicenter prospective clinical trial of paclitaxel/carboplatin/gemcitabine-based chemotherapy (GINECO study). Univariate COX model analysis was performed to assess the prognostic value of clinical and biological variables. Kaplan-Meier methods were used to generate progression-free and overall survival curves.

**Results:** Epithelial cells from the surface of the ovary and the fallopian tubes stained positive for CXCL12, whereas the follicles within the ovary did not. Epithelial cells in benign, borderline and malignant tumors also expressed CXCL12. In EOC specimens, CXCL12 immunoreactivity was observed mostly in epithelial tumor cells. The intensity of the signal obtained ranged from strong in 86 cases (47%) to absent in 18 cases (<10%). This uneven distribution of CXCL12 did not reflect the morphological heterogeneity of EOC. CXCL12 expression levels were not correlated with any of the clinical parameters currently used to determine EOC prognosis or with HER2 status. They also had no impact on progression-free or overall survival.

**Conclusion:** Our findings highlight the previously unappreciated constitutive expression of CXCL12 on healthy epithelia of the ovary surface and fallopian tubes, indicating that EOC may originate from either of these epithelia. We reveal that CXCL12 production by malignant epithelial cells precedes tumorigenesis and we confirm in a large cohort of patients with advanced EOC that CXCL12 expression level in EOC is not a valuable prognostic factor in itself.

**Trial Registration:** ClinicalTrials.gov: NCT00052468

## Background

Epithelial ovarian cancer (EOC) has one of the highest mortality rates of all gynecologic malignancies. It is the sixth most common cancer and the fifth most common cause of cancer-related death among women in developed countries [1]. Due to the silent nature of early-stage disease, most women with EOC have disseminated

disease (*i.e.* expansion in the peritoneum and metastasis in the omentum) at the time of diagnosis and present an advanced stage of the disease, with a five-year survival rate below 30% [2]. Despite the high incidence and mortality rates, the etiology of EOC and the molecular pathways underlying its progression remain poorly understood. According to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO), clinical stage, histologic grade and postoperative residual tumor mass are the most important prognostic factors in patients with

\* Correspondence: veronique.machelon@u-psud.fr; karl.balabanian@u-psud.fr  
<sup>1</sup>INSERM UMR\_S 996, Université Paris-Sud 11, Clamart, 92140 France  
Full list of author information is available at the end of the article

EOC [3]. However, clinical factors and derivative prognostic models remain inadequate for the accurate prediction of outcome for a specific patient, indicating a need for the identification of biological factors to improve prognostic assessment. This aspect has recently been addressed with the identification of several biomarkers for the identification of histologic subtypes and the more accurate prediction of patient outcome [4-9]. Chemokines and their receptors have been known for many years to influence the development of primary epithelial tumors, in which they regulate the proliferation and survival of tumor cells, tumor-infiltrating leukocytes, angiogenesis and metastasis [10-12]. In epithelial cancers, these molecules play a key role in controlling both autocrine and paracrine communication between the different cell types of the tumor microenvironment [13]. Thus, chemokines and their receptors may constitute new biomarkers of potential prognostic value in various cancers, including EOC.

In this study, we focused on the  $\alpha$ -chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12, which, together with its receptors CXCR4 and CXCR7, constitutes the chemokine/receptor axis attracting the greatest level of interest in oncology [11,14]. In EOC, CXCL12 products (*i.e.* protein and mRNA) have been detected in tumor cells [15,16]. We previously showed that CXCL12 orchestrates the recruitment of pre-DC2s and protects them from tumor macrophage IL-10-promoted apoptosis, thereby contributing to the immunosuppressive network within the tumor microenvironment [15]. In addition, CXCL12 regulates tumor angiogenesis, a critical step in tumor growth. Indeed, we have shown that hypoxia triggers the production of CXCL12 and vascular endothelium growth factor (VEGF) by EOC, with these two molecules acting in synergy to enhance tumor angiogenesis *in vivo* [17]. CXCL12 also acts on tumor cell proliferation and survival and, through its main receptor CXCR4, governs the migration of malignant cells and their invasion of the peritoneum, a major route for ovarian cancer spread [16,18-20]. Other factors must also be considered, but previous observations strongly suggest that CXCL12 provides the autocrine and paracrine signals controlling malignant progression in EOC [11]. Some recent studies have investigated CXCL12 status in EOC, and reported no prognostic significance of CXCL12 production [11,21,22]. However, the results were obtained with ovarian cancer specimens from patients undergoing chemotherapy via heterogeneous protocols, with a follow-up period of less than four years. The prognostic significance of CXCL12 production by ovarian cancer cells remains to be clearly assessed in larger cohorts of EOC patients undergoing the same type of chemotherapy and followed up for longer periods. Furthermore, the pattern of CXCL12

expression in healthy ovaries and in benign and borderline ovarian tumors has scarcely been investigated. Elucidation of these points is required to determine whether CXCL12 production is associated with the malignant process and whether it constitutes a valuable prognostic factor in EOC.

In this study, we investigated CXCL12 status in the reproductive tracts of healthy women. We studied the ovarian surface epithelium (OSE) and fallopian tubes, both of which are considered probable sources of EOC [23,24]. We also investigated CXCL12 status in benign and borderline epithelial tumors, and in a series of 183 patients with advanced primary EOC enrolled in a multicenter prospective clinical trial of paclitaxel/carboplatin/gemcitabine (TCG)-based chemotherapy [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00052468]. We quantified CXCL12 by immunohistochemistry (IHC) in EOC specimens and further assessed its potential association with clinical and pathologic features, including staging parameters and tumor histotypes, and with the expression of HER2, a tyrosine kinase receptor that may influence outcome when overexpressed [21,25]. Finally, we investigated whether the production of CXCL12 within the tumor affected progression-free survival (PFS) and the overall survival (OS) of patients with advanced primary EOC.

## Methods

### Ethics statement

We included 183 patients with advanced primary EOC (FIGO stage Ic-IV) in this study. All had been enrolled in the GERCOR-AGO-OVAR-9 large phase III randomized trial of first-line TCG-based chemotherapy (GINECO study) conducted at 58 French centers from July 2002 to April 2004 [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00052468] [25-27]. Formalin-fixed, paraffin-embedded tumors from primary surgery were obtained with the approval of the institutional review board of the corresponding center (CCPPRB number: 02780) after inclusion of the patient in the clinical trial. Formalin-fixed and paraffin-embedded specimens recovered from five healthy ovaries (mostly contralateral to the malignant ovary), eight benign tumors (4 serous and 4 mucinous), eight borderline tumors (4 serous and 4 mucinous), and three non epithelial ovarian tumors (2 granulosa tumors and 1 dysgerminoma) were provided from the archives of patients treated at Antoine-Béclère Hospital (Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Clamart, France) between 1998 and 2007. Approval was obtained from the ethics commission of Antoine-Béclère Hospital for all analyses of tumor material from the archives initially obtained for routine diagnostic and therapeutic purposes. This study was carried out in accordance with good clinical practice guidelines,

national laws, and the Declaration of Helsinki. All patients provided written informed consent.

#### Cell enrichment

Tumor cell enrichment from malignant ascites was based on the expression of CD326, a human epithelial antigen also known as EpCAM, one of the most frequently identified and highly expressed biomarkers in EOC [28]. CD326<sup>+</sup> cells were positively selected on AutoMACs columns (Mytenyi Biotech, Paris, France), from ascites samples collected with ethics committee (Antoine-Béclère Hospital) approval from one patient (FIGO stage IV) diagnosed with invasive EOC with peritoneal extension, as previously described [29]. In the positive fraction, the percentage of CD326<sup>+</sup> cells was >80%, whereas the negative fraction contained mostly CD45<sup>+</sup> leukocytes, as determined by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences, Le Pont De Claix, France) with FITC-conjugated anti-human CD45 (clone H130, IgG1, BD Biosciences) and PE-conjugated anti-human CD326 (clone HEA 125, IgG1, Mytenyi Biotech) monoclonal antibodies (mAb). Ascites samples were also analyzed for CXCL12 content with the human CXCL12/SDF-1 $\alpha$  Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Lille, France), according to the manufacturer's instructions.

#### Immunostaining grading and score

CXCL12 was localized immunohistochemically on 4  $\mu$ m sections of paraffin-embedded tissues (healthy ovaries, benign, borderline and non epithelial tumors) and on tissue microarrays (TMAs) of EOC specimens. Identical experimental protocols were used for immunohistochemistry (IHC) on conventional slides and TMAs. Sections were deparaffinized and rehydrated and then treated with citrate buffer pH6 and heated in a microwave oven. For CXCL12 immunostaining, we used a mAb against CXCL12 (clone K15C, IgG2a) at a concentration of 1.37  $\mu$ g/ml. This mAb has already been widely used for the detection of CXCL12 in mesothelial cells, ovarian cancer cells and breast carcinomas [15,30-33]. The binding of the K15C mAb was detected by the streptavidine-biotin peroxidase method (LSAB kit, Dako, Trappes, France). Sections were then counterstained with hematoxylin. Images were obtained with a Leica DMLB microscope equipped with standard optic objectives, at the indicated magnifications, and digitized directly with a Sony 3CCD color video camera.

Immunostaining for CXCL12 was then scored by two independent investigators (F.G. and S.C-B), as follows: an intensity score of 0 if negative, 1 (weak intensity), 2 (moderate intensity) or 3 (strong intensity), added to a score for the percentage of positive cells, of 0 (0%), 1 (1-10%), 2 (10-50%), 3 (50-80%) or 4 (>80%), as recently reported [29]. Tumor specimens scoring 0 to 4 were

considered to display low-moderate levels of CXCL12 expression (CXCL12<sup>low/moderate</sup>, n = 97), whereas those scoring 5 to 7 were classified as having high levels of CXCL12 expression (CXCL12<sup>high</sup>, n = 86). For the 183 patients included in the GINECO clinical trial, results were compared with IHC for HER2, as previously described [26].

#### RT-PCR analyses

Total cellular RNA was extracted from freshly frozen ovarian tissue samples, with the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). It was then reverse-transcribed with random hexamers (Roche Diagnostics, Meylan, France) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Fisher Bioblock, Illkirch, France). The resulting cDNAs (1  $\mu$ g) were then amplified by semi-quantitative PCR (2 min at 94°C followed by 33 cycles of 30 s at 61°C or 55°C for CXCL12 and  $\beta$ -actin, respectively) with forward (658-677) 5'-GGGCTCCTGGGTTTTGTATT-3' and reverse (1056-1075) 5'-GTCCTGAGAGTCCTTTTGCG-3' primers for CXCL12 (417 bp), and forward (214-223) 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3' and reverse (432-451) 5'-GGTCTCAACATGATCTGGG-3' primers for  $\beta$ -actin (237 bp). Quantitative real-time PCR was performed on a LightCycler instrument (LC480, Roche Diagnostics) with the LightCycler 480 SYBR Green detection kit (Roche Diagnostics) and forward (178-203) 5'-GTCAAGCATCTCAAATTCTCAACAC-3' and reverse (262-281) 5'-CACTTTAGCTTCGGGTCAATGC-3' primers for CXCL12 (103 bp), and forward (214-223) 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3' and reverse (432-451) 5'-GGTCTCAACATGATCTGGG-3' primers for  $\beta$ -actin (237 bp). We used the ABI 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the following amplification scheme: 95°C for 10 min and 45 cycles of 95°C for 10 s, 68°C for 10 s and 72°C for 5 s. The dissociation curve method was applied, according to the manufacturer's protocol (60°C to 95°C), to ensure the presence of a single specific PCR product. The standard curve method was used for analysis, and results are expressed as CXCL12/ $\beta$ -actin ratios.

#### Statistical analyses

For the series of 183 patients included in the GINECO clinical trial, the relationship between CXCL12 expression and clinical and pathologic features was assessed with *t*-tests (continuous variables) or Fisher's exact tests (binary variables). Overall survival (OS) was calculated from the date of inclusion to death and progression-free survival (PFS) was calculated from the date of inclusion until progression or last follow-up examination. Progression was defined as a 20% increase in the diameter of all measured lesions, the appearance of new lesions and/or

the doubling of CA125 tumor marker concentration from baseline values. Kaplan-Meier analysis was carried out to generate PFS and OS curves. Univariate COX model analysis was carried out to assess the prognostic influence of clinical and biological variables. Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CIs) were determined. Analyses were performed with R software (The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0, <http://www.r-project.org>). For comparisons of *CXCL12* mRNA levels in EOC samples, we used unpaired two-tailed Student's *t* tests (Prism software, GraphPad). *P* values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Detection of CXCL12 products in healthy and malignant ovarian epithelial cells

The cellular expression of CXCL12 was examined by IHC on sections isolated from five healthy ovaries, eight serous or mucinous benign tumors (some still containing normal ovarian tissue), eight serous or mucinous borderline epithelial tumors, three non epithelial ovarian tumors (*i.e.* 2 granulosa tumors and 1 dysgerminoma), and 183 invasive EOC. CXCL12 was clearly detected in cells of the OSE and the fallopian tube epithelium (Figure 1A). By contrast, CXCL12 was absent from both ovarian follicles and oocytes. CXCL12 immunoreactivity was detected in epithelium-derived proliferating tumor cells from benign tumors (Figure 1B). In both serous and mucinous borderline tumors and in serous, clear-cell, endometrioid and mucinous EOC specimens, CXCL12 was heterogeneously distributed in malignant cells, defining low and high expression profiles (Figures 1C and 1D). CXCL12 was confined to the cytoplasm of malignant epithelial cells, with particularly strong staining of the membrane frequently observed, and was not detected in nuclei (Figure 1D). CXCL12 was barely detectable in the stroma, and tumor epithelial cells are thus probably the principal source of CXCL12 in EOC. Epithelial cells isolated from malignant ascites and identified as CD326<sup>+</sup> cells were stained for CXCL12, whereas their CD326<sup>-</sup> non epithelial counterparts, consisting mostly of CD45<sup>+</sup> leukocytes, were not stained for CXCL12 (Figure 1E). CXCL12 was also absent from non epithelial ovarian tumors (Figure 1F). A similar pattern was observed for CXCL12 mRNA, as shown by conventional and real-time PCR (Figure 2). CXCL12 was assayed in the culture medium of three ovarian cancer cell lines, SKOV-3, OVCAR-3 and BG-1, and in malignant ascites. We found that CXCL12 was produced in all cases, at concentrations of 2 to 10 ng/ml. Thus, the epithelial cells of both the OSE and fallopian tubes constitutively produce CXCL12 in the reproductive tracts of healthy women. CXCL12 was recovered from benign,

borderline and malignant epithelial tumors but not from non epithelial ovarian tumors.

### Correlation of CXCL12 expression with clinical and pathological characteristics

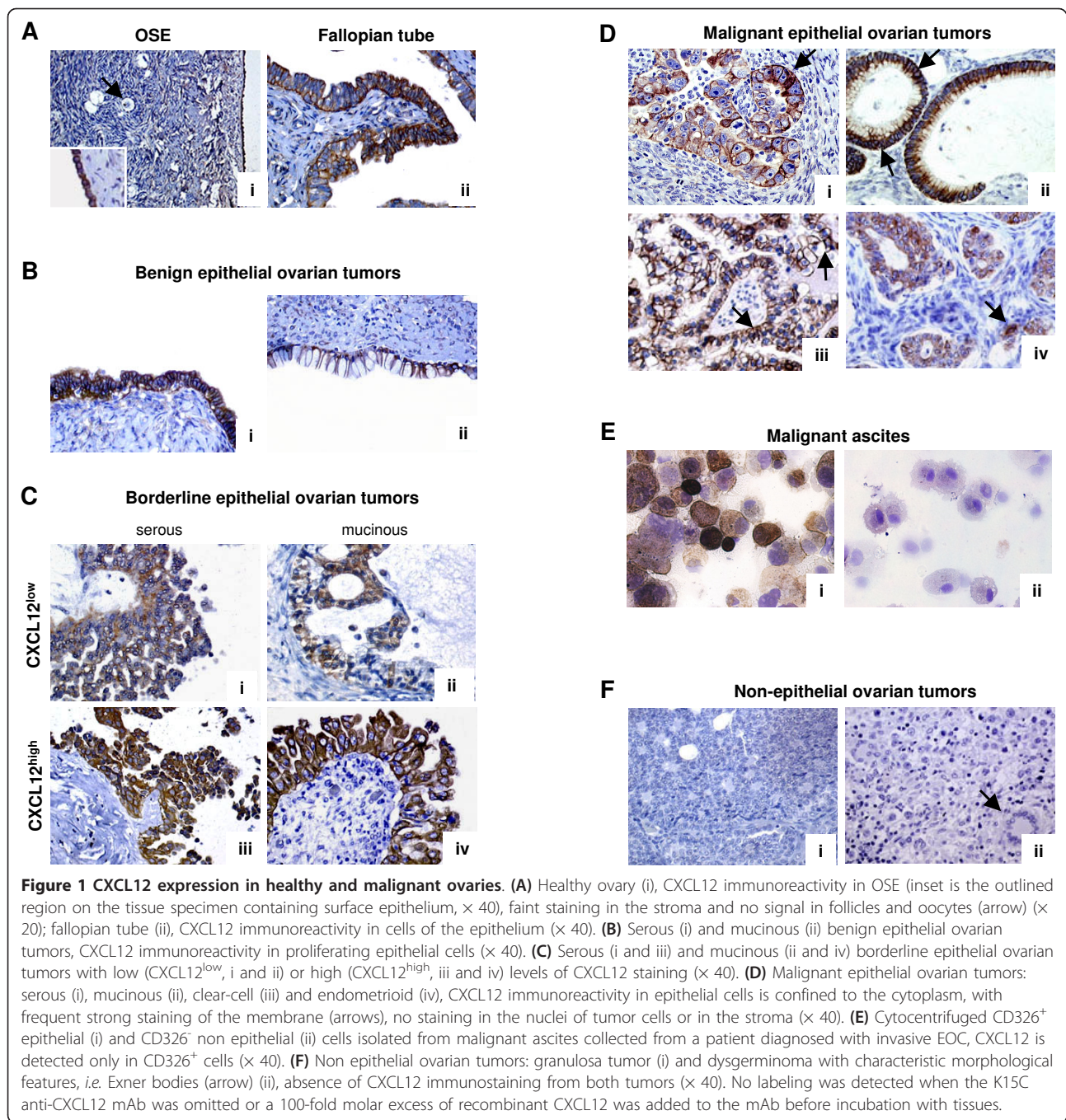
We evaluated the prognostic value of CXCL12 for EOC, by quantifying CXCL12 staining in 183 ovarian cancer specimens. The mean age of the patients at initial diagnosis was 59 years (range 25-77); 68% of patients had serous adenocarcinomas and 85% had stage III/IV disease. Median follow-up for patients was 69 months. CXCL12 was heterogeneously distributed in tumor cells, with some cells displaying no detectable staining and others, strong immunoreactivity. CXCL12 expression ranged from high levels (scores 5-7) in 86 (47%) specimens to an absence of staining in 18 (<10%) cases. We applied a single cut-off at score 4, the median and mean value of the entire cohort, for the identification of samples producing low-moderate (CXCL12<sup>low/moderate</sup>, scores 0-4, n = 97) and high (CXCL12<sup>high</sup>, scores 5-7, n = 86) levels of CXCL12. The median age of the patients was 59 (range 25-77) in the CXCL12<sup>low/moderate</sup> group and 57 (range 33-75) in the CXCL12<sup>high</sup> group. There was thus no significant difference in patient age between these two groups (*P* = 0.31). Statistical analyses of CXCL12<sup>high</sup> and CXCL12<sup>low/moderate</sup> immunostaining and classical clinical parameters, such as histotype, HER2 status, FIGO stage, ascites and size of residual tumor after first laparotomy, revealed no significant correlation of CXCL12 status with any of the parameters tested (Table 1). Thus, CXCL12 expression does not reflect the clinical status of OEC.

### Correlation of CXCL12 expression and patient outcome

We then investigated whether CXCL12<sup>high</sup> or CXCL12<sup>low/moderate</sup> status affected OS and/or PFS. As expected, univariate analysis validated, for this series, known prognosis factors such as performance status, FIGO stage, presence of ascites and residual tumor after first laparotomy, which were associated with shorter OS and PFS (Table 2). In our large and homogeneous cohort, CXCL12 expression levels had no effect on OS or PFS (Table 2 and Figure 3). Thus, CXCL12 expression by tumor epithelial cells is not in itself a valuable prognostic factor in patients with advanced EOC.

## Discussion

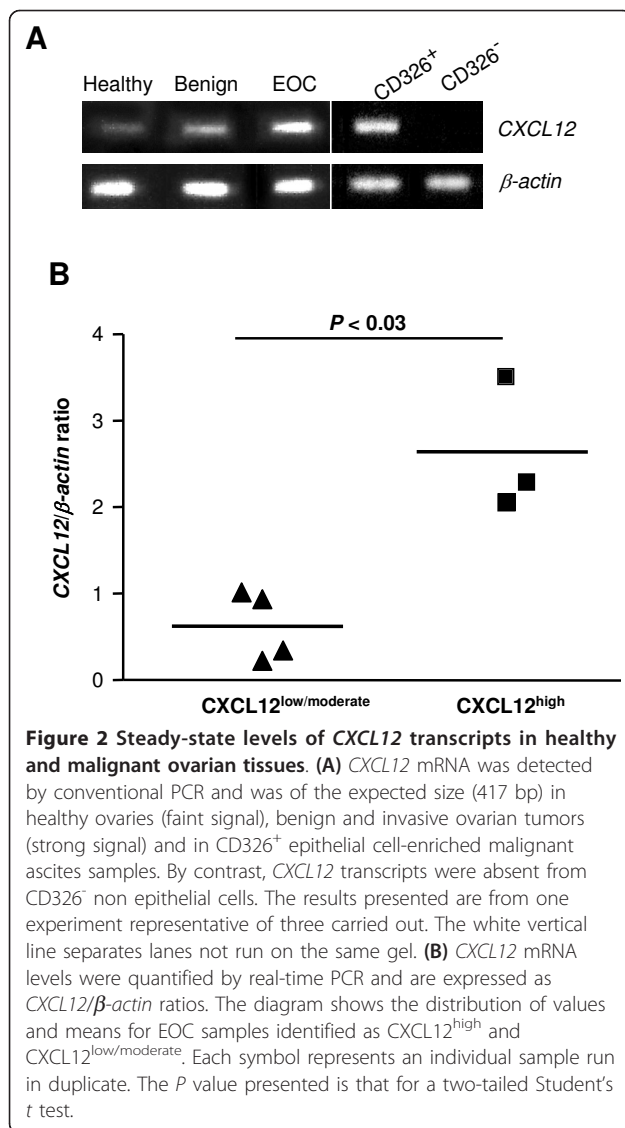
In this study, we demonstrate the previously unappreciated constitutive expression of CXCL12 by healthy ovarian epithelial cells and ovarian epithelial tumor cells, whether benign or malignant. CXCL12 was recovered from both the OSE and the epithelium of the fallopian tubes, both of which are considered possible origins of EOC. By contrast, it was not detected in



follicles and oocytes or in malignant tumor cells arising from them, granulosa tumors or dysgerminomas. Furthermore, CXCL12 expression correlated neither with clinical parameters nor with HER2 status in specimens from 183 patients with advanced primary EOC enrolled in a multicenter clinical trial of first-line TCG-based chemotherapy (GINECO study). The intratumoral production of CXCL12 does not reflect the morphological heterogeneity of EOC and has no impact on PFS or OS after adjustment for established prognostic factors.

Thus, CXCL12 is expressed by ovarian epithelial cells before tumorigenesis and does not constitute a valuable prognostic factor in EOC patients.

Recent studies on the origin and histogenesis of EOC have proposed that type I tumors, which are believed to include all major histotypes, originate from the OSE, whereas type II tumors, which are thought to consist almost exclusively of high-grade serous carcinomas, arise from the distal region of fallopian tubes [4,24,34]. Our findings clearly demonstrate that CXCL12 is



constitutively produced by the epithelial cells of the OSE, whereas such expression was not previously suspected [11,16]. This apparent discrepancy may result from differences between our experimental protocol and those used in previous studies. For example, we used an anti-CXCL12 mAb rather than a polyclonal Ab and an additional microwave pretreatment for antigen retrieval, both of which would have increased the sensitivity of immunostaining. CXCL12 was also recovered from the epithelial cells of fallopian tubes, which were recently identified as a possible origin of high-grade serous EOC and which have a Müllerian duct-derived embryologic origin in common with the OSE [23,28,35]. By contrast, CXCL12 was undetectable in follicles, oocytes and their malignant non epithelial counterparts. Thus, CXCL12 is a chemokine constitutively produced by epithelial ovarian cells, from both healthy and malignant tissues.

CXCL12 is present in ovarian epithelial cells before they become malignant and is therefore not useful as a marker of malignancy in EOC.

Scotton and coworkers reported a trend toward stronger CXCL12 expression in higher grade tumors [16]. However, Pils and coworkers recently found that the abundance of CXCL12 did not differ between borderline and malignant tumors [21]. In the present work, CXCL12 expression was detected in benign tumors as well as in borderline and malignant tumors. Although CXCL12 is unevenly distributed in low-grade (*i.e.* borderline and stage I) and in more advanced stage tumors, we have no evidence that its expression level is weaker in low-grade tumors. Among CXCL12-positive EOC specimens, we observed no significant differences in the fraction of CXCL12<sup>high</sup>-producing tumors for the four histotypes examined (*i.e.* serous, clear-cell, endometrioid and mucinous), despite previous reports of differences in epidemiologic and genetic changes, tumor markers and response to treatment (reviewed in [11]). We suggest that CXCL12 production levels overlap with EOC histotype differentiation and staging. Consistent with previous findings [16,22], CXCL12 was detected in more than 90% of patients with advanced primary EOC. However, it was barely detectable in the remaining cases (<10%), suggesting that CXCL12 expression might have been silenced, possibly through epigenetic mechanisms, such as promoter hypermethylation, a phenomenon already reported for colon carcinoma and breast cancer [36,37]. Indeed, further in-depth studies are required to determine whether transcriptional regulatory mechanisms account for heterogeneous CXCL12 production in EOC.

Recent studies have assessed the prognostic significance of CXCL12 expression in various cancers, including colorectal carcinoma [38], pancreatic ductal adenocarcinoma [39], breast cancer [40], esophageal squamous cell carcinoma [41], endometrial cancer [42], germ cell tumors [43] and EOC [21,22]. The study reported here was based on a large, homogeneous cohort of 183 patients, all given standard TCG-based chemotherapy. IHC showed that CXCL12 abundance was not correlated with any of the clinical parameters tested or with the HER2 status. Patients with CXCL12<sup>high</sup>-producing tumors had a PFS and OS similar to those of patients with CXCL12<sup>low/moderate</sup>-producing tumors. Consistent with the findings of smaller cohorts of patients given heterogeneous treatments [21,22], we therefore suggest that there is no evidence that CXCL12 production by malignant epithelial ovarian cells is of prognostic significance in EOC.

This lack of prognostic value for CXCL12 in EOC is somewhat puzzling, as this chemokine has been reported to enhance tumor cell proliferation and



**Table 1 Correlation of CXCL12 expression with clinical parameters**

	Patient number		P value <sup>a</sup>
	CXCL12 <sup>low/moderate</sup> Scores (0-4)	CXCL12 <sup>high</sup> Scores (5-7)	
Histotype			
Serous (n = 125)	66	59	0.90 (NS)
Non serous (n = 58)	31	27	
HER2			
Negative (n = 171)	93	78	0.57 (NS)
Positive (n = 10)	4	6	
Undetermined (n = 2)			
FIGO stage			
I+II (n = 27)	14	13	0.91 (NS)
III+IV (n = 155)	82	73	
Undetermined (n = 1)			
Ascites			
Absence (n = 74)	37	37	0.45 (NS)
Presence (n = 86)	47	39	
Undetermined (n = 23)			
Residual tumor after initial laparotomy			
>1 cm (n = 83)	40	43	0.98 (NS)
≤1 cm (n = 24)	11	13	
Undetermined (n = 76)			

<sup>a</sup>Fisher's exact test. NS: not significant.

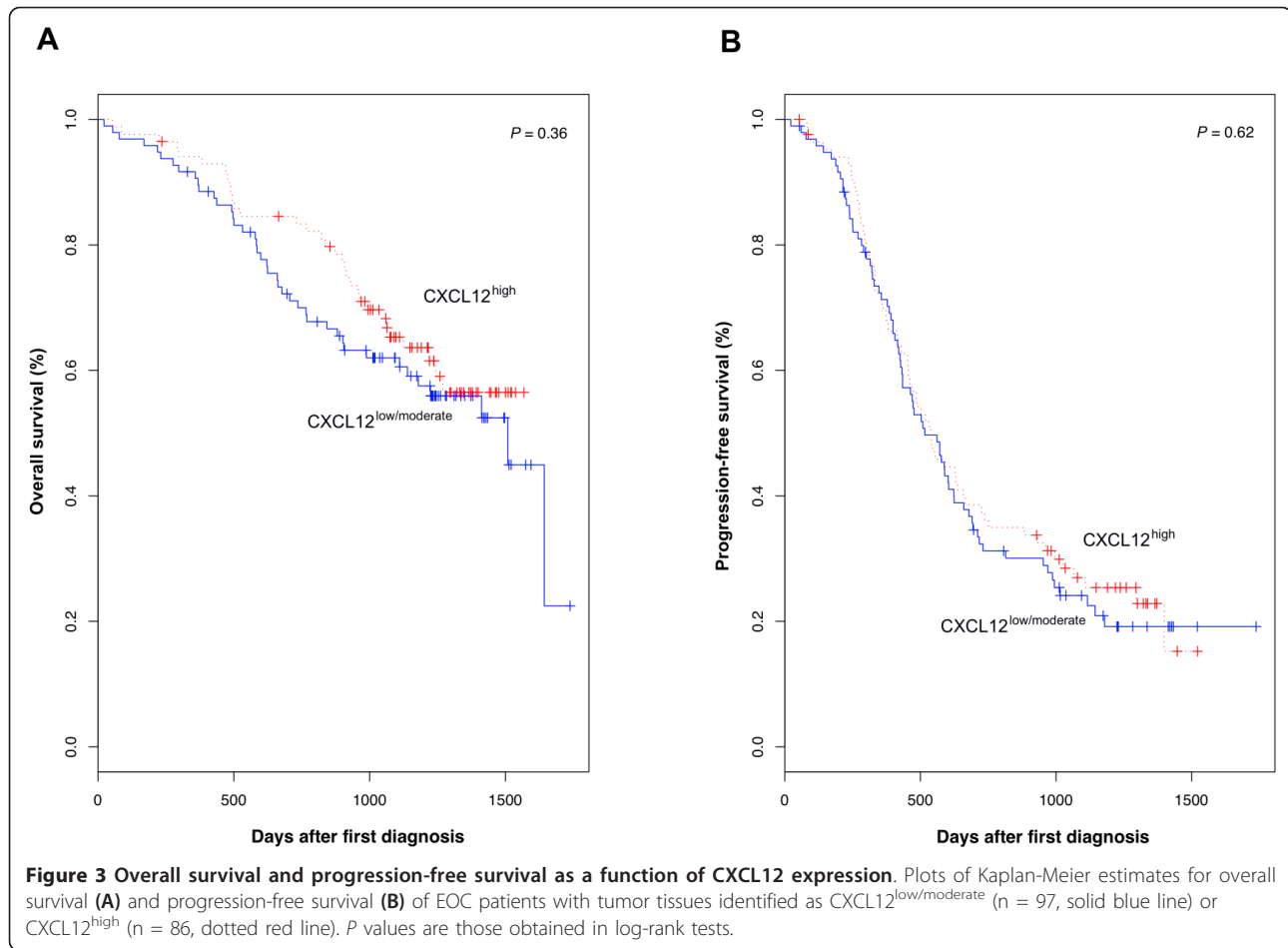
survival [16,18-20,44], to promote angiogenesis [17], to inhibit the host immune response [15] and to mediate resistance to hyperthermic intraperitoneal chemotherapy [45], which may favor tumor growth and spread. This apparent paradox may be explained by the cellular expression of CXCL12 not providing a true reflection of its bioavailability, which depends principally on the presence in the tumor microenvironment of factors capable of disrupting CXCL12 from glycosaminoglycans [46].

Moreover, CXCL12 activity may be mediated by two receptors, CXCR4 and CXCR7, and these receptors may also be rate-limiting elements. For many years, CXCL12 and CXCR4 were thought to act as an exclusive non redundant pair. However, the recent identification of RDC1/CXCR7 as a second receptor for CXCL12 has challenged this view, and we now need to determine the respective contributions of CXCR4 and CXCR7 to the homeostatic and pathological activities of CXCL12

**Table 2 Hazard ratios for OS and PFS of 183 patients with EOC after univariate COX regression analysis of CXCL12 abundance and clinical and pathologic features**

	Overall survival		Progression-free survival	
	HR <sup>a</sup> [95% CI <sup>b</sup> ]	P value	HR [95% CI]	P value
CXCL12 (5-7) vs (0-4)	0.80 [0.51-1.28]	0.36	0.91 [0.65-1.29]	0.62
HER2 Positive vs negative	1.41 [0.68-2.90]	0.36	1.45 [0.84-2.51]	0.18
Age >60 vs ≤60 years	1.40 [0.99-1.97]	<0.057	1.17 [0.90-1.51]	0.22
Performance status 1+2 vs 0	1.72 [1.20-2.48]	<0.003	1.45 [1.11-1.88]	<0.005
FIGO stage III+IV vs I+II	5.55 [2.27-13.60]	<0.0002	4.43 [2.65-7.39]	<0.0001
Ascites Presence vs absence	3.33 [2.16-5.14]	<0.0001	2.29 [1.71-3.05]	<0.0001
Residual tumor after initial laparotomy >1 cm vs ≤1 cm	1.72 [1.03-2.88]	<0.04	1.97 [1.36-2.87]	<0.0004

<sup>a</sup>Hazard ratio. <sup>b</sup>95% confidence interval.



[47-49]. The emerging possibility that CXCR7 acts as a decoy receptor provides further support for a potential role in EOC. Finally, the lack of influence of CXCL12 may reflect the unusual characteristics of metastases, predicting the occurrence of which is one of the major challenges in efforts to improve the clinical outcome of EOC. By contrast to breast cancer, in which distant metastases to the liver, lung and bone marrow are favored by high levels of CXCL12 expression in target organs and lower levels within the tumor [50], EOC spreads by the direct seeding of tumor cells into the peritoneal cavity, with preferential metastasis to local lymph nodes. In EOC, CXCL12 mRNA and protein have been detected mostly in the tumor cells themselves, and this feature has been reported for other cancers, including follicular lymphoma, pancreatic cancer, glioma and astrocytoma [10]. Ovarian epithelial tumor cells constitute a potent source of CXCL12. CXCL12 may therefore retain tumor cells at the site of production, rather than encouraging them to disseminate and to form secondary tumors in organs at some distance from the original tumor.

## Conclusions

Our findings highlight the previously unappreciated constitutive expression of CXCL12 by healthy epithelia of the ovary surface and the fallopian tubes, both these epithelia having been identified as probably sources of EOC. Thus, CXCL12 is expressed by epithelial cells before they become malignant. We also show that the level of CXCL12 expression in cancer cells is not a valuable prognostic factor in patients with advanced EOC. These findings do not exclude the possibility that CXCL12 contributes to tumor growth and spread via autocrine and/or paracrine action. There is therefore a need to determine whether CXCL12 status in EOC depends on its bioavailability and on the CXCR4/CXCR7 ratio in tumor cells, which would support an effect of CXCL12.

## List of abbreviations used

CI: Confidence interval; EOC: Epithelial ovarian cancer; FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics; HR: Hazard ratio; IHC: Immunohistochemistry; OS: Overall survival; OSE: Ovarian surface epithelium; PFS: Progression-free survival; SDF-1: Stromal cell-derived factor-1; TCG:

paclitaxel/carboplatin/gemcitabine; TMA: Tissue microarray; VEGF: vascular endothelium growth factor.

#### Acknowledgements and Funding

This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, grant number 4982), by Assistance-Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP, grant number 07018), Université Paris-Sud 11, and by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). Tumor collection was supported by GINECO (ARCAGY).

We thank P. Laurent and B. N'Guyen, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, AP-HP, Université Paris-Sud 11, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France, for technical assistance.

#### Author details

<sup>1</sup>INSERM UMR\_S 996, Université Paris-Sud 11, Clamart, 92140 France. <sup>2</sup>JE2492, Assistance-Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Paris-Sud 11, Villejuif, 94800 France. <sup>3</sup>Cabinet de Pathologie Tolbiac, Paris, 75013 France. <sup>4</sup>Service d'Oncologie médicale, AP-HP, Université Paris Descartes, Hôpital Hôtel-Dieu, Paris, 75001 France. <sup>5</sup>Centre Claudius Regaud, Toulouse, 33000 France. <sup>6</sup>INSERM U819, Laboratoire de Pathogénie Virale, Institut Pasteur, Paris, 75015 France. <sup>7</sup>Service de Microbiologie-Immunologie Biologique, AP-HP, Université Paris-Sud 11, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, 92140 France. <sup>8</sup>Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, AP-HP, Université Paris-Sud 11, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, 92140 France.

#### Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: VM, KB. Performed the experiments: FG, SN, LBD. Analyzed the data: VM, SCB, PB, SP, KB. Contributed reagents/materials/analysis tools: SCB, SP, EPL, JA, LG, FAS. Wrote the paper: VM, SCB, PB, KB. Provided funding: DE, KB. All authors read and approved the final manuscript.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 28 October 2010 Accepted: 16 March 2011

Published: 16 March 2011

#### References

1. Permeth-Wey J, Sellers TA: **Epidemiology of ovarian cancer.** *Methods Mol Biol* 2009, **472**:413-437.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ: **Cancer statistics, 2008.** *CA Cancer J Clin* 2008, **58**(2):71-96.
3. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG: **Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up.** *Cancer* 1998, **82**(5):893-901.
4. Shih Ie M, Kurman RJ: **Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis.** *Am J Pathol* 2004, **164**(5):1511-1518.
5. Zorn KK, Bonome T, Gangi L, Chandramouli GV, Awtrey CS, Gardner GJ, Barrett JC, Boyd J, Birrer MJ: **Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(18):6422-6430.
6. Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, et al: **Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies.** *PLoS Med* 2008, **5**(12):e232.
7. Song H, Ramus SJ, Tyrer J, Bolton KL, Gentry-Maharaj A, Wozniak E, Anton-Culver H, Chang-Claude J, Cramer DW, DiCiccio R, et al: **A genome-wide association study identifies a new ovarian cancer susceptibility locus on 9p22.2.** *Nat Genet* 2009, **41**(9):996-1000.
8. Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, Misk DE, Wu R, Zhai Y, Darrach DM, et al: **Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas.** *Cancer Res* 2002, **62**(16):4722-4729.
9. White NM, Mathews M, Yousef GM, Prizada A, Popadiuk C, Dore JJ: **KLK6 and KLK13 predict tumor recurrence in epithelial ovarian carcinoma.** *Br J Cancer* 2009, **101**(7):1107-1113.
10. Balkwill F: **Cancer and the chemokine network.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(7):540-550.
11. Barbieri F, Bajetto A, Florio T: **Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target.** *J Oncol* 2010, **2010**:426956.
12. Lazennec G, Richmond A: **Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation.** *Trends Mol Med* 2010, **16**(3):133-144.
13. Wilson J, Balkwill F: **The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment.** *Semin Cancer Biol* 2002, **12**(2):113-120.
14. Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W: **Stromal derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **292**:C987-95.
15. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermine A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselini I, Gordon A, et al: **Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells.** *Nat Med* 2001, **7**(12):1339-1346.
16. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G, Balkwill FR: **Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer.** *Cancer Res* 2002, **62**(20):5930-5938.
17. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, et al: **CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers.** *Cancer Res* 2005, **65**(2):465-472.
18. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR: **Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors?** *Cancer Res* 2001, **61**(13):4961-4965.
19. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F: **Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma.** *Int J Cancer* 2008, **122**(1):91-99.
20. Barbolina MV, Kim M, Liu Y, Shepard J, Belmadani A, Miller RJ, Shea LD, Stack MS: **Microenvironmental regulation of chemokine (C-X-C-motif) receptor 4 in ovarian carcinoma.** *Mol Cancer Res* 2010, **8**(5):653-664.
21. Pils D, Pinter A, Reibenwein J, Alfanz A, Horak P, Schmid BC, Hefler L, Horvat R, Reinthaller A, Zeillinger R, et al: **In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway.** *Br J Cancer* 2007, **96**(3):485-491.
22. Jiang YP, Wu XH, Shi B, Wu WX, Yin GR: **Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression.** *Gynecol Oncol* 2006, **103**(1):226-233.
23. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC: **Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology.** *Endocr Rev* 2001, **22**(2):255-288.
24. Karst AM, Drapkin R: **Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution.** *J Oncol* 2010, **2010**:932371.
25. Camilleri-Broet S, Hardy-Bessard AC, Le Tourneau A, Paraiso D, Levrel O, Leduc B, Bain S, Orfeuvre H, Audouin J, Pujade-Lauraine E: **HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group.** *Ann Oncol* 2004, **15**(1):104-112.
26. Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Broet P, Guastalla JP, Allouache D, Combe M, Weber B, Pujade-Lauraine E, et al: **HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients.** *PLoS One* 2007, **2**(11):e1138.
27. du Bois A, Herrstedt J, Hardy-Bessard AC, Muller HH, Harter P, Kristensen G, Joly F, Huober J, Avall-Lundqvist E, Weber B, et al: **Phase III trial of carboplatin plus paclitaxel with or without gemcitabine in first-line treatment of epithelial ovarian cancer.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:4162-4169.
28. Drapkin R, Crum CP, Hecht JL: **Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia.** *Hum Pathol* 2004, **35**(8):1014-1021.
29. Redjimi N, Gaudin F, Touboul C, Emilie D, Pallardy M, Biola-Vidamment A, Fernandez H, Prevot S, Balabanian K, Machelon V: **Identification of glucocorticoid-induced leucine zipper as a key regulator of tumor cell proliferation in epithelial ovarian cancer.** *Mol Cancer* 2009, **8**:83.
30. Coulomb-L'Hermine A, Amara A, Schiff C, Durand-Gasselini I, Fousat A, Delaunay T, Chaouat G, Capron F, Ledee N, Galanaud P, et al: **Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis:**

- expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**(15):8585-8590.
31. Balabanian K, Couderc J, Bouchet-Delbos L, Amara A, Berrebi D, Fousat A, Baleux F, Portier A, Durand-Gasselino I, Coffman RL, et al: **Role of the chemokine stromal cell-derived factor 1 in autoantibody production and nephritis in murine lupus.** *J Immunol* 2003, **170**(6):3392-3400.
  32. Kryczek I, Frydman N, Gaudin F, Krzysiek R, Fanchin R, Emilie D, Chouaib S, Zou W, Machelon V: **The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to T lymphocyte recruitment in human pre-ovulatory follicles and coordinates with lymphocytes to increase granulosa cell survival and embryo quality.** *Am J Reprod Immunol* 2005, **54**(5):270-283.
  33. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA: **Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion.** *Cell* 2005, **121**(3):335-348.
  34. Levanon K, Ng V, Piao HY, Zhang Y, Chang MC, Roh MH, Kindelberger DW, Hirsch MS, Crum CP, Marto JA, et al: **Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis.** *Oncogene* 2010, **29**(8):1103-1113.
  35. Naora H, Montell DJ: **Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**(5):355-366.
  36. Wendt MK, Johanesen PA, Kang-Decker N, Binion DG, Shah V, Dwinell MB: **Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis.** *Oncogene* 2006, **25**(36):4986-4997.
  37. Zhou W, Jiang Z, Liu N, Xu F, Wen P, Liu Y, Zhong W, Song X, Chang X, Zhang X, et al: **Down-regulation of CXCL12 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with metastatic progression in human breast carcinomas.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2009, **135**(1):91-102.
  38. Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S: **Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma.** *Am J Clin Pathol* 2009, **132**(2):202-210.
  39. Liang JJ, Zhu S, Bruggeman R, Zaino R, Evans D, Fleming JB, Gomez HF, Zander DS, Wang H: **High levels of expression of human stromal cell-derived factor-1 are associated with worse prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**(10):2598-2604.
  40. Hassan S, Ferrario C, Saragovi U, Quenneville L, Gaboury L, Baccarelli A, Salvucci O, Basik M: **The influence of tumor-host interactions in the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 ligand/receptor axis in determining metastatic risk in breast cancer.** *Am J Pathol* 2009, **175**(1):66-73.
  41. Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Okumura H, Setoyama T, Uchikado Y, Kita Y, Tamotsu K, Hanazono K, et al: **Expression of CXCL12 and its receptor CXCR4 in esophageal squamous cell carcinoma.** *Oncol Rep* 2009, **21**(1):65-71.
  42. Gelmini S, Mangoni M, Castiglione F, Beltrami C, Pieralli A, Andersson KL, Fambrini M, Taddei GL, Serio M, Orlando C: **The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer.** *Clin Exp Metastasis* 2009, **26**(3):261-268.
  43. Gilbert DC, Chandler I, McIntyre A, Goddard NC, Gabe R, Huddart RA, Shipley J: **Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents.** *J Pathol* 2009, **217**(1):94-102.
  44. Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, Zona GL, Spaziantie R, Florio T, Schettini G: **Stromal cell-derived factor 1 alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt.** *Cancer Res* 2003, **63**(8):1969-1974.
  45. Lis R, Touboul C, Mirshahi P, Ali F, Mathew S, Nolan DJ, Maleki TM, Abdalla SA, Raynaud CM, Querleu D, et al: **Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12.** *Int J Cancer* 2010, **128**:715-725.
  46. Laguri C, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H: **Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines—the CXCL12 example.** *Carbohydr Res* 2008, **343**(12):2018-2023.
  47. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F: **The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes.** *J Biol Chem* 2005, **280**(42):35760-35766.
  48. Thelen M, Thelen S: **CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio ?** *J Neuroimmunol* 2008, **198**(1-2):9-13.
  49. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, et al: **A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development.** *J Exp Med* 2006, **203**(9):2201-2213.
  50. Mirisola V, Zuccarino A, Bachmeier BE, Sormani MP, Falter J, Nerlich A, Pfeffer U: **CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival.** *Eur J Cancer* 2009, **45**(14):2579-2587.

#### Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/97/prepub>

doi:10.1186/1471-2407-11-97

Cite this article as: Machelon et al.: CXCL12 expression by healthy and malignant ovarian epithelial cells. *BMC Cancer* 2011 **11**:97.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



**Expression et rôle du récepteur CXCR7 dans le cancer  
épithélial de l'ovaire**

---

## II. Expression et rôle du récepteur CXCR7 dans le cancer épithélial de l'ovaire

### A- LE POINT SUR LA QUESTION

Le cancer épithélial de l'ovaire (CEO) est une cause majeure de mortalité par cancer gynécologique et se situe au sixième rang des néoplasies féminines. Il reste globalement une cause majeure de mortalité par cancer gynécologique (Jemal, Siegel et al. 2008). Ceci est principalement dû au fait que ces cancers sont souvent diagnostiqués tardivement (stades FIGO 3 et 4), ce qui rend difficile leur traitement. Plusieurs études impliquent les chimiokines et leurs récepteurs dans la progression de ces tumeurs malignes. Il a été montré le rôle important de SDF-1 dans la métastase, la prolifération et l'angiogenèse des différentes variétés de cancers comme le cancer de la prostate, le cancer du poumon, le cancer pancréatique (Sun, Cheng et al. 2010). En collaboration avec le Pr. W. Zou, l'équipe de Dr. V. Machelon a montré que la chimiokine SDF-1, produite par les cellules tumorales, contrôle la réponse anti-tumorale de l'hôte et participe au développement de la néovascularisation tumorale des tumeurs épithéliales des ovaires (Zou, Machelon et al. 2001; Kryczek, Lange et al. 2005). L'activité biologique de SDF-1 est médiée par l'interaction avec ses deux récepteurs, CXCR4 et CXCR7. Le récepteur CXCR4 est le premier et le plus connu des deux récepteurs de SDF-1. Son rôle dans le développement des tumeurs et l'apparition des métastases a été largement étudié. Dans le CEO, le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle important dans l'angiogenèse et dans la croissance de la tumeur (Kryczek, Lange et al. 2005; Porcile, Bajetto et al. 2005). CXCR7 est le second récepteur de SDF-1 tout récemment identifié et cloné (Balabanian, Lagane et al. 2005). Selon des publications récentes, CXCR7 est impliqué dans l'angiogenèse tumorale (Raggo, Ruhl et al. 2005; Miao, Luker et al. 2007), dans le développement des tumeurs du sein et du poumon (Miao, Luker et al. 2007) et dans l'apparition des métastases des cancers de la prostate (Wang, Dai et al. 2007). Jusqu'à ce jour, rien n'a été publié concernant l'expression et l'impact de CXCR7 dans les tumeurs ovariennes. Etant donné le rôle clef joué par la chimiokine SDF-1 dans le développement des tumeurs épithéliales des ovaires et le rôle du CXCR7 dans la tumorigenèse, il apparaît essentiel d'évaluer l'expression de CXCR7 dans les tumeurs épithéliales des ovaires et de

déterminer son rôle dans l'évolution des tumeurs. CXCR4 et CXCR7 sont souvent co-exprimés par une même cellule et peuvent interagir via la formation d'hétérodimères au sein desquels CXCR7 module les voies de signalisation médiées par CXCR4 (Sierro, Biben et al. 2007; Levoye, Balabanian et al. 2009). Dans le cancer du sein, la phosphorylation de CXCR4 serait induite par la co-expression de CXCR4 et de CXCR7 (Hassan, Ferrario et al. 2009). D'où l'importance de rechercher les interactions entre CXCR4 et CXCR7 et l'impact de CXCR7 sur les propriétés biochimiques de CXCR4 dans les cellules tumorales. Ce travail pourrait contribuer au développement de thérapies ciblées permettant la mise en place de traitements à la fois plus spécifiques et plus efficaces susceptibles d'améliorer la survie des patientes.

## B- LES OBJECTIFS

Ce projet centré sur l'étude de l'expression et de l'impact du récepteur CXCR7 dans les cancers épithéliaux de l'ovaire, s'articule autour de 4 objectifs:

1) Quantifier *in situ* l'expression cellulaire de CXCR7 révélée par immunohistochimie (IHC) dans des échantillons de tissu tumoral prélevés sur des patientes avec un diagnostic de cancer épithélial des ovaires, et corrélér ces données avec divers paramètres cliniques, histologiques et biologiques.

Pour cet objectif :

- Nous quantifierons par IHC l'expression de CXCR7 et de CXCR4 sur des coupes de fragments de tumeurs inclus en paraffine, par l'attribution de "scores" selon une méthodologie déjà utilisée dans les articles ci-joints.
- On comparera l'expression de CXCR7 dans les tissus sains et les tissus tumoraux.
- L'expression de CXCR7 sera corrélée à un certain nombre de paramètres clinico-pathologiques (age des patientes, stade FIGO qui mesure l'extension de la tumeur, grade, index de prolifération, survie des patientes).
- Nous analyserons la distribution de CXCR7 dans les différents types histologiques actuellement identifiés (séreux, mucineux, endométrioïdes, cellules claires et indifférenciées) et considérés comme des entités spécifiques avec un profil et des valeurs pronostiques

différentes (Kobel, Kalloger et al. 2008). Nous corrèlerons également l'expression de CXCR7 avec divers paramètres biologiques liés à la prolifération et la survie, tels que la forme phosphorylée de AKT (P-AKT), l'indice de prolifération Ki-67 et GILZ (Redjimi, Gaudin et al. 2009) et l'apoptose cellulaire mesurée par la technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling), cette technique permet la détection de la fragmentation de l'ADN.

- Comparer l'expression de CXCR7 à l'expression de CXCR4 et voir si le rapport CXCR4/CXCR7 peut être corrélé à des paramètres cliniques.

**2) Déterminer le rôle de CXCR7 sur la prolifération et la survie des cellules épithéliales de l'ovaire en réponse à CXCL12.**

Pour cet objectif, nous induirons la surexpression (ADNc) ou l'extinction (shRNA) stable de CXCR7 dans les 3 lignées cellulaires (SKOV-3, OVCAR-3, BG-1) par transduction lentivirale. Dans ces lignées transduites, nous mesurerons l'impact de CXCR7 sur la prolifération (par la technique d'incorporation de thymidine tritiée) et sur l'apoptose (par le marquage par l'Annexine-V/Iodure de Propidium et de la carbocyanine DIOC6(3), mesurées par la cytométrie en flux et par mesure de la formes actives des caspases comme les caspases 3, 8 et 9 par Western blot) en réponse à CXCL12.

**3) Rechercher les interactions entre CXCR4 et CXCR7 et l'impact de CXCR7 sur les propriétés biochimiques de CXCR4 dans les cellules tumorales.**

Pour cet objectif, nous évaluerons par co-immunoprécipitation (co-IP) et par Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET), la capacité des 2 récepteurs à former des hétérodimères. Nous évaluerons les effets de l'augmentation ou de la diminution de l'expression de CXCR7 sur les propriétés biochimiques et l'expression de CXCR4 dans les 3 lignées cellulaires transduites (OVCAR-3 et SKOV-3 et BG-1).

**4) Déterminer *in vivo* l'impact de CXCR7 sur la croissance de la tumeur et son pouvoir invasif dans un modèle de xéno greffe sur des souris athymiques (Nude).**



## C-RESULTATS PRELIMINAIRES

### C.1. Quantification de l'expression de CXCR7 et de CXCR4 dans les tissus tumoraux et dans les lignées cancéreuses

#### C.1.1. Quantification des transcrits

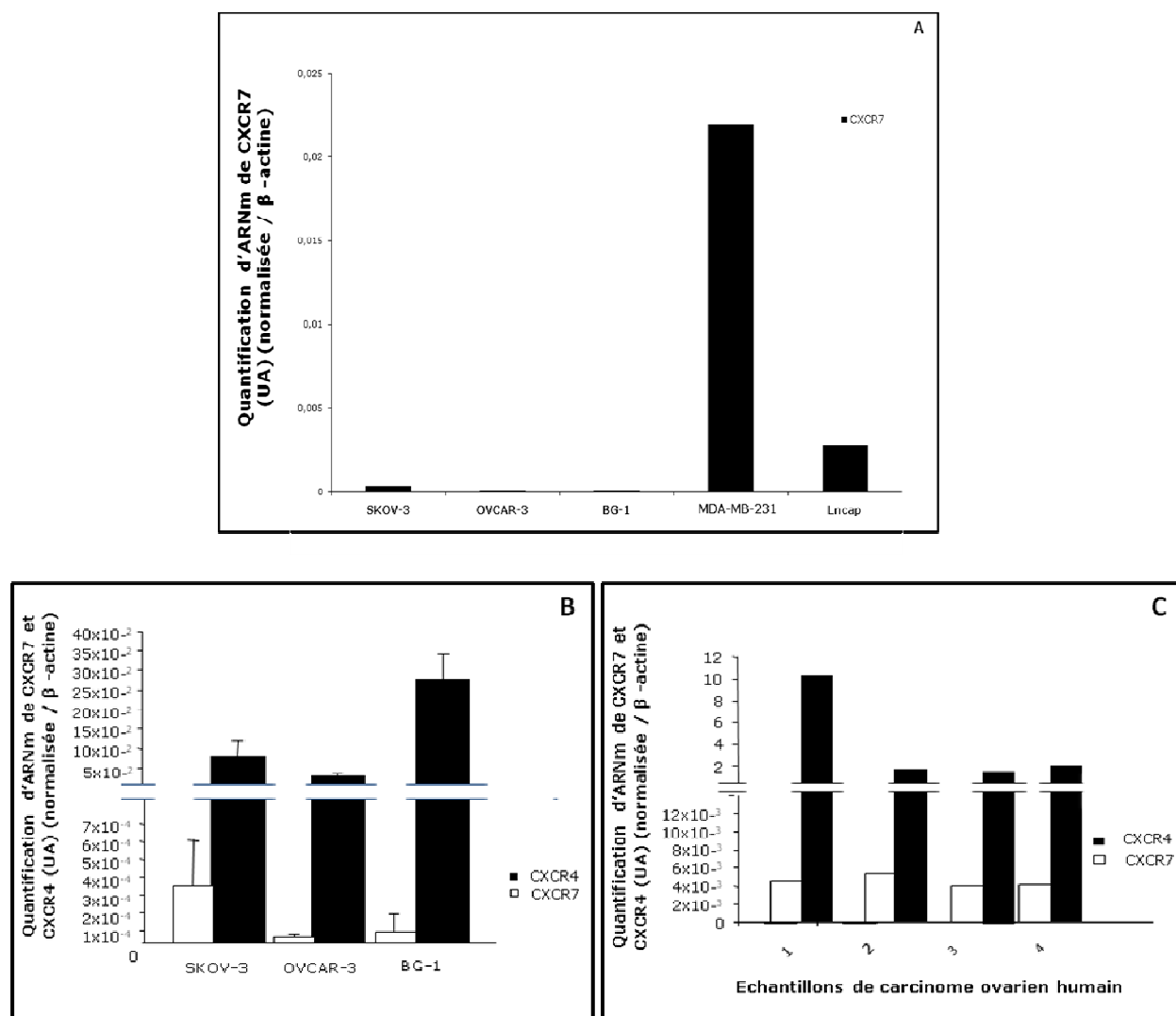
Nous avons quantifié l'expression transcriptionnelle (ARNm) de CXCR7 dans les 3 lignées du CEO (OVCAR-3 et SKOV-3 et BG-1), dans la lignée du cancer du sein (MDA-MB-231) et dans la lignée du cancer de la prostate (LNCaP) par PCR en temps réel (voir le protocole dans les articles ci-joints). Nous avons également quantifié l'expression transcriptionnelle de CXCR4 dans les 3 lignées du CEO et l'expression transcriptionnelle de CXCR4 et de CXCR7 dans 4 échantillons de tumeurs épithéliales de l'ovaire. Les amorces pour les récepteurs CXCR4 et CXCR7, la taille des transcrits et la température d'hybridation sont décrits dans le **tableau 1**.

**Tableau 1 :**

Gènes	Amorces	Taille du fragment	Températures d'hybridation
<b>CXCR4</b>	Sens : GAG CGC TAC CTG GCC ATC Antisens : GGC AGC CAA CAG GCG AAG A	365 pb	60°C
<b>CXCR7</b>	Sens : TGC ATC TCT TCG ACT ACT CAG A Anti-sens : GGC ATG TTG GGA CAC ATC AC	231 pb	60°C

L'expression d'ARNm de CXCR7 est 63 fois plus exprimée dans la lignée du cancer du sein MDA-MB-231 et 6 fois plus exprimé dans la lignée du cancer de la prostate en comparaison avec la lignée du cancer d'ovaire SKOV-3 et cette différence est beaucoup plus importante par comparaison avec les lignées OVCAR-3 et BG-1 (Figure 1 A).

Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les 3 lignées (SKOV-3, OVCAR-3, BG-1) pour les récepteurs CXCR4 et CXCR7 (Figure 1 B). Ainsi, nous avons trouvé que les variations d'expression d'ARNm de CXCR4 par rapport à CXCR7 dans 4 échantillons de carcinome ovarien (Figure 1 C) reflètent ce que nous avons trouvé dans les 3 lignées du CEO (voir le tableau 2).



**Figure 1: Quantification de l'expression des ARNm de CXCR4 et de CXCR7 dans les tumeurs épithéliales ovariennes malignes.** A) Quantification par PCR en temps réel des ARNm de CXCR4 et CXCR7 dans 3 lignées cellulaires du cancer épithélial de l'ovaire (SKOV-3, OVCAR-3 et BG1), moyenne de 3 expériences  $\pm$  écartype de la moyenne. B) Quantification de l'expression des ARNm de CXCR4 et CXCR7 dans 4 échantillons du cancer épithélial ovarien humain. C) Quantification de l'expression d'ARNm de CXCR7 dans 3 lignées cancéreuses ovariennes (SKOV-3, OVCAR-3, BG-1), dans la lignée du cancer du sein (MDA-MB-231) et dans la lignée du cancer de la prostate (LNCaP). L'expression des ARNm de CXCR4 et CXCR7 est normalisée par rapport à celle de la  $\beta$ -actine.

**Tableau 2 :**

Lignées du CEO	Rapport d'ARNm de CXCR4/CXCR7	Echantillons de CEO	Rapport d'ARNm de CXCR4/CXCR7
SKOV-3	223	1	2300
OVCAR-3	400	2	290
BG-1	2700	3	470
		4	470

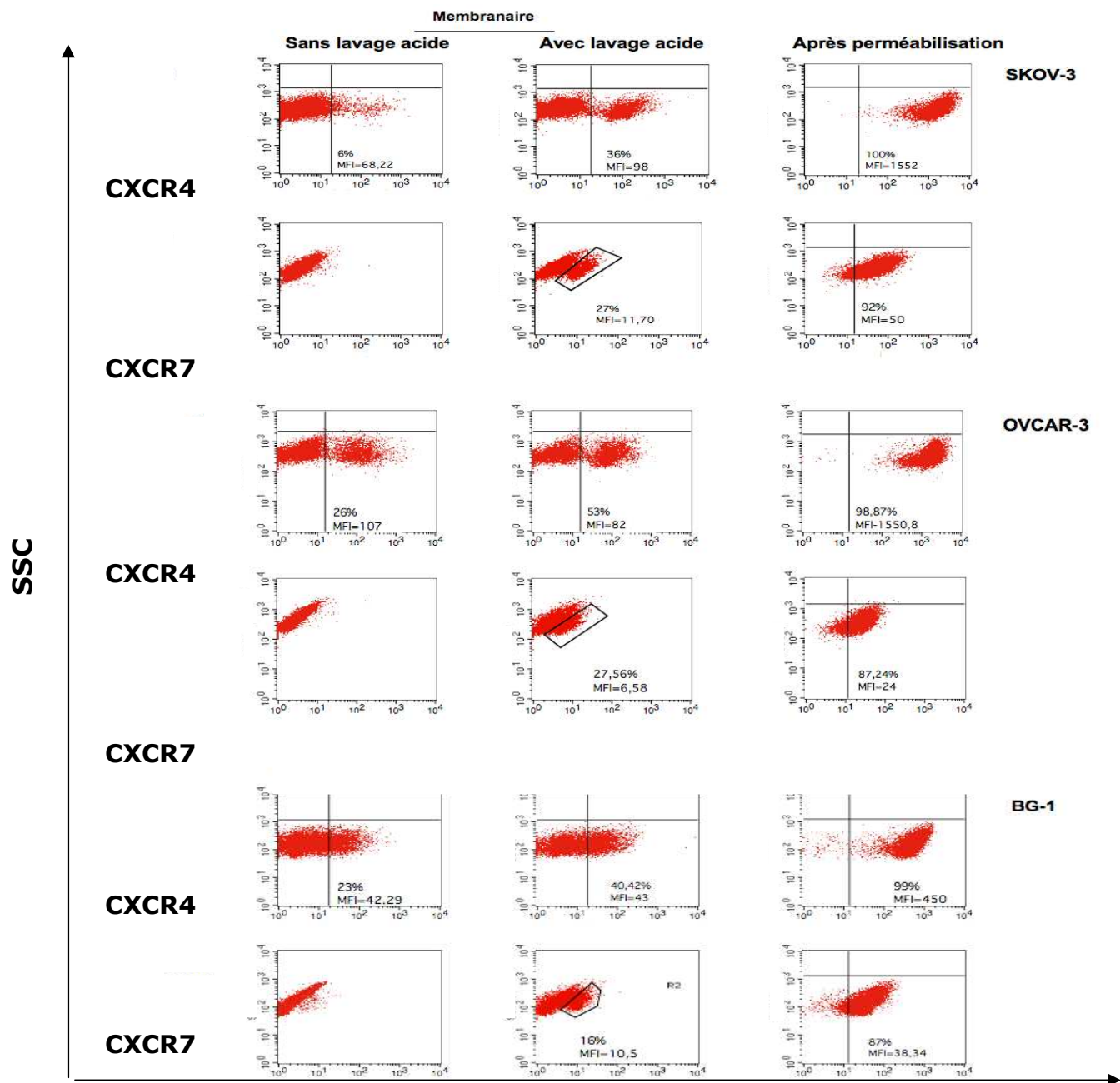
### C.1.2. Quantification de l'expression cellulaire

Pour confirmer le résultat obtenu par PCR en temps réel, nous avons étudié l'expression cellulaire, membranaire et intracellulaire, du CXCR7 et CXCR4 dans les 3 lignées cancéreuses par cytométrie en flux (voir le protocole dans l'article 2). Le récepteur CXCR4 est détecté par l'anticorps monoclonal anti-CXCR4-APC (anticorps IgG1-APC est utilisé comme un isotype contrôle de l'anticorps CXCR4-APC), le récepteur CXCR7 est détecté par l'anticorps primaire monoclonal anti-CXCR7 suivi d'anticorps secondaire polyclonal fluorescent conjugué au PE (anticorps IgG2a est utilisé comme un isotype contrôle de l'anticorps CXCR7). Les anticorps utilisés dans la cytométrie en flux sont décrit dans le **tableau 3**.

**Tableau 3 :**

Anticorps	Espèces	Types	Concentration utilisé	Fournisseur
CXCR4-APC	Souris	Monoclonal	10µg/ml	BD Pharmingen <sup>TM</sup> Référence : 555976
IgG1-APC (isotype contrôle de l'anticorps CXCR4-APC)	Souris	Monoclonal	10µg/ml	BD Pharmingen <sup>TM</sup> Référence : 349040
CXCR7	Souris	Monoclonal	10µg/ml	Donné par l'institut pasteur
IgG2a (isotype contrôle de l'anticorps CXCR7)	Souris	Monoclonal	10µg/ml	BD Pharmingen <sup>TM</sup> Référence : 555576
Anticorps secondaire-PE	Chèvre	Polyclonal	1µg/ml	DakoCytomation Référence : R0480

Les résultats montrent que l'expression membranaire des deux récepteurs augmente après un lavage acide (qui sépare le ligand de son récepteur) (Figure 2). De plus l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de CXCR4 membranaire est plus importante que celle de CXCR7 (il est d'un facteur 8 dans SKOV-3, d'un facteur 12 dans OVCAR-3 et d'un facteur 4 dans BG-1) (Figure 2). Après perméabilisation, la MFI de CXCR4 et de CXCR7 dans les 3 lignées cancéreuses augmente à peu près d'un facteur 10 et d'un facteur de 4 respectivement par rapport au MFI membranaire. La MFI de CXCR4 après perméabilisation est nettement plus importante que celle de CXCR7 (il est d'un facteur 31 dans SKOV-3, d'un facteur 65 dans OVCAR-3 et d'un facteur 12 dans BG-1) (Figure 2). Ces résultats suggèrent que le récepteur CXCR4 (expression membranaire et intracellulaire) est plus exprimé que le récepteur CXCR7 et qu'il existe une petite quantité de ces 2 récepteurs à la membrane qui peuvent fixer leur ligand.



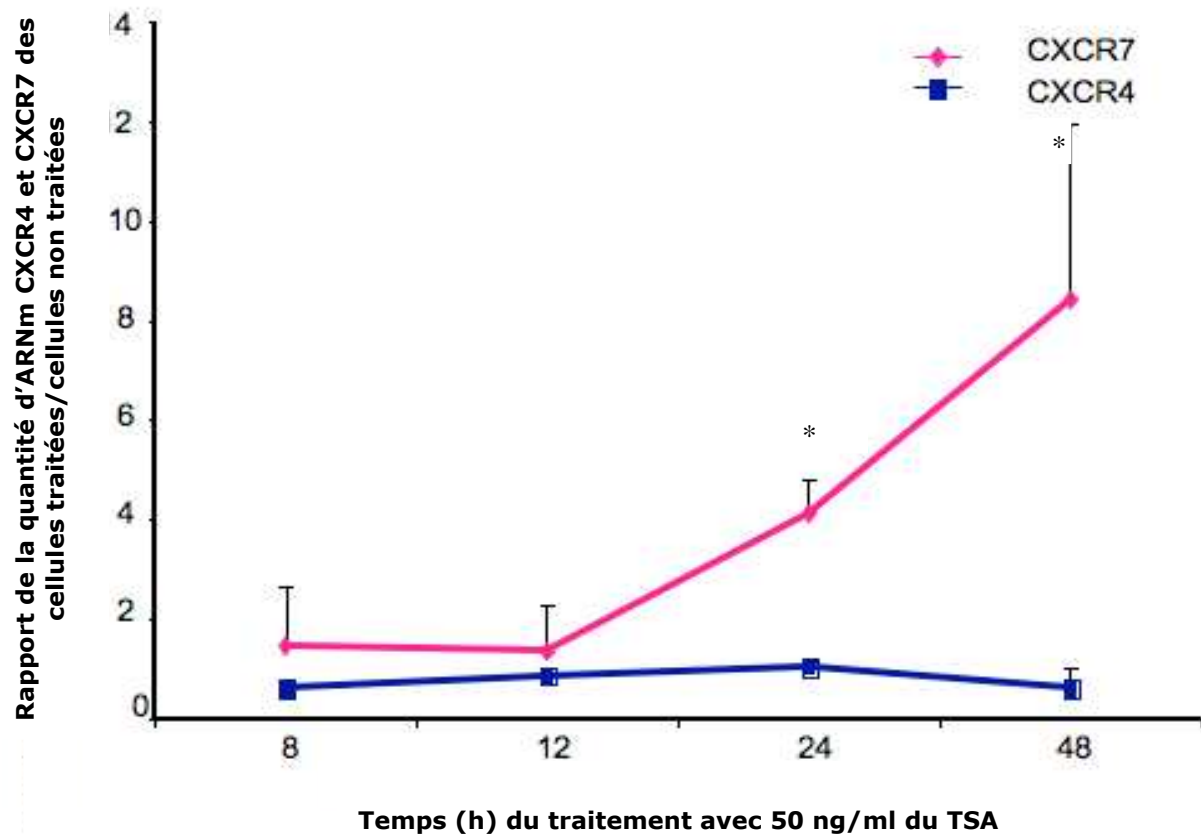
### La mesure de l'intensité de fluorescence

**Figure 2 : Quantification de l'expression cellulaire de CXCR4 et de CXCR7 dans les lignées du CEO (SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1).** Quantification par cytométrie en flux de l'expression de CXCR4 et de CXCR7 dans 3 lignées cellulaires. Première colonne : quantification l'expression membranaire de CXCR4 et CXCR7 en absence de lavage acide ; deuxième colonne : quantification l'expression membranaire de CXCR4 et CXCR7 en présence de lavage acide; troisième colonne : quantification l'expression des deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 après perméabilisation cellulaire. MFI= Median Fluorescence Intensities (intensité moyenne de fluorescence). SSC (Side Scatter), mesure la granularité des cellules.

## **C.2. Étude du mécanisme de régulation**

### **Effet du TSA sur l'expression de CXCR7 et de CXCR4**

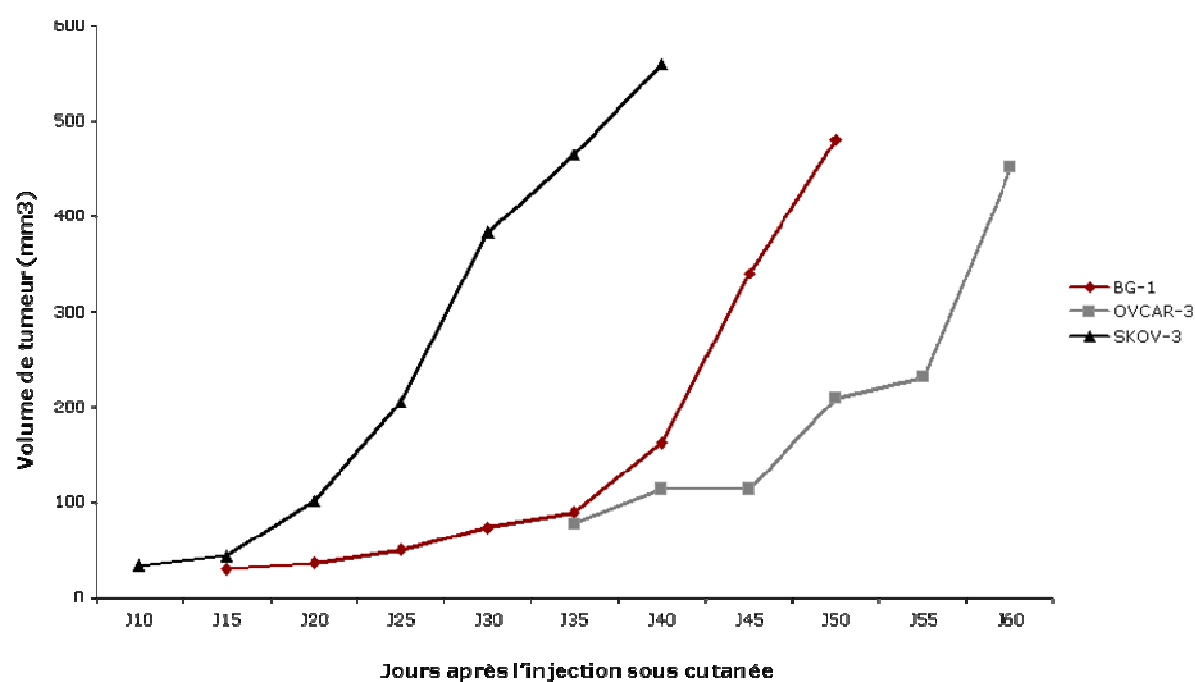
Il est connu que l'expression des gènes peut être régulée par des mécanismes épigénétiques (acétylation/déacétylation, méthylation/déméthylation, phosphorylation/déphosphorylation...) faisant intervenir des modifications de l'organisation de la chromatine (Illi, Scopece et al. 2005; Matouk and Marsden 2008). Ainsi, l'acétylation est connue pour rendre active des régions transcriptionnellement silencieuses. Nous avons voulu analyser si la faible expression de CXCR7 dans le CEO passe par une régulation épigénétique du gène de CXCR7? En particulier, une modification du niveau d'acétylation des histones pourrait éventuellement corrélérer avec une modification du niveau d'expression de CXCR7. Basée sur ce principe, on traite les cellules avec trichostatin A (TSA) qui est un inhibiteur de déacétylation des histones (HDAC). Cette molécule inhibe l'activité des HDACs, et permet l'augmentation de l'état acétylé de la chromatine. Nous avons mesuré l'expression d'ARNm de CXCR7 et du CXCR4 par PCR en temps réel en traitant la lignée BG-1 avec 50 ng/ml du TSA pendant 8, 12, 24, 48h. Les résultats montrent une augmentation significative de l'expression d'ARNm de CXCR7 dans la lignée BG-1 après 24 h (4 fois plus exprimé) et 48 h (8 fois plus exprimé) de traitement (Figure 3). En parallèle, l'expression d'ARNm de CXCR4 ne change pas dans les cellules traitées à la TSA (Figure 3). Ce qui suggère que la faible expression de CXCR7 dans le CEO peut être contrôlée par des mécanismes épigénétiques d'acétylation/déacétylation.



**Figure 3: Le traitement avec le TSA augmente l'expression d'ARNm de CXCR7 dans les cellules BG-1.** Les cellules BG-1 ont été cultivées dans un milieu de culture complet : DMEM sans rouge phénol contenant 1% de sérum, et incubées en présence de 50 ng/ml de TSA pendant 8h, 12h, 24h et 48h. La quantification des transcrits de CXCR4 et CXCR7 a été effectuée par PCR en temps réel et normalisée aux transcrits de  $\beta$ -actine. Les résultats représentent le facteur d'augmentation d'expression de transcrit de CXCR4 et CXCR7 par rapport au contrôle (cellules non traitées). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écartype de la moyenne de trois expériences indépendantes. \* $P < 0,05$  (t test student).

### **C. 3. Mise en point du modèle de xéno greffe pour les 3 lignées du cancer épithélial de l'ovaire (SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1)**

Nous avons injecté 8 millions de cellules cancéreuses (SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1) par voie sous-cutanée à des souris femelles athymiques (NUDE) âgées de 4 semaines. Nous avons observé la formation de tumeurs 2 semaines après l'injection pour les lignées SKOV-3 et BG-1 et 1 mois après l'injection pour la lignée OVCAR-3 (Figure 4). Lorsque la tumeur atteint un volume de 500 mm<sup>3</sup> on sacrifie les souris. Les résultats montrent que les modèles de xéno greffes pour les lignées SKOV-3 et BG-1 sont des bons modèles à utiliser pour étudier le rôle prolifératif du récepteur CXCR7 à cause de leur croissance tumorale rapide.



**Figure 4 : Modèles animaux NUDE du cancer épithélial de l'ovaire.** Injection sous-cutanée de 8 millions de cellules cancéreuses (SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1) par voie sous-cutanée à des souris femelles athymiques (NUDE). Le volume de la tumeur est mesuré tous les 5 jours selon la formule suivante : volume (mm<sup>3</sup>) = largeur (mm) x largeur (mm) x longueur (mm) x 0,5.



## D- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, premièrement nous avons mis en évidence, pour la première fois l'expression du récepteur CXCR7 par les cellules du cancer épithélial de l'ovaire et que cette expression (transcriptionnelle et cellulaire) est significativement plus faible que celle de CXCR4 dans 3 lignées du cancer épithélial de l'ovaire (SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1). Deuxièmement, nous avons montré pour la première fois que l'expression du récepteur CXCR7 augmente dans les cellules BG-1 traité par le TSA (inhibiteur des histones désacétylases). En parallèle, aucun effet sur CXCR4 n'a été observé. Pour confirmer ce résultat il faut étudier l'expression de CXCR7 par western blot dans les 3 lignées (SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1). Et dans un deuxième temps, pour déterminer l'efficacité du TSA, l'acétylation d'histone 3 sera analysée par western blot. Ensuite, l'activité du promoteur CXCR7 par la TSA sera étudiée par une mesure de l'activité de luciférase. Une technique de ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation) sera réalisée afin de vérifier si l'acétylation est liée au promoteur de CXCR7. Pour identifier le ou les domaines d'acétylation dans le promoteur de CXCR7 après un traitement du TSA l'activité de luciférase liée au promoteur CXCR7 sera réalisé après avoir muté les différents domaines du promoteur de CXCR7.

## **Article 2**

### **Identification of the chemokine CX<sub>3</sub>CL1 as a new mediator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian cancer**

Françoise Gaudin and **Salam Nasreddine**, Anne-Claire Donnadieu, Dominique Emilie,  
Sophie Prévot, Karl Balabanian, Véronique Machelon\*

Soumis à Molecular Cancer

---

### **III. Article 2: Identification of the chemokine CX<sub>3</sub>CL1 as a new mediator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian cancer**

Le cancer ovarien est une cause majeure de mortalité par cancer gynécologique. Les cancers épithéliaux représentent plus de 85% des cancers de l'ovaire et se situent au sixième rang des néoplasies féminines. En raison de la nature silencieuse de la maladie au stade précoce, la plupart des femmes avec du CEO sont diagnostiquées tardivement (stades FIGO 3 et 4), ce qui rend difficile leur traitement. En effet, les étapes de carcinogenèse ovarienne restent encore peu élucidées. Aussi, l'identification de molécules contribuant à la progression de ce cancer représente un enjeu majeur. Plusieurs études ont démontré les rôles des chimiokines et de leurs récepteurs dans la croissance et les métastases de diverses tumeurs épithéliales primaires.

La Fractalkine (FKN)/CX<sub>3</sub>CL1 est une chimiokine qui existe sous deux formes : membranaire et soluble, dont chacune joue un rôle différent. La FKN membranaire joue plutôt un rôle dans l'adhésion cellulaire. La FKN soluble, libérée par le clivage de la forme membranaire sous l'action de protéases, contribue à une réponse anti-tumorale par le recrutement des lymphocytes T et des cellules NK exprimant son récepteur CX<sub>3</sub>CR1. Ainsi, selon la forme membranaire ou soluble de la FKN, et selon l'expression du récepteur CX<sub>3</sub>CR1 ou l'expression de la FKN ou l'expression concomitante des deux par les cellules cancéreuses, le couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 peut avoir des effets pro ou anti-tumoraux.

L'objectif de ce travail vise à étudier l'expression de la FKN dans les cancers épithéliaux de l'ovaire et son impact sur la prolifération des cellules tumorales. L'identification de l'expression de la FKN par immunohistochimie sur des coupes de tissus provenant de 3 ovaires normaux, 8 tumeurs bénignes, 8 borderlines et 54 cancers épithéliaux de l'ovaire invasifs a montré que l'expression de la FKN préexiste à la tumorigenèse. Les niveaux d'expression de la FKN ont été corrélés positivement avec les deux marqueurs de prolifération Ki-67 (utilisé en routine comme un facteur de prolifération) et avec GILZ (Glucocorticoid-induced Leucine Zipper) qui était considéré récemment comme un facteur

prolifératif des cellules du cancer épithélial de l'ovaire (Spearman test in univariate analysis,  $P < 0,01$ ). Nous avons ensuite étudié si la production de la FKN est contrôlée par GILZ, une protéine de 17 KDa connue pour contrôler la transcription de diverses molécules. Notre étude révèle, pour la première fois que GILZ augmente l'expression de la FKN sous sa forme membranaire et sous sa forme soluble dans le CEO. Nous avons démontré que la FKN sous sa forme soluble joue un rôle clé dans la prolifération cellulaire des lignées du CEO. Nos résultats indiquent également que la FKN régule l'activation d'AKT, une molécule de voie de signalisation impliquée dans la progression tumorale.

## **Identification of the chemokine CX<sub>3</sub>CL1 as a new regulator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian cancer**

Françoise Gaudin<sup>1,\*</sup>, Salam Nasreddine<sup>1,\*</sup>, Anne-Claire Donnadieu<sup>1</sup>, Dominique Emilie<sup>1,2,†</sup>, Christophe Combadière<sup>3</sup>, Sophie Prévot<sup>4</sup>, Véronique Machelon<sup>1</sup> and Karl Balabanian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM UMR\_S996, Université Paris-Sud 11, F-92140 Clamart, France; <sup>2</sup>Service de Microbiologie-Immunologie Biologique, AP-HP, Hôpital Antoine-Béclère, F-92140 Clamart, France; <sup>3</sup>INSERM UMR\_S945, Université Pierre et Marie Curie (UPMC Univ Paris 06), Laboratory of Immunity and Infection, AP-HP, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, F-75651 Paris, France; <sup>4</sup>Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, AP-HP, Hôpital Antoine-Béclère, F-92140 Clamart, France.

\*These authors contribute equally to this work. †Deceased.

Correspondence should be addressed to Véronique Machelon, e-mail: [veronique.machelon@u-psud.fr](mailto:veronique.machelon@u-psud.fr); INSERM UMR-S996, 32 rue des Carnets, F-92140 Clamart, France; Phone: 33.(0)1.41.28.80.04; Fax: 33.(0)1.46.32.79.93.

### E-mail address:

*france.gaudin@laposte.net*

*sa.nareddine@gmail.com*

*ambre46@yahoo.com*

*christophe.combadiere@upmc.fr*

*sophie.prevot@abc.aphp.fr*

*veronique.machelon@u-psud.fr*

*karl.balabanian@u-psud.fr*

## **Abstract**

**Background:** Little is known about the molecules that contribute to the growth of epithelial ovarian carcinomas (EOC), which remain the most lethal gynecological cancer in women. The chemokine Fractalkine/CX<sub>3</sub>CL1 has been widely reported to play a biologically relevant role in tumor growth and spread. We report here the first investigation of the expression and role of CX<sub>3</sub>CL1 in EOC.

**Results:** Epithelial cells from the surface of the ovary and the Fallopian tubes and from benign, borderline and malignant tumors all stained positive for CX<sub>3</sub>CL1. In tumor specimens from 54 women who underwent surgical treatment for EOC diagnosis, CX<sub>3</sub>CL1 immunoreactivity was unevenly distributed in epithelial tumor cells, and ranged from strong (33%) to absent (17%). This uneven distribution of CX<sub>3</sub>CL1 did not reflect the morphological heterogeneity of EOC. It was positively correlated with the proliferation index Ki-67 and with GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper), previously identified as an activator of the proliferation of malignant EOC cells. Hierarchical clustering analysis, including age at diagnosis, tumor grade, FIGO stage, Ki-67 index, CX<sub>3</sub>CL1, SDF-1/CXCL12 and GILZ immunostaining scores, distinguished two major clusters corresponding to low and high levels of proliferation and differing in terms of GILZ and CX<sub>3</sub>CL1 expression. *GILZ* overexpression in the carcinoma-derived BG1 cell line resulted in parallel changes in CX<sub>3</sub>CL1 products. Conversely, CX<sub>3</sub>CL1 promoted through its binding to CX<sub>3</sub>CR1 AKT activation and proliferation in BG1 cells. In a mouse subcutaneous xenograft model, the overexpression of *GILZ* was associated with higher expression of CX<sub>3</sub>CL1 and faster tumor growth.

**Conclusion:** Our findings highlight the previously unappreciated constitutive expression of CX<sub>3</sub>CL1 preceding tumorigenesis in ovarian epithelial cells. Together with GILZ, this chemokine emerges as a regulator of cell proliferation, which may be of potential clinical relevance for the selection of the most appropriate treatment for EOC patients.

## Background

Epithelial ovarian cancer (EOC) constitutes the sixth most common cancer and the fifth leading cause of cancer-related death among women in developed countries [1]. Due to the silent nature of early-stage disease, most women with EOC have disseminated disease (*i.e.* expansion in the peritoneum and metastasis in the omentum) at the time of diagnosis and present advanced disease, with a five-year survival rate below 30% [2]. Despite the high incidence and mortality rates of EOC, the etiological factors involved in ovarian carcinogenesis remain poorly defined, limiting the efficacy of treatment protocols.

The epithelial tumor microenvironment consists of a complex tissue containing several cell types. Most of these cells produce and/or respond to chemokines, which may play key roles in the development and progression of primary epithelial tumors [3] [4] [5]. We have shown, for example, that the  $\alpha$ -CXC chemokine Stromal cell-Derived Factor-1 SDF-1/CXCL12 contributes to the immunosuppressive network within the tumor microenvironment, notably by orchestrating the recruitment of pre-DC2s [6]. We have also shown that CXCL12 regulates tumor angiogenesis and that this is critical for tumor growth [7]. By contrast, little if anything is known about the role of the chemokine Fractalkine/CX<sub>3</sub>CL1 in EOC, although it has been evidenced to mediate strong cell adhesion [8] and its presence in epithelial tissues is widely documented [9] [10]. CX<sub>3</sub>CL1 exists in two forms. The membrane-anchored form mediates the firm adhesion of cells expressing its sole receptor, CX<sub>3</sub>CR1, to the endothelium under physiological flow, through its own intrinsic adhesion function and through integrin activation [11] [12]. The soluble form is released through cleavage at a site close to the membrane [13]. Like other conventional chemokines, it recruits immune cells bearing CX<sub>3</sub>CR1, such as T lymphocytes and cytotoxic NK cells, dendritic cells or a large subpopulation of CD14<sup>+</sup> monocytes [8]. As a result of both the adhesion and chemoattractant activities of the chemokine, the CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 complex may mediate either pro- or anti-tumor effects [14]. Pancreatic ductal adenocarcinoma cells bearing CX<sub>3</sub>CR1 specifically adhere to CX<sub>3</sub>CL1-expressing cells of neural origin and migrate in response to CX<sub>3</sub>CL1 produced by neurons and nerve fibers, contributing to perineural dissemination in pancreatic cancer [15]. Prostate cancer cells that express CX<sub>3</sub>CR1 adhere to human bone marrow endothelial cells and migrate toward a medium conditioned by osteoblasts, which secrete the soluble form of the chemokine contributing to the high likelihood of prostate cancer cells metastasizing to the skeleton [16] [17]. By contrast, soluble CX<sub>3</sub>CL1 (sCX<sub>3</sub>CL1) released in the tumor microenvironment may be an active component of the anti-tumor response [18] [19] [20] [21], making the vaccination of mice with carcinoma cells modified to produce

CX<sub>3</sub>CL1 a potent anti-tumor response due to the chemoattraction of NK cells [22], or making CX<sub>3</sub>CL1 expression by colon cancer cells a factor that drastically reduced their metastatic potential [23].

In the present work, we have investigated the expression of CX<sub>3</sub>CL1 in healthy and malignant ovarian tissues and its role in the proliferation of malignant ovarian epithelial cells. This chemokine was produced by both healthy and malignant ovarian epithelial cells, and its production in EOC was positively correlated to cell proliferation index. Interestingly, it was also correlated to the expression of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), a 17 kDa leucine zipper protein discovered as a dexamethasone-induced transcript in murine thymocytes, and that we have recently shown to enhance cell proliferation in EOC and to activate AKT, a crucial signaling molecule in tumorigenesis [24, 25]. Our findings were supported by parallel and complementary data accumulated in tumor specimens from patients diagnosed for EOC, in the BG-1 ovarian cancer cell line and in a mouse subcutaneous xenograft model. They provide further insight into the role of CX<sub>3</sub>CL1 in malignant cell proliferation and tumor growth, closely associated with GILZ.

## **Results**

### ***Detection of CX<sub>3</sub>CL1 in healthy and malignant ovarian tissues***

The cellular expression of CX<sub>3</sub>CL1 was examined by immunohistochemistry (IHC) in sections isolated from three healthy ovaries, eight serous and mucinous benign tumors (some still containing normal ovarian tissue), eight serous and mucinous borderline tumors, two ovarian granulosa cell tumors, and from 54 specimens of invasive EOC. CX<sub>3</sub>CL1 was clearly detected in the ovary surface epithelium (OSE) cells and in the epithelium of the Fallopian tubes (Figure 1A). In serous and mucinous benign and borderline tumors, CX<sub>3</sub>CL1 immunoreactivity was detected in proliferating tumor cells derived from the epithelium (Figure 1, B and C). CX<sub>3</sub>CL1 expression was detected in EOC specimens, including the serous, clear-cell, endometrioid and mucinous histological subtypes (Figure 1D). In these tumors, it was detected mostly in malignant cells, making tumor cells the most significant source of CX<sub>3</sub>CL1 in EOC. Consistent with this finding, CX<sub>3</sub>CL1 was detected in epithelial cells from malignant ascites, with higher levels of expression in the CD326<sup>+</sup> fraction (Figure 1E). CX<sub>3</sub>CL1 was confined to the cytoplasm of malignant epithelial cells and was not detected in nuclei. CX<sub>3</sub>CL1 was absent from non-epithelial ovarian granulosa cell tumors (Figure 1F).



Messenger RNA for CX<sub>3</sub>CL1 was visualized by RT-PCR, which generated a product of the expected size (387 bp) from three healthy ovary samples, in six specimens from benign ovarian tumors, three borderline specimens and nine EOC specimens. It was also detected in the BG1, SKOV3 and OVCAR3 ovarian cancer cell lines. Representative data are shown in Figure 2A. The amount of mRNA was quantified by real time PCR on five EOC specimens. It was positively correlated with the intensity of IHC staining on a seven-point scale (Spearman's test,  $P < 0.05$ ,  $r = 0.88$ ) (Figure 2B). A 90-kDa protein, corresponding to the expected size of the full-length CX<sub>3</sub>CL1, was detected in EOC biopsy samples, in CD326<sup>+</sup> epithelial cells from malignant ascites and in SKOV3, BG1 and OVCAR3 cells (Figure 2C). CX<sub>3</sub>CL1 is a membrane-bound molecule with the chemokine domain on a mucin-like stalk. Cleavage at the base of this stalk by metalloproteinases generates a soluble chemokine, which functions as a classical chemoattractant [13]. We then investigated whether sCX<sub>3</sub>CL1 was released from ovarian cancer cells. It was detected in malignant ascites (ranging from 1.3 to 1.5 ng/ml). We also carried out ELISA assays on culture supernatants. The largest amounts of sCX<sub>3</sub>CL1 were recovered from the culture supernatant of OVCAR3 cells, which gave the strongest signal on western blots (Figure 2D). Our findings highlight the previously unappreciated constitutive expression of CX<sub>3</sub>CL1 on healthy epithelia of the ovary surface and Fallopian tubes, indicating that EOC may originate from either of these epithelia. We further reveal that CX<sub>3</sub>CL1 production by malignant epithelial cells precedes tumorigenesis.

### ***CX<sub>3</sub>CL1 is correlated with Ki-67 and GILZ in EOC***

CX<sub>3</sub>CL1 immunostaining was heterogeneous in EOC specimens, spanning from the absence of detectable staining (score 0, 9/54) to strong immunoreactivity (scores 5-7, 18/54). We therefore investigated whether differences in CX<sub>3</sub>CL1 expression levels were associated with the expression of two markers of proliferation: Ki-67, which is routinely used for diagnosis [26] and GILZ, which we recently identified as a factor controlling the proliferation of malignant EOC cells [25]. Immunoreactivity for CX<sub>3</sub>CL1, GILZ and Ki-67 was scored on a seven-point scale on the basis of staining intensity and the degree of staining of serial sections of fragments of EOC from 54 patients. There was a highly significant positive correlation between the scores for Ki-67 and those for GILZ, as expected (Table 1). Interestingly, significant positive correlations were found between CX<sub>3</sub>CL1 and Ki-67 and between CX<sub>3</sub>CL1 and GILZ, for the entire cohort of 54 patients (Figure 3, A and B). The immunostaining scores for these proteins were also correlated in serous carcinoma and non serous carcinoma (Table 1).

CXCL12, a chemokine produced by ovarian cancer cells [6], has been implicated in the control of proliferation in these cells [27]. As we have previously shown in a cohort of 183 patients [28], CXCL12 immunoreactivity in cancer cells was heterogeneous, with scores of 0 (undetectable production) obtained in 16 patients and of 5 to 7 (strong immunoreactivity) obtained in eight patients in our cohort of 54 patients. There was no significant correlation between final scores for CXCL12 and CX<sub>3</sub>CL1, or between final scores for CXCL12, GILZ and Ki-67. An analysis of seven datasets, including age at diagnosis, FIGO stage, grading, GILZ, Ki-67, CX<sub>3</sub>CL1 and CXCL12 immunoreactivities, based on an agglomerative hierarchical clustering approach revealed two major clusters, as shown by the dendrogram generated from the statistical analysis (Figure 3C). The main characteristics distinguishing the two major clusters, corresponding to low and high levels of proliferation, are presented in Table 2. As expected, CXCL12 production did not differ significantly between the two groups. By contrast, CX<sub>3</sub>CL1 and GILZ immunoreactivities in tumor cells were higher for the group with the higher level of proliferation. Despite the relatively small number of patients, the number of cancers at FIGO stages III and IV was significantly higher in the high proliferation group. By contrast, age at diagnosis and grade did not differ between the two groups. Thus, higher rates of proliferation were associated with the upregulation of GILZ and CX<sub>3</sub>CL1 expression.

#### ***GILZ upregulates CX<sub>3</sub>CL1 expression***

Immunohistochemical data clearly indicated that GILZ levels in malignant cells were positively correlated with CX<sub>3</sub>CL1 levels, suggesting a possible role for GILZ in regulating CX<sub>3</sub>CL1 production. We tested this hypothesis by determining the amounts of CX<sub>3</sub>CL1 mRNA and protein in pGILZ (overexpressing GILZ) and CTRL (producing low amount of GILZ) BG1 cells. As expected, GILZ content (mRNA and protein) was significantly higher in pGILZ than in CTRL clones. Parallel increases in CX<sub>3</sub>CL1 mRNA and protein were depicted on RT-PCR, IHC and western blots (Figure 4, A, B and C). In addition, the pGILZ cells released larger amounts of sCX<sub>3</sub>CL1 than the control cells (Figure 4D). Using an Ab targeting the extracellular domain of CX<sub>3</sub>CL1, western blots of lysates of BG1 cells treated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), a protein kinase C (PKC) activator, showed an absence of the 90-kDa band corresponding to the full-length of CX<sub>3</sub>CL1. Conversely, this treatment increased the release of sCX<sub>3</sub>CL1 into the supernatant. (Figure 4, C and D). Taken together, our results indicate that CX<sub>3</sub>CL1 production by ovarian epithelial malignant cells is upregulated by GILZ.

### ***CX<sub>3</sub>CL1 increases malignant cell proliferation***

We showed that sCX<sub>3</sub>CL1 is released by ovarian cancer cells from the shedding of the membrane-bound chemokine suggesting that sCX<sub>3</sub>CL1 may be an active component of the tumoral microenvironment. Here, we asked whether this chemokine has an impact on tumor cell proliferation, as suggested by the correlation of CX<sub>3</sub>CL1 and Ki-67 immunostainings in EOC specimens. This proliferative action may result from an autocrine effect of CX<sub>3</sub>CL1, which depends on the expression of its unique receptor, CX<sub>3</sub>CR1 [8]. We detected *CX<sub>3</sub>CR1* mRNA by conventional RT-PCR at the expected size (340 bp) in all the EOC specimens tested (N = 14) and in the three EOC cell lines, BG1, SKOV3 and OVCAR3. Flow-cytometric analyses further revealed membrane CX<sub>3</sub>CR1 expression in both CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> cells from malignant tumor specimens. In the CD45<sup>-</sup> fraction, which is highly enriched in malignant epithelial ovarian cells, the percentage of CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> cells ranged from 20% to 95% (Figure 5A). In BG1 cells, the steady-state level of membrane CX<sub>3</sub>CR1 expression was weak (<10% of total cells) under basal conditions (Figure 5B). Interestingly, the fraction of CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> cells was markedly increased by acidic treatment, a process known to dissociate the ligand from its receptor. On another side, decreasing the concentration of FBS from 10% to 1% in culture medium led to increased membrane expression of CX<sub>3</sub>CR1 in BG1 cells (Figure 5C). In contrast, the level of surface CX<sub>3</sub>CR1 was lower in pGILZ cells, which produce higher amounts of sCX<sub>3</sub>CL1 than CTRL cells. Based on these findings, we used CTRL BG1 cells cultured in medium supplemented with 1% FBS to measure the proliferative effect of recombinant human (rh)CX<sub>3</sub>CL1 by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation. Results from nine independent experiments showed that rhCX<sub>3</sub>CL1 roughly doubled the rate of cell proliferation after 24 h treatment (Figure 6A). This response was abrogated by the addition of a CX<sub>3</sub>CL1 analog with a modified N-terminus that binds to CX<sub>3</sub>CR1 and acts as an antagonist (Figure 6B) [29]. These results show a proliferative action of exogenous CX<sub>3</sub>CL1 through its binding to CX<sub>3</sub>CR1. We next investigated whether endogenous CX<sub>3</sub>CL1 stimulates tumor cell proliferation. For this purpose, pGILZ BG1 cells, which generate high amounts of endogenous CX<sub>3</sub>CL1, were treated with the CX<sub>3</sub>CL1 analog renewed every 24 h for 72 h. Under these conditions, the rate of cell proliferation was markedly decreased, underlying a role for endogenous CX<sub>3</sub>CL1 in regulating tumor cell proliferation (Figure 6C).

AKT hyperactivation is frequently observed in ovarian cancers and is related to the control of cell proliferation in EOC [30, 31] [32] [33]. Levels of pAKT, which is the active AKT form, were higher in rhCX<sub>3</sub>CL1-treated BG1 cells (Figure 6D). These results strongly suggest that the proliferative effect of the CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 couple is associated with AKT activation.

GILZ has been previously identified as a proliferative factor activating AKT in EOC [25]. To confirm that CX<sub>3</sub>CL1 action involves AKT activation *in situ*, we measured Ki-67 and pAKT scores on EOC specimens scored 0 for GILZ and either producing or not CX<sub>3</sub>CL1. As shown in Table 3, proliferation and AKT phosphorylation were higher in specimens producing CX<sub>3</sub>CL1. Altogether, these findings suggest that the proliferative effect of CX<sub>3</sub>CL1 on ovarian epithelial malignant cells is consecutive to CX<sub>3</sub>CR1 binding that activates AKT.

### ***In vivo impact of GILZ overexpression***

Finally, we investigated the impact of GILZ and CX<sub>3</sub>CL1 on tumor growth *in vivo* by using a mouse subcutaneous xenograft model. BG1 cells either overexpressing GILZ (pGILZ) or not (CTRL) were injected subcutaneously into athymic nude mice and tumor growth was followed for 35 days. The mean tumor volumes are represented graphically in Figure 7A. The tumors developing from pGILZ cells had significantly larger volumes than those developing from CTRL, at any given time point. Western blots of xenograft extracts and immunostaining showed parallel increases in GILZ and CX<sub>3</sub>CL1 protein levels (Figure 7, B and C). Thus, *GILZ* overexpression is clearly associated with higher levels of CX<sub>3</sub>CL1 production in tumors, resulting in higher rates of proliferation and tumor growth.

### **Discussion**

In this study, we unveiled that CX<sub>3</sub>CL1 was constitutively produced in EOC and investigated the role of this chemokine in tumor growth. The production of this chemokine preceded malignancy in the OSE, and was also found in the Fallopian tubes of healthy women and in benign tumors. Immunohistological analysis revealed that CX<sub>3</sub>CL1 production in EOC samples was correlated with levels of Ki-67 and GILZ, two markers of proliferation in malignant ovarian epithelial cells. Hierarchical clustering analysis identified two major clusters, with high and low levels of proliferation, differing in GILZ and CX<sub>3</sub>CL1 levels. *In vitro*, GILZ overproduction leads to an increase in CX<sub>3</sub>CL1 production in BG1 cells. CX<sub>3</sub>CL1 increases BG1 cell proliferation via its receptor, CX<sub>3</sub>CR1, and a parallel increase is observed in pAKT levels. In xenografted mice, the overexpression of both GILZ and CX<sub>3</sub>CL1 is associated with faster tumor growth. These results highlight a relationship between GILZ and CX<sub>3</sub>CL1 as a key regulator of malignant cell proliferation and tumor growth.

According to recent hypotheses concerning the origin and histogenesis of EOC, type I tumors, which are believed to include all major histotypes, originate from the OSE, which was traditionally considered to be the source of the neoplastic transformation. By contrast, type II

tumors, which are thought to comprise almost exclusively high-grade serous carcinomas, are believed to arise from the distal region of the Fallopian tubes [34] [35] [36]. Both the OSE and the Fallopian tubes are currently thought to be possible sources of neoplastic EOC and both are derived from the embryonic Müllerian duct [37]. CX<sub>3</sub>CL1 has been detected in the human endometrium [38] and Fallopian tubes [39]. We also detected CX<sub>3</sub>CL1 in the OSE, further indicating that the production of CX<sub>3</sub>CL1 by epithelial ovarian cells precedes tumorigenesis. CX<sub>3</sub>CL1 was also detected in benign and borderline tumor cells, suggesting that its production is not associated with malignancy.

Ovarian epithelial tumors are morphologically heterogeneous and are classified by pathologists into serous, clear cell, endometrioid and mucinous subtypes on the basis of histopathological examination. Each subtype is characterized by a specific mRNA profile, genetic risk factors and molecular features [34] [40] [41], suggesting that ovarian carcinoma is a heterogeneous disease [42]. Despite this heterogeneity, we found no significant association between CX<sub>3</sub>CL1 levels and histological type in our series, which included representative specimens of all four principal histological types of EOC. Like GILZ and CXCL12, CX<sub>3</sub>CL1 is widely expressed in EOCs and its presence does not reflect the morphological heterogeneity of EOC [25] [28].

The chemokines, including CXCL12, are produced locally in ovarian tumors and contribute to tumor microenvironment [5] [6]. Here, we identify CX<sub>3</sub>CL1 as another component of the EOC microenvironment. Epithelial cells from malignant ascites, tumor specimens and from three ovarian cancer cell lines, namely BG1, OVCAR3 and SKOV3, displayed staining for CX<sub>3</sub>CL1. CX<sub>3</sub>CL1 was confined to the cytoplasm and was absent from nuclei. The cells contained CX<sub>3</sub>CL1 with a molecular weight of 90 kDa corresponding to the membrane form of CX<sub>3</sub>CL1, from which the soluble form is derived by shedding [8]. The production of sCX<sub>3</sub>CL1 in culture supernatants paralleled that of the membrane-bound form, suggesting that the production of sCX<sub>3</sub>CL1 in EOC microenvironment was enhanced in tumors with strong CX<sub>3</sub>CL1 immunoreactivity. Interestingly, the local releasing of CX<sub>3</sub>CL1 may also depend on CXCL12, produced by epithelial ovarian malignant cells in EOC and known to regulate the cleavage of CX<sub>3</sub>CL1 from neurons [43]. We cannot exclude the possibility that CXCL12 stimulates the metalloproteinases involved in CX<sub>3</sub>CL1 cleavage in EOCs, as it does in neuronal cultures. Indeed, further investigation of this aspect is required to conclude.

The intensity of CX<sub>3</sub>CL1 staining and the fraction of tumor cells stained for CX<sub>3</sub>CL1 were variable in our cohort of 54 patients with advanced primary EOC. This heterogeneity in the production of CX<sub>3</sub>CL1 was positively correlated with GILZ levels. It does not exclude that

certain EOC specimens produce CX<sub>3</sub>CL1 in the absence of GILZ, as shown in Table 3. That is also the case for cells from OSE and benign tumors, which never produce GILZ [25]. We then found that GILZ increased the production of CX<sub>3</sub>CL1 transcripts and proteins, consistent with a transcriptional regulation of *CX<sub>3</sub>CL1* by GILZ in malignant tumor cells. GILZ interferes with various transcription factors [44] [45] or may directly control the transcriptional activity of proteins [46]. Further investigation is thus required to determine whether GILZ promotes *CX<sub>3</sub>CL1* transcription, as do several oncogenes including Ras, Myc and oncosuppressor genes, such as mutant p53, for chemokines and their receptors (reported in [47]).

GILZ is itself a proliferative factor in EOC [25], consistent with the correlation between CX<sub>3</sub>CL1 and Ki-67 levels in EOC specimens being a consequence of the upregulation of CX<sub>3</sub>CL1 production by GILZ. However, proliferative effects of CX<sub>3</sub>CL1 have been reported in smooth muscle cells [48] [49] and we could not exclude the possibility that CX<sub>3</sub>CL1 may affect the rate of proliferation through autocrine action. In line with this hypothesis, we showed that the constitutive production of CX<sub>3</sub>CL1 by malignant epithelial ovarian cells led to the release of the soluble form of this chemokine, which binds to CX<sub>3</sub>CR1 present on tumor cells. Further *in vitro* experiments showed that CX<sub>3</sub>CL1 promoted BG1 cell proliferation through its binding to CX<sub>3</sub>CR1 as well as AKT activation, as previously reported for human prostate cancer cells [17]. The PI3K/AKT pathway transmits mitogenic signals and controls cell cycle progression in ovarian cancer [31] [33]. We previously reported that GILZ activates AKT in EOC [25]. Here AKT activation was clearly associated with the action of CX<sub>3</sub>CL1. Finally, our data are consistent with a model in which GILZ activates CX<sub>3</sub>CL1 and the chemokine acts alone to support ovarian tumor cell proliferation via CX<sub>3</sub>CR1. Thus, the activation by GILZ of CX<sub>3</sub>CL1 production may contribute to the proliferative effect of GILZ. It does not exclude that GILZ in itself has a proliferative action in EOC and activates AKT. To conclude, further studies are still needed to precise the molecular and cellular mechanisms underlying the respective contribution of GILZ and CX<sub>3</sub>CL1 to the proliferation of malignant cells in EOC. Cancer cells frequently grow more rapidly and have higher proliferation rates than normal cells. CX<sub>3</sub>CL1 may participate to this action in EOC through autocrine effects that should contribute to its pro-tumor potential. However, we can no longer exclude that CX<sub>3</sub>CL1 also contributes to other aspects of tumor biology, including immune cell recruitment and the anti-tumor response. That probably should make the prognostic value of this chemokine difficult to evaluate.

## **Conclusion**

We show here that CX<sub>3</sub>CL1 is a component of the EOC microenvironment. Together with GILZ, this chemokine emerges as a regulator of cell proliferation in EOC. These results provide an encouraging starting point for elucidation of the functional importance of CX<sub>3</sub>CL1 in the progression of ovarian cancer and of the link between CX<sub>3</sub>CL1, GILZ and EOC proliferation demonstrated for the first time in this report. Few prognostic factors capable of accounting for tumor biology and disease course have been identified in ovarian cancer. The identification of molecular targets closely associated with cell proliferation might facilitate the development of personalized treatment and are of potential clinical relevance for the selection of the most appropriate treatment for certain cancer patients.

## **Materials and methods**

### ***Tissue samples***

Approval was obtained from the ethics commission of Antoine Béclère Hospital (Clamart, France) for all analyses of tumor material from clinical samples and archived material from patients diagnosed with an ovarian tumor (benign, borderline or malignant invasive). Immunohistochemical staining was carried out for CX<sub>3</sub>CL1, CXCL12, GILZ and Ki-67 in tissue specimens from primary invasive ovarian carcinomas taken for routine diagnosis and treatment purposes, from 54 patients treated surgically for ovarian cancer diagnosed at Antoine Béclère Hospital between 1998 and 2007. The clinical and pathological characteristics of the patients are described (Additional Table 1). None of the patients had received neo-adjuvant chemotherapy before surgery. Clinical stage was determined according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system (FIGO). Histological subtypes and grades were determined according to the criteria of the World Health Organization (WHO) classification [50].

### ***Immunostaining grading and score***

Immunohistochemical staining for CX<sub>3</sub>CL1, GILZ, CXCL12 and Ki-67 was performed on 5 µm sections from paraffin-embedded tissues from healthy ovaries, benign, borderline and malignant epithelial ovarian tumors, granulosa tumors and xenograft samples. The paraffin was removed by incubation in xylene and the sections were rehydrated in a graded series of ethanol solutions and washed in 1X phosphate-buffered saline (PBS). Antigens were unmasked by incubation in 10 mmol/l sodium citrate buffer (Dako, Trappes, France) and heating to 90°C in a microwave oven. Sections were then incubated for 2 h at room temperature with the appropriate primary antibody (Ab), under the conditions detailed in Additional Table 2. The sections were washed and incubated with a biotinylated secondary Ab for 1 h at room temperature, and then with streptavidin-horseradish peroxidase (-HRP) complex (LSAB kit, Dako). Sections were then counterstained with hematoxylin. Negative controls were carried out by applying the same procedure with omission of the primary Ab. Images were obtained on a Leica DMLB microscope equipped with standard optic objectives, at the indicated magnification, and were digitized directly with a Sony 3CCD color video camera.

Immunochemical staining was interpreted simultaneously by two independent investigators (FG and SP) blinded to the characteristics of the patients and clinical and pathological outcome. Immunostaining for CX<sub>3</sub>CL1, CXCL12, GILZ and Ki-67 was scored on the



following scale (with a maximum score of seven): negative (0), 1 (weak intensity), 2 (moderate intensity) or 3 (strong intensity) combined with the percentage of positive cells scored as 0 (0%), 1 (1-10%), 2 (10-50%), 3 (50-80%), 4 (>80%), as recently reported [25] [28].

### ***Tumor cell enrichment from ascites***

Tumor cell enrichment from ascites was based on the expression of CD326, a human epithelial antigen also known as EpCAM, one of the most frequently identified and highly expressed biomarkers in EOC [51]. CD326<sup>+</sup> cells were positively selected on autoMACs columns (Miltenyi Biotec, Paris, France) from ascites samples collected with institutional review board (Antoine-Béclère Hospital) approval from a patient diagnosed with invasive EOC with peritoneal extension, as previously described [25]. The percentage of CD326<sup>+</sup> cells in the positive fraction exceeded 80%, as shown by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences, France) with a PE-conjugated anti-human CD326 monoclonal Ab (mAb) (clone HEA 125, IgG1, Miltenyi Biotec).

### ***Cell lines***

The human epithelial ovarian carcinoma cell line BG1, which was derived from a stage III solid tumor tissue from a patient (kindly provided by Dr G. Lazenec, INSERM U844, Montpellier, France), was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/l L-glutamine and 0.1 mg/ml streptomycin. BG-1 clones stably overexpressing GILZ (pGILZ) or transfected with empty vector (CTRL) were generated as previously described [25]. The SKOV3 and OVCAR3 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 0.1 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 2 mmol/l L-glutamine and 10% FBS. The HEK 293T (ATCC) cell line was maintained in DMEM medium supplemented with 0.1 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 4 mmol/l L-glutamine and 10% FBS (Fisher Bioblock, Illkirch, France). All cell lines were maintained at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

### ***RT-PCR analyses***

Total RNA was extracted from cultured cells, freshly frozen ovarian tissue samples and tumor samples harvested from mice, with the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. The RNA was reverse transcribed to generate

cDNA with random hexamers (Roche Diagnostics, Meylan, France) and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Fisher Bioblock). We amplified the resulting cDNA (1 µg) by conventional or real-time PCR on a Light Cycler instrument (Roche Diagnostics), with the FastStart DNA Master SYBER Green kit (Roche Diagnostics), and carried out quantification by the standard curve method. The primer sequences, predicted amplicon size and annealing temperature are shown in Additional Table 3.

### ***[<sup>3</sup>H] thymidine uptake***

Cells were used to seed 96-well plates, in triplicate, at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well. They were grown to 60% confluence in DMEM medium supplemented with 10% FBS, for 24 h. The cells were then washed with PBS and cultured in charcoal-treated medium supplemented with 0.1% FBS. [<sup>3</sup>H] thymidine (0.5 µCi/well) (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France) was added and the cells were incubated overnight. The amount of incorporated radioactivity was determined as previously described [52] and the results are expressed as counts per minute (cpm). The binding of CX<sub>3</sub>CL1 to CX<sub>3</sub>CR1 was antagonized using a modified CX<sub>3</sub>CL1 analog, as recently described [29].

### ***Western blotting***

Cells ( $2 \times 10^6$ ) were lysed as previously described [52]. Equivalent amounts of protein were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, GE Healthcare, Orsay, France). Nonspecific binding was prevented by incubating the membranes with blocking buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN-20 and 5% skim milk powder) for 1 h at room temperature. The membranes were then incubated overnight at 4°C with specific primary Abs (Additional Table 2). These Abs were then detected by incubating the membrane with an HRP-conjugated secondary Ab (GE Healthcare) for 1 h at room temperature. The membrane was placed against film (GE Healthcare) and the bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). ScanAnalysis software (Biosoft, Cambridge, United Kingdom) was used for densitometric analysis. All bands were normalized with respect to β-actin.

### ***Flow cytometry analysis***

CX<sub>3</sub>CR1 was detected with or without the addition of acid buffer (50 mM glycine, 120 mM NaCl, pH = 2.7-3) and incubation for 3 minutes at 4°C to remove surface-bound ligands from

the receptor. The cells were washed with cold PBS supplemented with 2% FBS and incubated for 20 minutes on ice with 10 µg/ml FITC-conjugated anti-hCX<sub>3</sub>CR1 mAb (Additional Table 2). For the detection of the cytoplasmic pool of CX<sub>3</sub>CR1, cells were permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm™ reagent (BD Pharmingen, Le Pont De Claix, France) according to manufacturer's instructions, before labeling. At least 10,000 events were acquired for each sample. FITC-conjugated IgG2b was used as a negative isotype control (Clinisciences, Montrouge, France). Data were acquired with a FACSCalibur flow cytometer and analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences).

### ***ELISA***

Soluble CX<sub>3</sub>CL1 was detected with the human CX<sub>3</sub>CL1/Fractalkine Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Lille, France), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 450 nm and sCX<sub>3</sub>CL1 concentration was extrapolated from the standard concentration curve. The minimum detectable concentration was 0.018 ng/ml.

### ***In vivo xenografted tumor model***

Male nude athymic mice (Harlan, Gannat, France), purchased at four weeks of age, were used for xenograft studies. CTRL or pGILZ BG1 cells ( $8 \times 10^6$  cells in 200 µl PBS) were injected subcutaneously into the flanks of separate five-week-old mice. Tumor size was determined with calipers, every five days. All mice were killed humanely after 35 days. Tumor volume was calculated as follows:  $(L \times W^2) \times 0.5$ , (L: length; W: width). These studies obtained approval [agreement no. C92-023-0] for animal care, handling and experimentation in accordance with European Union and French guidelines for the use of laboratory animals.

### ***Statistical analysis***

Statistical analyses were performed with StatEL statistical software (Adscience, Paris, France). Spearman's test, univariate analysis, was used to assess the correlations between CX<sub>3</sub>CL1, GILZ and Ki-67 levels. Differences between groups were assessed with the Welch two-sample unpaired *t* test, and by two-tailed paired *t* tests. Fisher's exact tests were used to assess the significance of differences between clusters. Clustering, a widely used approach for subtype identification, was carried out with the hierarchical agglomerate clustering approach, in StatEL software, with Pearson's correlation function for quantitative data.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

FG performed most of the experiments, helped to develop the ideas, contributed to the analysis and interpretation of data and to the writing of the manuscript. SN carried out flow cytometry experiments and contributed to data analysis and the writing of the manuscript. ACD collected tumor specimens and clinical data from the patients and analyzed the immunohistochemical data. DE was involved in the writing of the grant proposal and data interpretation. CC provided experimental tools and contributed to manuscript editing. SP provided tumor specimens and analyzed the immunohistochemical data. VM developed the ideas underlying this study, coordinated the experiments, analyzed the data, wrote the manuscript, and contributed to the writing of the grant proposal. KB contributed to the development of the ideas underlying this study, data interpretation and the writing of the manuscript, and wrote the grant proposal. All the authors have read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgments and funding**

This work was supported by the Ligue contre le cancer (Comité Val d'Oise), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Paris-Sud, and the European Union FP6 (INNOCHEM, grant number LSHB-CT-2005-518167). We thank Drs. F. Arenzana-Seisdedos (INSERM U819, Institut Pasteur, Paris, France) and E. Brotin (INSERM UMR\_S996, Clamart, France) for providing us with the K15C mAb and for expertise in mouse xenograft models, respectively. We are grateful to P. Laurent and B. N'Guyen (Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, AP-HP, Université Paris-Sud, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France) for technical assistance.

## References

1. Permut-Wey J, Sellers TA: **Epidemiology of ovarian cancer.** *Methods Mol Biol* 2009, **472**:413-437.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ: **Cancer statistics, 2008.** *CA Cancer J Clin* 2008, **58**:71-96.
3. Barbieri F, Bajetto A, Florio T: **Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target.** *J Oncol* 2010, **2010**: 426956.
4. Balkwill F: **Cancer and the chemokine network.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:540-550.
5. Lazennec G, Richmond A: **Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation.** *Trends Mol Med* 2010, **16**:133-144.
6. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselini I, Gordon A, et al: **Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells.** *Nat Med* 2001, **7**:1339-1346.
7. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, et al: **CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers.** *Cancer Res* 2005, **65**:465-472.
8. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: **A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.** *Nature* 1997, **385**:640-644.
9. Brand S, Sakaguchi T, Gu X, Colgan SP, Reinecker HC: **Fractalkine-mediated signals regulate cell-survival and immune-modulatory responses in intestinal epithelial cells.** *Gastroenterology* 2002, **122**:166-177.
10. Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, Jewell DP, Gordon S, Powrie F, Greaves DR: **The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo.** *Am J Pathol* 2001, **158**:855-866.
11. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD: **Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow.** *J Exp Med* 1998, **188**:1413-1419.
12. Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, Okazaki T, Imai H, Bloom ET, Domae N, Umehara H: **CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms.** *J Immunol* 2000, **164**:4313-4320.
13. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW: **Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1).** *J Biol Chem* 2001, **276**:37993-38001.
14. D'Haese JG, Demir IE, Friess H, Ceyhan GO: **Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential.** *Expert Opin Ther Targets* 2010, **14**:207-219.
15. Marchesi F, Piemonti L, Fedele G, Destro A, Roncalli M, Albarello L, Doglioni C, Anselmo A, Doni A, Bianchi P, et al: **The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Cancer Res* 2008, **68**:9060-9069.
16. Jamieson WL, Shimizu S, D'Ambrosio JA, Meucci O, Fatatis A: **CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of**

- CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism.** *Cancer Res* 2008, **68**:1715-1722.
17. Shulby SA, Dolloff NG, Stearns ME, Meucci O, Fatatis A: **CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2004, **64**:4693-4698.
  18. Guo J, Zhang M, Wang B, Yuan Z, Guo Z, Chen T, Yu Y, Qin Z, Cao X: **Fractalkine transgene induces T-cell-dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of dendritic cells.** *Int J Cancer* 2003, **103**:212-220.
  19. Yu YR, Fong AM, Combadiere C, Gao JL, Murphy PM, Patel DD: **Defective antitumor responses in CX3CR1-deficient mice.** *Int J Cancer* 2007, **121**:316-322.
  20. Lavergne E, Combadiere B, Bonduelle O, Iga M, Gao JL, Maho M, Boissonnas A, Murphy PM, Debre P, Combadiere C: **Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo.** *Cancer Res* 2003, **63**:7468-7474.
  21. Ohta M, Tanaka F, Yamaguchi H, Sadanaga N, Inoue H, Mori M: **The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients.** *Int J Oncol* 2005, **26**:41-47.
  22. Guo J, Chen T, Wang B, Zhang M, An H, Guo Z, Yu Y, Qin Z, Cao X: **Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1.** *Immunol Lett* 2003, **89**:1-7.
  23. Vitale S, Cambien B, Karimjee BF, Barthel R, Staccini P, Luci C, Breitmayer V, Anjuere F, Schmid-Alliana A, Schmid-Antomarchi H: **Tissue-specific differential antitumor effect of molecular forms of fractalkine in a mouse model of metastatic colon cancer.** *Gut* 2007, **56**:365-372.
  24. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G, Riccardi C: **A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death.** *Immunity* 1997, **7**:803-812.
  25. Redjimi N, Gaudin F, Touboul C, Emilie D, Pallardy M, Biola-Vidamment A, Fernandez H, Prevot S, Balabanian K, Machelon V: **Identification of glucocorticoid-induced leucine zipper as a key regulator of tumor cell proliferation in epithelial ovarian cancer.** *Mol Cancer* 2009, **8**:83.
  26. Khouja MH, Baekelandt M, Nesland JM, Holm R: **The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma.** *Int J Gynecol Pathol* 2007, **26**:418-425.
  27. Porcile C, Bajetto A, Barbieri F, Barbero S, Bonavia R, Biglieri M, Pirani P, Florio T, Schettini G: **Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation.** *Exp Cell Res* 2005, **308**:241-253.
  28. Machelon V, Gaudin F, Camilleri S, Nasreddine S, Delbos L, Pujade-Lauraine E, Alexandre J, Gladieff L, Arenzana-Seisdedos F, Emilie D, et al: **CXCL12 expression by healthy and malignant ovarian epithelial cells.** *BMC Cancer* 2011, **11**:97.
  29. Dorgham K, Ghadiri A, Hermand P, Rodero M, Poupel L, Iga M, Hartley O, Gorochoy G, Combadiere C, Deterre P: **An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity.** *J Leukoc Biol* 2009, **86**:903-911.
  30. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW: **PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer.** *Nat Genet* 1999, **21**:99-102.
  31. Altomare DA, Wang HQ, Skele KL, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, Testa JR: **AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian**

- cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth.** *Oncogene* 2004, **23**:5853-5857.
32. Altomare DA, Testa JR: **Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer.** *Oncogene* 2005, **24**:7455-7464.
  33. Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH: **G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, **287**:C281-291.
  34. Shih Ie M, Kurman RJ: **Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis.** *Am J Pathol* 2004, **164**:1511-1518.
  35. Karst AM, Drapkin R: **Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution.** *J Oncol*, **2010**:932371.
  36. Levanon K, Ng V, Piao HY, Zhang Y, Chang MC, Roh MH, Kindelberger DW, Hirsch MS, Crum CP, Marto JA, Drapkin R: **Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis.** *Oncogene* 2010, **29**:1103-1113.
  37. Naora H, Montell DJ: **Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**:355-366.
  38. Hannan NJ, Jones RL, Critchley HO, Kovacs GJ, Rogers PA, Affandi B, Salamonsen LA: **Coexpression of fractalkine and its receptor in normal human endometrium and in endometrium from users of progestin-only contraception supports a role for fractalkine in leukocyte recruitment and endometrial remodeling.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**:6119-6129.
  39. Zhang Q, Shimoya K, Temma K, Kimura T, Tsujie T, Shioji M, Wasada K, Fukui O, Hayashi S, Kanagawa T, et al: **Expression of fractalkine in the Fallopian tube and of CX3CR1 in sperm.** *Hum Reprod* 2004, **19**:409-414.
  40. Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, Misek DE, Wu R, Zhai Y, Darrah DM, et al: **Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas.** *Cancer Res* 2002, **62**:4722-4729.
  41. Zorn KK, Bonome T, Gangi L, Chandramouli GV, Awtrey CS, Gardner GJ, Barrett JC, Boyd J, Birrer MJ: **Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:6422-6430.
  42. Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, et al: **Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies.** *PLoS Med* 2008, **5**:e232.
  43. Cook A, Hippensteel R, Shimizu S, Nicolai J, Fatatis A, Meucci O: **Interactions between chemokines: regulation of fractalkine/CX3CL1 homeostasis by SDF/CXCL12 in cortical neurons.** *J Biol Chem* 2010, **285**:10563-10571.
  44. Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A, Di Marco B, Marchetti C, Riccardi C: **Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:7929-7941.
  45. Asselin-Labat ML, David M, Biola-Vidamment A, Lecoeuche D, Zennaro MC, Bertoglio J, Pallardy M: **GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis.** *Blood* 2004, **104**:215-223.
  46. Zhang W, Yang N, Shi XM: **Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ).** *J Biol Chem* 2008, **283**:4723-4729.

47. Marchesi F, Locatelli M, Solinas G, Erreni M, Allavena P, Mantovani A: **Role of CX3CR1/CX3CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer.** *J Neuroimmunol* 2010, **224**:39-44.
48. Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin NO, Liu F, Melby PC: **Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway.** *Biochem J* 2003, **373**:547-558.
49. Perros F, Dorfmüller P, Souza R, Durand-Gasselín I, Godot V, Capel F, Adnot S, Eddahibi S, Mazmanian M, Fadel E, et al: **Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension.** *Eur Respir J* 2007, **29**:937-943.
50. Shimizu Y, Kamoi S, Amada S, Akiyama F, Silverberg SG: **Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up.** *Cancer* 1998, **82**:893-901.
51. Runz S, Keller S, Rupp C, Stoeck A, Issa Y, Koensgen D, Mustea A, Sehouli J, Kristiansen G, Altevogt P: **Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM.** *Gynecol Oncol* 2007, **107**:563-571.
52. Belot MP, Abdennebi-Najar L, Gaudin F, Emilie D, Machelon V: **Progesterone increases csk homologous kinase in HMC-1560 human mast cells and reduces cell proliferation.** *J Cell Biochem* 2007, **102**:1271-1280.



## Figure legends

**Figure 1. CX<sub>3</sub>CL1 immunoreactivity in healthy and malignant ovaries.** (A) healthy ovary, CX<sub>3</sub>CL1 immunoreactivity in the OSE (i) and Fallopian tube (ii). (B) Serous (i) and mucinous (ii) benign ovarian epithelial tumors. (C) Serous (i) and mucinous (ii) borderline ovarian epithelial tumors. (D) Malignant epithelial ovarian tumors: mucinous (i), endometrioid (ii), clear-cell (iii) and serous (iv), CX<sub>3</sub>CL1 immunoreactivity in epithelial cells is confined to the cytoplasm, no staining in the nuclei of tumor cells. (E) Cytocentrifuged CD326<sup>-</sup> non epithelial (i) and CD326<sup>+</sup> epithelial (ii) cells isolated from malignant ascites collected from a patient diagnosed with invasive EOC. CX<sub>3</sub>CL1 is detected in CD326<sup>+</sup> cells and also in some CD326<sup>-</sup> cells. (F) Non-epithelial ovarian granulosa cell tumor, absence of CX<sub>3</sub>CL1 immunostaining. (A-F) Magnification x 40.

**Figure 2. Steady-state levels of CX<sub>3</sub>CL1 products in healthy and malignant ovaries.** (A) *CX<sub>3</sub>CL1* mRNA was detected by conventional PCR at the expected size (387 bp) in representative specimens from 2 healthy ovaries, 5 cystadenomas (benign tumors), 2 borderline tumors, 5 adenocarcinomas (malignant tumors) and in the EOC-derived cell lines, SKOV3, OVCAR3 and BG1. The white vertical line separates lanes not run on the same gel. (B) *CX<sub>3</sub>CL1* mRNA levels were quantified by real-time PCR and are expressed as *CX<sub>3</sub>CL1* content normalized to that of *β-actin*. The diagram shows the distribution of immunostaining scores versus the amount of *CX<sub>3</sub>CL1* mRNAs normalized to those of *β-actin* for 5 EOC samples. Each symbol represents an individual sample run in triplicate (mean value); Spearman's test,  $P < 0.05$ ,  $r = 0.88$ . (C) CX<sub>3</sub>CL1 immunoblots of total protein lysates from EOC specimens, from CD326<sup>+</sup> epithelial cell-enriched malignant ascites samples, and from SKOV3, BG1 and OVCAR3 cell lines. The CX<sub>3</sub>CL1 protein is indicated as a ~90 kDa band. *β-actin* levels are shown for normalization. (D) Detection by ELISA of sCX<sub>3</sub>CL1 in the 24 h culture medium of BG1, OVCAR3 and SKOV3 cells (data are means  $\pm$  SEM of three separate experiments); undetectable sCX<sub>3</sub>CL1 in the culture medium of HEK-293T cells (HEK), used as a negative control.

**Figure 3. Correlation of CX<sub>3</sub>CL1 and Ki-67 and GILZ in EOC.** (A and B) CX<sub>3</sub>CL1 and Ki-67 final scores (A, Spearman test,  $P < 0.01$ ,  $r = 0.38$ ) and CX<sub>3</sub>CL1 and GILZ final scores

(B, Spearman test,  $P < 0.0001$ ,  $r = 0.59$ ) were positively correlated in 54 EOC specimens including serous (black squares) and non serous (white squares) samples. (C) Dendrogram generated by hierarchical agglomerative cluster analysis for the 54 EOC specimens studied, against age at diagnosis, FIGO stage, grade, Ki-67, GILZ, CX<sub>3</sub>CL1 and CXCL12 immunoreactivity levels. Two clusters are identified, with low (top) and high (bottom) levels of proliferation. Relevant specimens are labeled with numbers.

**Figure 4. GILZ upregulation increases CX<sub>3</sub>CL1 levels in ovarian epithelial malignant cells.** (A) CX<sub>3</sub>CL1 PCR signal intensity in CTRL and pGILZ BG-1 cells was quantified by densitometry with normalization against the signal for  $\beta$ -actin; results are expressed as CX<sub>3</sub>CL1/ $\beta$ -actin ratios. One experiment representative out of three. (B) Immunostaining for CX<sub>3</sub>CL1 on CTRL and pGILZ BG1 cytocentrifuged cells. Magnification x 40. (C) Total cellular protein extracts of CTRL and pGILZ BG1 cells cultured with or without 100 ng/ml PMA for 24 h were analyzed by western blotting with a specific Ab recognizing the extracellular domain of CX<sub>3</sub>CL1. CX<sub>3</sub>CL1 levels were quantified by densitometry, with normalization against the signal for  $\beta$ -actin; results are expressed as CX<sub>3</sub>CL1/ $\beta$ -actin ratios. One experiment representative of three. (D) Histograms show the release of sCX<sub>3</sub>CL1 into the supernatant of cells treated or not with PMA, as measured by ELISA. Results are the means  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , absence versus presence of PMA and # $P < 0.05$ , CTRL versus pGILZ BG1 cells (unpaired  $t$  test).

**Figure 5. Expression of CX<sub>3</sub>CR1 in ovarian epithelial malignant cells.** (A) Levels of CX<sub>3</sub>CR1 and of the pan-hematopoietic marker CD45 were determined by flow cytometry in 2 freshly dissociated samples of EOC specimens. Numbers indicate frequencies of CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells. (B) Representative FACS profiles for CX<sub>3</sub>CR1 levels in BG1 cells. Left, surface expression of CX<sub>3</sub>CR1 under basal conditions; middle, surface expression of CX<sub>3</sub>CR1 in cells after acidic treatment; right, expression of CX<sub>3</sub>CR1 in permeabilized cells. Numbers indicate percentage of CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> cells (mean  $\pm$  SEM) for 3 independent experiments. (C) Histograms show the fluorescence intensity of CX<sub>3</sub>CR1 staining at the surface of CTRL BG1 cells cultured in the presence of 1% or 10% FBS, and of CTRL and pGILZ BG1 cells cultured in the presence of 1% FBS. Numbers indicate the percentage of CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> cells for one representative experiment out of three.

**Figure 6. CX<sub>3</sub>CL1 promotes the proliferation of BG1 cells.** (A-C) Proliferation was measured by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation (A) in CTRL cells incubated with or without 10 ng/ml rhCX<sub>3</sub>CL1 for 24 h, 9 independent experiments. Histograms represent means ± SEM, paired *t* test, \*\* *P* < 0.001; (B) in CTRL cells incubated with or without 10 ng/ml rhCX<sub>3</sub>CL1 for 24 h, in the presence or absence of 10 μg/ml CX<sub>3</sub>CR1 antagonist; each symbol represents an individual sample run in triplicate, lines represent mean values, \* *P* < 0.05, *t* test, one representative experiment out of 3; (C) in pGILZ cells with and without treatment with 10 μg/ml CX<sub>3</sub>CR1 antagonist replaced every 24 h for 72 h, each symbol represents an individual sample run in triplicates, lines represent mean values, \* *P* < 0.05, *t* test, one representative experiment out of 3. (D) Total cellular protein extracts of CTRL cells cultured in the presence and absence of 10 ng/ml rhCX<sub>3</sub>CL1 analyzed by western blotting with specific Abs. pAKT levels were quantified by densitometry, with normalization against the signal for total AKT. Results are expressed as pAKT/AKT ratios. One blot, representative of three carried out, is shown.

**Figure 7. Impact of GILZ overexpression in xenografted tumors.** (A) pGILZ or CTRL BG1 cells (40 x 10<sup>6</sup> cells/ml) were injected subcutaneously into the right flanks of nude mice. Tumor size was measured every 5 days, for 35 days (N=3 mice per group). Tumor volume [mm<sup>3</sup>] was calculated as follows: (length [mm]) × (width [mm])<sup>2</sup> × 0.5.\*\* *P* < 0.001 (unpaired *t* test). (B) Total cellular protein extracts of xenografted tumors were analyzed by western blotting with specific Abs. CX<sub>3</sub>CL1 and GILZ levels were quantified by densitometry, with normalization against the signal for β-actin; results are expressed as CX<sub>3</sub>CL1 or GILZ/β-actin ratios. One blot representative of three carried out is shown. (C) Serial sections of pGILZ and CTRL xenografted tumors were stained for CX<sub>3</sub>CL1, GILZ and Ki-67. Negative control: no labeling was detected when each primary Ab was omitted. Magnification x 40.

**Table 1.** Correlations of CX<sub>3</sub>CL1, Ki-67 and GILZ immunoreactivity in EOC specimens.

---

	CX <sub>3</sub> CL1 / Ki-67	CX <sub>3</sub> CL1 / GILZ	GILZ / Ki-67
All EOC specimens N = 54	<sup>a</sup> r = 0.38 <sup>a</sup> P < 0.005	<sup>a</sup> r = 0.59 <sup>a</sup> P < 0.00001	<sup>a</sup> r = 0.57 <sup>a</sup> P < 0.00001
Serous specimens N = 30	<sup>a</sup> r = 0.42 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> r = 0.64 <sup>a</sup> P < 0.0001	<sup>a</sup> r = 0.57 <sup>a</sup> P < 0.001
Non serous specimens N = 24	<sup>a</sup> r = 0.45 <sup>a</sup> P < 0.05	<sup>a</sup> r = 0.57 <sup>a</sup> P < 0.005	<sup>a</sup> r = 0.57 <sup>a</sup> P < 0.005

---

<sup>a</sup>Spearman's test.

**Table 2.** Identification of high- and low-proliferation clusters

	Patient distribution		Fisher's test statistical significance
	Cluster 1 <b>Low proliferation rate</b>	Cluster 2 <b>High proliferation rate</b>	
All carcinomas	33	21	
Age at diagnosis			
< 60 year	21	10	
> 60 year	12	11	NS
Histological types			
Serous	17	13	
Non serous	16	8	NS
Clear cells	6	0	$P < 0.05$
Mucinous	5	3	NS
Endometrioid	4	3	NS
Undifferentiated	1	2	NS
Figo stages			
IA-IIIC	18	1	
IIIA-IV	15	20	$P < 0.0001$
Grades			
$\leq 2$	18	12	
$> 2$	15	9	NS
Ki-67 Immunostaining			
Low scores (0-3)	29	7	
High scores (4-7)	4	14	$P < 0.0001$
GILZ immunostaining			
Low scores (0-3)	27	6	
High scores (4-7)	6	15	$P < 0.0001$
CX <sub>3</sub> CL1 immunostaining			
Low scores (0-4)	27	10	
High scores (5-7)	6	11	$P < 0.01$
CXCL12 immunostaining			
Low scores (0-2)	16	12	
High scores (3-7)	17	9	NS

**Table 3.** Impact of CX<sub>3</sub>CL1 on cell proliferation and pAKT content in GILZ-negative (scored 0) EOC specimens.

---

	CX <sub>3</sub> CL1 <sup>-</sup> (scored 0) N = 6	CX <sub>3</sub> CL1 <sup>+</sup> (scored 2-6) N = 15	Student <i>t</i> test
Ki-67 scores (mean ± SEM)	0.5 ± 0.5	2 ± 0.4	<i>P</i> < 0.05
% pAKT high	20%	64.2%	

---

## **Description of additional files**

### **Supplementary Table 1**

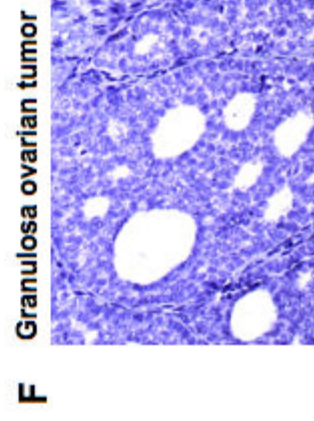
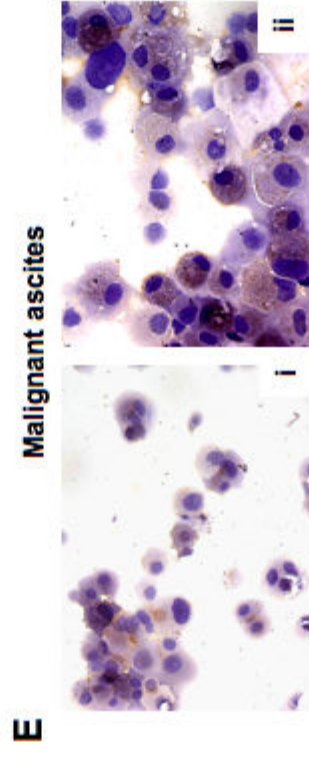
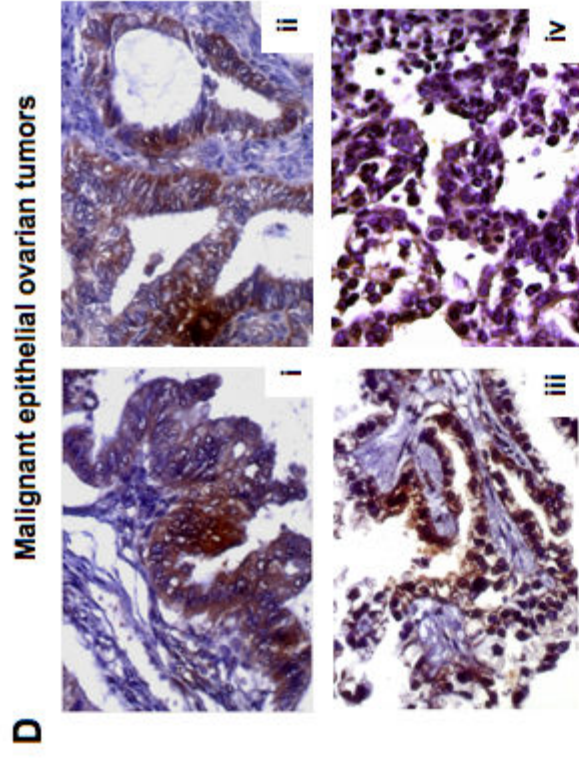
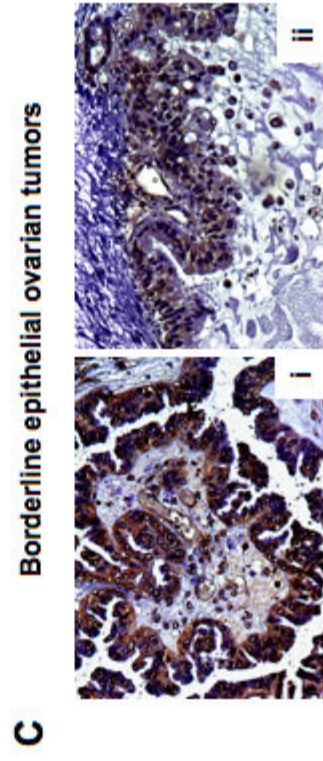
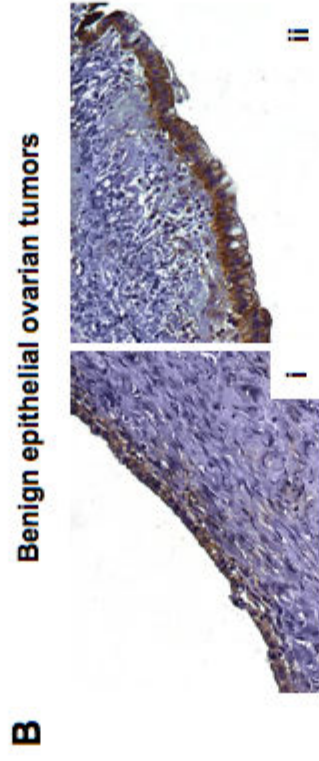
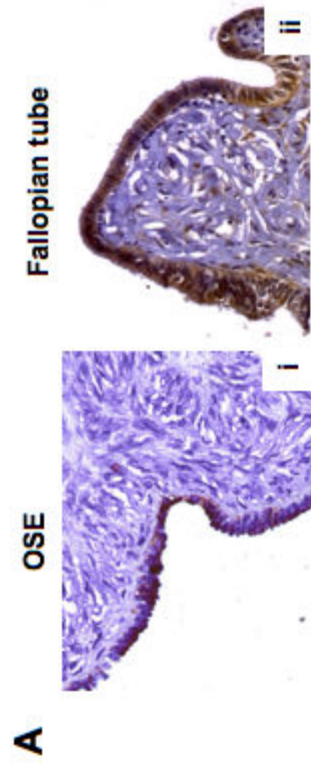
Clinical and histological parameters of patients

### **Supplementary Table 2**

Antibodies used for immunohistochemistry, western blotting and flow cytometry

### **Supplementary Table 3**

Primer sequences used for conventional and real-time PCR





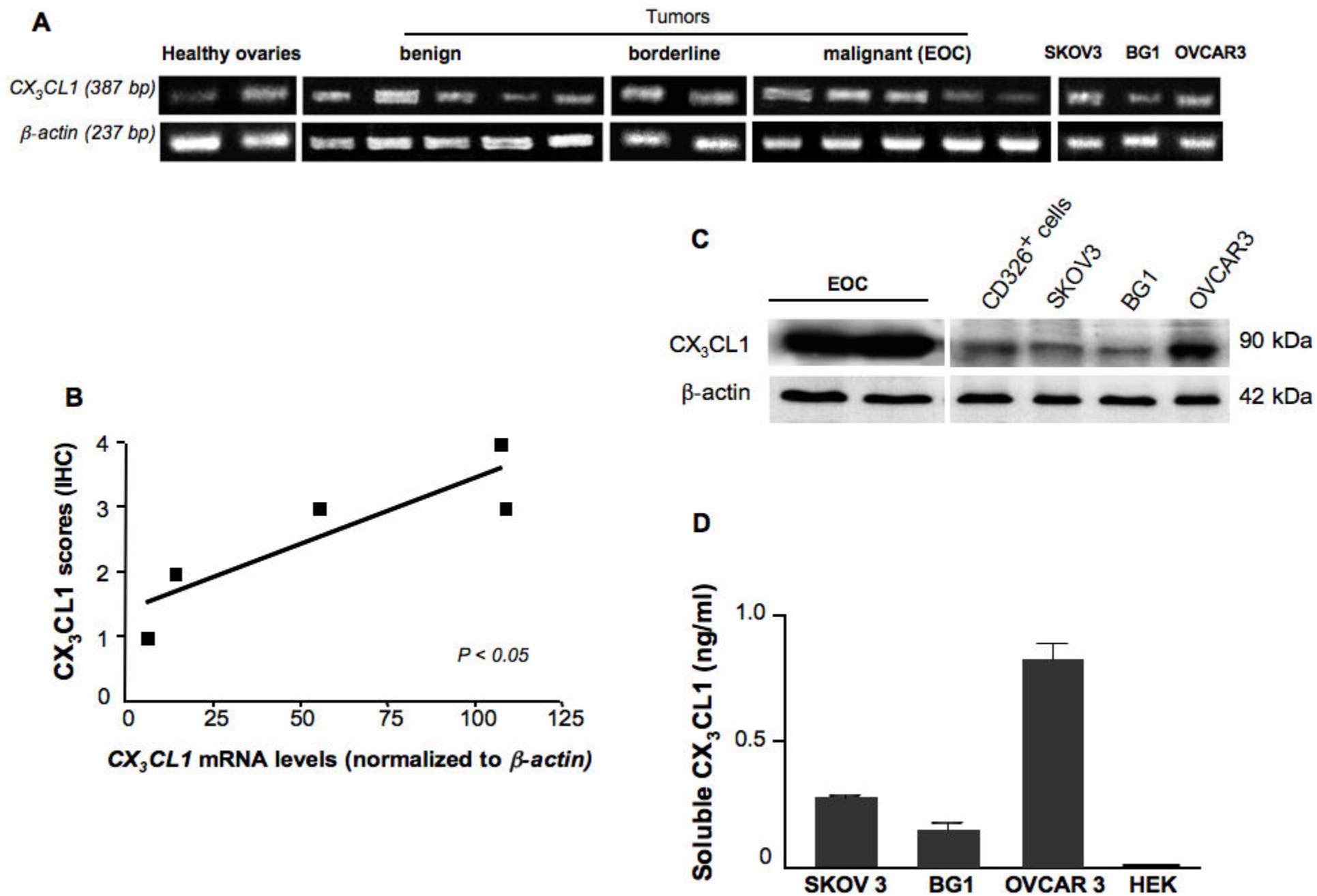
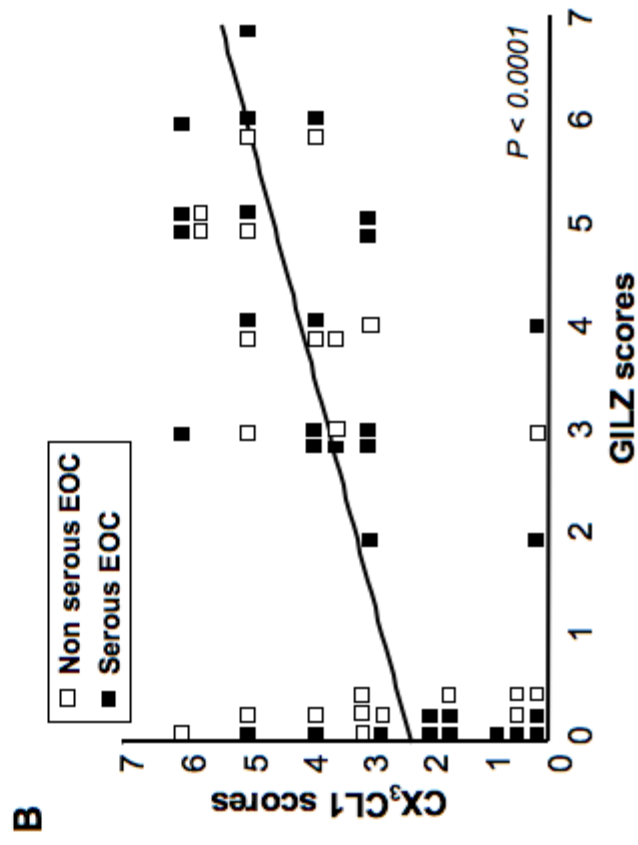
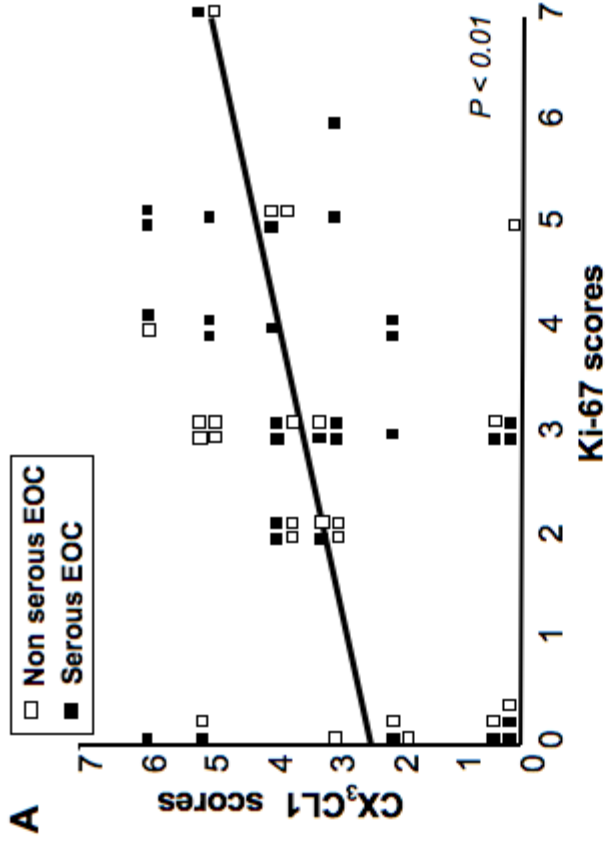
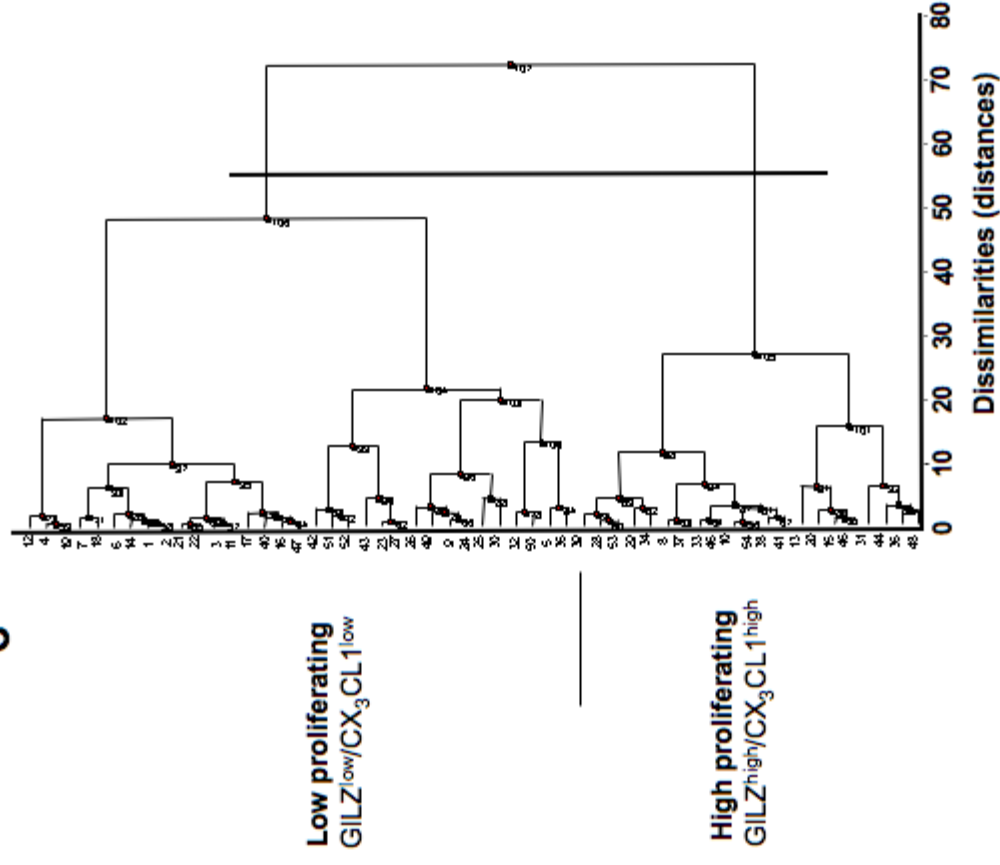


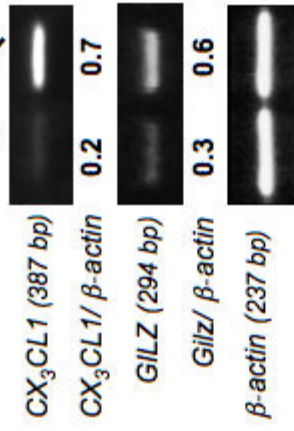
Figure 2



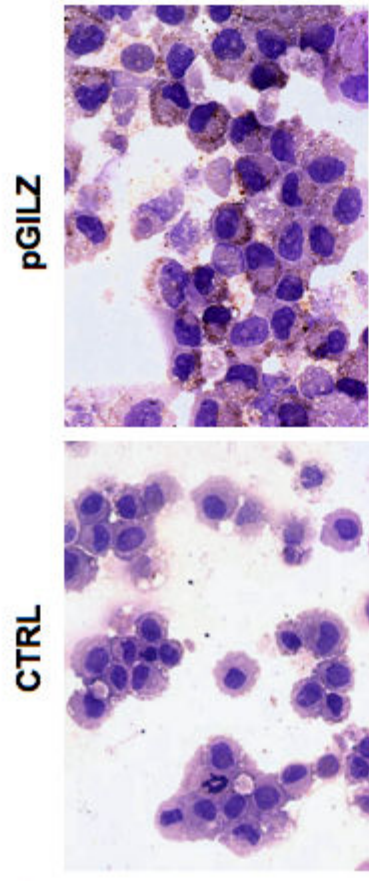
**C**



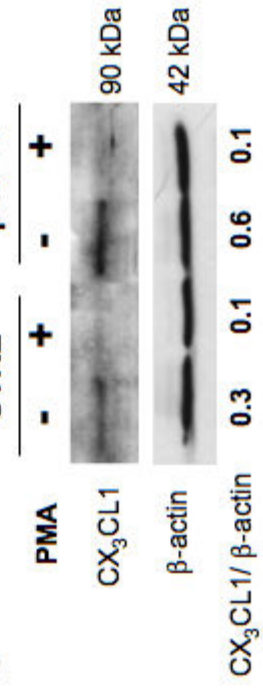
**A**



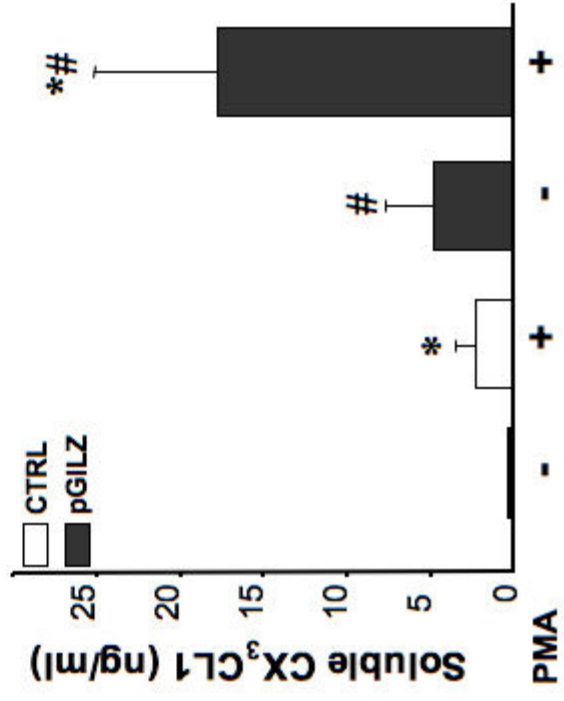
**B**



**C**



**D**



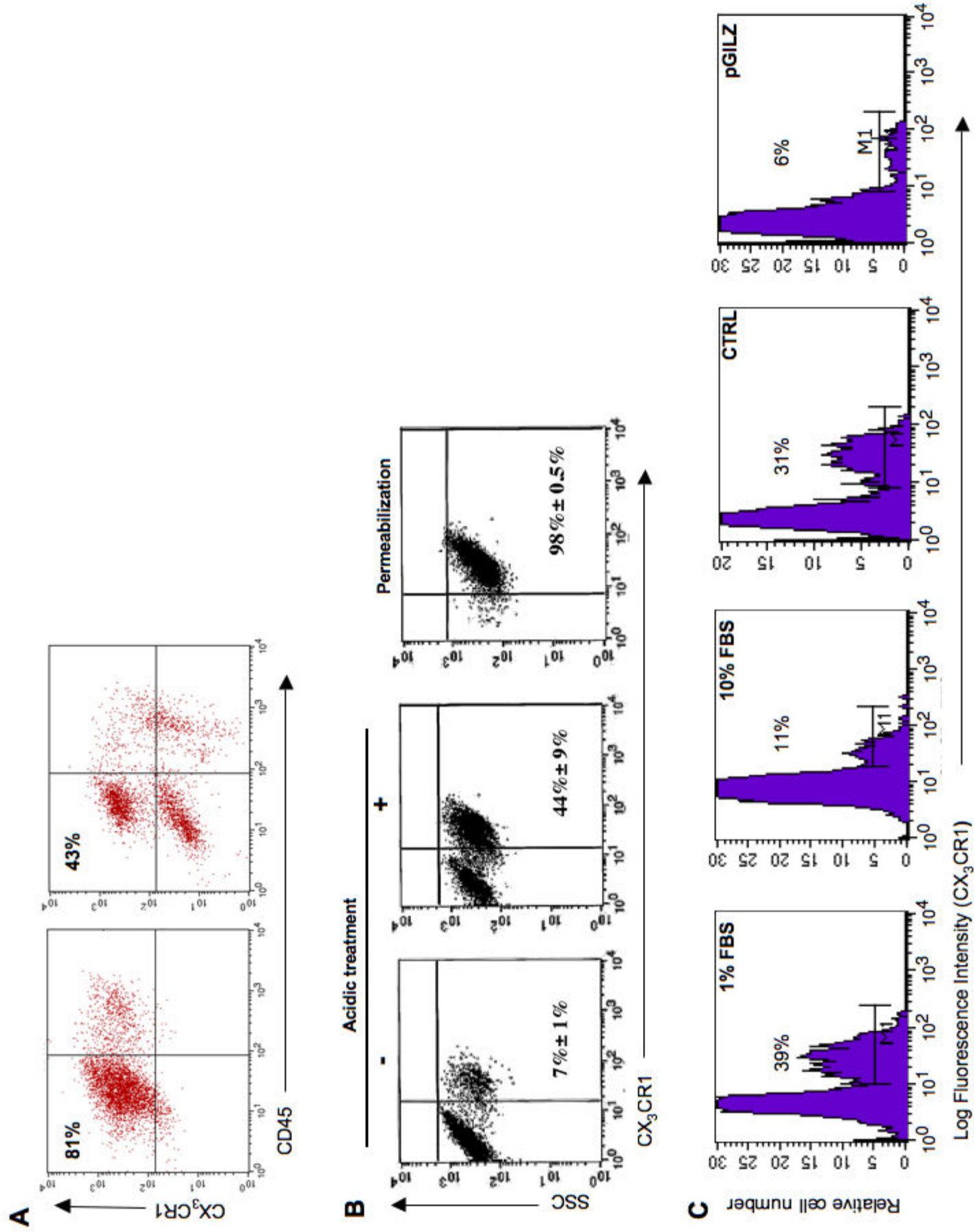
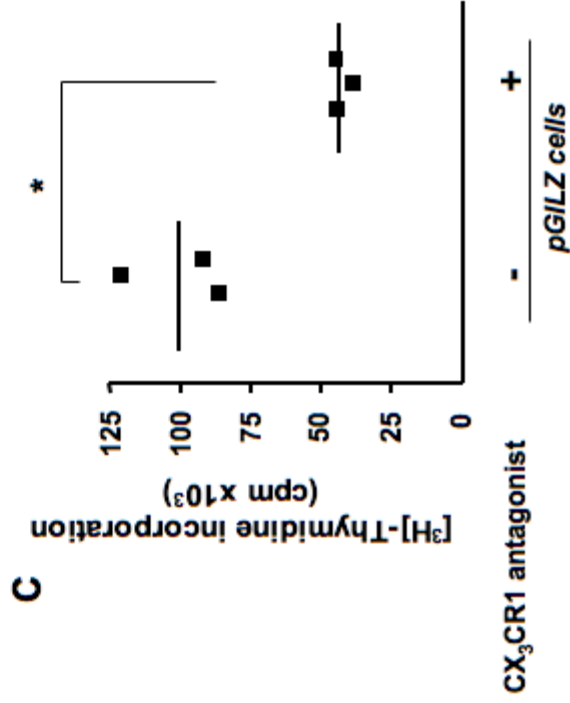
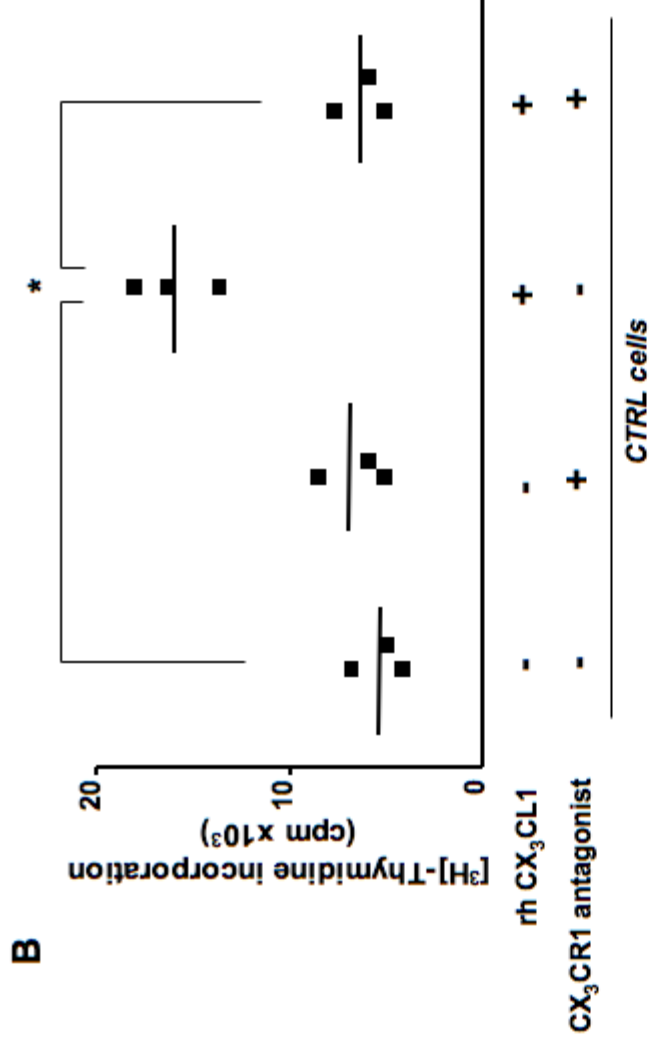
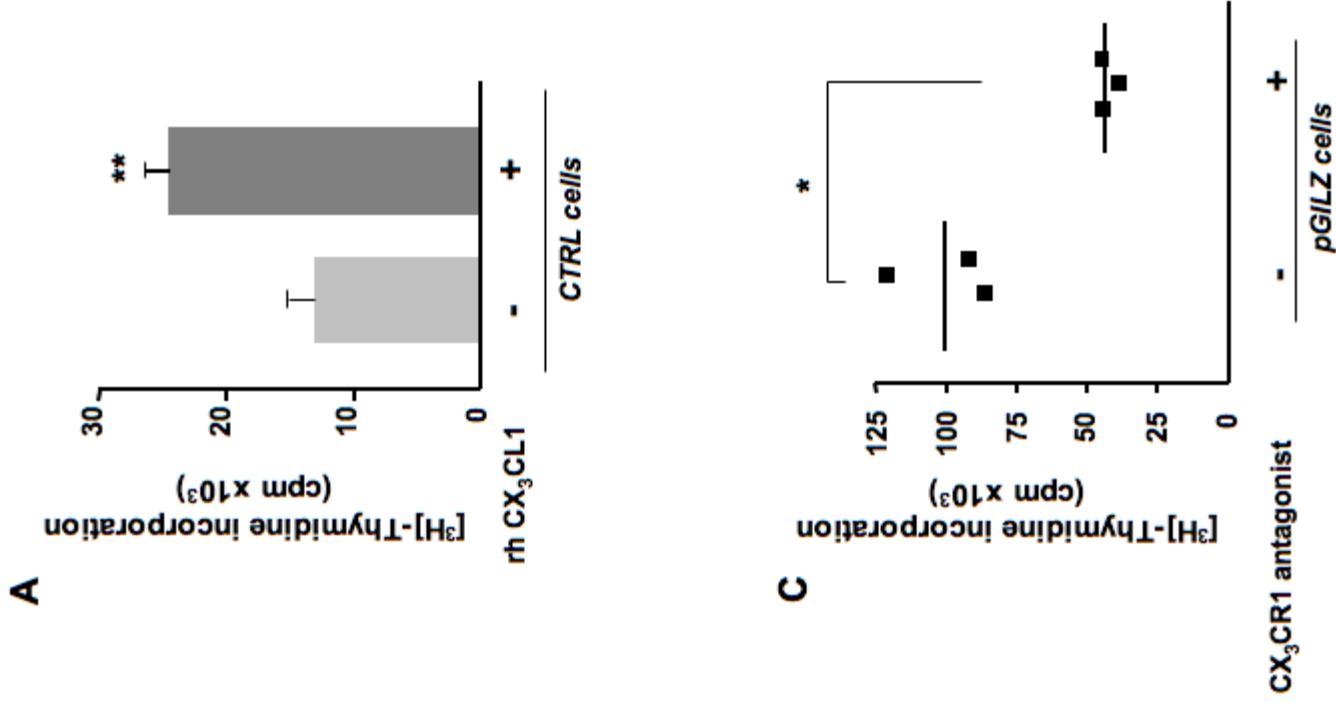
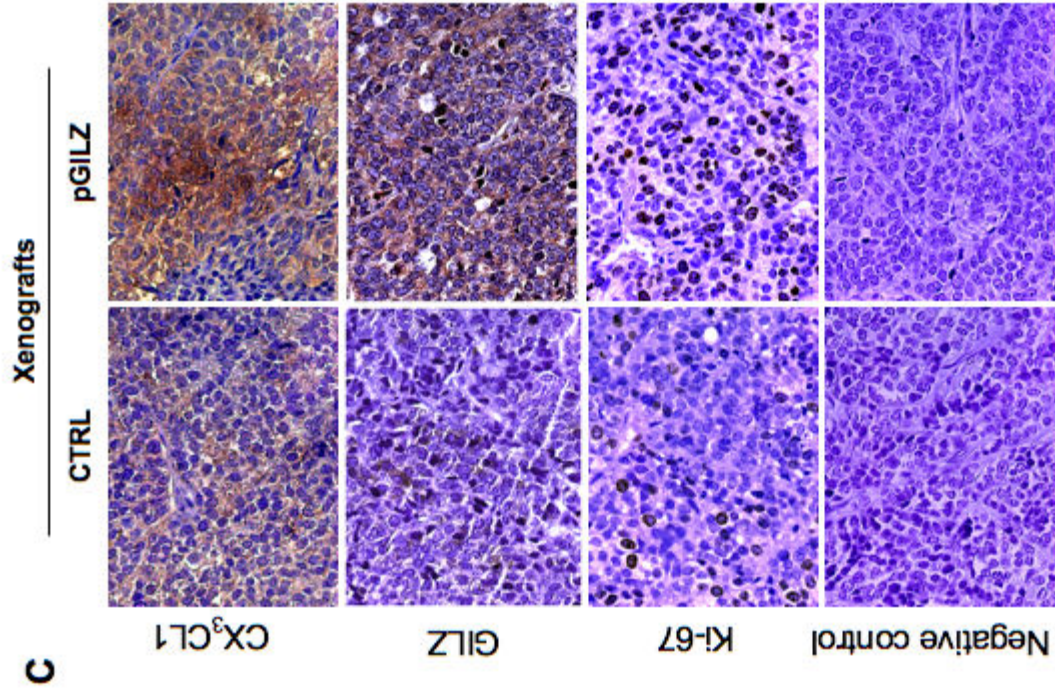
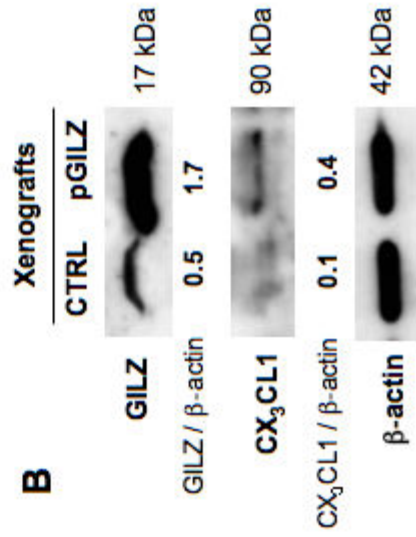
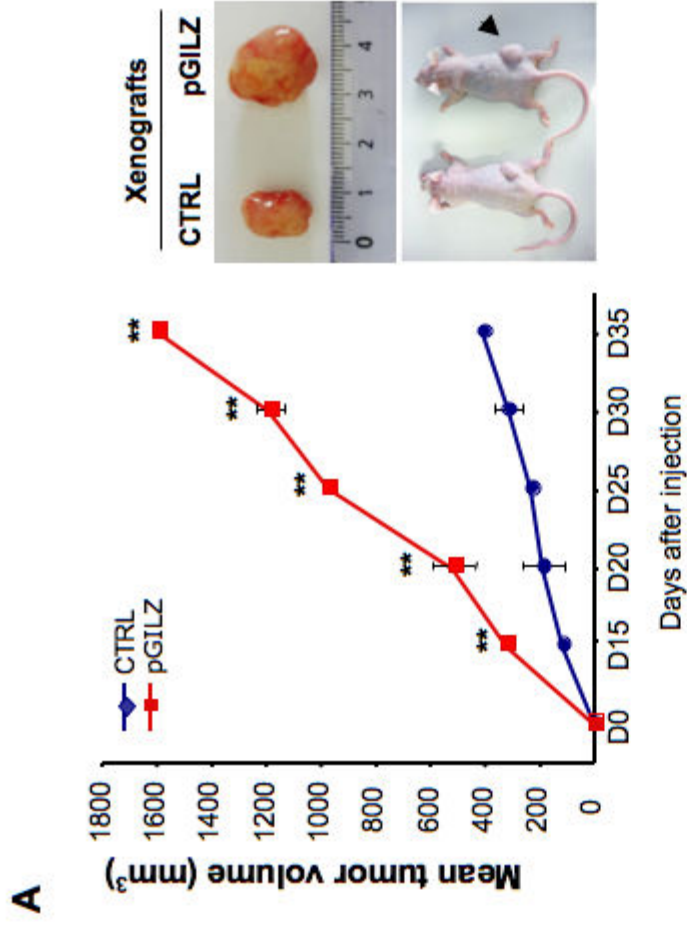


Figure 5





**Additional files provided with this submission:**

Additional file 1: Supplementary Table 1, 59K

<http://www.molecular-cancer.com/imedia/4415643335342377/supp1.doc>

Additional file 2: Supplementary Table 2, 51K

<http://www.molecular-cancer.com/imedia/9689817445342377/supp2.doc>

Additional file 3: Supplementary Table 3, 40K

<http://www.molecular-cancer.com/imedia/8296334885342377/supp3.doc>

**Additional File 1****Supplementary Table 1.** Clinical and histological parameters of patients

	Patient number	Percentage	Median	Min-Max
<i>Clinical parameters</i>				
Invasive ovarian tumors	54			
Age (years)			56	[30-86]
<i>Histological type</i>				
Serous	30	55.6		
Endometrioid	7	13		
Mucinous	8	14.8		
Clear-cell	6	11.1		
Undifferentiated	3	5.5		
<i>Disease stages</i>				
FIGO stages IA-IC	15 (12 IA + 3 IC)	27.8		
FIGO stages IIA-IIC	4 (2 IIA + 2 IIC)	7.4		
FIGO stages IIIA-IIIC	33 (2 IIIA + 6 IIIB + 25 IIIC)	61.1		
FIGO stage IV	2 IV	3.7		
<i>Histological grade</i>				
Grade 1	8	14.8		
Grade 2	13	24.1		
Grade 3	24	44.4		
Undetermined	9	16.7		



## Additional File 2

**Supplementary Table 2.** Antibodies used for immunohistochemistry, western blotting and flow cytometry

<b>Protein</b>	<b>Experimental procedure</b>	<b>Species</b>	<b>Type/Clone</b>	<b>Dilution</b>	<b>Origin</b>
<b>CX<sub>3</sub>CL1</b>	IHC/WB	Goat	Polyclonal	1:20/1:100	R&D Systems
<b>GILZ</b>	IHC/WB	Rabbit	Polyclonal	1:100/1:300	Tébu
<b>CXCL12</b>	IHC	Mouse	K15C	1:100	Pasteur Institute (U819 Inserm)
<b>pAKT (Ser 473)</b>	WB	Rabbit	Polyclonal	1:1000	Cell signaling
<b>Ki-67</b>	IHC	Mouse	MIB-1	1:50	Dako
<b>AKT</b>	WB	Rabbit	Polyclonal	1:1000	Cell signaling
<b>β-actin</b>	WB	Goat	Polyclonal	1:1000	Tébu
<b>CX<sub>3</sub>CR1-FITC</b>	FC	Rat	2A9-1	1:10	CliniSciences
<b>CD45-PerCP</b>	FC	Mouse	HI30	1:10	Biolegend

WB, Western blot

IHC, Immunohistochemistry

FC, Flow cytometry

## Additional File 3

**Supplementary Table 3.** Primer sequences used for conventional and real-time PCR

Target	PCR procedure	Forward and reverse primer sequences (Eurogentec, France)	Size of amplicons	Annealing temperature
<i>CX<sub>3</sub>CLI</i>	Conventional	5'-CCGAAGGAGAGCAATGGGTCAA-3' 5'-TTCCTACTCCCCCTGCTCAT-3'	387 bp	57°C
<i>CX<sub>3</sub>CLI</i>	Real-time	5'-GCTTTGCTCATCCACTATCAACA-3' 5'-GCTCCAGGCTACTGCTTTTCG-3'	282 bp	60°C
<i>CX<sub>3</sub>CRI</i>	Conventional	5'-TTCCTACTCCCCCTGCTCAT-3' 5'-CCTGTATGGGAAATGCCTGG-3'	340 bp	62°C
<i>GILZ</i>	*Conventional / Real-time	5'-TCTGCTTGGAGGGGATGTGG-3' 5'-ACTTGTGGGGATTCGGGAGC-3'	294 bp	62 / 65°C
<i>β-actin</i>	*Conventional / Real-time	5'-TTCCTACTCCCCCTGCTCAT-3' 5'-CCTGTATGGGAAATGCCTGG-3'	237 bp	55 / 60°C

\* the same primers were used for both conventional and real-time PCR.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Les tumeurs épithéliales représentent environ 90% des tumeurs malignes ovariennes (Chen, Ruiz et al. 2003). Le CEO représente une pathologie grave. En général, il est associé à un mauvais pronostic en raison de son diagnostic souvent tardif et de l'émergence d'une chimiorésistance. L'étude des facteurs contribuant à la croissance et à la progression tumorale est indispensable pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Plusieurs études ont démontré les rôles des chimiokines et de leurs récepteurs dans la croissance et les métastases de diverses tumeurs épithéliales primaires (Balkwill 2004; Lazennec and Richmond 2010).

Notre projet étudie plus particulièrement le rôle des deux chimiokines, SDF-1 et FKN dans le CEO. Il a été déjà identifié que les deux chimiokines SDF-1 et FKN jouent un rôle important dans la tumorigenèse de différentes tumeurs (le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer pancréatique...) (Sun, Schneider et al. 2005; D'Haese, Demir et al. 2010).

Les tumeurs épithéliales de l'ovaire produisent une quantité importante de SDF-1 (Zou, Machelon et al. 2001). Le couple SDF-1/CXCR4 joue un rôle important dans l'angiogenèse et dans la croissance des tumeurs épithéliales de l'ovaire. Tandis que le rôle de SDF-1 médié par son deuxième récepteur, CXCR7 n'a pas été encore étudié dans le CEO. Une étude récente a démontré que SDF-1 augmente l'expression de la FKN soluble (Cook, Hippensteel et al. 2010).

La FKN est une chimiokine étudiée pour son rôle important dans le cancer. La FKN a des effets paradoxaux dans les tumeurs (un rôle anti-tumoral ou un pro-tumoral) (voir chapitre de la FKN) et pour l'instant le rôle de la FKN dans le CEO n'a jamais été étudié.

Dans ce contexte, nous nous sommes donnés pour objectif de préciser la valeur pronostic de SDF-1 dans le CEO et le rôle de la FKN dans la prolifération des cellules tumorales.

## **L'expression de SDF-1 dans l'ovaire sain et dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire**

La chimiokine SDF-1 a été détectée dans la plupart des tumeurs y compris le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer du poumon, le cancer pancréatique (Sun, Cheng et al. 2010). Plusieurs études ont détecté l'expression transcriptionnelle et protéique de SDF-1 par les cellules tumorales du CEO (Zou, Machelon et al. 2001; Scotton, Wilson et al. 2002). Les tumeurs épithéliales de l'ovaire produisent une quantité importante de SDF-1 (Zou, Machelon et al. 2001). Dans ce contexte nous avons évalué l'expression de SDF-1 dans l'épithélium de l'ovaire sain et dans 183 échantillons du CEO dans le but d'étudier la valeur pronostic de SDF-1 dans le CEO.

Notre résultat d'IHC de SDF-1 sur 183 échantillons du CEO confirme bien les résultats des études précédentes (Zou, Machelon et al. 2001; Scotton, Wilson et al. 2002) qui montrent que SDF-1 est exprimé par le CEO. Cette expression au niveau des cellules tumorales est cytoplasmique avec un renforcement membranaire, alors qu'il n'a pas été détecté au niveau du noyau. Conformément aux résultats précédents (Scotton, Wilson et al. 2002; Jiang, Wu et al. 2006; Pils, Pinter et al. 2007), SDF-1 a été détecté dans plus de 90% des patients à un stade avancé du cancer. L'expression hétérogène de SDF-1 dans le CEO (sur-expression versus sous-expression) est confirmée par PCR en temps réel sur des échantillons du CEO. Scotton et al. ont démontré une corrélation positive entre l'expression de SDF-1 et le grade des tumeurs (Scotton, Wilson et al. 2002). Cependant, Pils et al. ont montré que l'expression de SDF-1 ne diffère pas entre les tumeurs borderline et malignes (Pils, Pinter et al. 2007). Notre résultat ne révèle pas une différence significative de l'expression de SDF-1 entre les tumeurs de grade faible (borderline et stade 1) et les tumeurs de grade avancée. Parmi les échantillons du CEO qui expriment SDF-1, nous n'avons pas observé de différence significative dans la production de SDF-1 dans les quatre sous-types histologiques (séreux, à cellules claires, endométrioïde et mucineux) ce qui suggère que son expression est indépendante du type histologique.

Nos résultats démontrent clairement que SDF-1 est produite par les cellules épithéliales de l'ovaire sain alors que cette expression n'a pas été détectée précédemment (Scotton, Wilson et al. 2002; Barbieri, Bajetto et al. 2010). Ceci pourrait résulter de différences entre notre protocole expérimental et celui utilisé dans les études précédentes. Par exemple, nous avons

utilisé un anticorps monoclonal anti-SDF-1 plutôt que d'un anticorps polyclonal et nous avons démasqué les sites de l'antigène par un prétraitement au micro-onde, ce qui pourrait améliorer la sensibilité de l'immunomarquage. SDF-1 a également été détectée dans les trompes de Fallope et dans les tumeurs bénignes. Ces résultats montrent que l'expression de SDF-1 préexiste à la tumorigenèse et que l'expression de SDF-1 par les cellules épithéliales malignes de l'ovaire, n'est pas consécutive à la malignité. En revanche, l'expression de SDF-1 n'a pas été détectée dans les follicules ovariens, dans les ovocytes, dans la tumeur non épithéliale de l'ovaire (la tumeur de la granulosa, dysgerminome), dans le stroma et dans les cellules non-épithéliales (CD326) de l'ascite maligne, suggérant que l'expression de SDF-1 dans la tumeur de l'ovaire est spécifique à l'épithélium ovarien.

### **Corrélation d'expression de SDF-1 avec les paramètres cliniques et pathologiques**

Des études récentes ont évalué la valeur pronostique de l'expression de SDF-1 dans divers cancers, dont le cancer du côlon (Akishima-Fukasawa, Nakanishi et al. 2009), adénocarcinome pancréatique (Liang, Zhu et al. 2010), le cancer du sein (Hassan, Ferrario et al. 2009), cancer de l'œsophage (Sasaki, Natsugoe et al. 2009), cancer de l'endomètre (Gelmini, Mangoni et al. 2009), les tumeurs des cellules germinales (Gilbert, Chandler et al. 2009). Ces différentes études montrent que les niveaux élevés d'expression de SDF-1 sont associés à un mauvais pronostic à cause de l'augmentation des métastases des cellules cancéreuses et à une diminution de survie sans progression tumorale avec une survie globale courte. Tandis que deux études faites sur des patientes atteintes de CEO montrent que les niveaux d'expression de SDF-1 n'a pas de valeur pronostique dans cette tumeur (Jiang, Wu et al. 2006; Pils, Pinter et al. 2007). Notre étude a été basée sur une grande cohorte homogène de 183 patientes, toutes traitées par chimiothérapie standard à base de TCG (paclitaxel/carboplatin/gemcitabine). Les résultats d'IHC ont prouvé que les niveaux d'expression de SDF-1 ne sont pas corrélés avec aucun des paramètres cliniques (les différents sous types histologiques, le stade FIGO, l'âge, l'indice de performance, la présence ou l'absence d'ascite, l'expression de HER2, récurrence tumorale après l'intervention chirurgicale). Ainsi, les patients atteints de tumeurs avec une production importante de SDF-1 (SDF-1-high) ont une survie sans progression tumorale (SSP) et une survie globale semblables à ceux des patients atteints de tumeurs avec une production modérée de SDF-1

(SDF-1-Low). Nos résultats confirment ce qui a été décrit précédemment dans une étude sur une petite cohorte de 80 patientes (Jiang, Wu et al. 2006) et dans une étude de grande cohorte de 148 patientes recevant des traitements hétérogènes (Pils, Pinter et al. 2007).

Cette absence de valeur pronostique pour SDF-1 dans le CEO est un peu surprenante, car cette chimiokine augmente la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Scotton, Wilson et al. 2001; Scotton, Wilson et al. 2002; Barbero, Bonavia et al. 2003; Kajiyama, Shibata et al. 2008; Barbolina, Kim et al. 2010), favorise l'angiogenèse tumorale (Kryczek, Lange et al. 2005), inhibe la réponse immunitaire de l'hôte (Zou, Machelon et al. 2001) et joue un rôle dans la résistance à la chimiothérapie hyperthermique intrapéritonéale (Lis, Touboul et al. 2011). Ce paradoxe peut s'expliquer par la fixation de SDF-1 à l'héparine sulfate (famille de glycosaminoglycane (GAG)) qui existe à la surface cellulaire et dans le microenvironnement tumoral (Laguri, Arenzana-Seisdedos et al. 2008). Ce dernier empêche la fixation de SDF-1 sur ces récepteurs (CXCR4 et CXCR7). Donc, il serait intéressant de mesurer l'expression de SDF-1 en présence de l'héparanase, une enzyme qui participe à la dégradation de l'héparine sulfate (Sanderson, Yang et al. 2005). En outre, l'activité de SDF-1 peut être dépendante de l'activité et de l'expression de deux récepteurs (CXCR4 et CXCR7). Une étude faite sur 80 échantillons du cancer épithélial de l'ovaire montre que la surexpression de CXCR4 est associée à un mauvais pronostic caractérisé par une diminution de la survie sans progression tumorale avec une survie globale courte (Jiang, Wu et al. 2006). Donc, il serait intéressant de mesurer l'expression des deux récepteurs de SDF-1 (CXCR4 et CXCR7) dans les 183 échantillons du CEO et de déterminer si leur expression a une valeur pronostique sur la croissance tumorale et la survie des patientes atteintes du cancer.

### **L'expression du récepteur CXCR7 dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire**

La chimiokine SDF-1 avec ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 constituent les couples de chimiokines/récepteurs qui attirent le plus grand niveau d'intérêt en oncologie (Kryczek, Wei et al. 2007; Barbieri, Bajetto et al. 2010). Plusieurs études ont montré le rôle protumoral du couple SDF-1/CXCR4 et SDF-1/CXCR7 dans différents types de cancers (Le cancer de la prostate, le cancer du sein, le cancer du poumon...) (Sun, Cheng et al. 2010). Il a été déjà démontré que l'effet de SDF-1 médié par CXCR4 est impliqué dans la régulation de la

prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Scotton, Wilson et al. 2001; Scotton, Wilson et al. 2002; Kajiyama, Shibata et al. 2008; Barbolina, Kim et al. 2010). Alors que l'expression du CXCR7 et son rôle dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire n'ont jamais été étudiés.

Nous avons quantifié l'expression d'ARNm de CXCR7 dans quatre échantillons du CEO et dans les trois lignées cancéreuses : SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1 par PCR en temps réel et l'expression cellulaire (dans les trois lignées cancéreuses) par cytométrie en flux. Une faible expression du récepteur CXCR7 a été détectée dans les cellules du CEO. Il est connu que l'expression des gènes peut être régulée par des mécanismes épigénétiques (acétylation/déacétylation, méthylation/déméthylation, phosphorylation/déphosphorylation...) faisant intervenir des modifications de l'organisation de la chromatine (Illi, Scopece et al. 2005; Matouk and Marsden 2008). Nous avons voulu analyser si cette faible expression de CXCR7 dans le CEO est due à une régulation épigénétique du gène de CXCR7. Le traitement des cellules BG-1 avec 50 ng/ml trichostatin A (TSA) qui est un inhibiteur de déacétylation des histones (HDAC) pendant 48 h augmente l'expression d'ARNm du CXCR7 d'un facteur 8. Pour expliquer ces résultats, il serait intéressant de confirmer l'effet du TSA sur l'expression du CXCR7 sur les deux autres lignées SKOV-3 et OVCAR-3 et de déterminer le mécanisme d'augmentation de CXCR7 par le TSA à court terme et d'élucider à long terme le rôle joué par CXCR7 dans le CEO.

### **L'expression de la FKN dans l'ovaire sain et dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire**

La FKN a été détectée dans différents types de tumeurs, dont le neuroblastome, le carcinome hépatocellulaire, le mélanome et la tumeur du colon (Marchesi, Locatelli et al. 2010). En 2004, deux études ont déterminé l'expression de la FKN et son récepteur, CX<sub>3</sub>CR1, dans les trompes de Fallope et dans l'endomètre (la couche interne de l'utérus) (Hannan, Jones et al. 2004; Zhang, Shimoya et al. 2004). Tandis que l'expression de la FKN dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire n'a pas été étudiée. Ce qui nécessite d'étudier le rôle de la FKN dans le microenvironnement du CEO.



Premièrement, nous avons recherché l'expression de la FKN par immunohistochimie (IHC) dans les tumeurs de l'ovaire. La FKN est exprimée de manière hétérogène dans le CEO (allant de l'absence ou la faible expression à une forte expression). Cette expression au niveau des cellules tumorales est cytoplasmique. L'expression hétérogène de la FKN pourrait être le résultat d'une modulation de l'activité de facteurs régulant son expression ou de processus épigénétiques tels que la méthylation/déméthylation et/ou acétylation/déacétylation de l'ADN.

Des études récentes montrent que la surface de l'ovaire sain et les trompes de Fallope sont considérées comme deux origines probables des tumeurs épithéliales de l'ovaire (Karst and Drapkin 2010; Levanon, Ng et al. 2010). Nous avons détecté l'expression de la FKN dans les trompes de Fallopes confirmant les résultats de Zhang et al. (Zhang, Shimoya et al. 2004) et dans la surface de l'ovaire sain pour la première fois. Et nous avons également détecté que la FKN est exprimée dans les tumeurs bénignes et borderline. Ces résultats montrent que l'expression de la FKN préexiste à la tumorigenèse, ce qui suggère que son expression par les cellules épithéliales malignes de l'ovaire, n'est pas consécutive à la malignité. En revanche, la FKN n'a pas été détectée dans le cancer non épithélial de l'ovaire comme la tumeur de la granulosa, suggérant que son expression dans la tumeur de l'ovaire est spécifique à l'épithélium ovarien. Il serait intéressant d'étudier l'expression de la FKN dans d'autres tumeurs non épithéliales (tumeurs germinales).

Le cancer épithélial de l'ovaire est un type de cancer hétérogène qui se caractérise par l'existence de différents sous-types histologiques (séreux, mucineux, endométrioïde, à cellules claires et indifférenciées). Chaque type histologique est associé à des événements moléculaires différents durant l'oncogenèse (Shih Ie and Kurman 2004), et est caractérisé par un profil d'expression de gènes distincts (Zorn, Bonome et al. 2005). Malgré son hétérogénéité, la FKN est détectée dans tous les types histologiques du CEO. De plus, aucune différence significative n'a été observée dans les niveaux d'expression de la FKN (classés : élevés vs faibles) entre les tumeurs séreuses et les tumeurs non séreuses (mucineux, endométrioïde, à cellules claires et indifférenciées) ce qui suggère que son expression est indépendante du type histologique.

Pour confirmer les résultats d'IHC nous avons évalué l'expression de la FKN par PCR semi-quantitative (dans l'épithélium d'ovaire normal, dans la tumeur bénigne, borderline et maligne et dans les 3 lignées cancéreuses : SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1), et par PCR en temps réel (dans les 5 échantillons de CEO) et par western blot (dans les cellules épithéliales (CD326<sup>+</sup>) de l'ascite maligne, dans des échantillons du cancer malin et dans les 3 lignées cancéreuses).

Nous avons également démontré qu'il existe une corrélation positive entre l'expression d'ARNm de la FKN par PCR en temps réel et l'intensité de son marquage d'immunohistochimie dans 5 échantillons du CEO.

La FKN existe sous deux formes : membranaire et soluble, dont chacune joue un rôle différent. La FKN membranaire joue plutôt un rôle dans l'adhésion cellulaire et la FKN soluble a une activité chimiotactique pour le recrutement des cellules qui expriment le récepteur CX<sub>3</sub>CR1. Dans notre étude, nous avons démontré par ELISA la production de la FKN soluble par les cellules du CEO (dans l'ascite maligne et dans les 3 lignées cancéreuses : SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1). Les résultats obtenus par ELISA et par western blot suggérant une corrélation positive entre la production de la forme soluble et la forme membranaire.

### **L'expression du récepteur de la FKN, CX<sub>3</sub>CR1 dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire**

L'activité biologique des chimiokines est médiée par l'interaction avec ses récepteurs. Le récepteur CX<sub>3</sub>CR1, le seul récepteur de la FKN (Bazan, Bacon et al. 1997) a été détecté dans différents types de tumeurs, dont le cancer de la prostate, le neuroblastome, le cancer du sein, le mélanome...(Shulby, Dolloff et al. 2004; Andre, Cabioglu et al. 2006; Ren, Chen et al. 2007; Nevo, Sagi-Assif et al. 2009). En revanche, son expression dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire n'a jamais été étudiée. D'où l'importance d'étudier l'expression du récepteur de la FKN dans le CEO.

Nous avons mis en évidence par PCR l'expression d'ARNm du récepteur CX<sub>3</sub>CR1 dans des échantillons de tumeur épithéliale de l'ovaire maligne et borderline et dans les 3 lignées cancéreuses (SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1), ce qui permet à la FKN d'exercer une activité

autocrine. Alors que nous avons observé une absence de son expression dans la tumeur bénigne et par conséquent l'absence de l'activité autocrine de la FKN.

Pour confirmer les résultats de PCR, nous avons étudié l'expression membranaire du récepteur dans la tumeur maligne et borderline et dans les 3 lignées cancéreuses (SKOV-3, OVCAR-3 et BG-1) par cytométrie en flux. Nous avons détecté l'expression du récepteur CX<sub>3</sub>CR1 dans la tumeur maligne et borderline alors qu'il a été faiblement détecté dans les 3 lignées sans avoir réalisé un lavage acide (un lavage acide sert à séparer le ligand de son récepteur et permet aux anticorps de CX<sub>3</sub>CR1 de se fixer sur le récepteur). Après un lavage acide l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 a été fortement détectée dans les trois lignées. En revanche, une expression intracellulaire très importante de CX<sub>3</sub>CR1 a été mise en évidence après une perméabilisation cellulaire, ce qui suggère qu'il existe juste une quantité minimale de CX<sub>3</sub>CR1 à la membrane capable de fixer son ligand FKN.

### **Rôle de la FKN dans les cellules du cancer épithélial de l'ovaire**

La FKN a des effets paradoxaux dans les tumeurs. Elle peut jouer deux rôles différents : un rôle anti-tumoral dans certains types de tumeurs et un rôle pro-tumoral dans d'autres types de tumeurs (D'Haese, Demir et al. 2010). L'effet de la FKN dans le cancer de l'ovaire n'a pas encore été étudié. Pour cette raison, nous avons voulu déterminer le rôle de la FKN dans le cancer épithélial de l'ovaire. Nos résultats d'IHC montrent une expression hétérogène de la FKN entre les différents prélèvements de tumeurs (allant de l'absence ou la faible expression à une forte expression). Les études de corrélations ont démontré que les niveaux d'expression de la FKN sont corrélés positivement à ceux des marqueurs de prolifération utilisés pour caractériser les tumeurs : le marqueur de prolifération Ki-67 (utilisé en routine comme un facteur de prolifération) (Khouja, Baekelandt et al. 2007) et GILZ a été identifié récemment comme un facteur prolifératif des cellules du cancer épithélial de l'ovaire (Redjimi, Gaudin et al. 2009). De plus, aucune différence significative dans la corrélation d'expression de la FKN et du Ki-67 ou d'expression de la FKN et du GILZ n'a été observée entre les tumeurs séreuses et non séreuses.

Dans notre cohorte de 54 patientes, le regroupement de sept paramètres (l'âge au moment du diagnostic, le stade FIGO, le classement histologique, l'immunomarquage de GILZ, Ki-67,

FKN/CX<sub>3</sub>CL1 et CXCL12/SDF-1), en utilisant une approche ascendante hiérarchique a permis de distinguer deux groupes : un groupe avec une faible prolifération et un autre groupe avec une prolifération importante. Dans le groupe avec une prolifération importante, nous observons une expression importante de la FKN, de GILZ et de l'indice de prolifération Ki-67 et un stade Figo avancé. En revanche, l'âge au moment du diagnostic et la production de SDF-1 n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes. Ces résultats montrent qu'il existe une corrélation entre l'expression de la FKN et GILZ (les cellules tumorales qui expriment plus de la FKN produisent plus de GILZ). Nous nous sommes demandés si GILZ contrôle l'expression de la FKN dans les cellules du cancer épithélial de l'ovaire sachant que GILZ est connu réguler l'expression de diverses protéines (Ayroldi and Riccardi 2009) et certaines cytokines (Hamdi, Bigorgne et al. 2007).

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons comparé l'expression de la FKN entre la lignée BG-1 control transfecté par un vecteur vide (BG-1-CTRL) et la lignée BG-1 qui surexprime GILZ d'une façon stable en la transfectant avec un vecteur codant pour l'expression de GILZ (p-GILZ). Une augmentation importante de l'expression transcriptionnelle et protéique de la FKN dans les lignées BG-1 pGILZ par rapport au BG-1-CTRL a été confirmée par PCR quantitative, western blot et par IHC sur des cellules cytocentrifugées. De plus, l'expression de la FKN soluble augmente dans les lignées BG-1 pGILZ, cette augmentation d'expression peut être due simplement à une augmentation d'expression membranaire de la FKN (plus on a de la FKN membranaire plus on a de la FKN soluble) et/ou elle est due à une augmentation des enzymes de clivages de la forme membranaire de la FKN comme ADAM10 et/ou ADAM17 (Ludwig, Hundhausen et al. 2005). Alors, il serait intéressant de voir si GILZ pourrait contrôler l'expression des enzymes de clivages ADAM10 et ADAM17. Nos résultats indiquent clairement que GILZ augmente la production de la FKN sous ses deux formes, soluble et membranaire.

Nous avons validé ces résultats dans un modèle de souris NUDE. Ces dernières ont reçu des xénogreffes sous-cutanées soit de la lignée BG-1 CTRL ou soit de la lignée BG-1 pGILZ. Les souris NUDE ayant eu des xénogreffes de la lignée BG1-pGILZ ont développé une tumeur plus importante par rapport aux souris NUDE ayant eu des xénogreffes de la lignée BG-1 CTRL. Les résultats du western blot et d'IHC sur les xénogreffes tumorales ont démontré qu'il y avait une augmentation parallèle entre les expressions protéiques du GILZ et FKN. Ce qui suggère que GILZ augmente l'expression de la FKN.

Par conséquent, la surexpression de GILZ dans les xénogreffes des souris NUDE est associée à une prolifération tumorale plus élevée, une croissance tumorale plus rapide et une production plus importante de la FKN.

Pour étudier l'effet de la FKN sur la prolifération des cellules cancéreuses de l'ovaire, nous avons ajouté de la FKN recombinante humaine (rhCX<sub>3</sub>CL1) au milieu de culture des cellules BG-1 (nous avons choisi cette lignée car nous avons déjà démontré que la lignée BG-1 exprime une faible quantité de la FKN soluble et membranaire par rapport aux deux autres lignées, SKOV-3 et OVCAR-3). La prolifération cellulaire est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée après 24 h d'incubation avec des rhCX<sub>3</sub>CL1. La prolifération cellulaire de la lignée augmente en présence de la FKN.

Pour vérifier que l'effet de la FKN est médié par son interaction avec son récepteur, nous avons mesuré l'effet prolifératif de la FKN recombinante en présence d'un analogue de la FKN humaine (hCX<sub>3</sub>CL1) avec une modification dans l'extrémité N-terminale qui se lie au récepteur CX<sub>3</sub>CR1 humain (hCX<sub>3</sub>CR1) et agit comme un antagoniste (Dorgham, Ghadiri et al. 2009). La prolifération cellulaire a été fortement réduite en présence de l'antagoniste, ce qui indique que l'effet prolifératif de la FKN recombinante était consécutif à sa liaison à son récepteur, CX<sub>3</sub>CR1. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la FKN recombinante sur la survie, l'apoptose et la migration cellulaire du CEO.

La voie des PI3K/AKT joue un rôle important dans la régulation de nombreux processus biologiques (survie, prolifération synthèse protéique) (Brazil, Yang et al. 2004). Elle est fréquemment hyperactivée dans les cancers notamment dans le CEO (Altomare, Wang et al. 2004; Gao, Flynn et al. 2004). Une étude faite sur les cellules humaines du cancer de la prostate montre que la FKN augmente la quantité de phospho-AKT (p-AKT, forme active) (Shulby, Dolloff et al. 2004). Dans notre étude, nous avons retrouvé une augmentation de la production de p-AKT dans les cellules BG-1 traitées avec la FKN recombinante. En outre, les échantillons du CEO identifiés comme ne produisant pas GILZ ont été marqués pour p-AKT et FKN. L'expression de p-AKT est trois fois plus élevée dans les échantillons qui expriment fortement la FKN par rapport aux échantillons qui expriment peu de la FKN. Ce qui suggère que l'activation d'AKT mesurée par la quantité de la forme phosphorylée est la conséquence de la production de FKN et que cette chimiokine pourrait stimuler la prolifération cellulaire, même en l'absence de GILZ. Donc, il serait intéressant d'étudier l'effet de la FKN sur la

prolifération cellulaire et sur l'activité d'AKT en absence de GILZ (transfection par des siRNA).

Il a été déjà démontré que le carcinome hépatocellulaire exprimant fortement CX<sub>3</sub>CR1 et FKN a un meilleur pronostic à cause de l'augmentation de la survie globale et de la survie sans progression tumorale (Matsubara, Ono et al. 2007). Egalement il a été déjà démontré dans le cas du cancer du poumon et du colon que l'injection sous cutanée des cellules cancéreuses surexprimant la FKN (Guo, Chen et al. 2003; Nukiwa, Andarini et al. 2006) transfectées par un vecteur codant pour la FKN induit une réponse anti-tumorale importante. Cette réponse est consécutive à l'effet chimioattractant puissant de FKN pour les cellules NK et les lymphocytes T aux sites tumoraux ce qui a diminué la croissance et la métastase de la tumeur. Dans ce contexte, l'effet de la FKN *in vivo* dépend du microenvironnement tumoral, donc il serait intéressant d'étudier l'effet de la FKN sur la croissance tumorale et sur l'invasion cellulaire par xénogreffe sous cutanée et intrapéritonéale des lignées du CEO respectivement dans des souris NUDE. Il serait donc également intéressant d'étudier les valeurs pronostiques de l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 et de la FKN dans les différents échantillons des patientes atteintes du CEO.

---

## Conclusion et perspectives

L'étude de SDF-1 par IHC sur 183 échantillons du CEO confirme bien les résultats des études précédentes qui montrent que SDF-1 est exprimé par le CEO (Zou, Machelon et al. 2001; Scotton, Wilson et al. 2002) et que les niveaux d'expression de SDF-1 dans les cellules tumorales n'ont pas de valeur pronostique sur la survie globale et sur la survie sans progression tumorale des patientes atteintes le CEO (Jiang, Wu et al. 2006; Pils, Pinter et al. 2007).

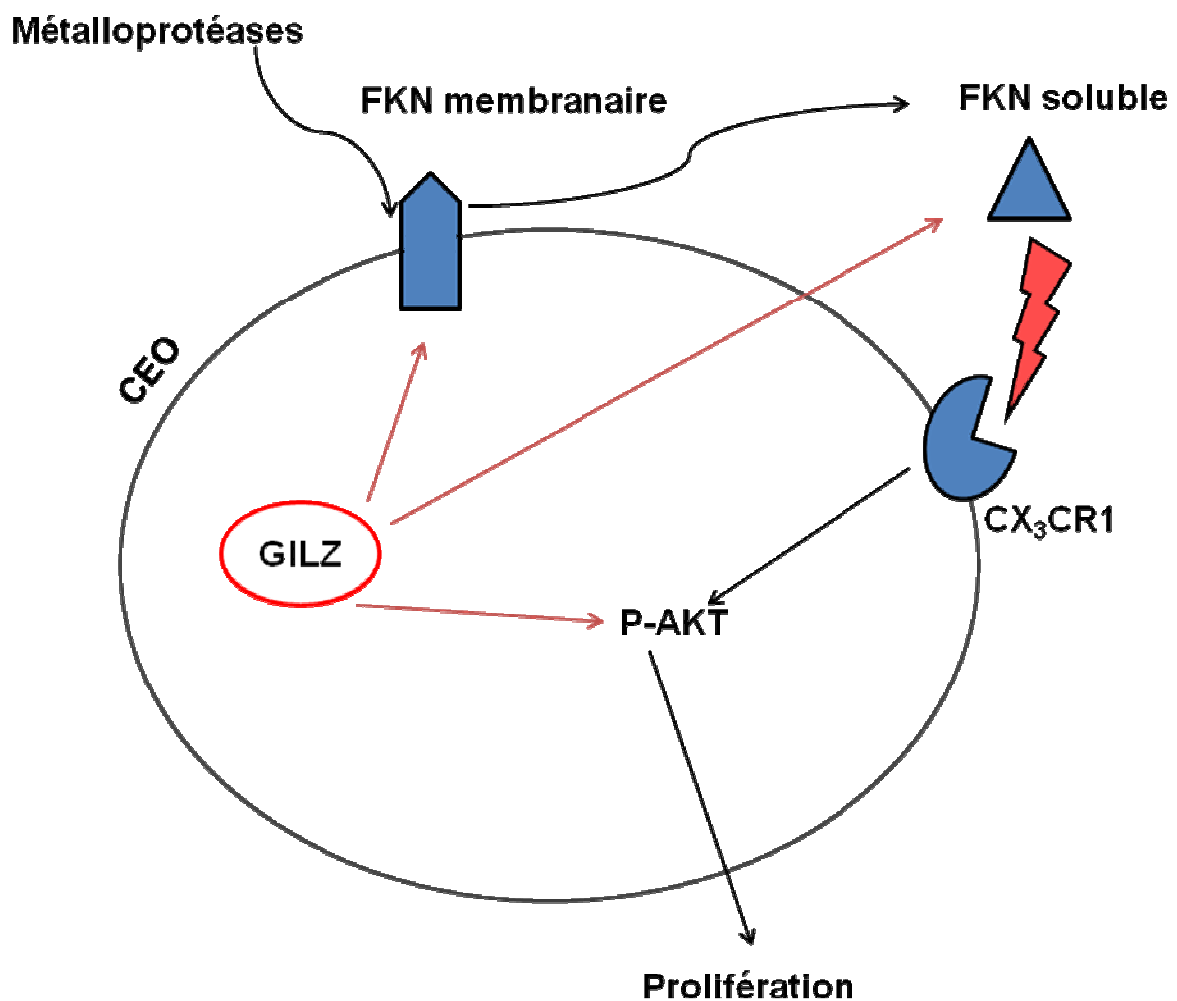
Nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois une expression de la FKN (la forme membranaire et la forme soluble) et de son récepteur (CX<sub>3</sub>CR1) par les cellules du cancer épithélial de l'ovaire. Notre étude révèle, pour la première fois que GILZ (considéré comme un facteur prolifératif des cellules du CEO) augmente l'expression de la FKN dans la lignée cancéreuse BG-1 du CEO. Nous avons démontré que la FKN sous sa forme soluble joue un rôle clé dans la prolifération cellulaire des lignées du CEO. Nos résultats indiquent également que la FKN augmente la forme phosphorylée d'AKT, une molécule de voie de signalisation impliquée dans la progression tumorale.

Une étude récente sur les neurones corticaux montre que SDF-1 augmente la production de la forme soluble de la FKN par une augmentation de l'expression de la métalloprotéase ADAM17, qui clive la forme membranaire de CX<sub>3</sub>CL1 (Cook, Hippensteel et al. 2010). Nos résultats montrent bien la production des deux chimiokines SDF-1 et FKN par les cellules du CEO, donc il serait intéressant de déterminer si SDF-1 favorise, via l'induction de protéases, la production de la forme soluble de CX<sub>3</sub>CL1 dans le CEO.

Nous envisageons également d'évaluer la valeur pronostique de la FKN dans le CEO. En utilisant la technologie des "tissue microarrays" établie à partir d'une large cohorte de patientes ayant reçu le même traitement par chimiothérapie. L'expression de la FKN sera corrélée à divers paramètres cliniques (ex : grade, stade FIGO) ainsi qu'à la survie des patientes (survie globale et la survie sans progression tumorale).

La compréhension des dérégulations moléculaires impliquées dans le processus de transformation ou de progression tumorale et de ce fait la caractérisation des molécules responsables de ces dysfonctionnements permettrait d'une part l'élaboration de nouvelles thérapeutiques ciblée, et d'autre part, d'identifier des facteurs biologiques qui pourraient renseigner sur la nature de la tumeur (établissement de profils biologiques des tumeurs) et influencer le choix des stratégies thérapeutiques.

**Schéma récapitulatif**



**Schéma récapitulatif d'action de GILZ et de la FKN dans les cellules du cancer épithélial de l'ovaire**



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Ahr, B., M. Denizot, et al. (2005). "Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation." J Biol Chem **280**(8): 6692-6700.
- Akishima-Fukasawa, Y., Y. Nakanishi, et al. (2009). "Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma." Am J Clin Pathol **132**(2): 202-210; quiz 307.
- Ali, S., A. C. Palmer, et al. (2000). "Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans." J Biol Chem **275**(16): 11721-11727.
- Altomare, D. A. and J. R. Testa (2005). "Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer." Oncogene **24**(50): 7455-7464.
- Altomare, D. A., H. Q. Wang, et al. (2004). "AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth." Oncogene **23**(34): 5853-5857.
- Andre, F., N. Cabioglu, et al. (2006). "Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer." Ann Oncol **17**(6): 945-951.
- Andrzejewski, M. G., A. Koelsch, et al. (2010). "Distinct role of the intracellular C-terminus for subcellular expression, shedding and function of the murine transmembrane chemokine CX3CL1." Biochem Biophys Res Commun **395**(2): 178-184.
- Angers, S., A. Salahpour, et al. (2002). "Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 409-435.
- Apostolakis, S., E. Krambovitis, et al. (2007). "CX3CR1 receptor is up-regulated in monocytes of coronary artery diseased patients: impact of pre-inflammatory stimuli and renin-angiotensin system modulators." Thromb Res **121**(3): 387-395.
- Arboleda, M. J., J. F. Lyons, et al. (2003). "Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells." Cancer Res **63**(1): 196-206.
- Argento, M., P. Hoffman, et al. (2008). "Ovarian cancer detection and treatment: current situation and future prospects." Anticancer Res **28**(5B): 3135-3138.
- Asselin-Labat, M. L., M. David, et al. (2004). "GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis." Blood **104**(1): 215-223.
- Auersperg, N., M. I. Edelson, et al. (1998). "The biology of ovarian cancer." Semin Oncol **25**(3): 281-304.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Auersperg, N., A. S. Wong, et al. (2001). "Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology." Endocr Rev **22**(2): 255-288.
- Ayroldi, E., G. Migliorati, et al. (2001). "Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB." Blood **98**(3): 743-753.
- Ayroldi, E. and C. Riccardi (2009). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action." FASEB J **23**(11): 3649-3658.
- Ayroldi, E., O. Zollo, et al. (2007). "GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling." J Clin Invest **117**(6): 1605-1615.
- Ayroldi, E., O. Zollo, et al. (2002). "Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1." Mol Cell Biol **22**(22): 7929-7941.
- Baeuerle, P. A. and O. Gires (2007). "EpCAM (CD326) finding its role in cancer." Br J Cancer **96**(3): 417-423.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.
- Baggiolini, M., A. Walz, et al. (1989). "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils." J Clin Invest **84**(4): 1045-1049.
- Balabanian, K., A. Foussat, et al. (2002). "CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **165**(10): 1419-1425.
- Balabanian, K., B. Lagane, et al. (2005). "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes." J Biol Chem **280**(42): 35760-35766.
- Balabanian, K., B. Lagane, et al. (2005). "WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12." Blood **105**(6): 2449-2457.
- Bali, A., P. M. O'Brien, et al. (2004). "Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer." Clin Cancer Res **10**(15): 5168-5177.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." Nat Rev Cancer **4**(7): 540-550.
- Balkwill, F. (2004). "The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4." Semin Cancer Biol **14**(3): 171-179.

- Barbero, S., R. Bonavia, et al. (2003). "Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt." Cancer Res **63**(8): 1969-1974.
- Barbieri, F., A. Bajetto, et al. (2010). "Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target." J Oncol **2010**: 426956.
- Barbolina, M. V., M. Kim, et al. (2010). "Microenvironmental regulation of chemokine (C-X-C-motif) receptor 4 in ovarian carcinoma." Mol Cancer Res **8**(5): 653-664.
- Bast, R. C., Jr., M. Feeney, et al. (1981). "Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma." J Clin Invest **68**(5): 1331-1337.
- Bast, R. C., Jr., B. Hennessy, et al. (2009). "The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation." Nat Rev Cancer **9**(6): 415-428.
- Bast, R. C., Jr., T. L. Klug, et al. (1983). "A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer." N Engl J Med **309**(15): 883-887.
- Bast, R. C., Jr., F. J. Xu, et al. (1998). "CA 125: the past and the future." Int J Biol Markers **13**(4): 179-187.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." Nature **385**(6617): 640-644.
- Becker, Y. (2007). "The spreading of HIV-1 infection in the human organism is caused by fractalkine trafficking of the infected lymphocytes--a review, hypothesis and implications for treatment." Virus Genes **34**(2): 93-109.
- Beral, V., D. Bull, et al. (2007). "Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study." Lancet **369**(9574): 1703-1710.
- Berchiche, Y. A., S. Gravel, et al. (2010). "Different effects of the different natural CC-chemokine receptor 2B (CCR2B) ligands on {beta}-arrestin recruitment, G{alpha}i signalling, and receptor internalization." Mol Pharmacol.
- Berkowitz, Z., S. H. Rim, et al. (2010). "Characteristics and survival associated with ovarian cancer diagnosed as first cancer and ovarian cancer diagnosed subsequent to a previous cancer." Cancer Epidemiol.
- Berrebi, D., S. Bruscoli, et al. (2003). "Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10." Blood **101**(2): 729-738.
- Bhandari, D., J. Trejo, et al. (2007). "Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4." J Biol Chem **282**(51): 36971-36979.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Bisset, L. R. and P. Schmid-Grendelmeier (2005). "Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective." Curr Opin Pulm Med **11**(1): 35-42.
- Blaschke, S. and G. A. Muller (2008). "[Fractalkine--a proinflammatory chemokine in rheumatoid arthritis]." Z Rheumatol **67**(5): 424-428.
- Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature **382**(6594): 829-833.
- Blohm, U., E. Roth, et al. (2002). "Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes." J Immunol **169**(10): 5522-5530.
- Blum, D. L., T. Koyama, et al. (2008). "Chemokine markers predict biochemical recurrence of prostate cancer following prostatectomy." Clin Cancer Res **14**(23): 7790-7797.
- Bockaert, J. (1991). "Coupling of receptors to G proteins, pharmacological implications." Therapie **46**(6): 413-420.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." EMBO J **18**(7): 1723-1729.
- Borroni, E. M., A. Mantovani, et al. (2010). "Chemokine receptors intracellular trafficking." Pharmacol Ther **127**(1): 1-8.
- Brandes, M., D. F. Legler, et al. (2000). "Activation-dependent modulation of B lymphocyte migration to chemokines." Int Immunol **12**(9): 1285-1292.
- Brazil, D. P., Z. Z. Yang, et al. (2004). "Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts." Trends Biochem Sci **29**(5): 233-242.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-868.
- Bruscoli, S., V. Donato, et al. (2010). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids." J Biol Chem **285**(14): 10385-10396.
- Burger, J. A. and T. J. Kipps (2006). "CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment." Blood **107**(5): 1761-1767.
- Burger, M., A. Glodek, et al. (2003). "Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells." Oncogene **22**(50): 8093-8101.
- Burns, J. M., B. C. Summers, et al. (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." J Exp Med **203**(9): 2201-2213.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Busillo, J. M., S. Armando, et al. (2010). "Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling." J Biol Chem **285**(10): 7805-7817.
- Calle, E. E., C. Rodriguez, et al. (2003). "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults." N Engl J Med **348**(17): 1625-1638.
- Cambien, B., M. Pomeranz, et al. (2001). "Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine-induced monocytic cell adhesion." Blood **97**(7): 2031-2037.
- Camilleri-Broet, S., A. C. Hardy-Bessard, et al. (2004). "HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group." Ann Oncol **15**(1): 104-112.
- Campoli, M., C. C. Chang, et al. (2002). "HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection." Vaccine **20 Suppl 4**: A40-45.
- Cannarile, L., S. Cuzzocrea, et al. (2009). "Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis." Gastroenterology **136**(2): 530-541.
- Cannarile, L., F. Fallarino, et al. (2006). "Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines." Blood **107**(3): 1039-1047.
- Cannarile, L., O. Zollo, et al. (2001). "Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene." Cell Death Differ **8**(2): 201-203.
- Cannistra, S. A. (2004). "Cancer of the ovary." N Engl J Med **351**(24): 2519-2529.
- Cardona, A. E., E. P. Piore, et al. (2006). "Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor." Nat Neurosci **9**(7): 917-924.
- Chakravorty, S. J., P. Cockwell, et al. (2002). "Fractalkine expression on human renal tubular epithelial cells: potential role in mononuclear cell adhesion." Clin Exp Immunol **129**(1): 150-159.
- Chen, S., D. Luo, et al. (2002). "TGF-beta1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia." J Neuroimmunol **133**(1-2): 46-55.
- Chen, V. W., B. Ruiz, et al. (2003). "Pathology and classification of ovarian tumors." Cancer **97**(10 Suppl): 2631-2642.
- Chien, J. R., G. Aletti, et al. (2007). "Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer." J Cell Biochem **102**(5): 1117-1129.
- Clark-Lewis, I., K. S. Kim, et al. (1995). "Structure-activity relationships of chemokines." J Leukoc Biol **57**(5): 703-711.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Clark, A. K., P. K. Yip, et al. (2007). "Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10655-10660.
- Clark, A. K., P. K. Yip, et al. (2009). "The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S." J Neurosci **29**(21): 6945-6954.
- Cohen, N., E. Mouly, et al. (2006). "GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response." Blood **107**(5): 2037-2044.
- Cole, K. E., C. A. Strick, et al. (1998). "Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3." J Exp Med **187**(12): 2009-2021.
- Colombo, N., T. Van Gorp, et al. (2006). "Ovarian cancer." Crit Rev Oncol Hematol **60**(2): 159-179.
- Combadiere, C., S. K. Ahuja, et al. (1995). "Cloning, chromosomal localization, and RNA expression of a human beta chemokine receptor-like gene." DNA Cell Biol **14**(8): 673-680.
- Combadiere, C., S. Potteaux, et al. (2003). "Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice." Circulation **107**(7): 1009-1016.
- Combadiere, C., K. Salzwedel, et al. (1998). "Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1." J Biol Chem **273**(37): 23799-23804.
- Connolly, D. C., R. Bao, et al. (2003). "Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer." Cancer Res **63**(6): 1389-1397.
- Cook, A., R. Hippensteel, et al. (2010). "Interactions between chemokines: regulation of fractalkine/CX3CL1 homeostasis by SDF/CXCL12 in cortical neurons." J Biol Chem **285**(14): 10563-10571.
- Cottreau, C. M., R. B. Ness, et al. (2000). "Physical activity and reduced risk of ovarian cancer." Obstet Gynecol **96**(4): 609-614.
- Coulomb-L'Hermin, A., A. Amara, et al. (1999). "Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8585-8590.
- Crump, M. P., J. H. Gong, et al. (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." EMBO J **16**(23): 6996-7007.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-949.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science **286**(5447): 2098-2102.
- D'Adamio, F., O. Zollo, et al. (1997). "A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death." Immunity **7**(6): 803-812.
- D'Haese, J. G., I. E. Demir, et al. (2010). "Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential." Expert Opin Ther Targets **14**(2): 207-219.
- De La Luz Sierra, M., F. Yang, et al. (2004). "Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity." Blood **103**(7): 2452-2459.
- Di Marco, B., M. Massetti, et al. (2007). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain." Nucleic Acids Res **35**(2): 517-528.
- Dichmann, S., Y. Herouy, et al. (2001). "Fractalkine induces chemotaxis and actin polymerization in human dendritic cells." Inflamm Res **50**(11): 529-533.
- Dinh, P., P. Harnett, et al. (2008). "New therapies for ovarian cancer: cytotoxics and molecularly targeted agents." Crit Rev Oncol Hematol **67**(2): 103-112.
- Dinulescu, D. M., T. A. Ince, et al. (2005). "Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer." Nat Med **11**(1): 63-70.
- Dong, H., S. E. Strome, et al. (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." Nat Med **8**(8): 793-800.
- Dorgham, K., A. Ghadiri, et al. (2009). "An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity." J Leukoc Biol **86**(4): 903-911.
- Durkan, A. M., R. T. Alexander, et al. (2007). "Expression and targeting of CX3CL1 (fractalkine) in renal tubular epithelial cells." J Am Soc Nephrol **18**(1): 74-83.
- Eddleston, J., J. Herschbach, et al. (2007). "The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells." J Allergy Clin Immunol **119**(1): 115-122.
- Elgert, K. D., D. G. Alleva, et al. (1998). "Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection." J Leukoc Biol **64**(3): 275-290.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Ellestad, L. E., S. A. Malkiewicz, et al. (2009). "Expression and regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper in the developing anterior pituitary gland." J Mol Endocrinol **42**(2): 171-183.
- Engelman, J. A. (2009). "Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations." Nat Rev Cancer **9**(8): 550-562.
- Engl, T., B. Relja, et al. (2006). "CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins." Neoplasia **8**(4): 290-301.
- Erreni, M., G. Solinas, et al. (2010). "Human glioblastoma tumours and neural cancer stem cells express the chemokine CX3CL1 and its receptor CX3CR1." Eur J Cancer **46**(18): 3383-3392.
- Farzan, M., T. Mirzabekov, et al. (1999). "Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry." Cell **96**(5): 667-676.
- Fathalla, M. F. (1971). "Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?" Lancet **2**(7716): 163.
- Fayers, P. M., G. Rustin, et al. (1993). "The prognostic value of serum CA 125 in patients with advanced ovarian carcinoma: an analysis of 573 patients by the Medical Research Council Working Party on Gynaecological Cancer." Int J Gynecol Cancer **3**(5): 285-292.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-877.
- Flesken-Nikitin, A., K. C. Choi, et al. (2003). "Induction of carcinogenesis by concurrent inactivation of p53 and Rb1 in the mouse ovarian surface epithelium." Cancer Res **63**(13): 3459-3463.
- Fong, A. M., S. M. Alam, et al. (2002). "CX3CR1 tyrosine sulfation enhances fractalkine-induced cell adhesion." J Biol Chem **277**(22): 19418-19423.
- Fong, A. M., L. A. Robinson, et al. (1998). "Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow." J Exp Med **188**(8): 1413-1419.
- Foussat, A., A. Coulomb-L'Hermine, et al. (2000). "Fractalkine receptor expression by T lymphocyte subpopulations and in vivo production of fractalkine in human." Eur J Immunol **30**(1): 87-97.
- Franke, T. F. (2008). "PI3K/Akt: getting it right matters." Oncogene **27**(50): 6473-6488.
- Fujimoto, K., T. Imaizumi, et al. (2001). "Interferon-gamma stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(2): 233-238.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Furusato, B., A. Mohamed, et al. (2010). "CXCR4 and cancer." Pathol Int **60**(7): 497-505.
- Gadducci, A., S. Cosio, et al. (2009). "Serum and tissue biomarkers as predictive and prognostic variables in epithelial ovarian cancer." Crit Rev Oncol Hematol **69**(1): 12-27.
- Galzi, J. L., M. Hachet-Haas, et al. (2010). "Neutralizing endogenous chemokines with small molecules. Principles and potential therapeutic applications." Pharmacol Ther **126**(1): 39-55.
- Gao, N., D. C. Flynn, et al. (2004). "G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells." Am J Physiol Cell Physiol **287**(2): C281-291.
- Gao, Z., X. Wang, et al. (2010). "Pancreatic stellate cells increase the invasion of human pancreatic cancer cells through the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis." Pancreatology **10**(2-3): 186-193.
- Garson, K., T. J. Shaw, et al. (2005). "Models of ovarian cancer--are we there yet?" Mol Cell Endocrinol **239**(1-2): 15-26.
- Garton, K. J., P. J. Gough, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)." J Biol Chem **276**(41): 37993-38001.
- Gelmini, S., M. Mangoni, et al. (2009). "The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer." Clin Exp Metastasis **26**(3): 261-268.
- Gerrits, H., D. S. van Ingen Schenau, et al. (2008). "Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice." Genesis **46**(5): 235-245.
- Gilbert, D. C., I. Chandler, et al. (2009). "Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents." J Pathol **217**(1): 94-102.
- Gleissner, C. A., A. Zastrow, et al. (2007). "IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells." Eur J Immunol **37**(1): 177-192.
- Godot, V., G. Garcia, et al. (2006). "Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells." Allergy **61**(7): 886-890.
- Gomez-Raposo, C., M. Mendiola, et al. (2010). "Molecular characterization of ovarian cancer by gene-expression profiling." Gynecol Oncol **118**(1): 88-92.
- Gozansky, E. K., J. M. Louis, et al. (2005). "Mapping the binding of the N-terminal extracellular tail of the CXCR4 receptor to stromal cell-derived factor-1alpha." J Mol Biol **345**(4): 651-658.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Grover, S., H. Koh, et al. (1992). "The effect of the menstrual cycle on serum CA 125 levels: a population study." Am J Obstet Gynecol **167**(5): 1379-1381.
- Grugan, K. D., C. Ma, et al. (2008). "Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma." J Steroid Biochem Mol Biol **110**(3-5): 244-254.
- Grymula, K., M. Tarnowski, et al. (2010). "Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas." Int J Cancer **127**(11): 2554-2568.
- Guo, J., T. Chen, et al. (2003). "Chemoattraction, adhesion and activation of natural killer cells are involved in the antitumor immune response induced by fractalkine/CX3CL1." Immunol Lett **89**(1): 1-7.
- Hamdi, H., A. Bigorgne, et al. (2007). "Glucocorticoid-induced leucine zipper: A key protein in the sensitization of monocytes to lipopolysaccharide in alcoholic hepatitis." Hepatology **46**(6): 1986-1992.
- Hamdi, H., V. Godot, et al. (2007). "Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper." Blood **110**(1): 211-219.
- Hanna, L. and M. Adams (2006). "Prevention of ovarian cancer." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **20**(2): 339-362.
- Hannan, N. J., R. L. Jones, et al. (2004). "Coexpression of fractalkine and its receptor in normal human endometrium and in endometrium from users of progestin-only contraception supports a role for fractalkine in leukocyte recruitment and endometrial remodeling." J Clin Endocrinol Metab **89**(12): 6119-6129.
- Haraldsen, G. and A. Rot (2006). "Coy decoy with a new ploy: interceptor controls the levels of homeostatic chemokines." Eur J Immunol **36**(7): 1659-1661.
- Haribabu, B., R. M. Richardson, et al. (1997). "Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization." J Biol Chem **272**(45): 28726-28731.
- Harrison, J. K., C. M. Barber, et al. (1994). "cDNA cloning of a G-protein-coupled receptor expressed in rat spinal cord and brain related to chemokine receptors." Neurosci Lett **169**(1-2): 85-89.
- Harrison, J. K., A. M. Fong, et al. (2001). "Mutational analysis of the fractalkine chemokine domain. Basic amino acid residues differentially contribute to CX3CR1 binding, signaling, and cell adhesion." J Biol Chem **276**(24): 21632-21641.
- Hartmann, T. N., J. A. Burger, et al. (2005). "CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells." Oncogene **24**(27): 4462-4471.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Hartmann, T. N., V. Grabovsky, et al. (2008). "A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells." *J Leukoc Biol* **84**(4): 1130-1140.
- Haskell, C. A., M. D. Cleary, et al. (1999). "Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation." *J Biol Chem* **274**(15): 10053-10058.
- Haskell, C. A., W. W. Hancock, et al. (2001). "Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection." *J Clin Invest* **108**(5): 679-688.
- Hassan, S., C. Ferrario, et al. (2009). "The influence of tumor-host interactions in the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 ligand/receptor axis in determining metastatic risk in breast cancer." *Am J Pathol* **175**(1): 66-73.
- Heesen, M., M. A. Berman, et al. (1996). "Cloning of the mouse fusin gene, homologue to a human HIV-1 co-factor." *J Immunol* **157**(12): 5455-5460.
- Heesen, M., M. A. Berman, et al. (1998). "Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1." *Immunogenetics* **47**(5): 364-370.
- Heesen, M., M. A. Berman, et al. (1997). "Alternate splicing of mouse fusin/CXC chemokine receptor-4: stromal cell-derived factor-1alpha is a ligand for both CXC chemokine receptor-4 isoforms." *J Immunol* **158**(8): 3561-3564.
- Herzog, H., Y. J. Hort, et al. (1993). "Molecular cloning, characterization, and localization of the human homolog to the reported bovine NPY Y3 receptor: lack of NPY binding and activation." *DNA Cell Biol* **12**(6): 465-471.
- Honzarenko, M., Y. Le, et al. (2002). "CCR5-binding chemokines modulate CXCL12 (SDF-1)-induced responses of progenitor B cells in human bone marrow through heterologous desensitization of the CXCR4 chemokine receptor." *Blood* **100**(7): 2321-2329.
- Horuk, R. (2001). "Chemokine receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(4): 313-335.
- Hu, L., J. Hofmann, et al. (2002). "Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models." *Cancer Res* **62**(4): 1087-1092.
- Huang, S., M. Van Arsdall, et al. (2002). "Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice." *J Natl Cancer Inst* **94**(15): 1134-1142.
- Huang, Y. W., P. Su, et al. (2009). "Constitutive endocytosis of the chemokine CX3CL1 prevents its degradation by cell surface metalloproteases." *J Biol Chem* **284**(43): 29644-29653.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Hundhausen, C., A. Schulte, et al. (2007). "Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes." J Immunol **178**(12): 8064-8072.
- Hung, S. C., R. R. Pochampally, et al. (2007). "Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo." PLoS One **2**(5): e416.
- Illi, B., A. Scopece, et al. (2005). "Epigenetic histone modification and cardiovascular lineage programming in mouse embryonic stem cells exposed to laminar shear stress." Circ Res **96**(5): 501-508.
- Imai, T., K. Hieshima, et al. (1997). "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion." Cell **91**(4): 521-530.
- Imaizumi, T., H. Yoshida, et al. (2004). "Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells." J Atheroscler Thromb **11**(1): 15-21.
- Iwakiri, S., N. Mino, et al. (2009). "Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer." Cancer **115**(11): 2580-2593.
- Jamieson, W. L., S. Shimizu, et al. (2008). "CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism." Cancer Res **68**(6): 1715-1722.
- Janowski, M. (2009). "Functional diversity of SDF-1 splicing variants." Cell Adh Migr **3**(3): 243-249.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Jiang, Y. P., X. H. Wu, et al. (2006). "Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression." Gynecol Oncol **103**(1): 226-233.
- Jordan, S. J., D. C. Whiteman, et al. (2006). "Does smoking increase risk of ovarian cancer? A systematic review." Gynecol Oncol **103**(3): 1122-1129.
- Jung, S., J. Aliberti, et al. (2000). "Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion." Mol Cell Biol **20**(11): 4106-4114.
- Kajiyama, H., K. Shibata, et al. (2008). "Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma." Int J Cancer **122**(1): 91-99.
- Kalatskaya, I., Y. A. Berchiche, et al. (2009). "AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties." Mol Pharmacol **75**(5): 1240-1247.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Kamat, A. A., M. Fletcher, et al. (2006). "The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer." Clin Cancer Res **12**(6): 1707-1714.
- Karst, A. M. and R. Drapkin (2010). "Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution." J Oncol **2010**: 932371.
- Khouja, M. H., M. Baekelandt, et al. (2007). "The clinical importance of Ki-67, p16, p14, and p57 expression in patients with advanced ovarian carcinoma." Int J Gynecol Pathol **26**(4): 418-425.
- Kikuchi, T., S. Andarini, et al. (2005). "Involvement of fractalkine/CX3CL1 expression by dendritic cells in the enhancement of host immunity against *Legionella pneumophila*." Infect Immun **73**(9): 5350-5357.
- Klein, R. L., A. R. Brown, et al. (2010). "Ovarian cancer metastatic to the breast presenting as inflammatory breast cancer: a case report and literature review." J Cancer **1**: 27-31.
- Klosowska, K., M. V. Volin, et al. (2009). "Fractalkine functions as a chemoattractant for osteoarthritis synovial fibroblasts and stimulates phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and Akt." Clin Exp Immunol **156**(2): 312-319.
- Kobel, M., S. E. Kalloger, et al. (2008). "Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies." PLoS Med **5**(12): e232.
- Kolbus, A., M. Blazquez-Domingo, et al. (2003). "Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling." Blood **102**(9): 3136-3146.
- Kourda, N., H. Elloumi, et al. (2008). "[Proliferating Brenner tumor: case report]." Gynecol Obstet Fertil **36**(3): 292-295.
- Kremlev, S. G. and C. Palmer (2005). "Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures." J Neuroimmunol **162**(1-2): 71-80.
- Kryczek, I., A. Lange, et al. (2005). "CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers." Cancer Res **65**(2): 465-472.
- Kryczek, I., S. Wei, et al. (2007). "Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **292**(3): C987-995.
- Kukreja, P., A. B. Abdel-Mageed, et al. (2005). "Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation." Cancer Res **65**(21): 9891-9898.
- Kurt, R. A., J. A. Park, et al. (2000). "TCR v(beta) usage and clonality of T cells isolated from progressing and rejected tumor sites before and after in vitro culture." Int Immunol **12**(5): 639-646.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Laframboise, S., R. Nedelcu, et al. (2002). "Use of CA-125 and ultrasound in high-risk women." Int J Gynecol Cancer **12**(1): 86-91.
- Laguri, C., F. Arenzana-Seisdedos, et al. (2008). "Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example." Carbohydr Res **343**(12): 2018-2023.
- Laing, K. J. and C. J. Secombes (2004). "Chemokines." Dev Comp Immunol **28**(5): 443-460.
- Landen, C. N., Jr., M. J. Birrer, et al. (2008). "Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer." J Clin Oncol **26**(6): 995-1005.
- Larsson, S. C., A. Akesson, et al. (2009). "Long-term dietary acrylamide intake and risk of epithelial ovarian cancer in a prospective cohort of Swedish women." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(3): 994-997.
- Lavergne, E., B. Combadiere, et al. (2003). "Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo." Cancer Res **63**(21): 7468-7474.
- Law, N. M. and S. A. Rosenzweig (1994). "Characterization of the G-protein linked orphan receptor GPRN1/RDC1." Biochem Biophys Res Commun **201**(1): 458-465.
- Lazennec, G. and A. Richmond (2010). "Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation." Trends Mol Med **16**(3): 133-144.
- Legler, D. F., M. Loetscher, et al. (1998). "B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5." J Exp Med **187**(4): 655-660.
- Lesnik, P., C. A. Haskell, et al. (2003). "Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis." J Clin Invest **111**(3): 333-340.
- Levanon, K., V. Ng, et al. (2010). "Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis." Oncogene **29**(8): 1103-1113.
- Levine, S. P. and H. Wohl (1976). "Human platelet factor 4: Purification and characterization by affinity chromatography. Purification of human platelet factor 4." J Biol Chem **251**(2): 324-328.
- Levoye, A., K. Balabanian, et al. (2009). "CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling." Blood **113**(24): 6085-6093.
- Li, F., Z. Wang, et al. (2010). "Down-regulation of fractalkine inhibits the in vitro and in vivo angiogenesis of the hepatocellular carcinoma HepG2 cells." Oncol Rep **24**(3): 669-675.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Liang, J. J., S. Zhu, et al. (2010). "High levels of expression of human stromal cell-derived factor-1 are associated with worse prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(10): 2598-2604.
- Liang, Z., Y. Yoon, et al. (2005). "Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis." Cancer Res **65**(3): 967-971.
- Libert, F., M. Parmentier, et al. (1989). "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family." Science **244**(4904): 569-572.
- Lis, R., C. Touboul, et al. (2011). "Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12." Int J Cancer **128**(3): 715-725.
- Liu, P., Y. R. Yu, et al. (2008). "CX3CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(2): 243-250.
- Loetscher, M., T. Geiser, et al. (1994). "Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes." J Biol Chem **269**(1): 232-237.
- Lucas, A. D., N. Chadwick, et al. (2001). "The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo." Am J Pathol **158**(3): 855-866.
- Lucchesi, W., G. Brady, et al. (2008). "Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2." J Virol **82**(15): 7456-7466.
- Ludwig, A., T. Berkhout, et al. (2002). "Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity." J Immunol **168**(2): 604-612.
- Ludwig, A., C. Hundhausen, et al. (2005). "Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules." Comb Chem High Throughput Screen **8**(2): 161-171.
- Lueth, N. A., K. E. Anderson, et al. (2008). "Coffee and caffeine intake and the risk of ovarian cancer: the Iowa Women's Health Study." Cancer Causes Control **19**(10): 1365-1372.
- Lukanova, A., P. Toniolo, et al. (2002). "Body mass index in relation to ovarian cancer: a multi-centre nested case-control study." Int J Cancer **99**(4): 603-608.
- Luker, K. E., J. M. Steele, et al. (2010). "Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands." Oncogene **29**(32): 4599-4610.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Luster, A. D., S. M. Greenberg, et al. (1995). "The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation." J Exp Med **182**(1): 219-231.
- Ma, Q., D. Jones, et al. (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9448-9453.
- Mabuchi, S., D. A. Altomare, et al. (2007). "RAD001 (Everolimus) delays tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer." Cancer Res **67**(6): 2408-2413.
- Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol **2**(2): 95-101.
- Maghazachi, A. A. (2000). "Chemokines, G proteins and natural killer cells." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **48**(2): 65-72.
- Maksym, R. B., M. Tarnowski, et al. (2009). "The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer." Eur J Pharmacol **625**(1-3): 31-40.
- Mantovani, A., S. Sozzani, et al. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." Trends Immunol **23**(11): 549-555.
- Marchesi, F., M. Locatelli, et al. (2010). "Role of CX3CR1/CX3CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer." J Neuroimmunol **224**(1-2): 39-44.
- Marchesi, F., P. Monti, et al. (2004). "Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4." Cancer Res **64**(22): 8420-8427.
- Marchesi, F., L. Piemonti, et al. (2008). "The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Res **68**(21): 9060-9069.
- Marechal, R., P. Demetter, et al. (2009). "High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma." Br J Cancer **100**(9): 1444-1451.
- Markmann, S., B. Gerber, et al. (2007). "Prognostic value of Ca 125 levels during primary therapy." Anticancer Res **27**(4A): 1837-1839.
- Matloubian, M., A. David, et al. (2000). "A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo." Nat Immunol **1**(4): 298-304.
- Matouk, C. C. and P. A. Marsden (2008). "Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression." Circ Res **102**(8): 873-887.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Matsubara, T., T. Ono, et al. (2007). "Fractalkine-CX3CR1 axis regulates tumor cell cycle and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma." J Surg Oncol **95**(3): 241-249.
- Matsumiya, T., K. Ota, et al. (2010). "Characterization of synergistic induction of CX3CL1/fractalkine by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells: an essential role for TNF-alpha in post-transcriptional regulation of CX3CL1." J Immunol **184**(8): 4205-4214.
- Meden, H. and A. Fattahi-Meibodi (1998). "CA 125 in benign gynecological conditions." Int J Biol Markers **13**(4): 231-237.
- Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." EMBO J **20**(10): 2497-2507.
- Meng, Q., C. Xia, et al. (2006). "Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway." Cell Signal **18**(12): 2262-2271.
- Miao, Z., K. E. Luker, et al. (2007). "CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15735-15740.
- Mikuta, J. J. (1993). "International Federation of Gynecology and Obstetrics staging of endometrial cancer 1988." Cancer **71**(4 Suppl): 1460-1463.
- Mittelstadt, P. R. and J. D. Ashwell (2001). "Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ." J Biol Chem **276**(31): 29603-29610.
- Montecarlo, F. S. and I. F. Charo (1996). "The amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1alpha receptor, confers chemokine selectivity. Evidence for a two-step mechanism for MCP-1 receptor activation." J Biol Chem **271**(32): 19084-19092.
- Moore, C. A., S. K. Milano, et al. (2007). "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 451-482.
- Moser, B. and K. Willmann (2004). "Chemokines: role in inflammation and immune surveillance." Ann Rheum Dis **63** Suppl 2: ii84-ii89.
- Mueller, A., E. Kelly, et al. (2002). "Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5." Blood **99**(3): 785-791.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-56.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Muller, O. G., R. G. Parnova, et al. (2003). "Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>." J Am Soc Nephrol **14**(5): 1107-1115.
- Munz, M., P. A. Baeuerle, et al. (2009). "The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling." Cancer Res **69**(14): 5627-5629.
- Murphy, P. M. (2001). "Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry." Nat Immunol **2**(2): 116-122.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." Pharmacol Rev **52**(1): 145-176.
- Murphy, P. M. and H. L. Tiffany (1991). "Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor." Science **253**(5025): 1280-1283.
- Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-638.
- Nagasawa, T., T. Nakajima, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14726-14729.
- Nagasawa, T., K. Tachibana, et al. (1999). "A CXC chemokine SDF-1/PBSF: a ligand for a HIV coreceptor, CXCR4." Adv Immunol **71**: 211-228.
- Nakayama, T., Y. Watanabe, et al. (2010). "Eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1." J Immunol **185**(11): 6472-6479.
- Naora, H. and D. J. Montell (2005). "Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms." Nat Rev Cancer **5**(5): 355-366.
- Nelson, B. H. (2008). "The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes." Immunol Rev **222**: 101-116.
- Ness, R. B. and C. Cottreau (1999). "Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer." J Natl Cancer Inst **91**(17): 1459-1467.
- Nevo, I., O. Sagi-Assif, et al. (2009). "The involvement of the fractalkine receptor in the transmigration of neuroblastoma cells through bone-marrow endothelial cells." Cancer Lett **273**(1): 127-139.
- Ngo, V. N., H. Korner, et al. (1999). "Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen." J Exp Med **189**(2): 403-412.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Nibbs, R. J., S. M. Wylie, et al. (1997). "Cloning and characterization of a novel promiscuous human beta-chemokine receptor D6." J Biol Chem **272**(51): 32078-32083.
- Niess, J. H., S. Brand, et al. (2005). "CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance." Science **307**(5707): 254-258.
- Nishiyori, A., M. Minami, et al. (1998). "Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia?" FEBS Lett **429**(2): 167-172.
- Noguchi, M., V. Ropars, et al. (2007). "Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt." FASEB J **21**(10): 2273-2284.
- Noske, A., A. Kaszubiak, et al. (2007). "Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: increased expression of AKT in advanced ovarian cancer." Cancer Lett **246**(1-2): 190-200.
- Nukiwa, M., S. Andarini, et al. (2006). "Dendritic cells modified to express fractalkine/CX3CL1 in the treatment of preexisting tumors." Eur J Immunol **36**(4): 1019-1027.
- O'Hayre, M., C. L. Salanga, et al. (2008). "Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment." Biochem J **409**(3): 635-649.
- Obermair, A., A. Fuller, et al. (2007). "A new prognostic model for FIGO stage 1 epithelial ovarian cancer." Gynecol Oncol **104**(3): 607-611.
- Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling." Prog Biophys Mol Biol **83**(2): 101-130.
- Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." Cell **121**(3): 335-348.
- Orsulic, S., Y. Li, et al. (2002). "Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system." Cancer Cell **1**(1): 53-62.
- Pablos, J. L., A. Amara, et al. (1999). "Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin." Am J Pathol **155**(5): 1577-1586.
- Page, C., H. J. Lin, et al. (2000). "Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis." Anticancer Res **20**(1A): 407-416.
- Pan, Y., C. Lloyd, et al. (1997). "Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation." Nature **387**(6633): 611-617.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Papadopoulos, E. J., D. J. Fitzhugh, et al. (2000). "Mast cells migrate, but do not degranulate, in response to fractalkine, a membrane-bound chemokine expressed constitutively in diverse cells of the skin." Eur J Immunol **30**(8): 2355-2361.
- Pelucchi, C., C. Galeone, et al. (2007). "Lifetime ovulatory cycles and ovarian cancer risk in 2 Italian case-control studies." Am J Obstet Gynecol **196**(1): 83 e81-87.
- Perez, S. A., L. G. Mahaira, et al. (2005). "A potential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival." Blood **106**(1): 158-166.
- Permuth-Wey, J. and T. A. Sellers (2009). "Epidemiology of ovarian cancer." Methods Mol Biol **472**: 413-437.
- Perros, F., P. Dorfmuller, et al. (2007). "Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension." Eur Respir J **29**(5): 937-943.
- Phillips, R. J., J. Mestas, et al. (2005). "Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha." J Biol Chem **280**(23): 22473-22481.
- Pils, D., A. Pinter, et al. (2007). "In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway." Br J Cancer **96**(3): 485-491.
- Porcile, C., A. Bajetto, et al. (2004). "CXCR4 activation induces epidermal growth factor receptor transactivation in an ovarian cancer cell line." Ann N Y Acad Sci **1030**: 162-169.
- Porcile, C., A. Bajetto, et al. (2005). "Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation." Exp Cell Res **308**(2): 241-253.
- Proudfoot, A. E., S. Fritchley, et al. (2001). "The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity." J Biol Chem **276**(14): 10620-10626.
- Raggio, C., R. Ruhl, et al. (2005). "Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." Cancer Res **65**(12): 5084-5095.
- Rajagopal, S., J. Kim, et al. (2010). "Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(2): 628-632.
- Raman, D., P. J. Baugher, et al. (2007). "Role of chemokines in tumor growth." Cancer Lett **256**(2): 137-165.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Raport, C. J., V. L. Schweickart, et al. (1995). "The orphan G-protein-coupled receptor-encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues." Gene **163**(2): 295-299.
- Raspollini, M. R., F. Castiglione, et al. (2005). "Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma." Ann Oncol **16**(4): 590-596.
- Redjimi, N., F. Gaudin, et al. (2009). "Identification of glucocorticoid-induced leucine zipper as a key regulator of tumor cell proliferation in epithelial ovarian cancer." Mol Cancer **8**: 83.
- Ren, T., Q. Chen, et al. (2007). "Down-regulation of surface fractalkine by RNA interference in B16 melanoma reduced tumor growth in mice." Biochem Biophys Res Commun **364**(4): 978-984.
- Riccardi, C., M. G. Cifone, et al. (1999). "Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GITR and GILZ, two dexamethasone-induced genes." Cell Death Differ **6**(12): 1182-1189.
- Rimaniol, A. C., S. J. Till, et al. (2003). "The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis." J Allergy Clin Immunol **112**(6): 1139-1146.
- Robert-Nicoud, M., M. Flahaut, et al. (2001). "Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2712-2716.
- Rodriguez-Frade, J. M., G. del Real, et al. (2004). "Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor." EMBO J **23**(1): 66-76.
- Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, et al. (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-3633.
- Roland, J., B. J. Murphy, et al. (2003). "Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling." Blood **101**(2): 399-406.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-928.
- Rossi, D. L., G. Hardiman, et al. (1998). "Cloning and characterization of a new type of mouse chemokine." Genomics **47**(2): 163-170.
- Russo, A., V. Calo, et al. (2009). "Hereditary ovarian cancer." Crit Rev Oncol Hematol **69**(1): 28-44.
- Saederup, N., L. Chan, et al. (2008). "Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis." Circulation **117**(13): 1642-1648.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Salmaggi, A., E. Maderna, et al. (2009). "CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases." Cancer Biol Ther **8**(17): 1608-1614.
- Salvucci, O., L. Yao, et al. (2002). "Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1." Blood **99**(8): 2703-2711.
- Sanderson, R. D., Y. Yang, et al. (2005). "Enzymatic remodeling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: growth regulation and the prospect of new cancer therapies." J Cell Biochem **96**(5): 897-905.
- Sarker, D., A. H. Reid, et al. (2009). "Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer." Clin Cancer Res **15**(15): 4799-4805.
- Sasaki, K., S. Natsugoe, et al. (2009). "Expression of CXCL12 and its receptor CXCR4 in esophageal squamous cell carcinoma." Oncol Rep **21**(1): 65-71.
- Schondorf, T., U. J. Gohring, et al. (2003). "Time to progression is dependent on the expression of the tumour suppressor PTEN in ovarian cancer patients." Eur J Clin Invest **33**(3): 256-260.
- Schonemeier, B., A. Kolodziej, et al. (2008). "Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain." J Comp Neurol **510**(2): 207-220.
- Schwarz, N., J. Pruessmeyer, et al. (2010). "Requirements for leukocyte transmigration via the transmembrane chemokine CX3CL1." Cell Mol Life Sci **67**(24): 4233-4248.
- Scotton, C. J., J. L. Wilson, et al. (2001). "Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors?" Cancer Res **61**(13): 4961-4965.
- Scotton, C. J., J. L. Wilson, et al. (2002). "Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer." Cancer Res **62**(20): 5930-5938.
- Shayesteh, L., Y. Lu, et al. (1999). "PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer." Nat Genet **21**(1): 99-102.
- Shi, X., W. Shi, et al. (2003). "A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells." EMBO Rep **4**(4): 374-380.
- Shih Ie, M. and R. J. Kurman (2004). "Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis." Am J Pathol **164**(5): 1511-1518.
- Shimizu, N., Y. Soda, et al. (2000). "A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses." J Virol **74**(2): 619-626.
- Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." Genomics **28**(3): 495-500.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Shulby, S. A., N. G. Dolloff, et al. (2004). "CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells." Cancer Res **64**(14): 4693-4698.
- Sierro, F., C. Biben, et al. (2007). "Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14759-14764.
- Silverberg, S. G. (2000). "Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal." Int J Gynecol Pathol **19**(1): 7-15.
- Sohy, D., H. Yano, et al. (2009). "Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of "selective" antagonists." J Biol Chem **284**(45): 31270-31279.
- Soundararajan, R., J. Wang, et al. (2007). "Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms." J Biol Chem **282**(50): 36303-36313.
- Soundararajan, R., T. T. Zhang, et al. (2005). "A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport." J Biol Chem **280**(48): 39970-39981.
- Springael, J. Y., E. Urizar, et al. (2005). "Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 611-623.
- Stadel, B. V. (1975). "Letter: The etiology and prevention of ovarian cancer." Am J Obstet Gynecol **123**(7): 772-774.
- Su, L. P., J. P. Zhang, et al. (2005). "[The role of CXCR4 in lung cancer metastasis and its possible mechanism]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **85**(17): 1190-1194.
- Sugaya, M., K. Nakamura, et al. (2003). "Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1." J Dermatol Sci **31**(3): 179-187.
- Sun, H. D., K. C. Chao, et al. (2010). "Brain metastasis of ovarian epithelial carcinoma." Taiwan J Obstet Gynecol **49**(1): 101-104.
- Sun, M., G. Wang, et al. (2001). "AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells." Am J Pathol **159**(2): 431-437.
- Sun, X., G. Cheng, et al. (2010). "CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression." Cancer Metastasis Rev **29**(4): 709-722.
- Sun, Y. X., A. Schneider, et al. (2005). "Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo." J Bone Miner Res **20**(2): 318-329.
- Tachibana, K., S. Hirota, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature **393**(6685): 591-594.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Tang, L., H. D. Hu, et al. (2007). "Gene therapy with CX3CL1/Fractalkine induces antitumor immunity to regress effectively mouse hepatocellular carcinoma." Gene Ther **14**(16): 1226-1234.
- Tashiro, K., H. Tada, et al. (1993). "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." Science **261**(5121): 600-603.
- Teicher, B. A. and S. P. Fricker (2010). "CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer." Clin Cancer Res **16**(11): 2927-2931.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nat Immunol **2**(2): 129-134.
- Thelen, M. and S. Thelen (2008). "CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio?" J Neuroimmunol **198**(1-2): 9-13.
- Tretarre, B., L. Remontet, et al. (2005). "[Ovarian cancer: incidence and mortality in France]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **34**(2): 154-161.
- Tripathi, P. and S. Agrawal (2006). "Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression." Cancer Invest **24**(2): 178-186.
- Tsou, C. L., C. A. Haskell, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine." J Biol Chem **276**(48): 44622-44626.
- Tynan, S. H., S. G. Lundeen, et al. (2004). "Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen." J Steroid Biochem Mol Biol **91**(4-5): 225-239.
- Ueno, T., K. Tanaka, et al. (2009). "Divergent role of donor dendritic cells in rejection versus tolerance of allografts." J Am Soc Nephrol **20**(3): 535-544.
- Umehara, H., E. T. Bloom, et al. (2004). "Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(1): 34-40.
- Umehara, H. and T. Imai (2001). "Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration and in vascular injury." Drug News Perspect **14**(8): 460-464.
- Valdivia-Silva, J. E., J. Franco-Barraza, et al. (2009). "Effect of pro-inflammatory cytokine stimulation on human breast cancer: implications of chemokine receptor expression in cancer metastasis." Cancer Lett **283**(2): 176-185.
- van der Burg, M. E., F. B. Lammes, et al. (1988). "Ovarian cancer: the prognostic value of the serum half-life of CA125 during induction chemotherapy." Gynecol Oncol **30**(3): 307-312.
- Verge, G. M., E. D. Milligan, et al. (2004). "Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions." Eur J Neurosci **20**(5): 1150-1160.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Vila-Coro, A. J., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (1999). "The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway." FASEB J **13**(13): 1699-1710.
- Wang, J., J. Dai, et al. (2007). "A glycolytic mechanism regulating an angiogenic switch in prostate cancer." Cancer Res **67**(1): 149-159.
- Wang, J., Y. Shiozawa, et al. (2008). "The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer." J Biol Chem **283**(7): 4283-4294.
- Wang, J., Y. Sun, et al. (2005). "Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis." Cell Signal **17**(12): 1578-1592.
- Wei, H., S. Ahn, et al. (2003). "Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10782-10787.
- Wei, S., T. Curiel, et al. (2008). "Inhibitory B7 family members in human ovarian carcinoma." Adv Exp Med Biol **622**: 261-271.
- White, G. E. and D. R. Greaves (2009). "Fractalkine: one chemokine, many functions." Blood **113**(4): 767-768.
- White, G. E., T. C. Tan, et al. (2010). "Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signalling." Cardiovasc Res **85**(4): 825-835.
- Whiteman, D. C., V. Siskind, et al. (2003). "Timing of pregnancy and the risk of epithelial ovarian cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(1): 42-46.
- Whittemore, A. S., R. Harris, et al. (1992). "Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. I. Methods. Collaborative Ovarian Cancer Group." Am J Epidemiol **136**(10): 1175-1183.
- Willems, S. H., C. J. Tape, et al. (2010). "Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17." Biochem J **428**(3): 439-450.
- Wynne, A. M., C. J. Henry, et al. (2010). "Protracted downregulation of CX3CR1 on microglia of aged mice after lipopolysaccharide challenge." Brain Behav Immun **24**(7): 1190-1201.
- Xin, H., T. Kikuchi, et al. (2005). "Antitumor immune response by CX3CL1 fractalkine gene transfer depends on both NK and T cells." Eur J Immunol **35**(5): 1371-1380.
- Xu, L. and I. J. Fidler (2000). "Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer." Oncol Res **12**(2): 97-106.

- Yan, L., B. Lin, et al. (2010). "Lewis (y) Antigen Overexpression Increases the Expression of MMP-2 and MMP-9 and Invasion of Human Ovarian Cancer Cells." Int J Mol Sci **11**(11): 4441-4452.
- Yang, X. P., S. Mattagajasingh, et al. (2007). "Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway." Circ Res **101**(10): 1001-1008.
- Yu, L., J. Cecil, et al. (2006). "Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1." Gene **374**: 174-179.
- Yu, Y. R., A. M. Fong, et al. (2007). "Defective antitumor responses in CX3CR1-deficient mice." Int J Cancer **121**(2): 316-322.
- Yuan, Z. Q., M. Sun, et al. (2000). "Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer." Oncogene **19**(19): 2324-2330.
- Zeng, Y., J. Jiang, et al. (2005). "Fractalkine gene therapy for neuroblastoma is more effective in combination with targeted IL-2." Cancer Lett **228**(1-2): 187-193.
- Zhang, L., J. R. Conejo-Garcia, et al. (2003). "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer." N Engl J Med **348**(3): 203-213.
- Zhang, Q., K. Shimoya, et al. (2004). "Expression of fractalkine in the Fallopian tube and of CX3CR1 in sperm." Hum Reprod **19**(2): 409-414.
- Zhang, W., N. Yang, et al. (2008). "Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)." J Biol Chem **283**(8): 4723-4729.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.
- Zorn, K. K., T. Bonome, et al. (2005). "Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer." Clin Cancer Res **11**(18): 6422-6430.
- Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." Nat Rev Cancer **5**(4): 263-274.
- Zou, W., V. Machelon, et al. (2001). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." Nat Med **7**(12): 1339-1346.
- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-599.



## **RESUME**

Le cancer épithélial de l'ovaire (CEO) est une cause majeure de mortalité par cancer gynécologique. Il est associé à un mauvais pronostic car il est souvent découvert à un stade tardif. Mieux comprendre les causes et les mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la progression de ce cancer représente un enjeu majeur.

Les deux chimiokines CXCL12/SDF-1 et fractalkine (FKN)/CX<sub>3</sub>CL1 ont été impliquées dans diverses tumeurs. La chimiokine SDF-1, a un effet immunosuppresseur dans le CEO. Elle est aussi impliquée dans l'angiogenèse tumorale. L'effet de SDF-1 médié par CXCR4 est également impliqué dans la régulation de la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. La FKN, a largement été mise en évidence dans les tissus épithéliaux et dans divers cancers où elle peut avoir soit un rôle anti-tumoral soit un rôle pro-tumoral. Jusqu'à présent la FKN n'a pas été étudié dans le CEO.

Dans notre étude, nous avons démontré l'expression de SDF-1 et de la FKN dans l'épithélium de surface de l'ovaire sain et dans les tumeurs bénignes et malignes. Ces résultats montrent que l'expression de SDF-1 et de la FKN préexiste à la tumorigenèse. Nous avons démontré une expression hétérogène des deux chimiokines dans les cellules du CEO. Les niveaux d'expression de SDF-1 dans les cellules tumorales sur une cohorte de 183 patientes n'ont aucune valeur pronostique sur la survie globale et sur la survie sans progression tumorale des patientes atteintes par le CEO. L'étude de la corrélation de l'expression de la FKN avec les deux marqueurs de prolifération, Ki-67 et GILZ, sur une autre cohorte de 54 patientes, complétée par des expériences *in vitro*, a montré que GILZ augmente l'expression de la FKN et d'autre part que la FKN elle-même augmente la prolifération. Cette étude contribue à élucider le rôle de SDF-1 et de la FKN dans le CEO.

## **English TITLE and ABSTRACT**

### **Study of the two chemokines CXCL12/SDF-1 and fractalkine (FKN)/CX<sub>3</sub>CL1 in epithelial ovarian cancer (EOC)**

Little is known about the molecules that contribute to tumor growth of epithelial ovarian carcinomas (EOC) that remains the most lethal gynecological neoplasm in women.

The two chemokines CXCL12/SDF-1 and fractalkine (FKN)/CX<sub>3</sub>CL1 have been widely studied in tumorigenesis. In epithelial ovarian cancer (EOC), SDF-1 enhances tumor angiogenesis and contributes to the immunosuppressive network. SDF-1 also acts on tumor cell proliferation and survival and, through its main receptor CXCR4, governs the migration of malignant cells and their invasion of the peritoneum. The chemokine FKN has been documented in epithelial tissues and in various cancers. FKN have paradoxical effects in tumors: anti-tumoral effect in some tumor entities and pro-tumoral effect in other tumor entities.

In our study, we demonstrated the expression of SDF-1 and FKN on the surface epithelium of normal ovaries and benign and malignant tumors, suggesting that the expression of these chemokines preexists to tumorigenesis. We also demonstrated an heterogeneous expression of both chemokines in EOC. In our large and homogeneous cohort (183 specimens of EOC), SDF-1 expression levels had no effect on overall survival or progression-free survival. Thus, SDF-1 expression by tumor epithelial cells is not in itself a valuable prognostic factor in patients with advanced EOC. FKN immunostaining scores (in 54 specimens of EOC) correlated positively with the two proliferation markers: Ki-67 and GILZ. *In vitro*, we demonstrated that GILZ increases the expression of FKN and that FKN itself increased proliferation. This study contributes in elucidating the role of the two chemokines SDF-1 and FKN in EOC.

**Pôle:** Immunologie et Biothérapies

**MOTS-CLES:** Cancer épithélial de l'ovaire, CXCL12/SDF-1, valeur pronostique, fractalkine (FKN)/CX<sub>3</sub>CL1, GILZ, prolifération.

**Adresse de l'unité où la thèse été préparée :** Unité *Inserm* 996-Cytokines, Chimiokines et immunopathologie-32, rue des carnets 92140 Clamart, France