THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale CBS2 – Sciences Chimiques et Biologique pour la Santé

Unité de recherche INSERM / Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier

Implication de l'Hormone Anti-Müllerienne et de ses récepteurs dans les cancers gynécologiques : stratégies thérapeutiques par anticorps associées

Présentée par Maëva CHAUVIN
Le 29 Novembre 2019

Sous la direction de André PÈLEGRIN

Devant le jury composé de

David PÉPIN, Pr, Harvard Medical School, Boston	Rapporteur
Patrick CHAMES, DR, CNRS UMR 1037	Rapporteur
Valérie GOUILLEUX-GRUART, MCU, Université de Tours	Examinateur
Isabelle NAVARRO-TEULON, CR, INSERM U1194	Examinateur
Jean-François PROST, CSO, Gamamabs	Examinateur
Pierre-Emmanuel COLOMBO, Pr, ICM Val d'Aurelle	Président du jury
André PÈLEGRIN, DR, INSERM U1194	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes premiers remerciements à mon directeur de thèse André PÈLEGRIN. André, je vous remercie de m'avoir permis de travailler sur ce projet et de m'avoir accordé votre confiance. Je vous remercie également pour la grande liberté que vous m'avez accordée dans mes recherches tout en étant très présent malgré vos nombreuses sollicitations. Vous êtes à l'écoute et toujours joignable lorsque j'avais besoin de vos conseils, même pendant vos vacances. J'ai pris un plaisir immense à travailler sur ce projet, nous avons pu le voir évoluer de sa conception jusqu'à son élaboration. A présent, nous avons créé une belle histoire avec comme aboutissement deux brevets, une publication soumise ainsi que bien d'autres projets qui s'ouvrent désormais dans les perspectives de notre travail. Vous avez mené à bien toutes les demandes de financement, qui m'ont permis de travailler sereinement et de me consacrer pleinement à mon sujet de thèse. J'admire votre acharnement au travail après tant d'années au service de la recherche académique et je me retrouve en vous sur les valeurs du travail ainsi que le goût de l'effort pour porter haut nos ambitions. J'ai également beaucoup appris humainement à vos côtés, par votre capacité à garder votre calme et à relativiser. Vous êtes pour moi un modèle de sagesse qui m'inspirera tout au long de ma carrière. J'espère que nos relations seront toujours aussi bonnes au fil des années et que je pourrai toujours bénéficier de vos conseils avisés. Je vous souhaite tout le meilleur et une belle retraite bien méritée, et vous remercie encore pour tout ce que vous m'avez apporté.

Je remercie les membres du jury de me faire l'honneur d'évaluer ce travail. Merci au Professeur David PÉPIN et Docteur Patrick CHAMES pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci également aux membres du jury les Docteurs Valérie Gouilleux-Gruart, Isabelle Navarro-Teulon, Jean-François Prost et le Professeur Pierre-Emmanuel Colombo pour avoir examiné mes travaux.

Ce travail n'aurait pas pu être effectué sans le soutien du LabEx MAbImprove et de la Ligue Nationale contre le Cancer. Je tiens à remercier particulièrement le LabEx MAbImprove pour le financement de mes 3 années de thèse et pour m'avoir permis d'évoluer dans un environnement scientifique et humain de qualité lors des retraites scientifiques du Mont-Dore… Merci à toi Mélusine pour avoir animé cette retraite ! Ce labEx m'a permis de faire des collaborations en premier avec l'équipe GenAc, Pierre, Myriam et Mady, je vous remercie pour la sélection triviale des anti-ALK. Merci à l'équipe de Martine Cérutti, je vous remercie pour votre super travail dans la conception des BsAb. Merci aussi à l'équipe FRAME pour cette collaboration AMH – FcRn qui je l'espère portera bientôt ses fruits.

Si cette thèse s'est aussi bien déroulée, c'est grâce à l'ambiance qui règne dans le labo. Merci à l'équipe AP, particulièrement aux « jeunes » de l'équipe. Après plus de 4 ans passés à l'IRCM, j'ai vu les anciens partir et les nouveaux arriver. Chacun de vous avez marqué mes années passées à l'IRCM et a rendu mon quotidien bien meilleur.
En 2015 lors de mon arrivée à l'IRCM, Charline, Sabrina, Romain, Alex, et Riad vous m'avez accueilli les bras ouverts. Je me rappelle de nos discussions tard le soir dans le bureau, les blind tests, les happy hours rondement menés, les nombreuses soirées hors du labo et bien évidemment des moments forts que l'on a partagés ensemble comme le LabEx, les weekends au ski, le mariage et j'en passe... Merci également aux conjoints de cette belle équipe Agathe, Audrey, Max et Micka pour partager avec nous leurs bonnes humeurs.

Un grand merci à toi Junior, tu as été mon confident, mon conseiller, et c'est auprès de toi que j'ai trouvé le plus souvent du réconfort. Tu as été aussi mon binôme pour les sorties, les bêtises et bien d'autres. Merci pour les soirées pétanque, nous avons formé un duo explosif : la team citron « nous on est puissant et on n'a pas le temps » raisonne encore dans l'institut. Ce qui fait la force de notre amitié se sont les valeurs humaines que l'on partage tous les deux, tu m'as redonné espoir... Je voulais te remercier d'avoir été et d'être toujours là pour moi, même à l'autre bout du monde, et sache que c'est réciproque. Ton départ de Montpellier a laissé un grand vide ici, mais je suis très fière de toi et du chemin que tu as parcouru, tu es un battant ! Je te remercie pour tous ces moments partagés. On se retrouvera bientôt, tu vas beaucoup me manquer le jour J.

Une mention spéciale pour le Dr Romain Lanotte, sans qui cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. Tu es la première personne que j'ai rencontrée sur les bancs de la faculté, fraîchement sortie de nos campagnes. Le Pignanais et la Nyonsaise se sont trouvés et ne se sont plus quittés et notre amitié est sans faille depuis. Qui aurait cru que 10 ans plus tard on en soit là tous les deux à faire notre thèse dans la même équipe. Je te remercie pour tous les moments de partage, de rigolade, de dur labeur, tu es la personne qui m'a sûrement le plus compris dans les galères de la thèse, tu as été un soutien énorme. Romain tu es la force tranquille du labo et je t'admire beaucoup pour ça. Je te souhaite tout le meilleur du monde tant au niveau personnel avec Audrey que professionnel.

Le départ des uns font l'arrivée des autres, Adrien jeune Nerd savoyard toujours prêt à rendre service ! Je te remercie pour ton aide notamment en informatique. Je te remercie également pour les dégustations de tes mets savoyards. A mon tour de te souhaiter bon courage pour la rédaction, tu es proche du but !

Mon binôme Emilia toujours prête aux aventures scientifiques les plus folles … Ce qui nous a valu notre réputation de « Bad girls » ! Ma très chère Emilia, tu as été mon rayon de soleil chaque matin. Tu es toujours pleine de bonne volonté, toujours à l'écoute et de très bons conseils. Chaque jour était bien meilleur à tes côtés ! Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté « so bien la rigouuulades ». Je finirai par ta phrase préférée « Montpellier plus belle ville du monde ».

Merci également aux statutaires de l'équipe qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse. Merci à toi Véro pour l'IF ainsi que de m'avoir formée au *vivo* merci aussi pour tes succulents gâteaux ! Merci à Laura qui a géré d'une main de maître l'organisation du labo. Merci également aux chercheurs de l'équipe, Muriel, Thierry, Christel et Marie-Alix pour votre gentillesse envers moi.

Merci aux compères Éric, Michaud, Djihane, Maicol, Nadège, Pierre… que j'ai le plaisir de retrouver aux « happy hour » pour parler science.

À tous les membres de l'IRCM et de l'ICM que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse. Sachez que chacun d'entre vous, par vos discussions sérieuses ou pas, a contribué à l'avancée et au bon déroulement de ce doctorat.

Si j'ai pu mener à bien cette thèse à l'IRCM, c'est sans doute grâce à mes encadrant de stage de Master 2. Pour commencer, à l'ANSM, merci à Julie pour m'avoir accueillie chaleureusement. Merci à toi Jean-Claude pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et pour tes bons conseils scientifiques.
Jean-Luc, je voudrais te remercier particulièrement. Tu as su donner un sens à ce stage et j'ai appris beaucoup à tes côtés tant au niveau technique que sur le plan humain. Tu es curieux de tout et passionné par ce que tu fais, sans ménager tes efforts au travail tel « la fourmi ». Hors labo, tu as marqué ma vie à jamais, tu as été présent pour moi et je n'oublierai pas ce que tu as fait. Aujourd'hui, je suis heureuse de faire partie de ta famille comme toi dans la mienne. Cette fois-ci nous pouvons parler de « Bon Karma ».

Merci à toi Cyril de m'avoir encadrée à l'IGH. Tu as été vraiment pédagogue, tu m'as appris de nombreuses techniques et c'est grâce à toi que j'ai pu être autonome en thèse. C'était vraiment agréable de travailler avec toi et je suis très fière d'avoir pu participer à ton projet. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté.

Pour sortir de ce quotidien souvent aliénant, je voulais remercier mes amis de la faculté avec qui je construis ma vie depuis près de 10 ans. Je ne compte plus les moments de partage, vous êtes ma deuxième famille, mon plus gros soutien et mon équilibre. Vous m'avez permis de maintenir ma santé mentale tout au long de cette thèse et me sortir la tête hors du labo, à vous tous les « mojitos tsé tsé ». Je commencerai par toi Philou ma plus vieille branche, ma vie Montpelliéraine a débutée à tes côtés et quel chemin on a parcouru tous les deux. Je suis heureuse de pouvoir encore partager de bons moment ensemble autour d'une bonne bouteille … ou encore sur le terrain de rugby, je ne pouvais pas rêver mieux comme coach. A Marjorie et à toi je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Marianne je voulais te remercier pour la joie de vivre que tu apportes au sein du groupe. Merci d'avoir partagé avec moi ces folles soirées de village et de m'avoir fait connaître ton petit coin de paradis Aveyronnais. Marion notre écolo en chef « fraichement » arrivé à Montpellier, tu t'es si vite intégrée à la vie du SUD que tu en deviendrais moins sauvage, il me semble. Je te remercie pour la touche nordique que tu apportes qui m'a fait souvent rire « une fois ». Laura, merci pour ces moments partagés dans notre Drôme provençale ! Davy, le voyageur, merci pour ton entrain pour les sorties. Antonia et Diané merci pour le bonheur que vous apportez dans le groupe notamment avec la venue de la petite Binta. Merci aux voisins Laurène, Quentin et Charles pour partager avec nous ces bons moments.

Ma Ju, mon binôme de galère de thèse, nous avons commencé cette aventure toutes les deux, nous nous sommes soutenu lors des week-ends passés au labo, au cours de la rédaction et j'en passe. Merci pour tous tes petits plats mijotés qui étaient un vrai réconfort après nos journées. Je te remercie aussi pour les nombreuses discussions scientifiques à couleur de bière dont ont émané nombreuses de nos idées. Tu as été un grand soutien et j'espère t'avoir toujours auprès de moi.

Je finirai par toi Mel, Nous avons partagé tellement depuis la L2, que ça serait plus long à écrire que cette thèse, des bancs de la fac en passant par le RU midi et soir, les révisions acharnées à la BU deux semaines avant les partiels, le Subway notre alimentation de base, le Barberousse et ses nombreuses rencontres, « la colloc... », toutes ces histoires uniques que l'on a partagées et que l'on partagera encore. Depuis bientôt 10 ans on ne s'est jamais quittées et toutes les étapes de la vie c'est ensemble qu'on les surmonte. Merci pour ton soutien essentiel pendant toutes ces années. Aujourd'hui, tu fais partie de ma famille et l'avenir est toujours plus rassurant en sachant que l'on sera présente l'une pour l'autre. Je ne peux pas finir sur ces remerciements sans une petite phrase culte de Céline « j'irai où tu iras ».

A travers vous tous qui partagez mon quotidien, je vous remercie pour le cocon douillet que vous m'offrez ici.

A mes amis dont nos routes se sont éloignées mais dont nos relations n'en reste pas moins solides. Marielle, je suis très fière de ton parcours et de ce que tu apportes à tes patients. Merci pour tes attentions envers moi et d'être toujours bienveillante et à l'écoute, tu es un souffle d'air frais pour moi et toutes les personnes que tu croises. Ma Fleu, depuis le lycée, tu es un repère pour moi, même si nos chemins ont pris des tournants différents, je sais que nous sommes présentes l'une pour l'autre quoiqu'il arrive.

Un grand merci à l'équipe féminine de rugby du Pic Saint Loup, « LES PICHOLINES », quelle belle bande de copines aussi attachantes les unes que les autres. Merci à vous toutes car vous avait été mon défouloir pendant 3 ans et m'avait permise de garder « Un esprit sain dans un corps sain ». Grâce à vous, j'ai pu décharger toutes les frustrations accumulées au cours de cette thèse. Ensemble, nous avons partagé les valeurs de l'ovalie, nous avons été soudées dans les matchs comme à la 3ème mi-temps. J'aurais aimé pouvoir faire un petit mot personnalisé pour chacune de vous car vous êtes toutes exceptionnelles, mais j'aurais surement l'occasion de vous le dire de vive voix.
Elina, c'est grâce à toi que j'ai pu intégrer l'équipe des Pichs, je te remercie d'avoir cru en mes capacités physiques. Camille, notre Cam'ptain, tu portes haut les couleurs des Pichs, tu peux être fière de toi et de ce que tu as créé car les Pichs c'est d'abord une histoire de copine... Et c'est cette ambiance qui règne au sein de l'équipe qui fait notre force aujourd'hui. Merci à vous deux pour l'intégration. Coach Philou, se retrouver sur le terrain quoi de mieux pour encore plus renforcer nos liens, tu as tous les atouts pour porter au plus haut les Pichs, merci d'être présent pour nous toutes. Merci à toi Marjo pour ta joie de vivre et surtout pour tes cagolades qui m'ont faite tellement rire. Une mention spéciale pour vous les filles Ju, Coco et Mel merci pour votre soutien aussi en dehors du terrain, j'ai rencontré des filles extraordinaires et il y'a des rencontres qu'on n'oublie jamais. Mes chères Pichs vous avez marqué ma vie et quoi qu'il arrive … Pich un jour Pich toujours !

Laurent, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien sans faille, tu as été là, à chaque étape de cette belle aventure. Toujours à me rassurer et me tempérer dans les moments les plus stressants, merci pour ta patience. Je te remercie aussi pour les longues conversations scientifiques que nous avons partagées. Tu as été mon pilier et mon repère à l'institut. La retraite au Mont dore restera gravé à tout jamais car c'est là où tout a commencé... Cette thèse c'est un bout de toi, de nous…Je finirai par la phrase du petit Prince qui nous a rythmé tout au long de ces 4 années… « On ne voit bien qu'avec le cœur, l'essentiel est invisible pour les yeux »

Je dédie cette thèse à ma famille. Je remercie mes parents de m'avoir inculqué les valeurs du travail, le sens de l'effort car dans la vie on n'a rien sans rien. Sachez que je n'oublie pas d'où je viens et c'est ça qui fait ma force aujourd'hui. Merci aussi pour l'éducation que vous m'avez donnée. Je voulais remercier particulièrement les deux femmes de ma vie, vous avez tout donné pour élever au mieux vos enfants effectuant tous les sacrifices possibles. Maman merci pour tout l'amour que tu nous donnes chaque jour, tu es mon équilibre.

Je réalise à quel point j'ai de la chance d'avoir une famille et des amis qui m'entourent et me soutiennent… Merci à vous tous.

«… C'est la dose qui fait le poison »

Paracelse XVIème siècle

AVANT-PROPOS

Ces travaux de recherches ont été financés pendant 3 ans par le Laboratoire d'excellence MAbImprove, Fondé sur un partenariat entre les Universités de Tours et de Montpellier, associant de nombreuses équipes de recherches dont les travaux communs sont axés sur les anticorps thérapeutiques. Cette thèse a aussi été financée 1 an par la Ligue Nationale Contre le Cancer.

Mes recherches se sont déroulées au sein de l'unité INSERM U1194 à l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM) dans l'équipe Immunociblage et Radiobiologie en Oncologie (IRO) dirigée par Dr. André Pèlegrin. Les objectifs principaux de l'équipe sont (i) la conception et le développement de nouveaux anticorps et de nouvelles molécules dérivées d'anticorps, (ii) l'amélioration de l'efficacité de ces thérapies ciblées, et (iii) la compréhension de leurs mécanismes d'action.

Les travaux récents de notre équipe ont montré l'intérêt thérapeutique du ciblage par anticorps du récepteur de type II de l'hormone anti-müllérienne (AMHRII) dans les cancers gynécologiques, notamment dans les cancers de l'ovaire où les thérapies sont souvent limitées du fait d'un fort taux de récidive (70%). Les types de cancers ovariens ainsi que les thérapies actuelles et en essais clinique seront détaillés dans le chapitre I de l'introduction bibliographique.

L'AMHRII est sur-exprimé dans les cancers et restreint dans les tissus sains. Notre laboratoire a développé le premier anticorps anti-AMHRII qui est actuellement en essai clinique par la société Gamamabs sous le nom de Murlentamab. Les premiers résultats sont encourageants avec, notamment, un recrutement significatif du système immunitaire au niveau de la tumeur. L'AMHRII peut s'hétérodimériser avec 3 récepteurs de type I, ALK2, ALK3 et ALK6. Cependant en oncologie, peu d'études ont mis en évidence l'implication précise de ces récepteurs de type I pourtant essentiels à la signalisation de l'AMH. L'implication des récepteurs de l'AMH en physiologie et en condition physiopathologique sera détaillée dans le chapitre II de l'introduction bibliographique.

Dans le but d'améliorer nos thérapies anti-AMHRII, nous nous sommes intéressés aux rôles des récepteurs ALK associés au récepteur AMHRII dans la signalisation de l'AMH. L'observation que ALK2 et ALK3 sont impliqués différemment nous a conduit à développer une nouvelle stratégie thérapeutique utilisant des anticorps bispécifiques ciblant les récepteurs AMHRII-ALK afin d'orienter la signalisation de l'AMH vers une voie apoptotique.

En embryologie, l'AMH est connue pour induire par apoptose la régression des canaux Müller. Sur la base de cet effet physiologique pro-apoptotique, de nombreux auteurs ont proposé l'AMH comme agent thérapeutique des cancers gynécologiques. Le point commun de ces études est l'utilisation de l'AMH à fortes doses par rapport aux concentrations physiologiques retrouvées chez l'homme et la femme. Dans nos travaux, nous montrons que l'AMH à faibles doses a un effet paradoxal favorisant la prolifération. Ces résultats nous ont conduit à l'élaboration d'une deuxième stratégie thérapeutique par anticorps pour supprimer l'effet prolifératif de l'AMH. Les thérapies ciblant l'axe AMH/AMHRII seront décrites dans le chapitre IV de l'introduction bibliographique.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 19

Chapitre I : Les cancers de l'ovaire 21
1.1 Incidence et mortalité 21
1.2 Les différents types de cancer de l'ovaire 22
1.2.1 Le cancer épithélial de l'ovaire 22
1.2.2 Le cancer du stroma et/ou des cordons sexuels 24
1.2.3 Les tumeurs germinales 25
1.2.4 La carcinose péritonéale 25
1.3 Les marqueurs tumoraux 25
1.3.1 Les marqueurs génétiques dans les cancers de l'ovaire 26
1.3.2 Les marqueurs protéiques dans les cancers de l'ovaire 27
1.3.2.1 Protéines circulantes 27
1.3.2.2 Protéines membranaires 27
1.4 Les traitements des cancers ovariens 28
1.4.1 La classification FIGO 28
1.4.2 La chirurgie 29
1.4.3 Les thérapies ciblées dans le traitement des cancers de l'ovaire 30
1.4.3.1 Les anticorps monoclonaux (MAbs) : anti-VEGF, anti-CD3-EpCam 30
1.4.3.2 Les Inhibiteurs de PARP 34
1.4.3.3 Autres pistes de thérapies ciblées 35
1.4.4 Les thérapies en essais cliniques 38
1.4.4.1 Les immunothérapies 38
1.4.4.2 Les CAR T cells 38
1.4.4.3 Les ADC (anticorps drug conjugates) 39
1.4.4.4 Les vaccins thérapeutiques 39
1.5 Conclusion du chapitre I : Les cancers de l'ovaire 40

Chapitre II : L'hormone anti-müllerienne et ses récepteurs : Nouvelles cibles thérapeutiques pour les cancers ovariens ? 41
2.1 Les fonctions physiologiques de l'Hormone Anti-Müllerienne (AMH) 41
2.1.1 Structure 41
2.1.2 Les concentrations sériques d'AMH 43
2.1.2.1 Implication de l'AMH chez l'homme 43
2.1.2.2 Implication de l'AMH chez la femme 46
2.2 Les récepteurs de l'AMH 47
2.2.1 Le récepteur de type II : AMHRII 48
2.2.2 Les récepteurs de type I : ALK (Activin like kinase receptor) 48
2.2.2.1 Expression dans les tissus 49
2.2.2.2 Rôle physiologique des récepteurs ALK 2, 3, 6 51
2.3 Interaction AMHRII – ALK (2,3,6) 56
2.3.1 Interaction AMHRII-ALK2 56
2.3.2 Interaction AMHRII-ALK3 56
2.3.3 Interaction AMHRII-ALK6 58
2.4 La signalisation de l'AMH 59
2.4.1 La voie SMAD (Small Mother Against Decapentaplegic) 59
2.4.2 Les protéines cibles de l'AMH 61
2.4.2.1 WNT/β-caténine 61
2.4.2.2 La voie NF-ĸB 62
2.4.2.3 PI3K/AKT 63

2.4.2.4 C-Jun 63
2.4.3 Régulation des gènes cibles de l'AMH 64
2.5 Conclusion de chapitre II : L'hormone anti-müllerienne et ses récepteurs 66

Chapitre III : Implication de l'AMH dans les cancers 67
3.1 AMH marqueur du cancer de la granulosa 67
3.2 Expression des récepteurs de l'AMH dans les cancers ovariens 68
3.2.1 Expression du récepteur de type II : AMHRII 68
3.2.2 Expression des récepteurs de type I : ALK2, ALK3, ALK6 70
3.3 Effet anti-cancéreux de l'AMH dans différents modèles de lignées cellulaires. 71
3.3.1 L'AMH inhibe la survie cellulaire et la prolifération 71
3.3.2 Inhibition de la croissance tumorale 72
3.3.3 Arrêt du cycle cellulaire et Induction de la voie apoptotique 73
3.3.4 Inhibition de la migration 75
3.3.5 Combinaison AMH – chiomiothérapies 75
3.4 Effet prolifératif de l'AMH 77

Chapitre IV : Thérapies ciblant l'axe AMH 81
4.1 AMH recombinante 82
4.2 Les anticorps monoclonaux 82
4.2.1 Ingénierie de sélection des anticorps : hybridomes et phage display 82
4.2.2 Les anticorps en clinique 84
4.2.3 Fonction des anticorps 85
4.3 L'anticorps anti-AMHRII : le 12G4 86
4.3.1 Développement du 12G4 86
4.1.1 Rôle de l'anticorps 12G4 87
4.1.2 Version humanisé du 12G4 : le 3C23K 88
4.1.3 Effet du 3C23K comparé au 12G4 89
4.1.4 L'anticorps 3C23K en essai clinique : GM102/ Murlentamab 90
4.2 Les anticorps bispécifiques (BsAb) 91
4.2.1 Les différents formats de BsAb 91
4.2.2 Les BsAb en clinique 93
4.3 L'anticorps bispécifique tétravalent (BsAb) 95
4.3.1 Format du BsAb tétravalent 95
4.3.2 La liaison du BsAb tétravalent 96
4.3.3 La stabilité du BsAb tétravalent 97
4.3.4 Activité du BsAb tétravalent médiée par le Fc 97

OBJECTIFS DE LA THÈSE 99

RESULTATS ET DISCUSSION 103

Chapitre V : Implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH et stratégie thérapeutique associée 107
5.1 Caractérisation et rationnel des modèles d'étude 109
5.1.1 Profil d'expression d'AMHRII 109
5.1.1.1 Expression membranaire et intracellulaire des récepteurs AMHRII, ALK2, ALK3, ALK6 dans les lignées cellulaires 109
5.1.1.2 Expression membranaire des récepteurs AMHRII, ALK2, ALK3, ALK6 dans les cellules isolées d'ascites de patientes 111
5.1.2 Régulation de la production de l'AMH 115
5.2 Effet anti-tumoral de l'AMH 117

5.2.1 Structure et construction de l'AMH recombinante (LR-AMH) 117
5.2.2 La signalisation p-SMAD1/5 118
5.2.3 Induction de l'apoptose 119
5.2.4 Inhibition de la survie clonogénique 120
5.2.5 Inhibition de la migration 121
5.3 Implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH 123
5.3.1 Invalidation des récepteurs ALK par siRNA « small interfering RNA » 123
5.3.2 Recrutement des récepteurs ALK à la membrane cellulaire en présence d'AMH 125
5.3.3 Mise en évidence de l'hétérodimérisation AMHRII-ALK en présence d'AMH 127
5.3.4 Expression des récepteurs ALK2, ALK3 et protéine de signalisation de l'AMH 128
5.4 Effet de l'AMH sur des cellules isolées d'ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire 130
5.5 Conclusion sur l'implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH 133
5.6 Stratégie thérapeutique : Orientation de la signalisation de l'AMH par le biais des anticorps bispécifiques (BsAb) AMHRII –ALK (2,3,6) 134
5.6.1 Caractérisation des anticorps anti-ALK2 et anti-ALK3 135
5.6.1.1 Sélection des anticorps anti-ALK 135
5.6.1.2 Caractérisation de la liaison des IgG1 humaines anti-ALK 136
5.6.1.3 Etude des épitopes des anti-ALK 138
5.6.2 Clonage au format BsAb pour cibler les récepteurs ALK2 et ALK3 140
5.6.2.1 Format et structure des BsAb 141
5.6.2.2 Caractérisation des BsAb 142
5.6.3 Effets des BsAb sur les lignées cellulaires de cancers ovariens 144
5.6.3.1 Les BsAb modulent la signalisation de l'AMH 144
5.6.3.2 Les BsAb inhibent la viabilité et la prolifération cellulaire 145
5.6.3.3 Les BsAb anti-AMHRII-ALK2 inhibent la migration des cellules SKOV3-AMHRII 147
5.6.4 Effet des BsAb sur cellules primaires isolées d'ascites de patientes 148
5.6.5 Etude des effets des BsAb in vivo 149
5.7 Conclusion du chapitre V : Implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH et stratégies thérapeutiques associées 153

CHAPITRE VI : Implication dose dépendante de l'AMH dans la survie cellulaire et stratégie thérapeutique associée 155
6.1 Effet de l'AMH sur la viabilité cellulaire 155
6.1.1 Implication du récepteur AMHRII dans le cancer de l'ovaire 155
6.1.2 A faible concentration, l'AMH favorise la prolifération cellulaire 157
6.2 Stratégie thérapeutique : inhiber l'effet prolifératif de l'AMH endogène par le biais d'anticorps anti-AMH 159
6.2.1 Sélection des anticorps anti-AMH 159
6.2.2 Caractérisation de l'anticorps anti-AMH (B10) 161
6.3 Effet biologique de l'anticorps B10 162
6.3.1 L'anticorps anti-AMH B10 réduit la prolifération cellulaire 162
6.3.2 L'anticorps B10 inhibe la prolifération des cellules isolées d'ascites de patiente 164
6.3.3 Contrôle de la croissance tumorale par l'anticorps B10 166
6.4 Optimisation de l'anticorps B10 168
6.5 Conclusion du chapitre VI : Implication dose dépendante d'AMH dans la survie cellulaire et stratégie thérapeutique associée 171

CHAPITRE VII : Perspectives sur de nouvelles stratégies thérapeutiques impliquant l'axe AMH/AMHRII 175
7.1 Combinaison AMH exogène et anticorps anti-AMHRII 175
7.2 Interaction du VEGF avec l'axe AMH/AMHRII 176
7.3 Interaction du FcRn (récepteur Fc néonatal) avec l'axe AMH/AMHRII 178
7.4 Conclusion Chapitre VII : Perspectives sur de nouvelles stratégies thérapeutiques associant l'axe AMH/AMHRII 181

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 183

ANNEXE 189

MATERIELS ET METHODES 195

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 207

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : GLOBOCAN 2018 ESTIME L'INCIDENCE ET LA MORTALITE DES CANCERS DANS LE MONDE EN 2018 CHEZ LA FEMME 21
FIGURE 2 : LOCALISATION DES DIFFERENTS TYPES DE CANCER DE L'OVAIRE 22
FIGURE 3 : FREQUENCE (%) DES HISTOTYPES DES CANCERS EPITHELIAUX 24
FIGURE 4 : MARQUEURS GENETIQUES MUTES EN FONCTION DE L'HISTOTYPE DES CANCERS OVARIENS 26
FIGURE 5 : ARBRE DECISIONNEL DES TRAITEMENTS A EFFECTUER LORS D'UNE TUMEUR 29
FIGURE 6 : STRUCTURE D'UN ANTICORPS DE FORMAT IGG1 31
FIGURE 7 : SURVIE SANS PROGRESSION DES ESSAIS CLINIQUES GOG-218 ET ICON7 32
FIGURE 8 : SURVIE SANS PROGRESSION DES ESSAIS CLINIQUE OCEAN ET AURELIA 33
FIGURE 9: STRUCTURE ET MODE D'ACTION DU CATUMAXOMAB 34
FIGURE 10 : EFFET DE L'OLAPARIB SUR LA SURVIE SANS PROGRESSION 35
FIGURE 11: BILAN DES THERAPIES CIBLEES ACTUELLES ET POTENTIELLES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DE L'OVAIRE 37
FIGURE 12 : SCHEMA DE LA BIOSYNTHESE DE L'AMH 42
FIGURE 13 : VARIATION DES CONCENTRATIONS SERIQUES D'AMH CHEZ L'HOMME ET LA FEMME AU COURS DE LA VIE 43
FIGURE 14 : DIFFERENCIATION DU TRACTUS GENITAL SOUS L'INFLUENCE DE L'AMH 44
FIGURE 15 : REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE DE L'AMH 45
FIGURE 16 : ROLE DE L'AMH DANS LA FOLLICULOGENESE 46
FIGURE 17: SCHEMA DE LA STRUCTURE DES RECEPTEURS AMHRII ET ALK 47
FIGURE 18 : LES RECEPTEURS DE LA FAMILLE TGF-B 49
FIGURE 19 : EXPRESSION DES RECEPTEURS ALK DANS DES ECHANTILLONS DE TISSU. 50
FIGURE 20 : IMPLICATION DES RECEPTEURS ALK AU COURS DE L'OSTEOGENESE ET LA CHONDROGENESE 52
FIGURE 21 : EXPRESSION ET ROLE DES RECEPTEURS ALK3 (BMPR-IA) ET ALK6 (BMPR-IB) DANS LE DEVELOPPEMENT NEURAL DU XENOPE 53
FIGURE 22 : IMPLICATION DES RECEPTEURS ALK DANS LE DEVELOPPEMENT ET LE MAINTIEN DES TISSUS ADULTES 55
FIGURE 23 : MODELE SCHEMATIQUE D'ACTION DE L'AMH DANS LA REGRESSION DES CANAUX DE MÜLLER 57
FIGURE 24 : IMPLICATION DES RECEPTEURS ALK DANS LA SIGNALISATION DE L'AMH 58
FIGURE 25 : STRUCTURE DES R-SMAD, CO-SMAD, I-SMAD 61
FIGURE 26 : GENES MODULES PAR L'AMH SUR LA LIGNEE DE L'ENDOMETRE AN3CA 65
FIGURE 27 : VOIES CANONIQUE ET NON CANONIQUE DE L'AMH 66
FIGURE 28 : IMMUNOHISTOCHIMIE (12G4) DE L'EXPRESSION D'AMHRII DANS LES TISSUS OVARIENS NORMAUX ET CANCEREUX 69
FIGURE 29 : EXPRESSION DES RECEPTEURS DE L'AMH DE TYPE I ET II PAR IMMUHISTOCHIMIE 70
FIGURE 30 : INHIBITION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE MEDIEE PAR L'AMH 71
FIGURE 31 : INDUCTION DE L'APOPTOSE DEPENDANTE DE LA CONCENTRATION EN AMH SUR LES CELLULES DE TUMEUR DE LA GRANULOSA 74
FIGURE 32 : EFFET DE L'AMH ET DU PACLITAXEL SUR L'INVASION DES CELLULES CANCEREUSES 75
FIGURE 33 : EFFET DE L'AMH EN ASSOCIATION AVEC LA CHIMIOTHERAPIE 76
FIGURE 34: EFFET PROLIFERATIF DE L'AMH A FAIBLE DOSE SUR LES CELLULES DE SERTOLI DE SOURIS 78
FIGURE 35 : AMH ET AMHRII REGULENT LES VOIES DE SURVIE DANS LE CANCER DU POUMON NSCLC 79
FIGURE 36 : SCHEMA DES DEUX STRATEGIES THERAPEUTIQUES CIBLANT LA VOIE DE L'AMH 81
FIGURE 37 : SCHEMA DE L'AMH RECOMBINANTE 82
FIGURE 38: ETAPE D'UN TOUR DE SELECTION PAR PHAGE DISPLAY 83
FIGURE 39: NOMBRE D'ANTICORPS APPROUVES EN CLINIQUE PAR ANNEE 84
FIGURE 40: LIAISON DU 12G4 SUR LE RECEPTEUR AMHRII RECOMBINANT PAR RAPPORT AU SITE DE LIAISON DE L'AMH 86
FIGURE 41 : LA LIAISON DU 12G4 SUR DES MODELES CELLULAIRES DE CANCER OVARIEN 87
FIGURE 42 : ETAPES DE MATURATION DE L'ANTICORPS 12G4 EN VERSION HUMANISE LE 3C23K 88
FIGURE 43 : ESSAI IN VIVO DE L'ANTICORPS 12G4 MURIN ET SA VERSION HUMANISE LE 3C23K 89
FIGURE 44 : REPRESENTATION DES 60 FORMATS DE BISPECIFIQUES RECENSES 92
FIGURE 45 : CHRONOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DES BSAB 93

FIGURE 46: FORMAT DE L'ANTICORPS BISPECIFIQUE (BSAB) TETRAVALENT POUR LES CIBLES HLADR ET CD5 95
FIGURE 47 : LIAISON DES BSAB VERSUS LES ANTICORPS PARENTAUX 96
FIGURE 48 : EXPRESSION EXTRA- ET INTRACELLULAIRE DES RECEPTEURS AMHRII, ALK2, ALK3 ET ALK6 DES CELLULES COV434-AMHRII ET SKOV3-AMHRII 110
FIGURE 49: EXPRESSION DU RECEPTEUR AMHRII AU COURS DU TEMPS 112
FIGURE 50 : ETAPES DU TRI CELLULAIRE PAR BILLES MAGNETIQUES 113
FIGURE 51 : MORPHOLOGIE DES CELLULES ISOLEES D'ASCITES DES PATIENTES 114
FIGURE 52 : DOSAGE DE L'AMH DANS LE SURNAGEANT DES LIGNEES CELLULAIRES ET DES CELLULES D'ASCITES 116
FIGURE 53 : EXPRESSION L'ARNM DE L'AMH EN PRESENCE D'AMH EXOGENE 116
FIGURE 54 : CONSTRUCTION DU VECTEUR DE LA LR-AMH 117
FIGURE 55 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT DE LA LR-AMH 117
FIGURE 56 : EFFET DE LA LR-AMH SUR LA PHOSPHORYLATION DE SMAD1/5 118
FIGURE 57 : INDUCTION DE L'APOPTOSE DES CELLULES TRAITEES PAR LA LR-AMH 119
FIGURE 58 : INHIBITION DE LA SURVIE CLONOGENIQUE DOSES DEPENDANTES D'AMH 121
FIGURE 59 : INHIBITION DE LA MIGRATION PAR LA LR-AMH 122
FIGURE 60 : IMPLICATION DES RECEPTEURS ALK DANS LA SIGNALISATION DE L'AMH 124
FIGURE 61 : EXPRESSION MEMBRANAIRE DES RECEPTEURS AMHRII ET ALK2, 3,6 A LA MEMBRANE DES LIGNEES CELLULAIRES 126
FIGURE 62 : MISE EN EVIDENCE DE L'HETERODIMERISATION DES RECEPTEURS AMHRII-ALK EN PRESENCE DE LR-AMH 127
FIGURE 63 : MODULATION DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS ALK ET DES PROTEINES APOPTOTIQUES ET DE SURVIE DANS LES LIGNEES CELLULAIRES TRAITEES A DOSES CROISSANTE D'AMH 129
FIGURE 64 : EFFET DE L'AMH SUR LA VIABILITE CELLULAIRE DES CELLULES ISOLEES D'ASCITES DE PATIENTES 131
FIGURE 65 : EFFET DE L'AMH SUR L'EXPRESSION DES RECEPTEURS ALK ET DES PROTEINES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA SURVIE ET L'APOPTOSE DANS LES CELLULES D'ASCITES 131
FIGURE 66 : SCHEMA BILAN DE L'EFFET DE L'AMH DANS NOS CONDITIONS EXPERIMENTALES BASALES (<10PM) ET EN PRESENCE DE CONCENTRATION ELEVEE D'AMH (25NM) 132
FIGURE 67 : HOMOLOGIE DES SEQUENCES PEPTIDIQUES DES RECEPTEURS ALK 135
FIGURE 68 : LIAISON DES IGG1 ANTI-ALK GLYCOSYLEES ET AGLYCOSYLEES. 137
FIGURE 69 : AFFINITE DES ANTI-ALK 138
FIGURE 70 : DETERMINATION DES EPITOPES DES ANTI-ALK 139
FIGURE 71 : CONSTRUCTION DES PLASMIDES CODANTS POUR LES BSAB AMHRII-ALK 140
FIGURE 72 : FORMAT DE L'ANTICORPS BISPECIFIQUE (BSAB) 141
FIGURE 73 : ANALYSE DES BSAB SUR GEL D'ACRYLAMIDE SDS-PAGE EN CONDITION REDUCTRICE ET NON REDUCTRICE. 142
FIGURE 74 : EC50 DES ANTICORPS MONOSPECIFIQUES (MAB) VS BISPECIFIQUES (BSAB) DETERMINEE PAR ELISA 143
FIGURE 75 : EFFET DES BSAB SUR LA SIGNALISATION DE L'AMH ET L'ACTIVITE DES CASPASE 3/7 144
FIGURE 76 : EFFET DES BSAB SUR LA VIABILITE CELLULAIRE DES COV434-AMHRII ET SKOV3-AMHRII 145
FIGURE 77 : EFFET DES BSAB SUR LA SURVIE CLONOGENIQUE DES COV434-AMHRII ET SKOV3-AMHRII 146
FIGURE 78 : EFFET DES BSAB SUR LA MIGRATION CELLULAIRE DES SKOV3-AMHRII ET IMPLICATION D'ALK2 DANS CET EFFET 147
FIGURE 79 : EFFET DES BSAB SUR LES CELLULES ISOLEES D'ASCITES DE PATIENTES ATTEINTES DE CANCERS OVARIENS 148
FIGURE 80 : KAPLAN MEIER DE LA SURVIE GLOBALE DES SOURIS TRAITEES AVEC LES BSAB AMHRII-ALK3 151
FIGURE 81 : EXPRESSION DU RECEPTEUR AMHRII EN CONDITION IN VITRO ET IN VIVO 151
FIGURE 82 : BILAN DE LA STRATEGIE DES BSAB SUR LA SIGNALISATION DE L'AMH 152
FIGURE 83 : COMPARAISON DES CELLULES TRANSFECTEES AVEC LE RECEPTEUR AMHRII VS LES CELLULES WT 157
FIGURE 84 : EFFET DE LA LR-AMH A FAIBLE DOSE 158
FIGURE 85 : LIAISON DES ANTI-AMH 160
FIGURE 86 : CARACTERISATION DE L'ANTICORPS ANTI-AMH (B10) 161
FIGURE 87 : INHIBITION DE LA VIABILITE/PROLIFERATION ET ACTIVATION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ANTICORPS B10 163
FIGURE 88 : : INHIBITION DE LA VIABILITE/PROLIFERATION ET ACTIVATION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ANTICORPS B10 SUR LES CELLULES D'ASCITES DES PATIENTES 6 ET 7 165
FIGURE 89 : CONTROLE DE LA CROISSANCE TUMORALE ET AUGMENTATION DE LA SURVIE DES SOURIS TRAITEES AVEC LES ANTICORPS ANTI-AMH (B10) ET ANTI-AMHRII (12G4) IN VIVO 166
FIGURE 90 : ESSTIMATION DE LA CONCENTRATION D'AMH DANS LE SANG PERIPHERIQUE 167
FIGURE 91 : LIAISON DES ANTI-AMH EN ELISA ET CYTOMETRIE EN FLUX 168

FIGURE 92 : EFFET DES ANTICORPS B10 HUMAINS NATIFS ET AGLYCOSYLES SUR LA SURVIE ET L'ACTIVITE DES CASPASES 3/7 SUR LES CELLULES D'ASCITES DE LA PATIENTE 7 169
FIGURE 93 : BILAN DE L'EFFET DE L'ANTI-AMH B10 COMME STRATEGIE THERAPEUTIQUE 173
FIGURE 94 : EFFET DE LA COMBINAISON D'AMH EXOGENE ET DE L'ANTI-AMHRII (12G4) 175
FIGURE 95 : EFFET DU VEGF SUR L'EXPRESSION D'AMHRII SUR LES CELLULES KGN ET LES SKOV3-WT 176
FIGURE 96 : IMPLICATION DE L'AMH ET AMHRII DANS L'EXPRESSION DU FCRN 179

TABLEAU 1 : CLASSIFICATIONS DE FIGO ET TNM DES DIFFERENTS STADES D'EVOLUTION DU CANCER OVARIEN 28
TABLEAU 2 : RESUME DES PROCESSUS BIOLOGIQUES MODULES PAR L'AMH 64
TABLEAU 3 : EXPRESSION DU RECEPTEUR AMHRII DANS LES TISSUS GYNECOLOGIQUES NORMAUX ET CANCEREUX 69
TABLEAU 4 : LES BSAB EN ESSAI CLINIQUE EN CANCEROLOGIE 94
TABLEAU 5 : : EXPRESSION EXTRA- ET INTRACELLULAIRE DES RECEPTEURS DE L'AMH SUR LES LIGNEES CELLULAIRES DE CANCERS OVARIENS 109
TABLEAU 6 : EXPRESSION MEMBRANAIRE DES RECEPTEURS DE L'AMH SUR LES CELLULES ISOLEES D'ASCITES DE PATIENTES 111
TABLEAU 7 : DOSAGE DE L'AMH DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE 115
TABLEAU 8 : CONCEPTION DE L'ESSAI IN VIVO 149
TABLEAU 9 : AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFCATION DES RECEPTEURS ALK ET DE L'AMH. 205
TABLEAU 10 : LISTE DES RESSOURCES UTILISEES 205

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Incidence et mortalité

En 2018, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 295 414 nouveaux cas de femmes atteintes du cancer de l'ovaire dans le monde. Il est le 8 ème cancer en termes d'incidence. L'apparition d'un cancer de l'ovaire est prédominante dans les pays développés en Europe, aux Etats-Unis ou au Canada et moins répandue dans les populations africaines et asiatiques. Il concerne en général les femmes âgées de plus de 45 ans (âge moyen de découverte : 57 ans) (Allemani et al., 2015). Le cancer de l'ovaire est également la 8ème cause de décès par cancer chez la femme (**Figure 1**) (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2015). En effet, il est qualifié de « tueur silencieux » en raison de l'absence de symptômes aux stades précoces et de stratégies de dépistage efficace. Ces cancers sont généralement diagnostiqués à un stade avancé lorsque la maladie est déjà disséminée dans la cavité péritonéale (plus de 70% de stades III ou IV au diagnostic). À ces stades avancés, le taux de guérison est très faible et le pronostic est généralement sombre avec une survie globale de 5 ans d'environ 20 à 30% selon le type de cancer ovarien. Cependant, lorsque la maladie est diagnostiquée au stade primaire, la survie à 5 ans peut atteindre 90% mais les récidives sont nombreuses.

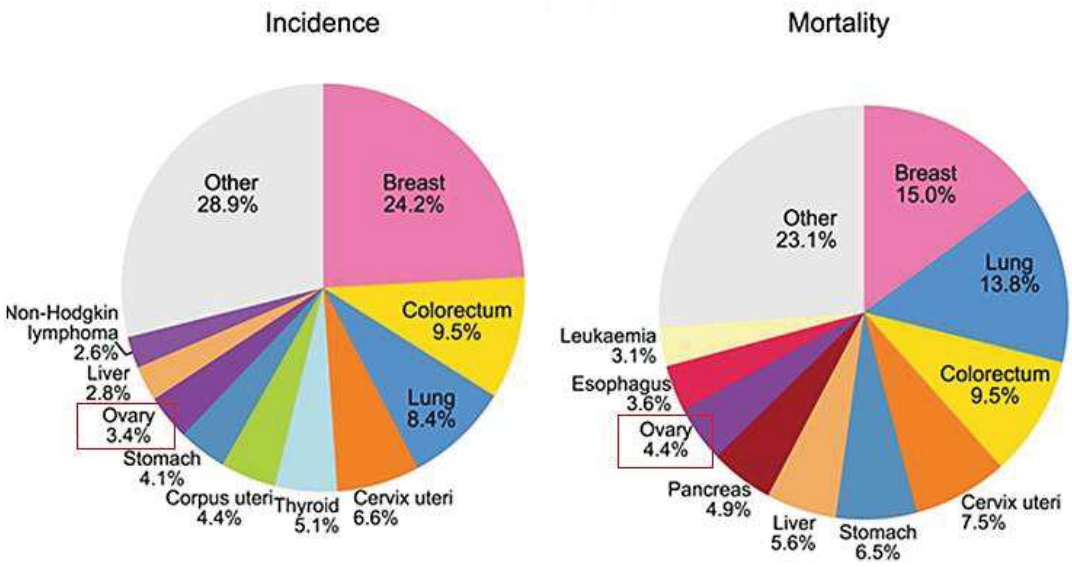


Figure 1 : GLOBOCAN 2018 estime l'incidence et la mortalité des cancers dans le monde en 2018 chez la femme

1.2 Les différents types de cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire regroupe différents types et sous-types avec des caractéristiques clinicopathologiques et moléculaires distinctes. Bien qu'ils soient hétérogènes, ils sont traités comme une pathologie unique. Il semble donc essentiel dans cette partie de faire un point sur ces caractéristiques et d'identifier les marqueurs tumoraux afin d'adapter au mieux les thérapies pour chaque type de cancers de l'ovaire.

Il existe trois types de cancer de l'ovaire qui proviennent de type cellulaires différents selon la localisation anatomiques (Chen et al., 2003) (**Figure 2**) :

- Cellules épithéliales
- Cellules du stroma
- Cellules germinales

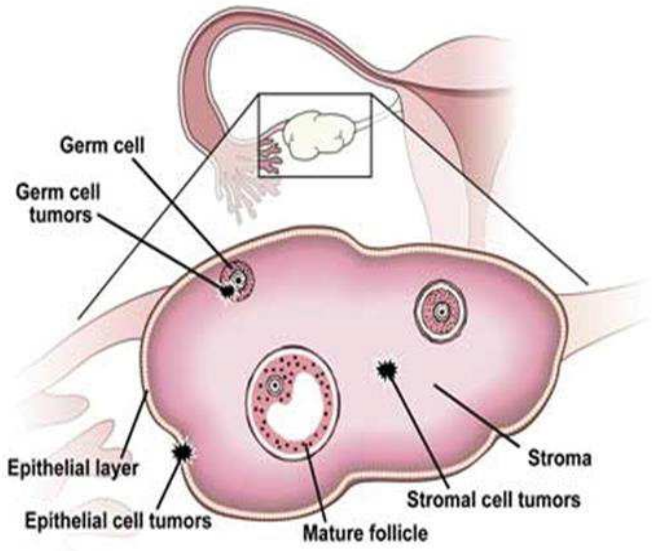


Figure 2 : Localisation des différents types de cancer de l'ovaire

1.2.1 Le cancer épithélial de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire d'origine épithéliale localisé à la surface de l'ovaire représente la majorité des cancers de l'ovaire, soit 90%. Il est décrit comme étant hétérogène avec 5 sous-types histologiques (histotypes) différents : séreux de haut grade, séreux de bas grade, endométrioïdes, mucineux, et à cellules claires (**Figure 3**). Des études ont montré que les tumeurs d'histotypes différents peuvent avoir des caractéristiques distinctes en ce qui concerne l'épidémiologie, les anomalies génétiques, l'expression des marqueurs tumoraux et donc une réponse aux traitements variables (Aunoble et al., 2000; Feeley and Wells, 2001; Marquez et al., 2005; McCluggage, 2011).

Adénocarcinome séreux de haut et bas grade

L'adénocarcinome séreux de haut grade est le type histologique le plus fréquent environ 80% des tumeurs malignes. La plupart des tumeurs sont largement disséminées dans la cavité péritonéale au moment du diagnostic et le pronostic vital est plutôt mauvais. Les taux de survie à cinq ans sont respectivement de 76%, 56%, 25% et 9% pour les patientes atteintes de tumeurs de stade I, II, III et IV. Les tumeurs séreuses de bas (plus rare) et haut grade sont différenciées par leur pathogénie. Dans les carcinomes séreux de haut grade, la mutation du gène TP53 représente 97 à 100% des cas selon les méthodes, tandis que la mutation de KRAS/BRAF semble être caractéristique des tumeurs de bas grade (Vang et al., 2009).

Tumeur endométrioïde

Les tumeurs endométrioïdes représentent environ 15 à 20% des tumeurs épithéliales. Elles sont constituées de cellules qui ressemblent à celles de l'épithélium endométrial et sont généralement associées à une endométriose (présence aberrante extra-utérine de cellules endométriales). Il peut être difficile pour les pathologistes de déterminer, en se basant uniquement sur des critères morphologiques, si les tumeurs endométriales et ovariennes représentent deux carcinomes primaires indépendants ou un seul cancer primaire survenant dans un organe et métastasant dans l'autre (Soliman et al., 2004).

Adénocarcinome mucineux

Ce type de cancer représente environ 5 à 10% de l'ensemble des cancers ovariens. Les cellules qui le composent sont mucosécrétantes et ressemblent aux cellules sécrétrices de l'épithélium intestinal. Les tumeurs de stade I sont localisées la plupart de temps sur un seul ovaire. Une ablation chirurgicale suffit souvent face à une tumeur mucineuse. Lorsque le diagnostic est posé à un stade plus avancé, le taux de mortalité est beaucoup plus élevé, en rapport avec une association dans 85 % des cas à un pseudomyxome péritonéal. Le second sous-type est dit endocervical ou Müllérien (Moriya et al., 2003).

Tumeurs à cellules claires

Ces tumeurs également rares (moins de 5%) se développent également à partir de cellules endométriales ayant migré de l'utérus vers l'ovaire de manière rétrograde. Les cellules tumorales présentent généralement un cytoplasme clair en raison de la présence de glycogène intracytoplasmique (Anglesio et al., 2011)

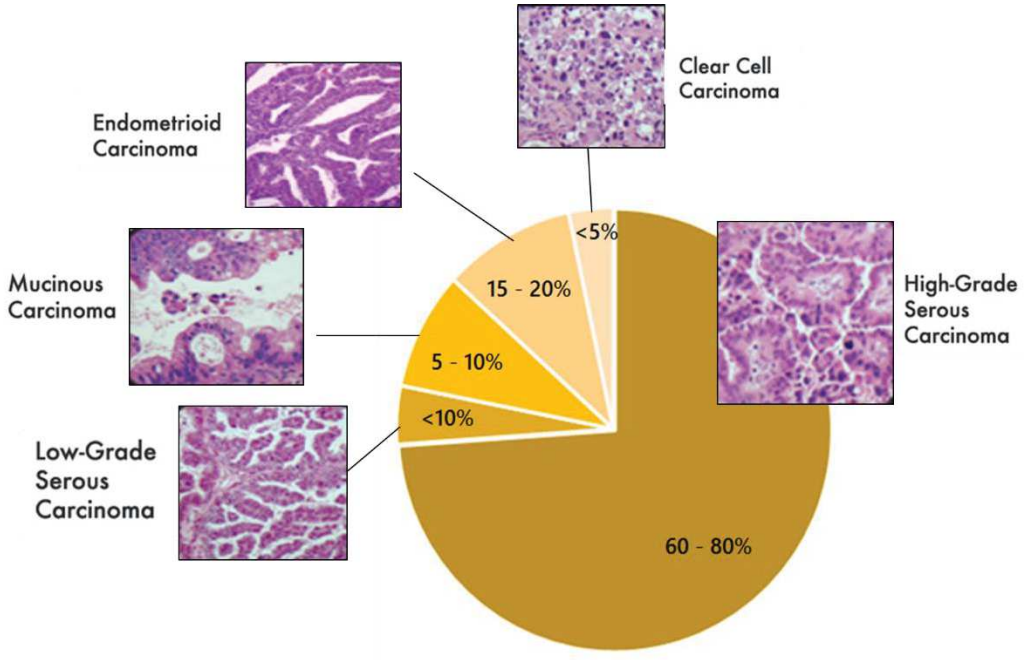


Figure 3 : Fréquence (%) des histotypes des cancers épithéliaux
Adapté de Kathleen Cho (2016)

1.2.2 Le cancer du stroma et/ou des cordons sexuels

Les tumeurs du stroma et/ou des cordons sexuels sont rares et représentent environ 8% des tumeurs maligne ovariennes. Elles se développent à partir des cellules appartenant au tissu de soutien des ovaires qui sont impliquées dans la production d'hormones. Les tumeurs du stroma et des cordons sexuels entraînent donc fréquemment des troubles hormonaux qui peuvent aider au diagnostic tel que l'augmentation du taux d'AMH corrélé à la croissance tumorale (Chang et al., 2009). Dans la grande majorité des cas, ces tumeurs sont découvertes à un stade précoce. Cela permet d'obtenir un taux élevé de guérison.

Le cancer du stroma comprend les tumeurs de la granulosa, les plus fréquentes de cette catégorie. La granulosa est une couche de cellules folliculaires granuleuses qui entoure l'ovocyte et la cavité du follicule ovarien. On distingue deux types histologiques : la forme adulte et la forme juvénile. La forme adulte est majoritaire (95 % des cas) et concerne des femmes de plus de 50 ans (Schumer and Cannistra, 2003). L'évolution de ces tumeurs est lente et les récidives post opératoires sont tardives (six ans en moyenne). Le taux de survie à cinq ans des tumeurs de la granulosa se situe entre 75 et 90 %, tous stades confondus. Ce pronostic est modulé selon le stade déterminé par la classification de FIGO, la taille tumorale, la rupture tumorale intrapéritonéale, la bilatéralité, le résidu tumoral après chirurgie et l'âge.

1.2.3 Les tumeurs germinales

Les tumeurs germinales se composent à 95% de tumeurs bénignes comme les kystes et les tératomes et 5% sont des tumeurs germinales malignes. Elles surviennent le plus souvent chez la femme de moins de 30 ans. Si le pronostic des tumeurs germinales malignes est le plus souvent excellent avec un taux de guérison proche de 100 % pour les stades précoces et de 75 % pour les stades avancés, il existe néanmoins des facteurs pronostiques défavorables, tels que la taille tumorale supérieure à 10 cm et certains types histologiques (Bats et al., 2009).

1.2.4 La carcinose péritonéale

Les cancers de l'ovaire présentent une croissance rapide avec une dissémination des cellules cancéreuses dans la cavité péritonéale responsable de la formation de liquide d'ascite. L'extension tumorale prend en compte différents processus cellulaires tels que la prolifération des cellules cancéreuses au niveau de site proche des ovaires et la transition épithélio-mésenchymateuse favorisant l'envahissement de sites à distance (Lengyel, 2010). L'hétérogénéité cellulaire présente dans le liquide d'ascite est mal connue et complexe, il comprend les cellules cancéreuses mais aussi des fibroblastes associés au cancer (CAF), des cellules souches mésenchymateuses et des cellules du système immunitaire tel que des macrophages ou monocytes infiltrant et des lymphocytes T régulateurs (Ahmed and Stenvers, 2013).

Lors du diagnostic, 70 à 90% des patientes présentent une carcinose péritonéale associée à un mauvais pronostic (Kipps et al., 2013). Une étude de Shen-Gunther et Mannel a montré que la formation d'ascite dépend du stade de la maladie, plus de 89% des patientes ayant un cancer de l'ovaire de stade II/III, quel que soit le type histologique, développeront un ascite contre seulement 17% des patientes en stade I (Lurie et al., 2009; Shen-Gunther and Mannel, 2002).

1.3 Les marqueurs tumoraux

Au cours du processus de carcinogénèse, les cellules acquièrent des caractéristiques phénotypiques qui les distinguent des cellules normales. Ces marqueurs tumoraux génétiques et protéiques sont retrouvés dans le sang, les urines, les tissus de patients et ils varient en fonction du type de cancer. Ces indicateurs peuvent aider au dépistage, à établir le diagnostic et pronostic ainsi qu'au suivi thérapeutique des patients. Grâce à la recherche en oncologie, à la caractérisation tumorale et aux progrès techniques, de nouveaux marqueurs de plus en plus spécifiques ont été identifiés pour donner naissance à des thérapies de plus en plus ciblées et personnalisées.

1.3.1 Les marqueurs génétiques dans les cancers de l'ovaire

Dans le cancer épithélial de l'ovaire, les mutations génétiques varient en fonction de l'histotype de la tumeur. Les mutations géniques les plus fréquemment impliquées sont *TP53, BRCA1/2, KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *PTEN*, *PIK3CA*, β-catenin (*CTNNB1*), *ARID1A* (Cuatrecasas et al., 1998; Kurman, 2013; Kurman and Shih, 2008; Singer et al., 2003). Les tumeurs séreuses de bas grade sont caractérisées le plus souvent par la mutation de KRAS et ne présentent pas de mutations de p53 (Cuatrecasas et al., 1998; Teneriello et al., 1993). À l'inverse, les tumeurs de haut grade présentent généralement des mutations p53 et BRCA1/2 (Kappes et al., 1995; Sieben et al., 2004). Quant aux tumeurs mucineuses, elles sont caractérisées, dans la majorité des cas, par des mutations KRAS (Enomoto et al., 1991; Mok et al., 1993) et les tumeurs endométrioïdes par des mutations PTEN (Obata et al., 1998). Ci-dessous une classification mettant en évidence les facteurs génétiques associés aux différents types de cancer de l'ovaire (**Figure 4**).

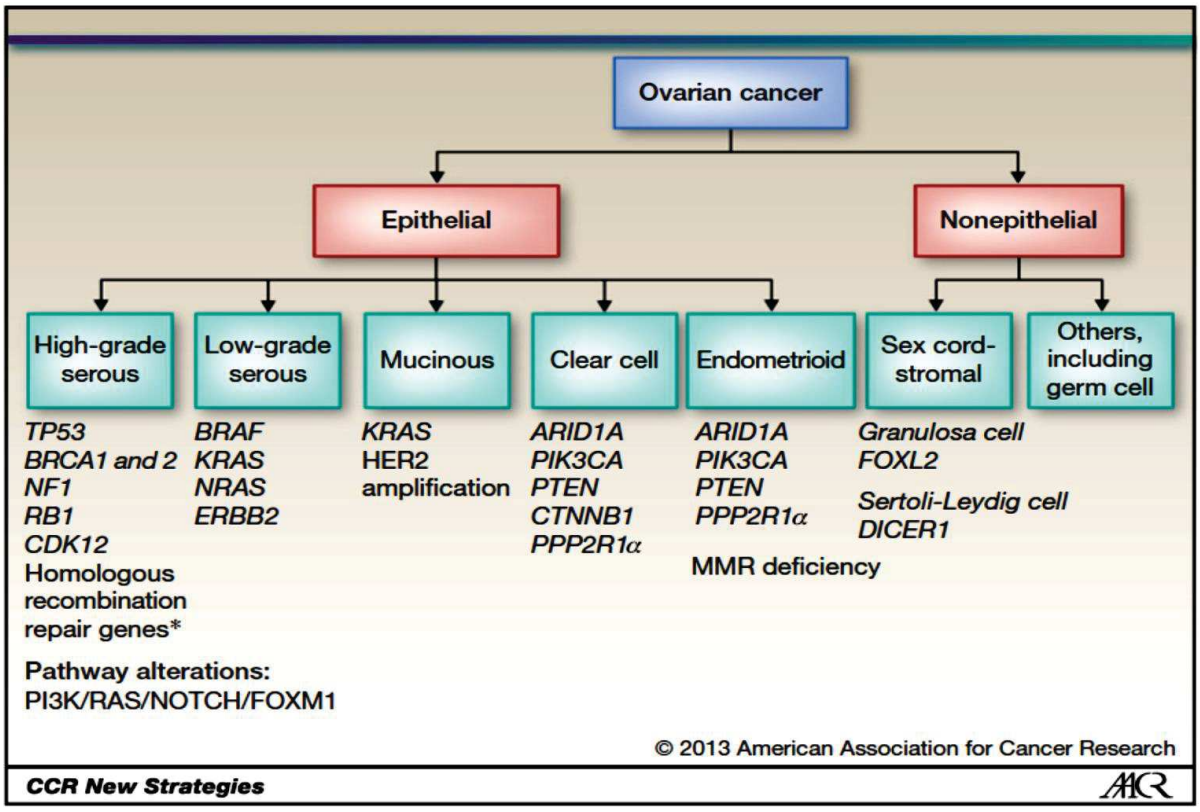


Figure 4 : Marqueurs génétiques mutés en fonction de l'histotype des cancers ovariens
(Banerjee et al, 2013)

1.3.2 Les marqueurs protéiques dans les cancers de l'ovaire

1.3.2.1 Protéines circulantes

Le marqueur tumoral CA-125 « Cancer Antigen 125 » est retrouvé de manière élevé dans le sang de patientes notamment dans les cancers épithéliaux de l'ovaire. L'utilisation clinique standard du marqueur tumoral CA-125 a été examinée dans de nombreuses études en mettant l'accent sur les niveaux du marqueur avant et après traitement. La concentration de CA-125 dépend du type histologique : un taux anormal a été observé dans 99% des carcinomes séreux, 89% des endométrioses et 69% des cancers mucineux. Il est aussi dépendant du stade clinique selon la classification FIGO (Kabawat et al., 1983; Morales-Vásquez et al., 2016).

Le dosage du CA 125 sert principalement à suivre la réaction du patient suite à un traitement du cancer de l'ovaire : il donne des indications quant à l'efficacité du traitement, ou à la survenue d'une récidive. L'analyse n'est pas utilisée pour dépister le cancer de l'ovaire car la présence de CA 125 n'est pas spécifique (il peut être élevé en présence d'une maladie bénigne ou de cancers autres que celui de l'ovaire).

L'inhibine et l'hormone antimüllérienne sont quant eux des marqueurs spécifiques du cancer de l'ovaire notamment chez les femmes atteintes de tumeurs du stroma de l'ovaire. Ces deux marqueurs appartiennent à la grande famille des TGFβ et sont sécrétés par les follicules de l'ovaire. Leur niveau est augmenté lors du développement du cancer ovarien, en particulier, pour l'AMH dont la concentration dans le sérum de patiente est corrélée à la croissance des tumeurs de la granulosa (Chang et al., 2009; Long et al., 2000). Cependant, le dosage de l'AMH dans le sérum n'est pas corrélé avec la croissance tumorale quand il s'agit du cancer épithélial de l'ovaire (Schock et al., 2014; Walentowicz et al., 2013). L'AMH est un marqueur spécifique du cancer du stroma de l'ovaire dont je développerai plus précisément ses fonctions physiologiques et son implication dans le cancer dans le chapitre III de ce manuscrit.

1.3.2.2 Protéines membranaires

Dans une cellule tumorale, l'activité des récepteurs membranaires ou des protéines intracellulaires peut être augmentée par surexpression ou mutation, créant des conditions propices à la prolifération de la cellule, à sa survie, ou encore induisant des propriétés d'invasion. Toutes ces anomalies deviennent autant de marqueurs moléculaires potentiels qui peuvent servir pour le diagnostic et le pronostic. De manière plus intéressante, ces marqueurs membranaires sont aussi des cibles thérapeutiques potentielles. Sur ce principe, de nombreuses thérapies ont vu le jour comme l'apparition des anticorps monoclonaux ciblant les récepteurs membranaires surexprimés dans le développement cancéreux : tels que les récepteurs de la famille HER (Human Epidermal Growth Factor

Receptor) qui sont impliqués dans la prolifération cellulaire et surexprimés dans certains cancers. Sur ce principe nous développerons dans cette thèse de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le marqueur membranaire AMHRII spécifique des cancers ovariens.

1.4 Les traitements des cancers ovariens

1.4.1 La classification FIGO

La prise en charge des tumeurs épithéliales ou du stroma est dépendante du stade de la tumeur. L'extension de la maladie est codifiée de manière standardisée avec le système TNM pour « Tumor Node Metastasis ». Cependant, cette classification présente des inconvénients dans le cadre du cancer de l'ovaire car la prise en charge ne dépend pas que de la taille tumorale contrairement à d'autres cancers. La classification FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie Obstétrique) est alors utilisée. Cette stadification permet d'établir par la suite le traitement adéquat pour la patiente (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classifications de FIGO et TNM des différents stades d'évolution du cancer ovarien
Adapté de la revue Prat et al, 2015

T	N	M	Stades FIGO	Définition
T1	**N0**	**M0**	**Stade I**	**Tumeur limitée aux ovaires (un ou les 2)**
T1a	N0	M0	Stade I A	tumeur limitée à un seul ovaire ; capsule intacte, sans tumeur à la surface de l'ovaire ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
T1b	N0	M0	Stade I B	tumeur limitée aux deux ovaires ; capsules intactes, sans tumeur à la surface de l'ovaire ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
T1c	N0	M0	Stade I C*	tumeur limitée à 1 ou aux 2 ovaires, avec soit rupture capsulaire, soit tumeur à la surface des ovaires, soit cellules malignes présentes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
T2	**N0**	**M0**	**Stade II**	**Tumeur intéressant 1 ou les 2 ovaires avec extension pelvienne**
T2a	N0	M0	Stade II A	extension et/ou greffes utérines et/ou tubaires ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou le liquide de lavage péritonéal
T2b	N0	M0	Stade II B	extension à d'autres organes pelviens ; pas de cellules malignes dans le liquide d'ascite ou le liquide de lavage péritonéal
T3	**et/ou N1**	**M0**	**Stade III**	**Tumeur de l'ovaire avec extension péritonéale abdominale et/ou ganglionnaire rétropéritonéale**
T3a	N0	M0	Stade III A**	métastases rétropéritonéales microscopiques ± péritoine
T3b	N0	M0	Stade III B	métastases péritonéales extra-pelviennes ≤ 2 cm ± adénopathies
T3c	et/ou N1	M0	Stade III C	métastases péritonéales extra-pelviennes >2 cm ± adénopathies
Tous T	**Tous N**	**M1**	**Stade IV*** **	**Métastases à distance (à l'exclusion des métastases péritonéales)**

- *** : stade IC**
  - IC1 : rupture peropératoire
  - IC2 : rupture préopératoire ou végétations en surface
  - IC3 : cellules malignes dans l'ascite ou le liquide de lavage péritonéal.
- **** : stade IIIA**
  - IIIA1 : adénopathie rétropéritonéale seule (prouvé par cytologie/histologie)
    - IIIA1(i) : foyer adénocarcinomateux dans l'adénopathie ≤ 10 mm
    - IIIA1(ii) : foyer adénocarcinomateux dans l'adénopathie >10 mm.
  - IIIA2 : extension péritonéale microscopique extrapelvienne ± adénopathies.
- ***** : stade IV** : cancer de l'ovaire avec métastases à distance
  - IVA : plèvre (cytologie positive)
  - IVB : autres métastases y compris adénopathies inguinales.

1.4.2 La chirurgie

Le recours à la chirurgie est réalisé en 1ère ligne lorsque la tumeur n'est pas disséminée dans la cavité péritonéale ou métastatique. Une fois la résection complète après chirurgie, le choix des traitements complémentaires dépend du stade de la tumeur. Il est orienté selon l'arbre décisionnel ci-dessous (**Figure 5**A). En cas de carcinose péritonéale, la CHIP (Chimiothérapies Hyperthermique Intra-Péritonéale) peut être proposée pendant le geste chirurgical. En effet, pour que le traitement soit efficace, il doit avoir lieu avant que les adhérences post-opératoires n'apparaissent. Ces adhérences qui sont consécutives à la chirurgie pourraient alors piéger des cellules tumorales restantes, qui ne seraient pas détruites par le « bain » de chimiothérapie. Si la CHIP semble particulièrement adaptée aux cancers de l'ovaire en revanche, sa mise en œuvre reste complexe compte tenu d'un bénéfice/risque incertain (Lécuru et al., 2019).

En revanche dans le cas d'une tumeur inopérable en raison de l'extension tumorale (généralement ≥ stade IIIC), d'une contre-indication médicale et/ou anesthésique à la chirurgie première ou lors d'une chirurgie incomplète, la chimiothérapie est utilisée en première ligne comme indiqué sur l'arbre décisionnel ci-dessous (**Figure 5**B).

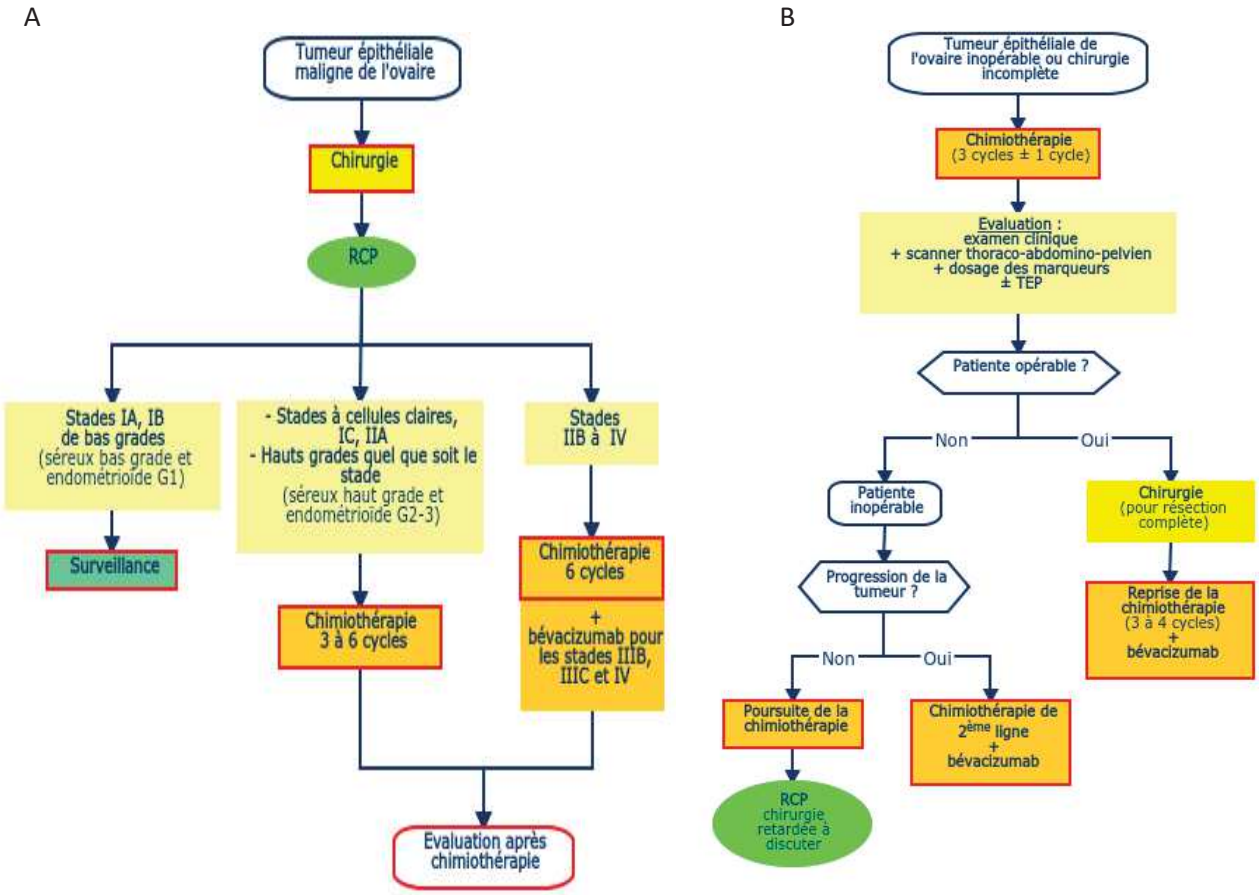


Figure 5 : Arbre décisionnel des traitements à effectuer lors d'une tumeur
A) Opérable. B) Non opérable

La chimiothérapie est envisagée lorsque la tumeur progresse ou n'est plus limitée au niveau des ovaires. Les molécules utilisées sont les sels de platine (carboplatine) et les taxanes (paclitaxel). Tous deux bloquent le processus de division cellulaire conduisant à la mort de la cellule cancéreuse. Le carboplatine inhibe la réplication de l'ADN et le placlitaxel inhibe la dépolymérisation des microtubules. Cependant, ils engendrent de nombreux effets secondaires car les cellules saines vont subir également l'effet du médicament. Le protocole de chimiothérapie peut être prescrit en combinaison avec la chirurgie, et commencer avant l'opération. Cette chimiothérapie, dite néo adjuvante, vise à réduire le volume de la tumeur, faciliter l'intervention et à prévenir la dissémination métastatique. Plus souvent, la chimiothérapie du cancer de l'ovaire est prescrite en situation adjuvante, c'est-à-dire après l'opération, notamment si l'ablation n'est pas complète. Enfin, dans les tumeurs de stade avancé (stade IV), la chimiothérapie est prescrite en dehors de toute chirurgie et associée au Bévacizumab (anti-VEGF, développé partie 1.4.3.1) afin de ralentir la croissance tumorale. Le schéma standard est l'administration toutes les 3 semaines pour 6 cycles de carboplatine associé aux paclitaxel (Katsumata et al., 2009).

1.4.3 Les thérapies ciblées dans le traitement des cancers de l'ovaire

L'identification des marqueurs tumoraux a conduit aux développement et à l'évolution rapide des stratégies ciblées. Dans le cancer de l'ovaire, celles-ci sont basées sur une approche ciblant le microenvironnement tumoral tel que le ciblage de la voie du VEGF par le Bévacizumab ainsi que le ciblage des voies défectueuses de réparation de l'ADN par les inhibiteurs de PARP.

1.4.3.1 Les anticorps monoclonaux (MAbs) : anti-VEGF, anti-CD3-EpCam

L'étude approfondie des marqueurs membranaires sur les cellules tumorales a conduit au développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces cibles thérapeutiques. Les anticorps sont des macromolécules complexes de type immunoglobuline de 150kDa, réparties en plusieurs classes et sous classes avec des activités biologiques spécifiques. Les IgG représentent 75% des immunoglobulines. Elles sont utilisées en thérapie essentiellement parce qu'elles sont les plus simples et qu'elles ont un temps de demi-vie plus long, grâce à leur capacité de liaison au FcRn (Néonatal Fc Récepteur). Elles sont constituées de deux chaines lourdes (H) et de deux chaînes légères (L) reliées entre elles par des ponts disulfures. Elles sont composées de domaines variables (VL et VH) et de domaines constants (CL et CH 1, 2, 3) ainsi que d'une région charnière (H) située entre le domaine CH1 et CH2. À l'extrémité des Fab (formés de la chaîne légère en entier (V_L+C_L) et d'une partie de la chaîne

lourde (V_H+C_H1)), le repliement des chaînes peptidiques des régions VH et VL assure un rapprochement spatial des six CDR, constituant le site de liaison de l'antigène, aussi appelé paratope. Le paratope de l'anticorps reconnait sur l'antigène un motif spécifique qui est l'épitope (**Figure 6**). Quant au fragment Fc (cristallisable), il détermine la demi-vie de l'anticorps grâce à la liaison de cette partie aux récepteurs FcRn permettant le recyclage de l'augmentation de sa durée de vie dans l'organisme. C'est également avec cette partie constante que l'anticorps a la capacité de recruter les cellules effectrices du système immunitaire (macrophage et NK) (Schroeder and Cavacini, 2010).

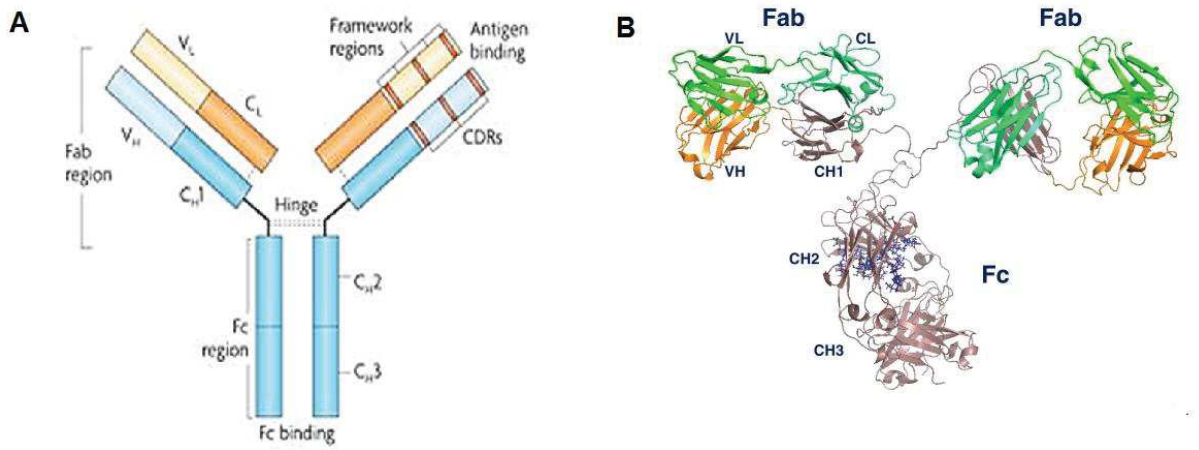


Figure 6 : Structure d'un anticorps de format IgG1
A) Représentation schématique de la strucutre d'un anticorps au format IgG1 d'après Hansel et al., 2010. B) Représentattion structurelle de l'anticorps, chaque domaine est formé de feuillets β anti-parallèles sur 2 plans d'après Chiu and Gilliland, 2016.

Dans le cas des cancers de l'ovaire, deux anticorps sont validés en routine clinique, l'anticorps monoclonal Bévacizumab et l'anticorps bispécifique Catumaxomab. Le Bévacizumab utilisé en combinaison avec la chimiothérapie est le 1er traitement de maintenance de la survie. L'anticorps bispécifique Catumaxomab est utilisé dans le traitement des ascites malin Epcam positif, mais a été retiré du marché en 2017 pour des raisons commerciales.

Le Bévacizumab : anti-VEGF

Les anticorps monoclonaux (Mabs) peuvent aussi être utilisés pour cibler des protéines du microenvironnement tumoral tel que le Bevacizumab qui cible le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) et neutralise son activité. Cette protéine sécrétée par la tumeur a la capacité d'augmenter fortement l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux capillaires sanguins au niveau de la tumeur pour favoriser la croissance tumorale (Chellappan et al., 2018). Le Bévacizumab a été le premier anticorps monoclonal humain utilisé dans le traitement du cancer de l'ovaire.

Actuellement, le Bévacizumab est administré chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire de stade IIIB, IIIC et IV en association aux chimiothérapies (15 mg/kg de poids corporel administré une fois toutes les 3 semaines, en perfusion intraveineuse).

Les études cliniques G0G-0218 et ICON7 (Banerjee and Kaye, 2013; González Martín et al., 2019; Oza et al., 2015; Perren et al., 2011) ont été réalisées afin de déterminer le bénéfice rendu par rapport aux chimiothérapies. L'essai clinique GOG-0218 met en évidence que l'association de la chimiothérapie de référence carboplatine et paclitaxel (CP) associé au Bévacizumab (Bev) suivi du Bévacizumab seul augmente la survie sans progression de manière significative par rapport à la chimiothérapie seule (Burger et al., 2011) (**Figure 7**A). Dans l'essai ICON7, le Bévacizumab est utilisé en première intention de traitement après chirurgie. Les auteurs montrent que la survie sans progression est plus élevée que chez les patientes traitées après chirurgie avec la chimiothérapie standard (Carboplatine et paclitaxel) (**Figure 7**B).

A : GOG-0218 **B** : ICON7

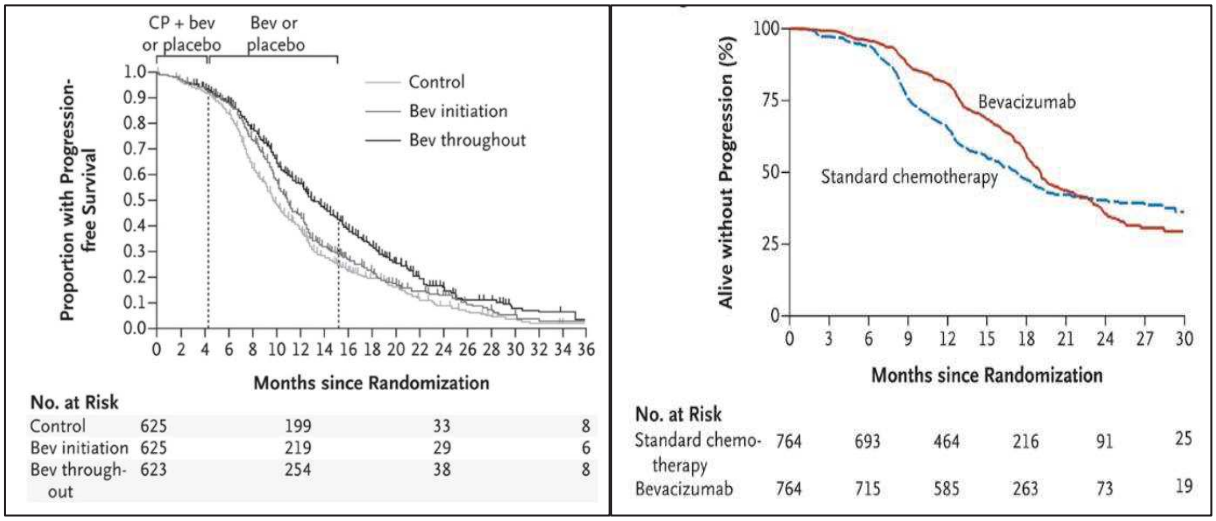


Figure 7 : Survie sans progression des essais cliniques GOG-218 et ICON7
(Perren et al., 2011 ; Burger et al., 2011)

Le Bévacizumab a fait également l'objet de deux autres études cliniques OCEAN et AURELIA évaluant l'extension de l'anticorps chez les patientes en première récidive ainsi que les patientes sensibles et résistantes aux sels de platine (Aghajanian et al., 2012; Pujade-Lauraine et al., 2014). L'étude OCEAN a montré que la combinaison chimiothérapie (Gemcitabine + Carboplatine (GC)) et Bévacizumab (BV) entraine une amélioration statistiquement significative de la survie sans progression par rapport à la chimiothérapie seule (GC + Placebo) (**Figure 8**A). Quant à l'étude clinique AURELIA, elle combine un seul agent de chimiothérapie (CT) paclitaxel ou topotecan en combinaison avec le Bévacizumab. Les auteurs observent à nouveau une augmentation de la survie sans progression (**Figure 8**B).

A : OCEAN **B** : AURELIA

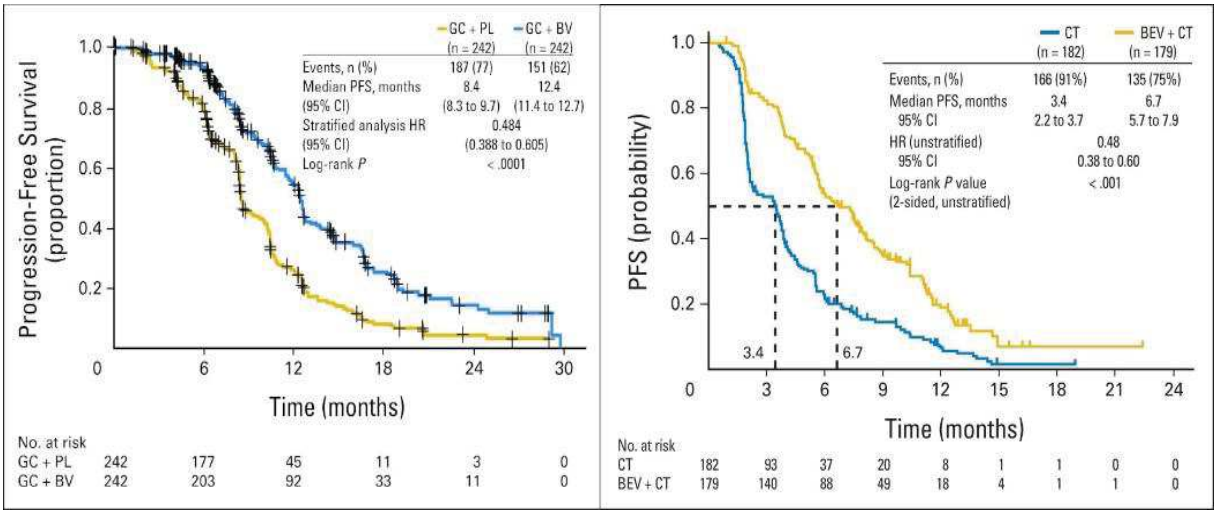


Figure 8 : Survie sans progression des essais clinique OCEAN et AURELIA
(Aghajanian et al., 2012 ; Pujade-Lauraine et al.,2014)

Ces essais ont rapporté une amélioration statistiquement significative de la survie sans progression, mais pas de la survie globale.

Plusieurs méta-analyse ont examiné le niveau d'efficacité et de sécurité de l'anticorps dans le traitement du cancer de l'ovaire, analysant la progression, la survie et les toxicités des 4 essais randomisés effectués avec le Bévacizumab. Le Bévacizumab est associé à des événements indésirables tels que l'hypertension, les saignements, la thrombo-embolie, la protéinurie, la cicatrisation retardée et les événements gastro-intestinaux. La plupart de ces événements peuvent être contrôlés. Actuellement, l'ajout du Bévacizumab à la chimiothérapie pourrait augmenter le contrôle des tumeurs dans les cancers ovariens, tant dans le traitement de première intention que dans le cas d'une rechute de la maladie. Cependant, les résultats d'études incluant le Bévacizumab n'ont pas montré d'amélioration de la survie globale pour les maladies primaires ou récidivantes et d'autres essais clinique incluant le Bévacizumab sont en cours (Rossi et al., 2017).

Catumaxomab (REMOVAB®)

Cet anticorps trifonctionnel a la particularité de cibler deux antigènes, le marqueur CD3 présent sur les lymphocyte T et EpCam marqueur des cellules épithéliales (**Figure 9**A). Sa partie Fc permet de recruter les cellules du système immunitaire(Linke et al., 2010). Le Catumaxomab est le premier anticorps bispécifique mis sur le marché, en 2009 et a été approuvé par l'EMA pour son utilisation dans le traitement intrapéritonéal de l'ascite malin chez les patientes atteintes d'un carcinome EpCAM-positif (**Figure 9**B) (Seimetz et al., 2010; Spiess et al., 2015a). La ponction intrapéritonéale plus l'ajout du Catumaxomab en intra-péritonéal améliore la qualité de vie par rapport à la ponction seule (Frampton, 2012). Cependant, la sélection des patientes candidates pour le traitement au Catumaxomab est limitée car l'apparition d'ascite est souvent une situation de stade très avancé et la survie des patients est généralement très courte.

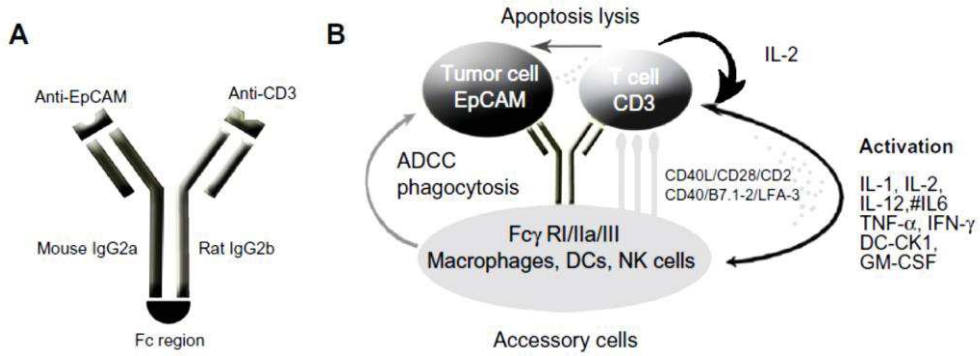


Figure 9: Structure et mode d'action du Catumaxomab
D'après Eskander RN, Tewari KS et al., 2013

1.4.3.2 Les Inhibiteurs de PARP

Les poly- (ADP-riboses) polymérases (PARP) sont des enzymes impliquées dans la réparation des cassures simples brins de l'ADN. Les deux protéines PARP et BRCA sont complémentaires pour réparer respectivement les cassures simples et doubles brins de l'ADN. Dans les cellules cancéreuses et notamment les cellules épithéliales séreuses du cancer de l'ovaire, la voie BRCA est déficiente par mutation des gènes BRCA1 et 2 (King et al., 2003; Press et al., 2008). Des inhibiteurs de PARP ont été testés chez les patientes en récidive du cancer de l'ovaire et BRCA mutées, 40% répondent à ce traitement avec un bénéfice clinique et un gain de 6 à 9 mois sur la survie sans progression (**Figure 10**) (Fong et al., 2010; Ledermann et al., 2012). L'inhibiteur chimique de PARP, l'olaparib, a été approuvé et autorisé sur le marché en 2014. L'utilisation des inhibiteurs de PARP pour le cancer de l'ovaire évolue rapidement et les inhibiteurs de PARP sont devenus une option de thérapie ciblée pour le traitement

du cancer de l'ovaire chez les patientes mutées BRCA1/2. En 2017 deux essais cliniques ENGOT-Ov21/SOLO2 et ARIEL3 ont confirmé l'effet bénéfique sur la survie sans progression des patientes en récidive (Pujade-Lauraine et al., 2017).

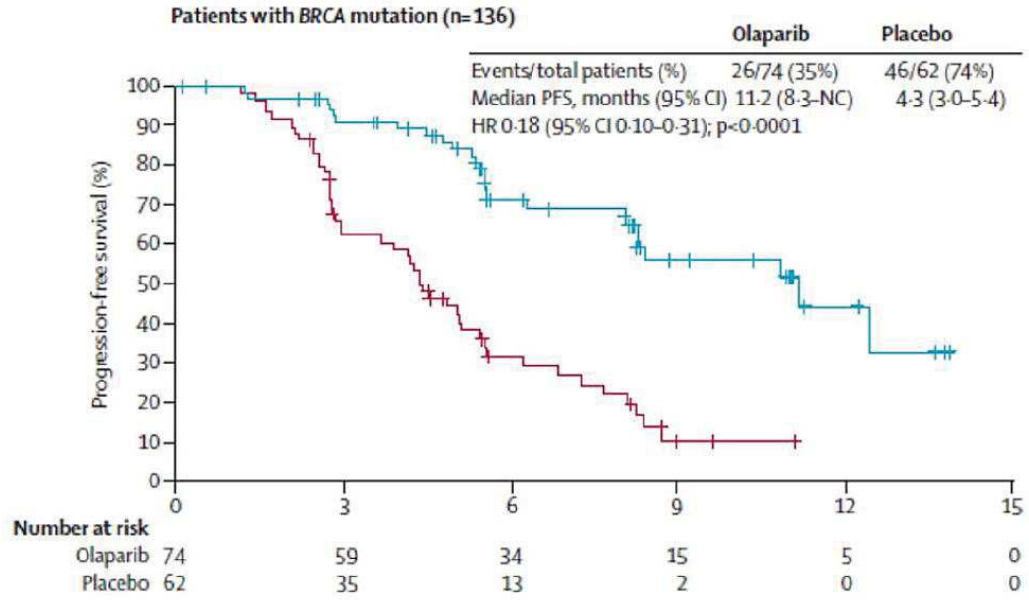


Figure 10 : Effet de l'Olaparib sur la survie sans progression
D'après Iedermann et al., 2012.

1.4.3.3 Autres pistes de thérapies ciblées

Une étude de Banerjee K et al, publiée en 2013 a passé en revue les possibilités de cibler d'autres voies et récepteurs qui peuvent être des cibles thérapeutiques dans le cancer de l'ovaire, notamment les voies (**Figure 11**) telles que :

- La voie PI3K/AKT/mTOR qui est souvent hyperstimulée du fait que la protéine PTEN inhibiteur d'AKT, soit délétée dans 30% des carcinomes ovariens de type cellules claires et endométrioides. MK- 2206 est un inhibiteur allostérique d'AKT et AZD2014 un inhibiteur de mTOR.
- La voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK qui joue un rôle important dans les cancers séreux de bas grade mutés BRAF ou KRAS. Un inhibiteur de MEK, Selumetinib, a montré un effet sur la réponse globale de 15% et une stabilisation de la maladie dans 65% des cas.
- La famille HER (Human Epidermal growth factor Receptor) comprend plusieurs récepteurs exprimés dans les cancers de l'ovaire : EGFR, HER 2 et HER 3. Malgré l'expression d'EGFR dans 60% des cas, les essais réalisés avec les TKI (Inhibiteur de tyrosine kinase) d'EGFR (Erlotinib et

Gefitinib) sont décevants. Le même constat a été établi avec les anticorps monoclonaux anti-HER2 (Trastuzumab et Pertuzumab). Cependant, les études ont été analysées sur une population totale, et une sélection plus approfondie des patientes selon leur statut d'expression permettrait de meilleurs résultats avec les anticorps. HER3 semblerait être une meilleure cible, d'autant plus que son expression a été corrélée à un mauvais pronostic et à une résistance aux chimiothérapies.

- Un inhibiteur de Src (Saracatinib) a été testé en phase II dans le cancer de l'ovaire sensible aux sels de platine mais aucun bénéfice n'a été observé. Néanmoins, des études précliniques ont montré son effet sur la resensibilisation des cellules au Paclitaxel et pourrait donc avoir un intérêt en association.
- La voie de l'IGF (Insulin-like Growth Factor) joue également un rôle dans la résistance aux chimiothérapies et IGF-1 est surexprimé dans les cancers séreux de bas grade. Le Linsitinib (TKI d'IGF-1 et de l'insuline) pourrait entrer dans la stratégie thérapeutique de cette catégorie de cancer en association avec les inhibiteurs de MEK.
- Les récepteurs des folates semblent être une cible de choix puisqu'ils sont exprimés dans 90% des cancers de l'ovaire. Le folate est un composant de base du métabolisme cellulaire, de la synthèse et de la réparation de l'ADN. Il est impliqué dans les réactions essentielles de transfert de carbone et est une vitamine nécessaire aux cellules normales et tumorales. Deux stratégies différentes ont été envisagées : un anticorps monoclonal anti-récepteur de folates appelé Farletuzumab et le Vindafolite ou EC145 qui est une molécule conjuguée associant un folate à un cytotoxique, la vinblastine. Celle-ci a montré son efficacité, dans une étude de phase II en association à la Doxorubicine liposomale avec une amélioration de la survie sans progression des cancers résistants au Paclitaxel.

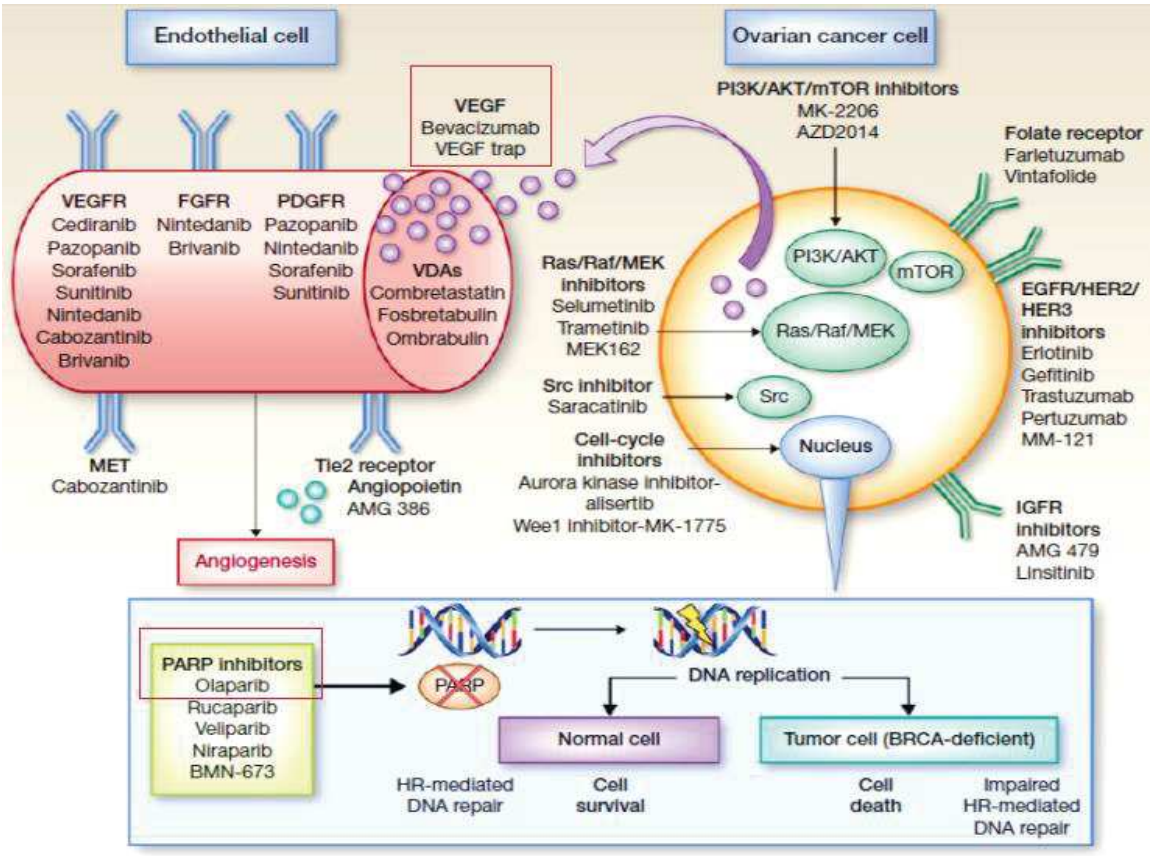


Figure 11: Bilan des thérapies ciblées actuelles et potentielles dans le traitement du cancer de l'ovaire *(Banerjee et al, 2013)*

1.4.4 Les thérapies en essais cliniques

Lors d'un essai clinique, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont testées afin d'évaluer leurs efficacités et leur tolérance dans le traitement du cancer de l'ovaire. Elles sont le plus souvent dirigées contre des cibles moléculaires indispensables à la prolifération et la croissance tumorale. Au-delà des anti-angiogenèse, des anticorps inhibiteurs de croissance ou des inhibiteurs de PARP, une nouvelle approche thérapeutique consiste à renforcer la réaction immunitaire.

1.4.4.1 Les immunothérapies

En condition physiologique, différents points de contrôle du système immunitaire stimulent ou bloquent l'activité des lymphocytes T afin de réguler la balance entre la réponse immunitaire et la tolérance.

Les protéines membranaires CTLA4 et PD1 sont des points de contrôle immunitaires inhibiteurs qui ont pour rôle de réduire la réponse immunitaire induite après stimulation par un antigène. Dans de nombreux cancers, ces deux protéines sont surexprimées et leur surexpression sont maintenues dans le temps. Des anticorps ont été développés pour inactiver ces deux points de contrôle de l'immunité et ainsi augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale. Les anticorps bloquants comme le nivolumab et pembrolizumab (anti-PD-1) ou l'ipilimumab (anti-CTLA4) sont déjà approuvés par la FDA et l'EMA dans le traitement du mélanome, du cancer du poumon, de la leucémie et du lymphome Hodgkinien.

Dans le cancer de l'ovaire, un important infiltrat des lymphocytes T effecteurs (CD4+ CD8+) est observé (Dadmarz et al., 1996; Ma and Gu, 1991), ainsi que l'expression du biomarqueur PD-L1 à la surface des cellules tumorales (Hamanishi et al., 2007; Taube et al., 2014; Webb et al., 2016). D'après ces deux observations qui sont i) l'accessibilité des cellules immunitaire au niveau de la tumeur et ii) la dominance des points de contrôle supprimant l'immunité anti-tumorale, ont suscité l'intérêt thérapeutique. Plusieurs essais cliniques majeurs ont été réalisés dans le cancer de l'ovaire utilisant des anticorps ciblant les modulateurs de points de contrôle du système immunitaire évoqué ci-dessus (Suh et al., 2018).

1.4.4.2 Les CAR T cells

Le principe des CAR T cell (en anglais, Chimeric Antigen Receptor ou CAR) est d'isoler les lymphocytes T du patient pour les modifier afin qu'ils reconnaissent spécifiquement un biomarqueur présent sur les cellules tumorales et ainsi les cibler plus efficacement. Les lymphocytes T sont donc modifiés génétiquement pour qu'ils expriment un récepteur antigénique chimérique d'intérêt tumoral, leur permettant de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales. Ils sont ensuite réimplantés chez le

patient. Des traitements expérimentaux exploitant ces cellules modifiées, ou cellules CAR-T, ont fait l'objet d'essais cliniques depuis ces cinq dernières années surtout pour les tumeurs liquides (Jindal et al., 2018). Dans les cancers ovariens, trois CAR-T sont en essais cliniques de phase I et II dans le traitement s et ciblent les marqueurs tumoraux NY-ESO-1 (NCT01697527), MAGE-A3 (NCT02111850), mesothéline (NCT01583686) (Cortez et al., 2018).

1.4.4.3 Les ADC (anticorps drug conjugates)

Les avancées dans l'ingénierie des anticorps ont permis de développer des anticorps conjugués permettant de délivrer, de manière sélective, une puissante cytotoxicité à l'intérieur des cellules tumorales. Ils sont composés d'un ou plusieurs agents cytotoxiques connectés à un anticorps monoclonal par une liaison covalente stable. Le récepteur aux folates a été une cible de choix dans son ciblage par anticorps car il est surexprimé dans 90% des cancers ovariens comme évoqué précédemment. De plus, La capacité du récepteur folate à internaliser de grosses molécules rend celui-ci bien adapté aux stratégies thérapeutiques à base d'anticorps et de médicaments conjugués (ADC). L'anticorps humain mirvetuximab ciblant le récepteur aux folates associé à un agent anti-mitotique (soravtansine) est évalué lors d'une étude clinique de phase I (NCT01609556). Cet ADC démontre un taux de réponse global de 47% et une augmentation de la survie sans progression de 6,7 mois chez des patients atteints de cancers épithéliaux de l'ovaire et de l'endomètre présentant une résistance aux chimiothérapies à base de sel de platine (Moore et al., 2017).

Une étude de phase Ib a récemment été amorcée pour évaluer les associations à base de mirvetuximab soravtansine associant le bevacizumab, la doxorubicine liposomale pégylée et le pembrolizumab dans le cadre de la résistance du platine.

1.4.4.4 Les vaccins thérapeutiques

La vaccination thérapeutique consiste à induire une réponse immunitaire, lorsque cette dernière fait défaut chez le patient atteint de cancer ou à fort risque de récidive. Elle est différente de la vaccination préventive car la tumeur est déjà présente et développe des mécanismes pour échapper au contrôle du système immunitaire. Le but de cette thérapie est de stimuler le système immunitaire qui repose sur l'identification spécifique de la cellule cancéreuse. La présentation de cet antigène au système immunitaire peut se faire soit par injection d'une copie synthétique de l'antigène/marqueur tumoral, soit par injection de cellules dendritiques issues du patient chargées en antigènes tumoraux pour stimuler les lymphocytes T, ou bien par injection de virus modifiés produisant eux même ces antigènes. De nombreux vaccins thérapeutiques sont en essai clinique pour le traitement des cancers de l'ovaire comme nouvelle stratégie thérapeutique (Martin Lluesma et al., 2016).

1.5 Conclusion du chapitre I : Les cancers de l'ovaire

La recherche des marqueurs tumoraux ainsi que le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques offre un large éventail de thérapies ciblées. Pour le cancer de l'ovaire, plusieurs essais cliniques en cours sont axés principalement sur les thérapies qui stimulent le système immunitaire, testées seules ou associées aux chimiothérapies. Cependant, compte tenu de l'évolution rapide de la maladie, des nombreuses récidives et du développement fréquent de résistances aux thérapies, il est nécessaire de trouver de nouveaux biomarqueurs ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques (Luvero et al., 2014).

L'hormone anti-müllérienne (AMH) et ses récepteurs suscitent un intérêt particulier de par son expression augmentée dans les cancers gynécologiques et restreinte dans les tissus sains. Ces observations ont conduit aux développements de nouveaux traitements comme l'anticorps monoclonal le GM102/Murlentamab (NCT02978755, NCT03799731). Cet anticorps dirigé contre le récepteur AMHRII, en clinique actuellement, sera détaillé dans le chapitre IV (Kersual et al., 2014; Salhi et al., 2004).

2.1 Les fonctions physiologiques de l'Hormone Anti-Müllerienne (AMH)

L'hormone anti-müllérienne a été identifiée pour la première fois en 1953 par le Professeur Alfred Jost sous le nom d'inhibiteur Müllerien (JOST, 1953) puis purifié par Picard et Josso en 1984 par immunochromatographie à partir de testicules de fœtus bovin (Picard and Josso, 1984). Deux ans plus tard, l'équipe de Richard Cate séquence les gènes de l'AMH bovin et humain et révèle une homologie de séquence de 78% notamment dans la partie C-terminal qui est hautement conservée (Cate et al., 1986). Chez l'Homme, l'AMH a été détectée dans les cellules de Sertoli immatures ainsi que dans les cellules de la granulosa de l'ovaire.

2.1.1 Structure

L'AMH appartient à la grande famille des TGF-β (transforming growth factor β). Cette famille inclut de nombreux ligands tel que le TGFβ, l'activine, les BMP. L'analyse des séquences génomiques a montré une homologie de l'AMH avec les facteurs de croissance de la famille TGF-β qui réside principalement dans la partie C-terminale, partie biologiquement active (Picard and Josso, 1984). L'AMH est codée par un gène de 2,8kb de 5 exons et 4 introns localisés sur le chromosome 19p13. Une fois traduit, il donne naissance à une glycoprotéine précurseur, un homodimére de 140kDa, composé de deux monomères de 70kDa liés par deux ponts disulfures. L'AMH est biologiquement active lorsqu'elle subit un clivage protéolytique entre les résidus R^{427} et S^{428} pour former un monomère de 110kDa et un dimère carboxiterminal de 25kDa. Le domaine C-terminal confère l'activité biologique de l'hormone alors que le domaine N-terminal potentialise l'effet de l'AMH et contribue à l'augmentation de l'activité et de la demi-vie de l'hormone dans le sang (**Figure 12**) (MacLaughlin et al., 1992; Picard et al., 1986; Wilson et al., 1993).

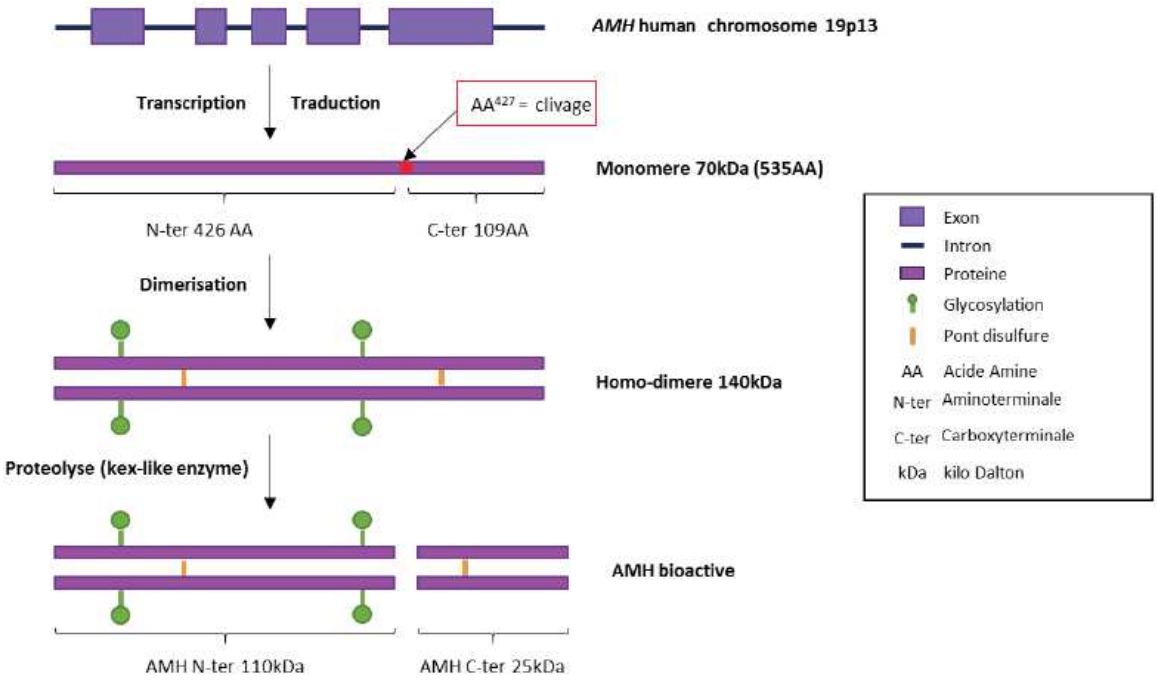


Figure 12 : Schéma de la biosynthèse de l'AMH
Adapté de Kim et al., 2014

2.1.2 Les concentrations sériques d'AMH

Chez l'homme, la concentration sérique de l'AMH s'élève juste après la naissance, elle est de l'ordre de 50 ng/ml (0,7nM) puis diminue à la puberté sous l'influence de la testostérone pour atteindre un niveau basal d'environ 3 ng/ml (0,4 nM). Chez la femme, l'AMH est décelable à partir de la 36ème semaine de grossesse dans les cellules de la granulosa puis atteint un pic de concentration à la puberté aux alentours de 3ng/ml et décroit progressivement jusqu'à la ménopause (**Figure 13**) (Kim et al., 2014; MacLaughlin and Donahoe, 2010; Rajpert-De Meyts et al., 1999). Des études ont montré que les taux d'AMH sont corrélés dans le temps avec la réserve folliculaire (van Rooij et al., 2002).

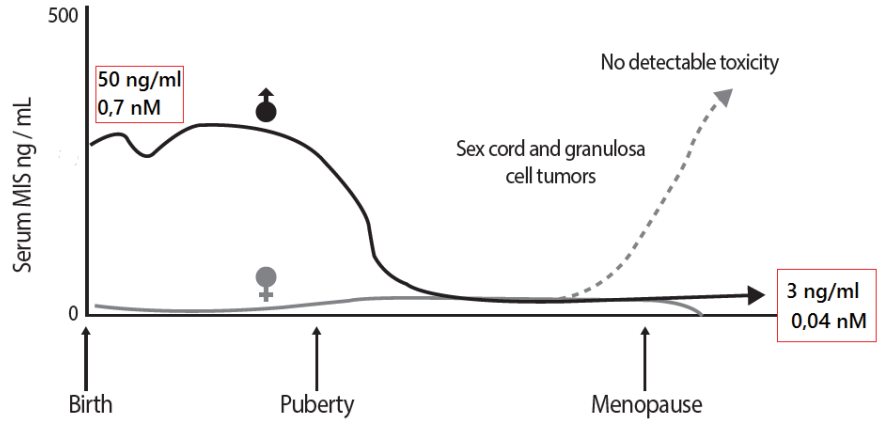


Figure 13 : Variation des concentrations sériques d'AMH chez l'homme et la femme au cours de la vie
Adapté de Kim et al., 2014

2.1.2.1 Implication de l'AMH chez l'homme

Un des rôles majeurs de l'AMH, mis en évidence par Alfred Jost, est son implication dans la régression des canaux de Müller pendant la vie fœtale. Dans ce contexte, l'AMH est considérée comme une hormone masculinisante favorisant la régression des canaux de Müller au profit des canaux de Wolff (**Figure 14**) (Mullen and Behringer, 2014). Le processus de régression des canaux de Müller implique des mécanismes cellulaires tels que la migration, la transition épithélio-mésenchymateuse et l'apoptose (Allard et al., 2000; Austin, 1995; Mullen and Behringer, 2014). L'AMH est sécrétée par les cellules de Sertoli localisées dans les testicules fœtaux et se fixe sur son récepteur AMHRII localisé dans le mésenchyme des canaux de Müller. Des mutations de l'AMH sont associées au syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS) encore appelé syndrome de l'homme à utérus (Josso et al., 2013).

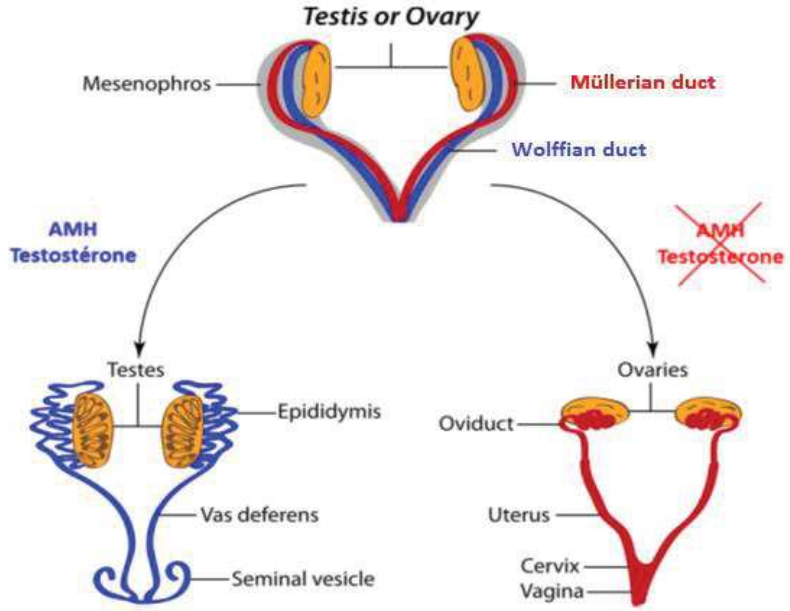


Figure 14 : Différenciation du tractus génital sous l'influence de l'AMH
Schéma tiré de la revue de Mullen et al., 2014

Chez le fœtus mâle, la transcription du gène AMH est régulée par de multiples facteurs de la différentiation sexuelle masculine tels que SOX9, SF-1, Wt-1 et Dax-1. SOX9 et SF1 se lient sur le promoteur de l'AMH (Arango et al., 1999) et agissent en synergie pour l'activer (Schepers et al., 2003). Le facteur GATA4 coopère également avec SOX9 et SF1 pour stimuler fortement l'expression de l'AMH (Tremblay and Viger, 2003). L'enzyme WT1 en s'associant à SF1 va également moduler l'expression de l'AMH afin de l'activer tandis que DAX-1 interfère dans leur liaison (**Figure 15**) (Nachtigal et al., 1998; Tremblay and Viger, 2003).

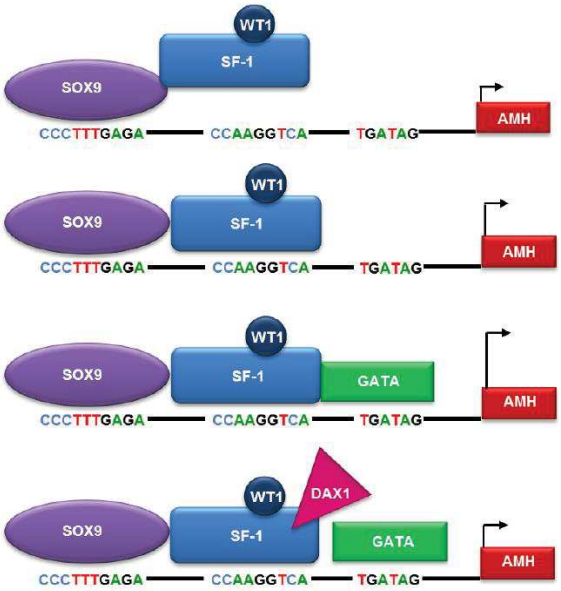


Figure 15 : Régulation de l'expression génique de l'AMH
Adapté d'Arango et al., 1999

Chez les souris, le KO de l'AMH a permis de comprendre l'importance de cette hormone dans la régression des canaux de Müller qui, à elle seule, induit cette dégradation. Ces expériences ont également mis en évidence que l'inhibition de l'hormone chez les mâles entraine une hyperplasie des cellules de Leydig qui conduit à un effet de régulation négative de l'AMH sur ce type de cellules (Behringer et al., 1994). Inversement, la surexpression de l'AMH chez des souris mâles inhibe la croissance des cellules de Leydig ainsi qu'une diminution de la concentration en testostérone dans les cellules de Sertoli (Teixeira et al., 1999).

2.1.2.2 Implication de l'AMH chez la femme

Chez la femme, ce sont les cellules de la granulosa qui produisent l'AMH. Cette hormone est retrouvée dans le liquide des follicules pré-antraux, des petits follicules antraux et dans la circulation sanguine. Une étude menée par l'équipe d'Axel Themmen a montré que le profil d'expression de l'AMH chez des femmes en bonne santé et cyclées régulièrement était identique à celui décrit chez la ratte et la souris (Weenen et al., 2004). L'AMH joue un rôle dans l'activité ovarienne au cours de la folliculogénèse (**Figure 16**). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'AMH a un effet inhibiteur sur le recrutement des follicules primordiaux. Des études sur des rattes et des souris femelles dont le gène de l'AMH a été invalidé montrent que les ovaires contiennent moins de follicules primordiaux. En effet, la réserve de follicules primordiaux chez la ratte KO AMH décroit plus rapidement et réduit également la sensibilité des follicules à l'hormone FSH durant le processus d'acquisition de la dominance folliculaire (**Figure 16**) (Broekmans et al., 2008; Nilsson et al., 2011). De plus, une étude a montré que le taux d'AMH sérique chez les femmes diminue avec l'âge, bien avant d'autres facteurs participant à la folliculogénèse tels que la FSH, l'inhibine B ou le nombre de follicules antraux (te Velde and Pearson, 2002). Du fait de son rôle dans la folliculogénèse, l'AMH est utilisée en clinique comme marqueur de la réserve ovarienne.

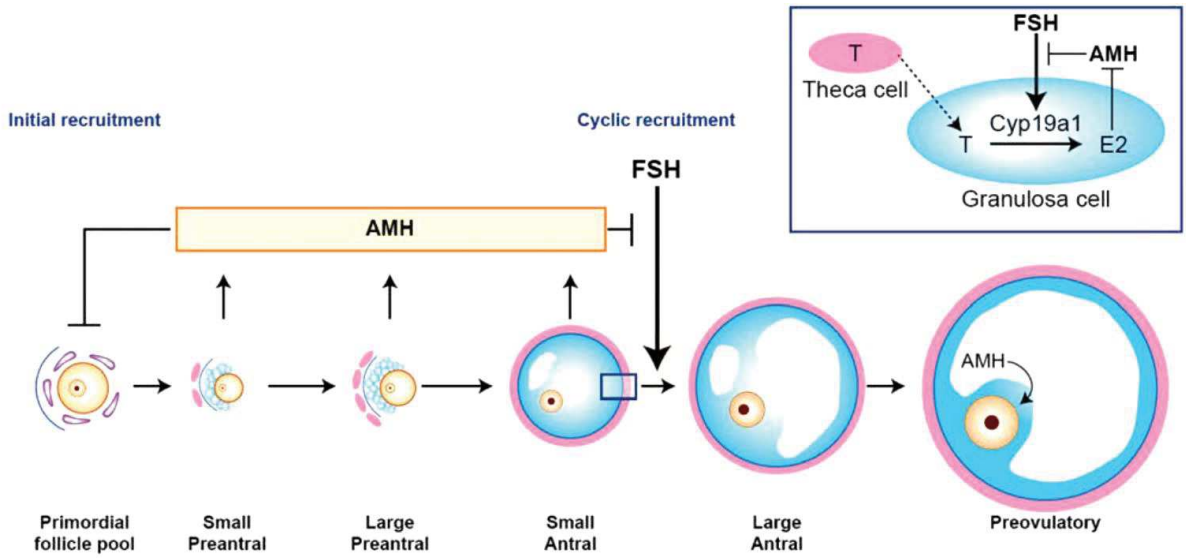


Figure 16 : Rôle de l'AMH dans la folliculogénèse
(Themmen et al., 2005)

2.2 Les récepteurs de l'AMH

Comme tous les membres de la famille TGFβ, l'AMH exerce son activité via des récepteurs sérine/thréonine kinase de type II (AMHRII) qui signe la spécificité du ligand et des récepteurs de type I ubiquitaires appelés ALK (Activin like kinase) qui initient la signalisation intracellulaire. L'hétérodimérisation des deux types de récepteurs forme un complexe tétramérique. Les deux types de récepteurs (**Figure 17**) sont composés de:

- Un domaine extracellulaire en N-terminal, riche en résidus cystéine, permettant la liaison du ligand
- Un domaine transmembranaire unique
- Un domaine intracellulaire en C-terminal comportant le domaine sérine/thréonine kinase et une queue cytoplasmique. Les récepteurs ALK, quant à eux, présentent une région GS, en N-terminal du domaine kinase, qui est le lieu de phosphorylation par le récepteur de type II

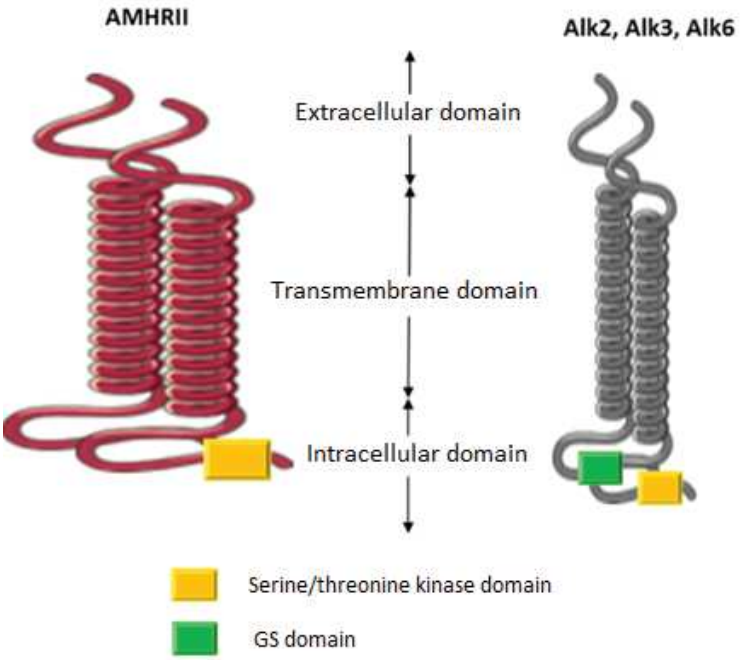


Figure 17: Schéma de la structure des récepteurs AMHRII et ALK

2.2.1 Le récepteur de type II : AMHRII

Le récepteur AMHRII est exprimé dans les cellules mésenchymateuses des canaux de Müller pendant la vie fœtale (Arango et al., 2008). Les souris KO pour AMHRII présentent le même phénotype que les souris KO pour l'AMH à savoir une rétention des canaux de Müller (Mishina et al., 1996). Ces résultats ont permis de montrer que le récepteur AMHR-II est le récepteur unique et spécifique de l'AMH. L'AMHRII est exprimé de manière physiologique par les cellules de la granulosa fœtales et post-natales (Baarends et al., 1994). La présence du récepteur de type II a également été décrite dans les cellules de la thèque interne de l'ovaire de rat (Ingraham et al., 2000), dans le myomètre utérin (Arango et al., 2008) ,dans l'utérus gravide (Teixeira et al., 1996) , dans les cellules de Sertoli (Belville et al., 2005) et également décrit dans les motoneurones, l'hypothalamus et l'hypophyse (Lebeurrier et al., 2008; Wang et al., 2005).

Le gène du récepteur spécifique de type II de l'AMH a été cloné en 1994 (Baarends et al., 1994; di Clemente et al., 1994). Il est localisé sur le chromosome 12q13 et comprends 11 exons. Il a été montré que les exons 2 et 3 codent pour le domaine extracellulaire de la protéine, l'exon 4 pour le domaine transmembranaire et les sept derniers exons pour le domaine intracellulaire portant l'activité sérine thréonine kinase. Le récepteur de type II s'associe avec les récepteurs de type I qui incluent : ALK2 (ACVR1a), ALK3 (BMPR1a) et ALK6 (BMPR1b) (di Clemente et al., 2010a; Teixeira et al., 1996).

2.2.2 Les récepteurs de type I : ALK (Activin like kinase receptor)

Les récepteurs ALK font partie de la grande famille des BMP « bone morphogentic protein » de type I. Ils traduisent le signal des ligands de la famille des TGFβ via les récepteurs de type II qui signe la spécificité du ligand. Sept récepteurs ALK ont été identifiés de ALK1 à ALK7. Ce sont des récepteurs ubiquitaires qui peuvent s'associer avec différents récepteurs de types II pour induire des signalisations bien spécifiques. Ils possèdent un domaine GS qui sert de site d'activation par les récepteurs de type II, et un domaine kinase qui active les molécules de signalisation en aval notamment les protéines SMAD (Wrana et al., 1994). Les récepteurs ALK1,2,3,6 phosphorylent la protéine SMAD1/5/8 tandis que les récepteurs ALK4,5,7 activent SMAD2/3 (Massagué et al., 2005) (**Figure 18**).

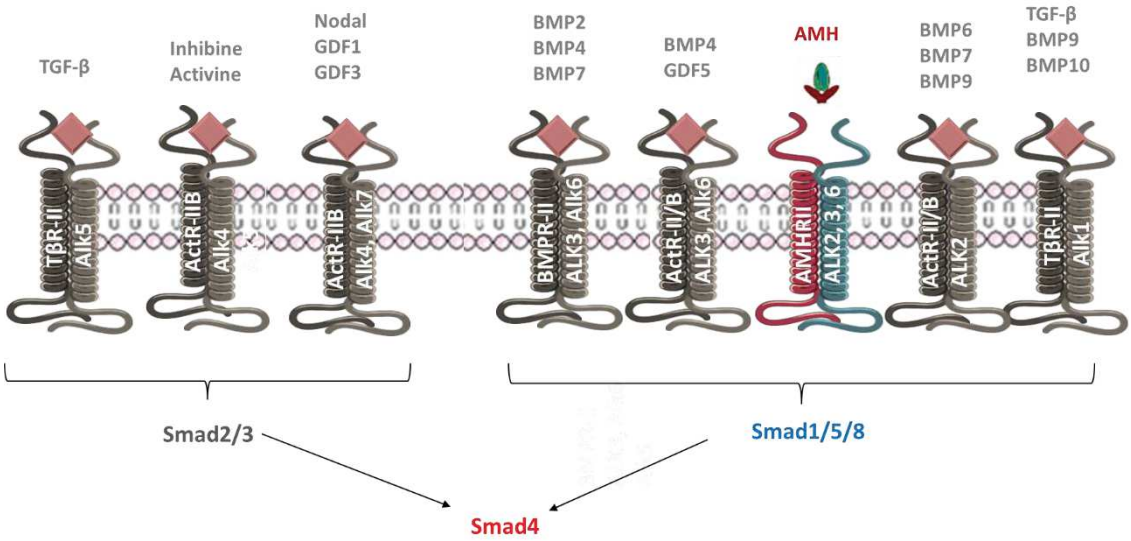
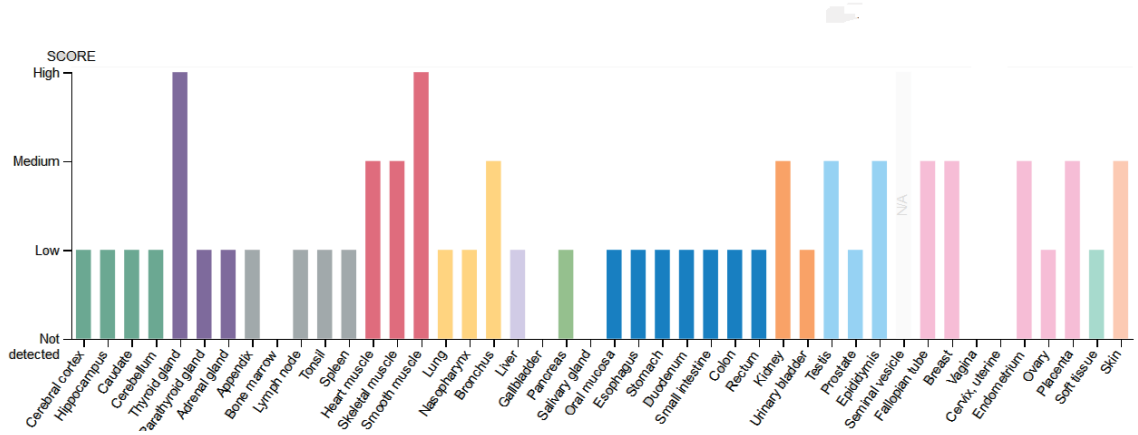


Figure 18 : Les récepteurs de la famille TGF-ß
Adapté de Shi and Massagué et al., 2003

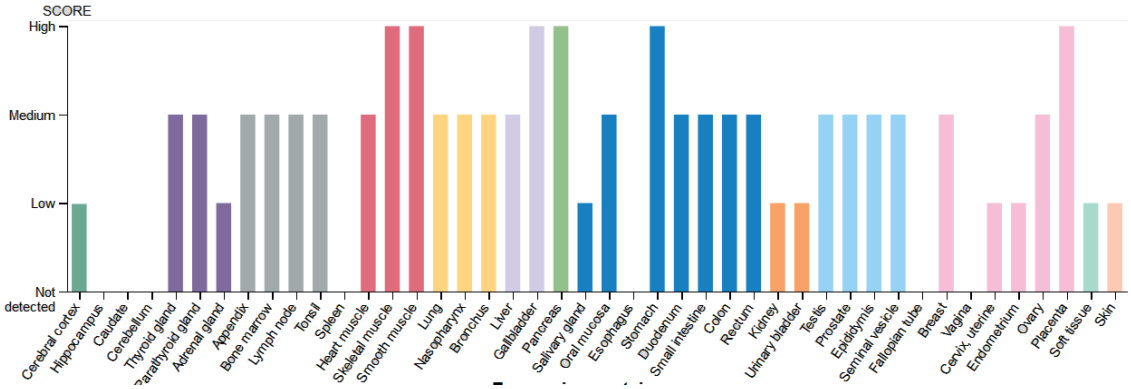
2.2.2.1 Expression dans les tissus

Les gènes ALK2 et ALK3 ont été identifiés par Ten Dijke en 1993. Ils présentent une forte homologie de séquence entre eux. ALK2 est localisé sur le chromosome 2q24 alors qu'ALK3 est présent sur le chromosome 10q23 (ten Dijke et al., 1993). En 1999, Astrom et al, clone le gène ALK6 sur le chromosome 4q22 (Aström et al., 1999). Par contraste avec l'AMHRII qui est exprimé dans les tissus cibles de l'AMH, les récepteurs ALK ont une expression ubiquitaire et donc sont retrouvés dans de nombreux organes. Selon la base de donnée « Human Protéin Atlas », seule l'expression des protéines ALK2 et ALK3 a été évaluée dans les tissus. Pour ALK6 seule l'expression de l'ARNm a été quantifiée et ne permet pas d'estimer précisément son expression protéique dans les différents tissus (**Figure 19**).

A) Expression protéique de ALK2 :



B) Expression protéique de ALK3



C) Expression de l'ARNm de ALK6, expression protéique en attente

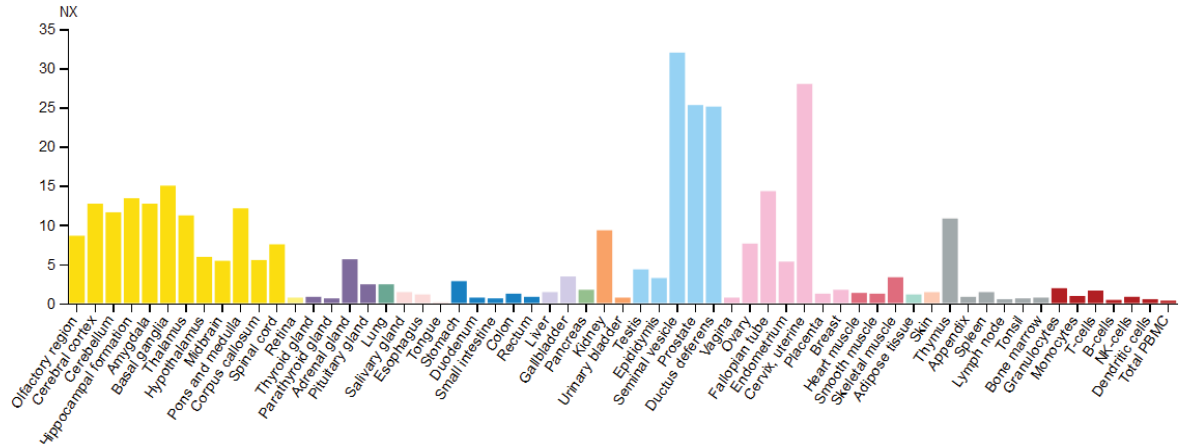


Figure 19 : Expression des récepteurs ALK dans des échantillons de tissu.

A) et B) Expression protéiques des récepteurs ALK2 et ALK3, évaluée par l'intensité de coloration immunohistochimique (score négatif, faible, modéré ou fort. C) Expression de l'ARNm d'ALK6 représenté par TPM (transcrit par millions utilisé comme score d'abondance, le seuil de détection a été fixé >1 TPM. Les valeurs d'expression de la transcription obtenues, appelées expression normalisée (NX), ont été calculées pour chaque gène dans chaque échantillon.

2.2.2.2 Rôle physiologique des récepteurs ALK 2, 3, 6

Les récepteurs ALK induisent l'effet de la superfamille TGF-β et des ligands BMP (bone morphogenic protein) dans une variété de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'adhésion et la migration. Ils jouent donc des rôles importants dans de nombreux processus biologiques. Au cours des études embryologiques, au stade précoce plusieurs équipes ont réalisé des KO contre les récepteurs ALK sur des modèles de souris. Le phénotype des souris KO pour ALK2 et ALK3 est létal puisqu'il empêche la formation du mésoderme, feuillet donnant naissance aux muscles squelettique, os, reins, tractus génital et système sanguin (Komatsu et al., 2007; Mishina et al., 1995; Park et al., 2006). Le KO du récepteur ALK6 ne semble pas induire un phénotype létal cependant il engendre de nombreux défauts au niveau de l'organisation squelettique (Yi et al., 2000), la rétine (Liu et al., 2003) ainsi que les fonctions reproductrice chez la femelle (Yi et al., 2001). De nombreuses publications ont montré qu'une activité aberrante des récepteurs ALK est impliquée dans plusieurs troubles, y compris le développement tumoral. Dans cette partie, je détaillerai leur rôle dans différents tissus et organes afin de déterminer si chacun d'eux participe préférentiellement à un processus biologique précis.

- Dans le développement osseux

Les récepteurs ALK2, 3 et 6 sont connus pour jouer des rôles essentiels dans le développement squelettique à travers la fixation des ligands BMP. Des études cliniques, des modèles animaux et des lignées cellulaires ont démontré de façon constante que les trois récepteurs de type I sont essentiels à la prolifération et à la différenciation des os et du cartilage (**Figure 20**) (Lin et al., 2016).

Une étude de Rigueur et al en 2015 a mis en évidence que le récepteur ALK2 induit une régulation positive sur la prolifération et la migration des cellules au cours de la chondrogenèse (Rigueur et al., 2015). La mutation R206H impliquant un gain de fonction d'ALK2 dans le domaine GS est responsable de 98% des maladies congénitales qui conduit à l'ossification progressive des muscles (Kaplan et al., 2009) (Pignolo et al., 2011; Shore et al., 2006).

Une délétion du récepteur ALK3 dans le développement embryonnaire tardif des ostéoblastes induit une augmentation accrue de la masse osseuse (Kamiya et al., 2008). ALK3 a donc une régulation négative sur la prolifération.

Durant le développement, l'expression d'ALK6 est étroitement contrôlée notamment au cours de la différentiation des ostéoblastes où ALK6 est impliqué dans le devenir cellulaire de l' ostéolinéage (Kaps et al., 2004; Lavery et al., 2008; Lin et al., 2016; Singhatanadgit and Olsen, 2011) .

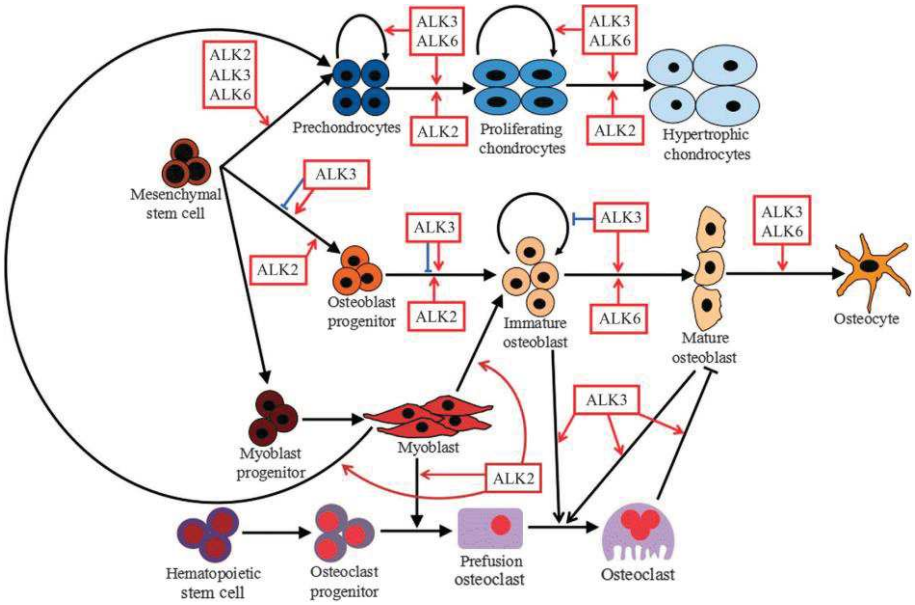


Figure 20 : Implication des récepteurs ALK au cours de l'ostéogénèse et la chondrogenèse
Rôles régulateurs de l'ALK2, de l'ALK3 et de l'ALK6 dans les différents stades de différenciation des cellules et des myoblastes d'ostéolineage, de chondrolineage et de lignée ostéoclastique. (Lin S et al., 2016)

- Dans le développement du système cardiovasculaire

ALK2 et ALK3 sont exprimés dans le cœur au cours du développement embryonnaire contrairement à ALK6 (Dewulf et al., 1995). ALK2 est impliqué dans la formation du myocarde et dans la régulation de la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT) durant la formation de la valve cardiaque à l'inverse de ALK3 qui stimule l'E-cadhérine impliquée dans l'adhérence, processus inverse à l'EMT (Desgrosellier et al., 2005) (Zeisberg et al., 2003). Quant à ALK6 aucune publication ne fait référence à son rôle dans le système cardiaque.

- Dans le développement du système neural

Les protéines de la famille des BMP sont cruciales également dans le développement neural central et périphérique. Durant l'embryogénèse, des expériences fournissent des indications sur la façon dont les BMP et ses récepteurs établissent le tissu neural et contrôlent les types et nombre de neurones formés.

Une étude a montré dans le développement de la crête neurale du Xénope que les récepteurs ALK3 et ALK6 contribuent tous deux au réseau de régulation des gènes qui régulent l'axe dorso-ventral avec une expression temporelle et spatiale différente. Si ALK3 semble être exprimé de manière constante tout au long du développement, l'expression de ALK6 n'est mise en évidence qu'à partir de la semaine E9,5 (**Figure 21**).

Autant chez la souris que chez le xénope, ALK6 a un rôle bien spécifique dans le développement de la crête neurale (Dewulf et al., 1995; Panchision et al., 2001; Schille et al., 2016). Une autre étude réalisée par Brederlau en 2003 a montré le rôle majeur de ALK6 dans la différentiation des cellules gliales progénitrices (Brederlau et al., 2004).

ALK2 semble également impliqué dans la formation de la crête neurale. En effet, la délétion du récepteur par le système Cre/loxP chez les souris engendre de multiples anomalies cranofaciales. Ainsi la signalisation via le récepteur ALK2 régule le développement normal de la crête neurale (Dudas et al., 2004).

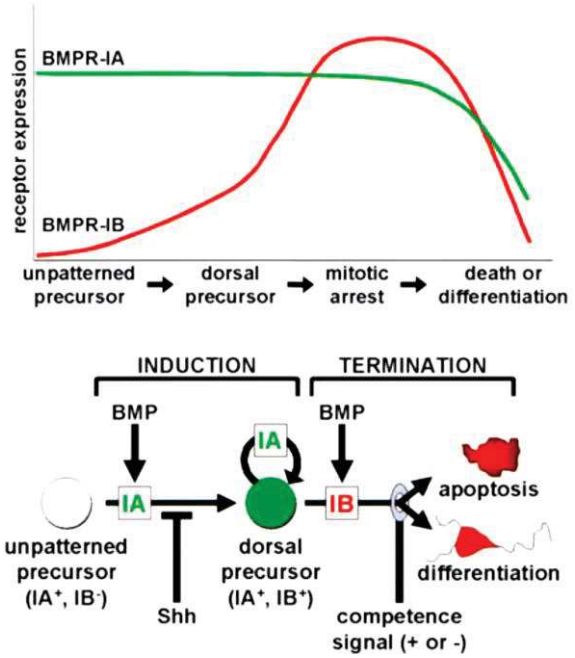


Figure 21 : Expression et rôle des récepteurs ALK3 (BMPR-IA) et ALK6 (BMPR-IB) dans le développement neural du xénope (Panchision et al., 2001)

- Dans le système reproducteur

Les récepteurs ALK2 et ALK3 jouent un rôle majeur dans la régression des canaux de Müller au cours de la différentiation masculine. Cette partie sera détaillée dans la partie interaction AMHRII-ALK. Cependant indépendamment d'AMHRII, ALK6 joue un rôle essentiel dans la fonction reproductive femelle, son expression fluctue tout au long des étapes de la folliculogénèse. L'expression réduite ou perturbée d'ALK6 sur la surface des cellules de la granulosa a été associée à une réduction de la croissance des follicules (Regan et al., 2016).

Dans les cellules de la granulosa, l'inhibition des deux récepteurs ALK3 et ALK6 est impliquée dans le développement cancéreux. En effet, l'expression de l'oncogène Myc, de la cycline D2 et E2 est augmenté chez la souris KO ce qui promeut la prolifération tumorale de la granulosa (Edson et al., 2010).

- Dans le système digestif

Une mutation ou la perte de fonction du récepteur ALK3 est la cause de 45% des cas de développement du syndrome juvénile de polypes (Zhou et al., 2001). De plus, l'inhibition du récepteur ALK3 induit l'expansion des cellules souches intestinales, ce qui met en évidence le rôle de ce récepteur dans le maintien de cellules souches indifférenciées (He et al., 2004)

Au cours de cette analyse bibliographique, nous observons que l'expression des récepteurs ALK est différente selon les tissus et que chacun de leur rôle est spécifique d'une fonction physiologique. De manière générale, les récepteurs ALK ont des rôles cruciaux dans l'embryogénèse et le développement. Ils régulent et maintiennent aussi l'homéostasie des tissus adultes et fonctionnent en étroite collaboration.

De plus, les récepteur ALK2, 3 et 6 ont des rôles spécifiques dans le devenir cellulaire. En effet, au cours du développement osseux, cardiaque ou lors de la régression des canaux de Müller, ALK2 induit une régulation positive sur la prolifération ainsi que la migration tandis qu'ALK3 a un rôle opposé puisqu'il induit l'apoptose et l'inactivation de la migration. En ce qui concerne le récepteur ALK6, plusieurs études mettent en évidence son rôle dans la différentiation des ostéoblastes et des cellules progénitrices gliales.

Nous constatons que dans la plupart des cas, ALK2 est associé et impliqué dans la prolifération et la migration, ALK3 dans l'induction de l'apoptose et ALK6 dans la différentiation cellulaire. Ces récepteurs ALK sont donc impliqués dans des processus essentiels et souvent dérégulés dans le développement cancéreux (**Figure 22**).

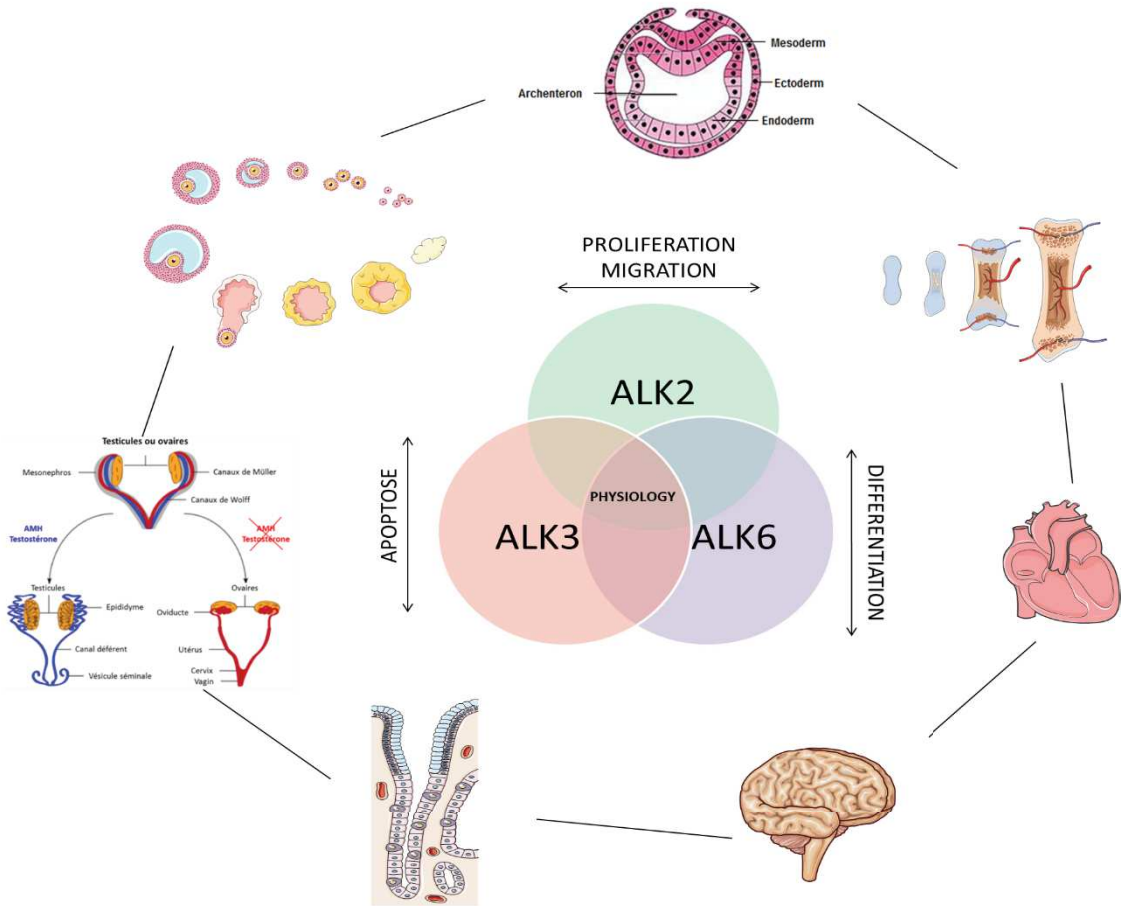


Figure 22 : Implication des récepteurs ALK dans le développement et le maintien des tissus adultes

2.3 Interaction AMHRII – ALK (2,3,6)

Les interactions du récepteur AMHRII avec les récepteurs ALK ainsi que les effets biologiques résultant de ces interactions sont loin d'être tous élucidés. Plusieurs études s'intéressent à l'association de l'AMHRII avec ALK2, ALK3 ou ALK6 montrant des résultats contradictoires. Les tentatives d'identifier un récepteur de type I unique impliqué dans les effets de l'AMH parmi l'ensemble des récepteurs de type I, ont été peu concluantes (Josso and Clemente, 2003).

2.3.1 Interaction AMHRII-ALK2

Au cours de la différentiation masculine, des études ont montré que le récepteur ALK2 s'hétérodimérise avec AMHRII. Une étude de Visser et al en 2001 a étudié l'hétérodimérisation de l'AMHRII avec les récepteurs ALK en présence d'AMH sur des cellules pluripotentes issues de cellules embryonnaires de souris. Sur ce modèle, l'étude révèle que la signalisation AMH passe préférentiellement par l'interaction d'AMHRII avec le récepteur ALK2. En effet, l'induction du gène rapporteur Tlx2, crucial dans le développement, n'est augmentée que lors d'une transfection commune des récepteurs AMHRII et ALK2 et de manière surprenante elle est diminuée ou normale lors de la transfection respective d'ALK3 et ALK6 (Visser et al., 2001). Cette hypothèse a été confirmée, la même année, par Clarke et al qui démontrent que lorsque le domaine kinase du récepteur ALK2 est tronqué l'induction du gène reporteur est inhibée (Clarke et al., 2001). De plus, une inhibition d'ALK2, ex-vivo (cultures cellulaires faites à partir de cellules extraites de la souris), favorise une persistance des canaux de Müller au niveau de la crête urogénitale féminine. Cette persistance n'est pas retrouvée lors de l'utilisation d'oligomère anti-sens d'ALK6 suggérant qu'ALK2 participe aux fonctions de l'AMH dans le processus de différentiation sexuelle (Visser et al., 2001).

2.3.2 Interaction AMHRII-ALK3

En 2002, Jamin et al ont montré sur un modèle de souris que le récepteur ALK3 est essentiel à la régression des canaux de Müller. L'inhibition du récepteur ALK3 induit la persistance des canaux (Jamin et al., 2002, 2003). Quelques années plus tard en 2006, il s'est avéré que les deux récepteurs ALK2 et ALK3 jouent, tous deux, un rôle dans la régression des canaux. Une étude a montré au cours du développement embryonnaire qu'il s'agit d'un modèle spatiotemporel de l'expression de ALK2 et ALK3. ALK2 est augmenté en début de processus (semaine 14) et participe à la migration ainsi que l'EMT de l'épithélium cœlomique alors que ALK3 intervient de manière plus tardive (semaine 15) pour initier la régression des canaux de Müller en induisant de l'apoptose (Zhan et al., 2006) (**Figure 23**) .

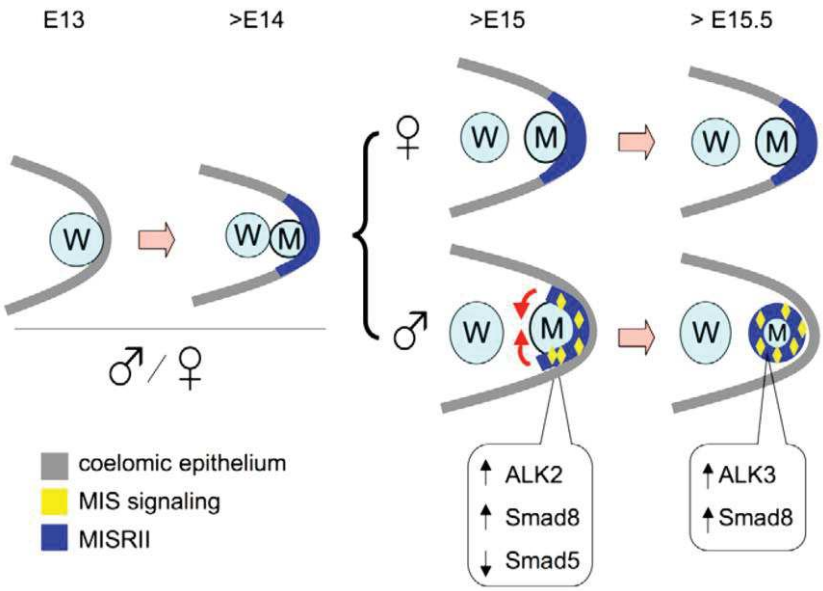


Figure 23 : Modèle schématique d'action de l'AMH dans la régression des canaux de Müller. W : Woman ; M : Man ; MIS : Müllerian inhibiting substance.
(Zhan et al., 2006)

En 2008, Orvis et al nuance l'importance du récepteur ALK2 en démontrant la participation du récepteur ALK3 dans le processus de régression des canaux de Müller. L'utilisation d'un système cre/lox a permis de créer des souris KO conditionnelles (cKO) pour chaque récepteur et a mis en évidence que le récepteur ALK2 pouvait prendre le relais en absence d'ALK3 (Orvis et al., 2008).

L'interaction AMHRII-ALK3 a aussi été mise en évidence dans les cellules de Sertoli et Leydig. Dans La lignée cellulaire immature murine de Sertoli (SMAT-1), il a été montré que l'AMH recombinante induit le recrutement du récepteur ALK3 et phosphoryle SMAD1. En l'absence de ALK3, ALK2 permet de compenser en prenant le relais alors que ALK6 a un effet inhibiteur sur cette voie SMAD1 (Belville et al., 2005).

Sur les cellules de Leydig immatures et indifférenciées, le modèle de souris KO pour le récepteur ALK3 engendre un phénotype similaire au phénotype KO AMH. Ces résultats confirment qu'ALK3 est le récepteur spécifique et préférentiellement recruté par AMHRII durant la différentiation des cellules de Leydig (Wu et al., 2012)

Sédès et al ont transfecté des siRNA dans des cellules immatures de la granulosa dans le but de bloquer individuellement l'expression des récepteurs ALK2, ALK3, ALK6. Les auteurs remarquent que seule l'inhibition d'ALK3 diminue la phosphorylation des protéines Smad1/5/8 sous influence d'AMH (**Figure**

24A). Cette observation a été confirmée *in vivo* dans des souris ALK2 cKO et ALK3 cKO (**Figure 24**B) (Sèdes et al., 2013).

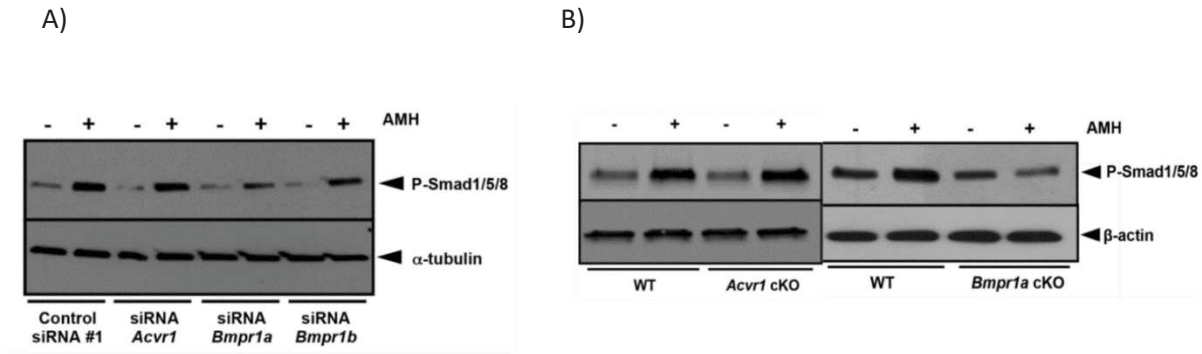


Figure 24 : Implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH
A) Western Blot : phosphosmad1/5/8 dans des cellules de la granulosa immatures transfectées avec différents siRNA dirigés contre Alk2 (Acvr1), Alk3 (Bmpr1a) et Alk6 (Bmpr1b). B) Western Blot : phosphosmad 1/5/8 de cellules de la granulosa immatures de souris Alk2 cKO et Alk3 cKO. *(Sédès et al. 2013.*

2.3.3 Interaction AMHRII-ALK6

En ce qui concerne le récepteur ALK6, une seule étude montre l'interaction AMHRII et ALK6 par co-immunoprecipitation sur les cellules d'ovaire de hamster (CHO) (Gouédard et al., 2000) . Cependant, la délétion du récepteur ALK6 dans le modèle de souris n'interfère pas dans la régression des canaux de Müller (Clarke et al., 2001). ALK6 semble donc être impliqué dans la signalisation de l'AMH mais dans un autre processus biologique que la régression des canaux de Müller.

Ces études suggèrent qu'à l'état physiologique, le ligand AMH s'associe à AMHRII et entraine le recrutement des 3 récepteurs ALK (2, 3, 6) afin d'induire des effets différents sur le devenir cellulaire. Nohmo et al avait déjà reporté ce concept que différentes combinaisons de récepteurs engendrent l'implication de différentes cascades de signalisation avec l'étude de BMP4 (Nohno et al., 1995). Lors de la régression des canaux de Müller, nous avons vu que l'expression du récepteur AMHRII est constante au cours du processus. Par contre, une expression séquentielle des récepteurs de type I (ALK2 et ALK3) est observée. Cette variabilité d'expression semble permettre un rôle différent de l'hormone selon le récepteur présent, avec tout d'abord, l'expression d'ALK2 favorisant la migration des cellules, puis l'expression d'ALK3 stimulant l'apoptose des cellules des canaux de Müller sous l'influence de l'AMH (Zhan et al., 2006) . Cette notion de dualité fonctionnelle des récepteurs ALK dans

le développement du système reproducteur est aussi retrouvée dans le développement neural développé ultérieurement (Panchision et al., 2001; Schille et al., 2016).

2.4 La signalisation de l'AMH

L'AMH se fixe sur son récepteur de type II (AMHRII) au niveau de sa partie C-terminale qui est biologiquement active, un complexe tétramérique se forme entre deux récepteurs de type II (AMHRII) et deux récepteurs de type I (Alk2, Alk3 ou Alk6). La région GS des récepteurs Alk est alors phosphorylée par l'AMHRII grâce à son activité sérine/thréonine kinase. Le récepteur Alk ainsi activé devient plus affin pour les protéines R-Smad (Smad1, 5 et 8) (Massagué and Gomis, 2006). Grâce au co-activateur SMAD4, le complexe formé est transloqué dans le noyau afin d'agir comme facteur de transcription. Cependant, d'autres voies de signalisation sont aussi modulées par l'AMH telles que la voie WNT/β-caténine, NFƙb, Pi3K/AKT et Jun.

2.4.1 La voie SMAD (Small Mother Against Decapentaplegic)

La voie de signalisation SMAD 1/5/8 est la voie principale de l'AMH (Massagué et al., 2005).

<u>R-SMAD : SMAD1/5/ 8</u>

Les protéines R-Smad sont constituées de deux domaines globulaires, MH1 et MH2, reliés entre eux par une région « linker » :

- La région MH1 est une région très conservée entre les différents R-Smad de la famille TGF-β, favorisant la liaison à l'ADN grâce à une structure β-hairpin.
- Le domaine MH2 joue un rôle important dans la transduction du signal car il participe à la reconnaissance des récepteurs de type I, à la liaison à des cofacteurs de transcription et permet la formation du complexe avec la protéine co-activatrice Smad4. La présence d'un groupe d'acides aminés basiques permet un recrutement de la protéine au niveau du récepteur de type I phosphorylé qui a lui-même la capacité de phosphoryler les R-Smad au niveau d'une séquence Ser-X-Ser du domaine MH2. De plus, il présente une zone d'acides aminés hydrophobes permettant la liaison avec les cofacteurs nucléaires et ainsi l'interaction avec l'ADN.
- Le « linker » est une région flexible composée d'une séquence PY reconnue par les protéines ubiquitine ligase, Smurf 1 et 2 favorisant la dégradation de la protéine SMAD1/5/8 (**Figure 25**).

Co-SMAD : SMAD4

La protéine Smad4 possède la même structure globulaire que les R-Smad (Figure 25) (Massagué et al., 2005):

- Le domaine MH1 possède la même fonction que pour les R-Smad favorisant ainsi la liaison à l'ADN.
- Le domaine MH2 diffère des R-Smad car il ne possède pas de site Ser-X-Ser et ne peut donc pas être phosphorylé par le récepteur de type I. Les acides aminés hydrophobes présents participent alors à la fixation de la protéine aux R-Smad pour former un complexe trimérique activé pouvant être transloqué au noyau. Ce domaine comporte également une région appelée SAD pour Smad4 Activation Domaine, qui participe à la liaison aux cofacteurs activateurs ou inhibiteurs nucléaires.
- La région linker possède, quant à elle, la séquence d'export nucléaire (séquence NES pour Nuclear Export Signal). En effet, la protéine Smad4 n'étant pas phosphorylée, son retour dans le cytoplasme nécessite l'intervention de protéines de transport. Après dissociation du complexe trimérique, la séquence NES est reconnue par le facteur d'export nucléaire CRM1 permettant la sortie du noyau (Pierreux et al., 2000) (**Figure 25)**.

Protéine inhibitrice I-SMAD: SMAD 6 et SMAD 7

Il existe deux protéines I-Smad, Smad6 et Smad7, qui par leur divergence au niveau de leur séquence N-terminale présentent chacune une affinité particulière pour la voie de signalisation TGF-β/Activine ou BMP/AMH. En effet, Smad7 a été montré comme réduisant le signal induit par le TGF-β, l'activine mais aussi les BMP. A contrario, Smad6 participe à l'inhibition de la signalisation induite préférentiellement par les BMP et l'AMH (Clarke et al., 2001; Ishisaki et al., 1999; Itóh et al., 1998). En comparaison avec les protéines R-Smad, les I-Smad ne possèdent pas de domaine MH1 permettant la liaison à l'ADN ni de séquence Ser-X-Ser sur MH2, site de la phosphorylation par le récepteur de type I. Cependant, elles possèdent le motif PY sur la région « linker » induisant la fixation de la protéine ubiquitine ligase Smurf et leur dégradation. Ces protéines I-Smad sont capables de se fixer sur les récepteurs de type I phosphorylés empêchant la liaison des R-Smad et peuvent également interférer avec la formation du complexe entre les R-Smad et la protéine co-activatrice Smad4 (Massagué et al., 2005; Park, 2005) (**Figure 25**).

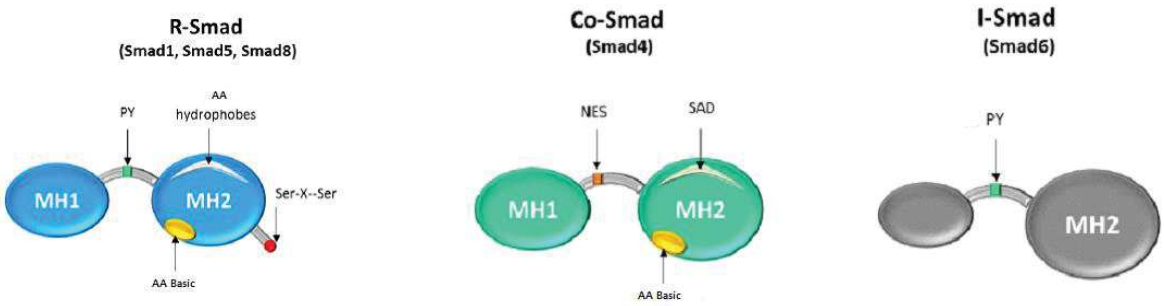


Figure 25 : Structure des R-Smad, Co-Smad, I-Smad
Adapté de Massagué et al., 2005

L'AMH implique de manière directe la phosphorylation des SMAD mais aussi de manière indirecte d'autres protéines telles que les protéines Wnt/β-caténine, NFkb, AKT et c-jun. L'implication de ces protéines varies selon le modèle cellulaire étudié.

2.4.2.1 WNT/β-caténine

La voie de signalisation intracellulaire Wnt/β-caténine contrôle un très grand nombre de décisions cellulaires au cours du développement embryonnaire et durant la vie adulte. La β-caténine (gène CTNNB) est une molécule impliquée dans l'adhésion cellulaire. Sa première fonction dans le cytoplasme est de se lier au cytosquelette d'actine via une molécule d'α-caténine et, au niveau extracellulaire, aux structures jonctionnelles de l'E-cadhérine (CDH1). Elle joue donc un rôle majeur dans les jonctions intercellulaires des tissus épithéliaux et dans le maintien de l'architecture tissulaire. La β-caténine libre cytoplasmique, en équilibre avec la β-caténine liée au niveau des jonctions intercellulaires, est maintenue inactive, en absence de signal WNT. La β-caténine interagit avec les facteurs de transcription TCF/LEF impliqués dans la prolifération, polarité, l'adhésion et la mobilité.

<u>L'AMH et activation de la voie WNT/β-caténine</u>

Dans la fonction reproductrice, plusieurs études ont décrit l'implication de la voie WNT/β-caténine. En effet, la β-caténine s'accumule dans le mésenchyme des canaux de Müller et elle est nécessaire à la régression de ces canaux (Allard et al., 2000; Kobayashi et al., 2011).

En 2000, Allard et al observe sur du tissu mésenchymateux péri-müllérien que le traitement par l'AMH induit une accumulation de β-caténine qui altère la transcription du gène LEF1 ainsi que le processus de migration (Allard et al., 2000). De plus, Kobayashi, Stewart et al., en 2011 montre que l'AMH produite par les cellules de Sertoli active, via ALK3, les SMAD1/5/8 qui a leur tour induisent l'expression

de WNT4. WNT4 permet d'activer la β-caténine qui induit la régression des canaux de Müller (Kobayashi et al., 2011).

En oncologie, l'AMH aurait également un rôle dans la suppression des tumeurs testiculaires chez des souris surexprimant la β-caténine. Ces études montrent que l'AMH inhibe l'activité oncogène de β-caténine pour induire la tumorigénèse (Tanwar et al., 2012).

Une étude de 2017 de Park et al, montre également l'implication de l'AMH dans la voie β-catenine au travers de la protéine ICAT qui a pour rôle d'inhiber la β-catenine. L'étude détermine que l'AMH régule de manière positive ICAT dans la lignée ovarienne OVCAR8 et de ce fait diminue la viabilité cellulaire, et induit l'arrêt du cycle et induit de l'apoptose. Les effets de l'AMH sont inhibés lorsque la protéine ICAT est inhibée par siRNA (Park et al., 2017).

2.4.2.2 La voie NF-ƙB

NF-ƙB fait partie de la famille des facteurs de transcription. Elle est impliquée dans la réponse immunitaire, au stress et transcrit des gènes anti-apoptotiques. NF-ƙB est une protéine cytoplasmique composée de deux sous unités p50 et p65 maintenues inactives par la liaison IƙB. Une fois relâchée par la protéine IƙB suite à des signaux externes, la protéine NF-ƙB vas réguler ses gènes cibles. De manière paradoxale, il est observé que ce facteur peut être à la fois régulateur de la croissance cellulaire et inducteur d'apoptose dans plusieurs systèmes cellulaires dépendant du stimulus (Baichwal and Baeuerle, 1997; Barkett and Gilmore, 1999).

<u>L'AMH et activation de la voie NF-ƙB</u>

L'induction de la voie NF-ƙB par l'AMH est décrite dans des modèles de cancer mammaires et de la prostate. Segev et al en 2001 montre que le traitement des cellules cancéreuses du sein (T47D) par l 'AMH active NF-ƙB qui régule de manière sélective le gène précoce LEX-1S qui, surexprimé, inhibe la croissance des cellules. Cette étude montre également qu'une administration d'AMH chez la souris induit l'activation de la voie NF-ƙB et l'expression du gène LEX-1S dans la glande mammaire (Segev et al., 2001).

La même équipe s'est intéressée également au rôle de l'AMH sur la voie NF-ƙB dans la prostate. L'administration d'AMH chez la souris mâle induit l'augmentation de l'expression du gène Iex1 dans la prostate. Ceci suggère que l'AMH pourrait être un régulateur hormonal endogène de la voie NF-ƙB dans la prostate *in vivo* et *in vitro* (Segev et al., 2002).

En 2007, une étude met en évidence la collaboration entre les voies NF-ƙB et SMAD1 pour activer un gène anti-prolifératif dans les cellules cancéreuses du sein, le gène GRO-β (Gupta et al., 2007) .

2.4.2.3 PI3K/AKT

La protéine serine/thréonine kinase AKT est devenue un centre d'attention majeur en raison de son rôle critique dans la régulation de diverses fonctions cellulaires tel que la croissance, la prolifération et la survie cellulaire (Brotelle and Bay, 2016). AKT est activée par phosphorylation de la sérine^{473} induite par la protéine PI3K, à l'inverse la protéine PTEN déphosphoryle AKT pour l'inactiver. Dans le cancer, PI3K et PTEN sont fréquemment mutées et induisent une sur-activation de la voie PI3K/AKT (Carnero et al., 2008). AKT contribue à la prolifération cellulaire par phosphorylation des inhibiteurs du cycle cellulaire (CDK p21 et p27) ainsi que des protéines pro-apoptotiques. AKT régule également l'activité transcriptionnelle du facteur nucléaire NF-ƙB. En effet, la cascade de signalisation NF-ƙB interagit avec plusieurs voies parallèles, y compris les cascades de signalisation initiées par PI3K et AKT (Bai et al., 2009)

L'AMH et activation de la voie PI3K/AKT

Une étude de 2009 chez le rat montre que l'élongation du canal de Müller est essentiellement due à deux processus : d'une part la prolifération des cellules de l'extrémité postérieure sous la dépendance de la voie PI3K/AKT et d'autre part la migration des cellules méso-épithéliales Müllériennes le long du canal de Wolff (Fujino et al., 2009).

2.4.2.4 C-Jun

Parmi les membres importants de la famille des MAP kinases figurent les kinases c-Jun N-terminal (JNK) qui participent à des réponses au stress et contrôlent la stimulation de certaines cytokines. Elles participent donc à la régulation des processus inflammatoires. La voie JNK semble être aussi régulée par l'AMH. En effet, une étude montre que l'inhibition de c-jun diminue la production d'AMH (Bildik et al., 2018). De plus, une analyse transcriptomique met également en évidence la régulation du gène c-jun par l'AMH dans l'endomètre et l'ovaire (Chung et al., 2015; Nam et al., 2009).

2.4.3 Régulation des gènes cibles de l'AMH

Pour comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels l'AMH inhibe la croissance cellulaire, Nam et al ont utilisé la technologie des puces à ADN dans la lignée épithéliale ovarienne (OVCAR8). Dans cette étude, 498 gènes ont été cartographiés selon des processus biologiquement connus comme le métabolisme, la croissance cellulaire et l'apoptose (**Tableau 2**) (Nam et al., 2009). En 2015, Chung et al ont réalisé une analyse transcriptomique sur les cellules de l'endomètre (AN3CA) traitées avec l'AMH pendant 96h à intervalle de 24h. L'AMH induit la transcription de 2688 gènes régulés de manière significative et qui sont associés à des processus biologiques connus. Les gènes codant pour les protéines Wnt/βcaténine, du cytosquelette, du cycle cellulaire, les MAPK et les protéines d'apoptose sont mise en évidence comme étant les plus modulées par l'AMH (**Figure 26**A). De plus, une analyse par Western blot a validé l'expression protéique des gènes modulés par l'AMH (**Figure 26**B). Ces analyses de transcriptomique sur cellules de cancer de l'endomètre confirment les observations précédentes selon lesquelles l'AMH fonctionne comme suppresseur de tumeur en régulant les voies de signalisation susceptibles de contribuer au développement du cancer (Chung et al., 2015).

Tableau 2 : Résumé des processus biologiques modulés par l'AMH
Traitement à l'AMH des cellules de cancer épithélial de l'ovaire (OVCAR8) (Nam et al., 2009)

Biological process	No. of genes
Signal transduction	108
Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	90
Protein metabolism and modification	78
Mesoderm and ectoderm development	42
Cell proliferation and differentiation	38
Cell cycle	23
Cell adhesion	23
Oncogenesis	19
Apoptosis	18

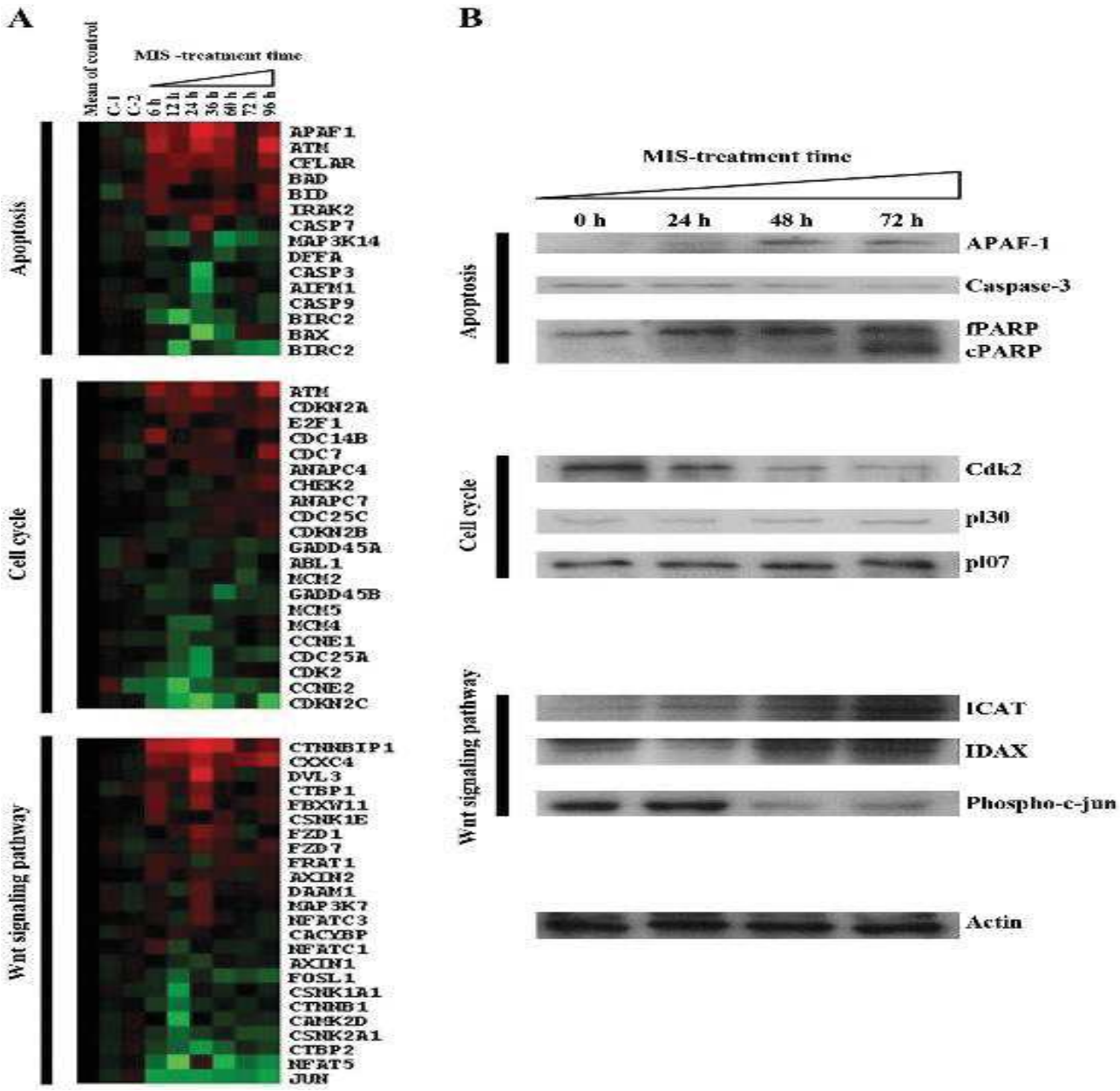


Figure 26 : Gènes modulés par l'AMH sur la lignée de l'endomètre AN3CA

A) Les valeurs de rouge sont supérieures et les valeurs de vert sont inférieures à la valeur moyenne des cellules non traitées. B) Analyse par Western de l'expression des protéines liées à la voie de signalisation de l'apoptose, du cycle cellulaire et de la signalisation Wnt dans des cellules AN3CA traitées avec 10 µg /ml (142 nM) d'AMH pendant 0, 24, 48 et 72 h. (Chung et al., 2015).

2.5 Conclusion de chapitre II : L'hormone anti-müllerienne et ses récepteurs

En physiologie ou dans le développement cancéreux, les études ont montré que l'AMH module plusieurs effecteurs directs comme les protéines SMAD1/5/8 ou indirects comme les protéines β-caténine, NF-kB, PI3K/AKT et c-jun. Ces voies de signalisation, qu'elle soient canonique (SMAD) ou non canonique (WNT/β-catenin, NF-kB, PI3K/AKT, C-Jun) (Horbelt et al., 2012), sont augmentées ou diminuées par l'AMH pour induire l'apoptose décrite comme la fonction principale de l'AMH. L'effet apoptotique de l'AMH est la plupart du temps mis en évidence par l'étude de l'activité de la protéine caspase 3, qui est le point culminant de nombreuses voies de signalisation pour induire la mort des cellules suites à des signaux cellulaires intrinsèques ou extrinsèques. L'étude de ces diverses voies de signalisation met en évidence la complexité du réseau de l'AMH ainsi que la complexité de ses différentes fonctions qui ne sont pas complétement élucidées (**Figure 27**).

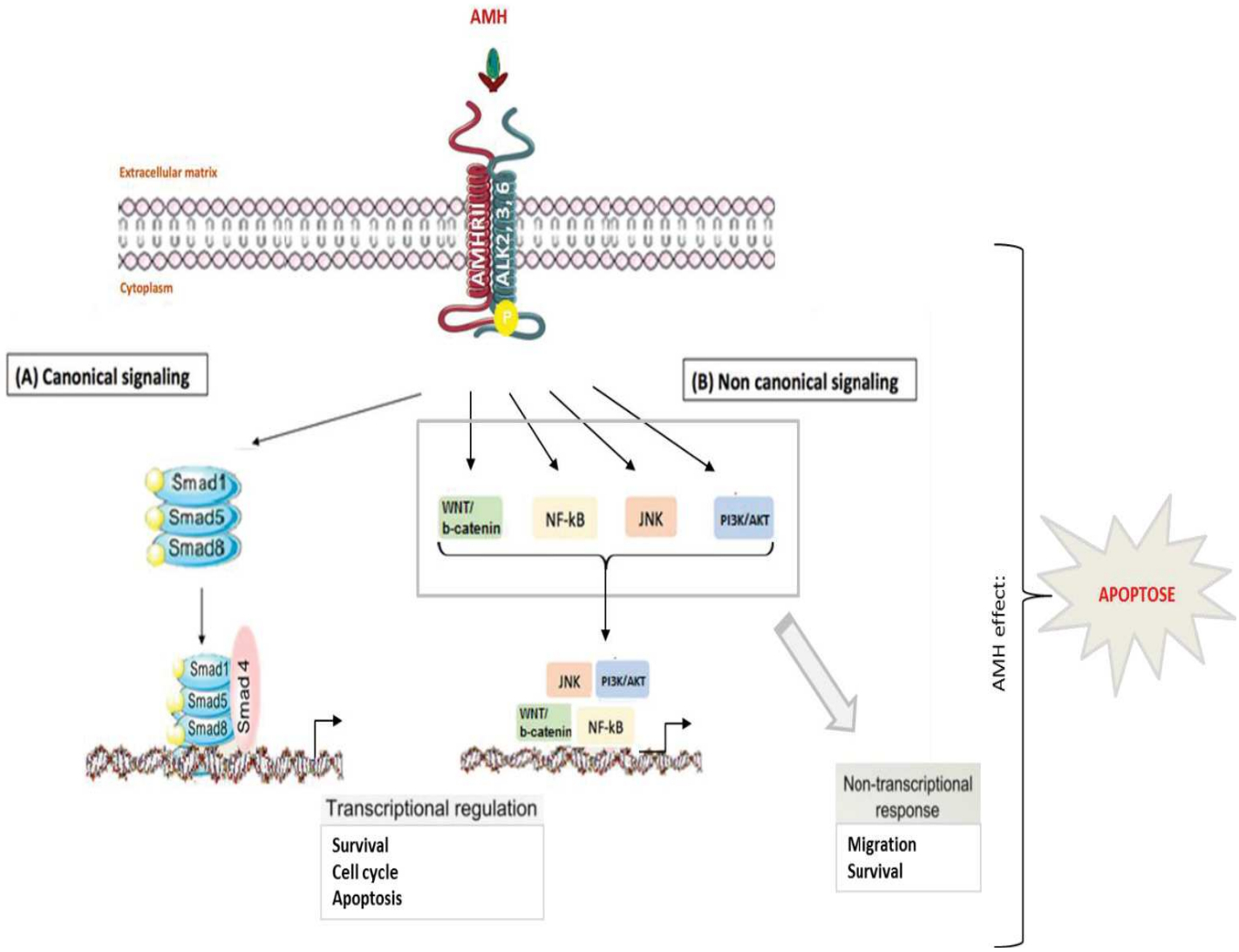


Figure 27 : Voies canonique et non canonique de l'AMH

Dans le précèdent chapitre, nous avons montré que les récepteurs ALK2, ALK3 et ALK6 sont essentiels dans l'équilibre physiologique. Ils sont impliqués dans les processus biologiques tel que la prolifération, la migration et l'apoptose souvent dérégulés dans le cancer. A travers ces récepteurs, l'AMH induit la régression des canaux de Müller par apoptose au cours du développement. Cet effet physiologique a suscité l'intérêt des chercheurs en cancérologie, qui sont toujours à la recherche d'agents capables d'induire l'apoptose des cellules tumorales. D'autre part, l'AMH suscite également l'intérêt en oncologie car elle est un marqueur spécifique du cancer de la granulosa et que son récepteur est sur-exprimé dans différents types de cancer (ovaire, endomètre, col de l'utérus, sein, prostate).

3.1 AMH marqueur du cancer de la granulosa

L'AMH est produite par les cellules de la granulosa des follicules ovariens. De ce fait, la croissance tumorale des cellules de la granulosa est corrélée à l'augmentation de la concentration d'AMH sérique. Le taux d'AMH sérique est donc détecté chez les patientes de manière élevé et à l'inverse le taux d'AMH chute après résection tumorale. La récidive tumorale est également corrélée avec l'augmentation sérique de l'hormone. En 2009, Chang et al effectuent des dosages de l'hormone circulante dans le sérum sur 32 patientes atteintes du cancer de la granulosa. Cette étude, montre une étroite corrélation entre la masse tumorale du cancer de la granulosa et l'augmentation du taux sérique d'AMH. Dans ce type de cancer, l'AMH est validée comme marqueur de progression et de récidive après traitement (Chang et al., 2009; Rey et al., 1996).

Cependant, dans les cancers ovariens d'origine épithéliale, aucune corrélation n'est observée entre la concentration sérique de l'hormone et la croissance tumorale. Deux études de Walentowics et al, en 2013, et Schock et al, en 2014 ont dosé l'AMH sur de larges cohortes de patientes atteintes de cancers épithéliaux (respectivement 72 et 107 patientes). Aucune corrélation significative n'est mis en évidence entre la taille tumorale et la concentration de l'hormone (Schock et al., 2014; Walentowicz et al., 2013).

3.2 Expression des récepteurs de l'AMH dans les cancers ovariens

3.2.1 Expression du récepteur de type II : AMHRII

Dans les tissus sains, l'expression du récepteur de type II, AMHRII, affiche un profil d'expression restreint qui est limité aux cellules de la granulosa, de Sertoli et Leydig. En revanche, plusieurs études ont mis en évidence la sur-expression de l'AMHRII dans les cancers gynécologiques. En 2008, Bakkun-Gamez établit par technique d'immunohistochimie que l'expression membranaire de l'AMHRII est significativement plus importante dans les cancers ovariens épithéliaux (69%) que dans les tissus sains (0%) sur une cohorte de 207 patientes. La surexpression du récepteur AMHRII est aussi mise en évidence dans le cancer de l'endomètre dont 75% des tumeurs de l'endomètre présente le récepteur AMHRII contre 28% dans les tissus sains (**Tableau 3**). Bien que le but principal de cette étude soit de définir l'expression du récepteur, une analyse de la corrélation entre la présence d'AMHRII et les données cliniques ont été réalisées montrant que l'expression d'AMHRII n'a pas d'impact sur i) le grade des cancers ovariens épithéliaux, ii) les traitements anti-tumoraux (résection optimale de la tumeur, association à la chimiothérapie ou non) iii) la survenue de récurrence (37 mois pour le groupe AMHRII positif et 35 mois pour le groupe AMHRII négatif) (Bakkum-Gamez et al., 2008).

En 2004 puis en 2014, notre équipe, met également en évidence l'expression du récepteur AMHRII sur 20 biopsies principalement représentées de cancers épithéliaux de l'ovaire et de la granulosa (**Figure 28**) (Kersual et al., 2014; Salhi et al., 2004).

En 2015, Pépin et al constate également que 88 % des tumeurs séreuses expriment le récepteur AMHRII par immunohistochimie (Pépin et al., 2015).

En ce qui concerne les cancers de la granulosa, le récepteur AMHRII est représenté à 100% tant au niveau de l'ARNm que protéique (Anttonen et al., 2011).

Le récepteur AMHRII est aussi détecté au niveau du col utérin, du sein et de la prostate (Segev et al., 2002) et plus récemment dans le poumon (Beck et al., 2016) et le cancer colorectal (Pellatt et al., 2018).

Tableau 3 : Expression du récepteur AMHRII dans les tissus gynécologiques normaux et cancéreux
(Bakkun-Gamez et al., 2008)

Tissue	MISIIR expression	*p* value
Ovarian cancer (all EOCs)	125/182 (69%)	0.008 [a, b]
Serous	22/29 (76%)	0.002 [a, b]
Clear cell	10/25 (40%)	0.14 [a, b]
Endometrioid	17/31 (55%)	0.011 [a, b]
Mucinous	3/3 (100%)	0.018 [a, b]
Benign ovarian epithelium	0/5 (0%)	–
Dysgerminoma	17/22 (77%)	<0.001 [c, d]
Benign ovarian stroma	3/24 (12.5%)	–
Endometrial cancer (all histologies)	82/109 (75%)	<0.001 [c, e]
Benign endometrium	39/139 (28%)	–
Proliferative	11/68 (17%)	<0.001 [c, f]
Secretory	16/47 (34%)	<0.001 [c, f]
Atrophic	12/24 (50%)	0.018 [c, f]
Uterine malignant mixed Müllerian tumor	30/51 (59%)	<0.001 [c, g]
Leiomyosarcoma	15/29 (52%)	0.004 [a, g]
Endometrial stromal sarcoma	4/18 (22%)	0.27 [a, g]
Benign myometrium	0/11 (0%)	–

Histologic subtype was available for 88 of the 182 EOCs.
[a] Fisher's exact test.
[b] Chi square.
[c] Compared to benign ovarian epithelium.
[d] Compared to benign ovarian stroma.
[e] Compared to overall benign endometrium.
[f] Compared to endometrial cancer.
[g] Compared to benign myometrium.

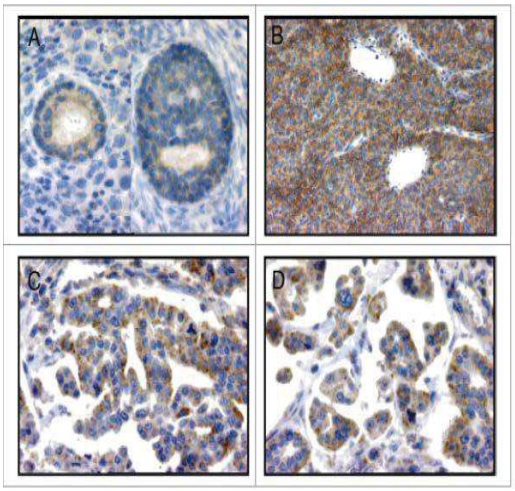


Figure 28 : Immunohistochimie (12G4) de l'expression d'AMHRII dans les tissus ovariens normaux et cancéreux
(A) Follicules ovariens normal. (B) Tumeur de la granulosa (C et D) Adénocarcinome séreux (Kersual et al., 2014)

Une des caractéristiques majeures des cancers de l'ovaire est la formation de liquide d'ascites dans le péritoine, présent dans 80% des cas. La formation d'ascite est la cause de nombreuses récidives et représente un enjeu clinique (Kipps et al., 2013). De ce fait, des études ont été réalisées sur des modèles de cellules cancéreuses issus d'ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire. La présence du récepteur AMHRII a été établie dans 8 ascites sur 9 (Masiakos et al., 1999). Plus récemment, une étude de cultures primaires de liquide d'ascite (16 cultures d'ascite), sous format adhérent ou en sphéroïdes, démontre que celles-ci expriment AMHRII quel que soit le type histologique (14 carcinomes séreux, un endométrioïde et un mucineux) (Pépin et al., 2015).

L'expression d'AMHRII semble également présente dans les cellules souches ou progénitrices de cancer. Ces cellules sont connues pour être impliquées dans la chimiorésistance et la récidive des cancers (Bapat et al., 2005). Même si l'expression d'AMHRII n'a pas été clairement mise en évidence, les auteurs ont montré l'effet inhibiteur de l'AMH sur ce type cellulaire suggérant la présence de son récepteur (Fuller et al., 1985a; Masiakos et al., 1999; Wei et al., 2010).

3.2.2 Expression des récepteurs de type I : ALK2, ALK3, ALK6

En ce qui concerne les récepteurs ALK, une seule étude récente de Basal et al a analysé la co-expression d'AMHRII, ALK2, ALK3 et ALK6 par IHC dans 262 échantillons de carcinome ovarien épithélial. L'AMHRII a été exprimée dans 73,4 % des échantillons, tel que rapporté précédemment. Dans la série de 235 échantillons dans lesquels les quatre récepteurs ont pu être évalués, 36 % ont exprimé AMHRII/ALK2/ALK3/ALK6, 34 % AMHRII/ALK2/ALK3, 18 % ALK2/ALK3 et 7 % ALK2/ALK3. Ces profils d'expression n'ont pas été corrélés avec le stade de la maladie, la survie globale ou la survie sans maladie (Basal et al., 2016) (**Figure 29**).

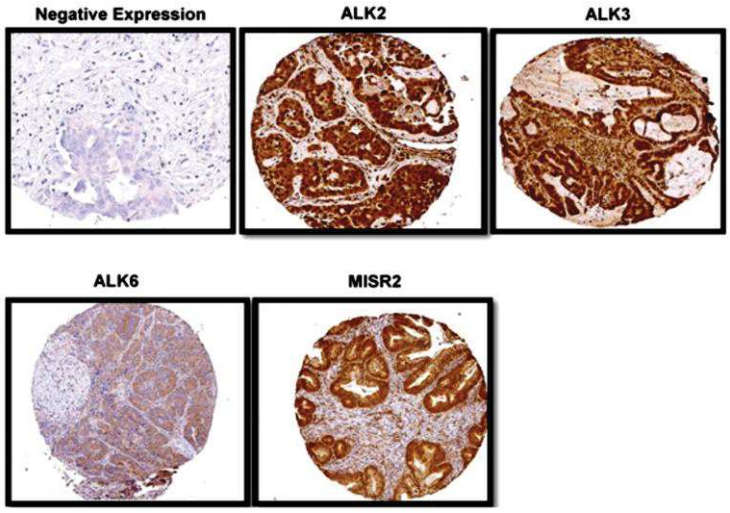


Figure 29 : Expression des récepteurs de l'AMH de type I et II par immuhistochimie
(Basal et al., 2016)

3.3 Effet anti-cancéreux de l'AMH dans différents modèles de lignées cellulaires.

L'expression du récepteur spécifique AMHRII dans les différents cancers gynécologiques, et la capacité physiologique de l'AMH à induire l'apoptose lors de la différentiation sexuelle ont encouragé de nombreuses équipes à considérer l'hormone comme une approche thérapeutique potentielle.

3.3.1 L'AMH inhibe la survie cellulaire et la prolifération

De nombreuses études montrent la capacité de l'AMH à inhiber la prolifération cellulaire de différentes lignées ovariennes avec une action qui semble dose dépendante. De plus, la sensibilité des lignées cellulaires à l'AMH est variable. L'effet de l'AMH est donc lignée dépendante (Masiakos et al., 1999) (Anttonen et al., 2011) (**Figure 30**).

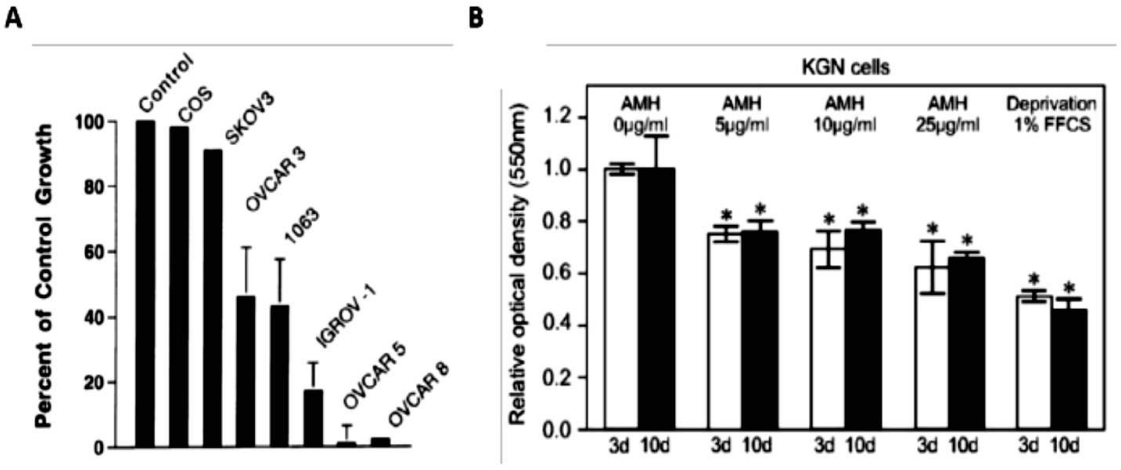


Figure 30 : Inhibition de la croissance cellulaire médiée par l'AMH
(A) Test de survie clonogénique de lignées de cancers épithéliaux ovariens (COS, SKOV3, OVCAR3,5 et 8, 1063, IGROV-1) en présence de 15µg/mL (214nM) d'AMH. Les données sont représentées selon le pourcentage moyen de colonies formées par rapport au contrôle (Masiakos PT et al., 1999). (B) Test de viabilité cellulaire (MTS) de la lignée de tumeur de la granulosa KGN. Les données sont représentées selon le nombre relatif moyen de cellules en comparaison avec le contrôle (Anttonen M et al., 2011)

L'effet anti-prolifératif de l'AMH est également étudié dans le cancer de l'endomètre. Renaud et al met en évidence une inhibition de la viabilité cellulaire par l'AMH de l'ordre de 67% pour la lignée AN3CA et 52% pour la lignée KLE après 8 jours de traitement d'AMH à 71nM. Cette observation a été confirmée par transfection de la lignée AN3CA avec le gène de l'AMH sous forme active ou inactive. La sécrétion de l'hormone active réduit alors de 50% la formation de colonies, au bout de 3 semaines, en comparaison avec la croissance des cellules transfectées avec le gène d'AMH inactif ou le vecteur contrôle (Renaud et al., 2005).

Dans les cancers du sein et de la prostate, l'AMH présente également un effet inhibiteur sur la croissance des cellules cancéreuses en activant la voie NF-κB ainsi que transcription de l'ARNm LEX-1S, indiquant une régulation négative de la croissance cellulaire (Segev et al., 2001, 2002).

De plus, à partir de lignées épithéliales d'ovaire, SKOV3, OVCAR5 et IGROV-1, Wei et al isolent par cytométrie en flux des cellules souches progénitrices de cancer grâce aux marqueurs CD44, CD24 et Epcam positifs présents sur leur membrane, permettant de différencier cette population cellulaire. Le traitement de ces cellules souches progénétrices de cancer avec l'hormone est comparé aux chimiothérapies de référence. Cette étude montre que la prolifération des cellules souches précancéreuses est largement diminuée à doses croissantes d'AMH, contrairement aux chimiothérapies (Wei et al., 2010).
En 2012 Meirelle et al complète ces résultats et montre l'effet inhibiteur de l'AMH sur les cellules souches (CD44+, CD24+, Epcam+) par des essais de survie clonogénique (Meirelles et al., 2012).

3.3.2 Inhibition de la croissance tumorale

Dans l'étude de Stephen et al, des souris sont transplantées au niveau de l'ovaire avec un polymère délivrant des doses supra-physiologiques d'AMH (7-10µg/ml, soit 100-143nM pour un poids moléculaire d'AMH de 70kDa). Une semaine après cette première opération, des cellules tumorales humaines IGROV-1 sont implantées sous la capsule rénale. Les auteurs ont comparé la croissance tumorale 15 jours plus tard. La croissance des tumeurs est significativement diminuée chez les souris préalablement transplantées avec le polymère d'AMH (Stephen et al., 2001).

En 2006, une étude *vivo* montre aussi que l'AMH (20µg /animal/jour) inhibe la croissance tumorale des souris greffées avec la lignée MOVCAR7. Cette lignée murine est issue de souris transgéniques qui développent des cancers de l'ovaire et imitent étroitement les adénocarcinomes de l'ovaire humain (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006).

Pépin et al en 2015 ont greffé, sur des souris, des PDX (patient derived xenograft) issus de patientes atteintes de cancers épithéliaux de l'ovaire. Les souris sont par la suite traitées par thérapie génique avec un Adénovirus AVV9 (adeno-associated virus serotype 9) qui délivre de l'AMH au sein de la tumeur. L'AMH produite contrôle le volume tumoral de 3 tumeurs PDX sur 5 sans signe de toxicité mettant en évidence l'intérêt thérapeutique de l'utilisation de l'AMH (Pépin et al., 2015).

3.3.3 Arrêt du cycle cellulaire et Induction de la voie apoptotique

Dans le cancer de l'ovaire épithélial, de l'endomètre, du col de l'utérus, de la prostate et du sein, l'exposition à l'AMH recombinante inhibe la croissance tumorale des cellules cancéreuses. Ce processus se manifeste par un blocage de la progression du cycle cellulaire entrainant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Dans les cellules épithéliales de l'ovaire, l'AMH engendre des niveaux élevés de p16, protéine suppressive de tumeur qui bloque le complexe CDK4/CDK6 cycline D. Le gène codant pour p16 n'est pas modulé par l'AMH, il s'agit potentiellement d'une inhibition de la dégradation de cette protéine avec allongement de son temps de demi-vie (Ha et al., 2000; Nam et al., 2009). Cela suggère un rôle important de p16 dans la régulation de la croissance des cellules épithéliales, d'où proviennent 90% des cancers ovariens (Ha et al., 2000). L'expression de la protéine p16 est également augmentée dans des modèles de cancer du col de l'utérus, de l'endomètre et de la prostate (Barbie et al., 2003; Namkung et al., 2012; Renaud et al., 2005 ; Segev et al., 2002).

A contrario, dans les tumeurs de la granulosa, l'AMH ne module pas ou peu le cycle cellulaire avec une expression stable de la cycline D2, responsable de la régulation du cycle. Cependant, l'élévation de la caspase 3 clivée et de son action lors d'un traitement par AMH sur la lignée cellulaire KGN et sur des cellules primaires de tumeur de la granulosa prouve l'effet pro-apoptotique de l'hormone.

Nous venons de voir que l'AMH induit l'arrêt du cycle cellulaire au niveau de la transition de la phase G1/S. Cet état favorise l'entrée des cellules dans un processus apoptotique. En 2011, Antonnen et al, se sont focalisés sur l'induction de l'apoptose par traitement à des doses croissantes d'AMH dans des modèles de lignées de la granulosa (KGN) ainsi que dans des lignées primaires établies à partir de tumeur fraîche. Cette équipe analyse les protéines impliquées dans cette voie (clivage de caspase 3) grâce à différentes techniques biochimiques (Western blot et kit de bioluminescence ApoptoGlow® mesurant l'activité des caspases 3/7). Ils montrent que l'AMH entraine une augmentation dose dépendante (0–179 nM) du clivage des caspases (**Figure 31**A) ainsi que de leur activité (**Figure 31**B) corrélée à une augmentation du pourcentage des cellules en apoptose (**Figure 31**C) (Anttonen et al., 2011).

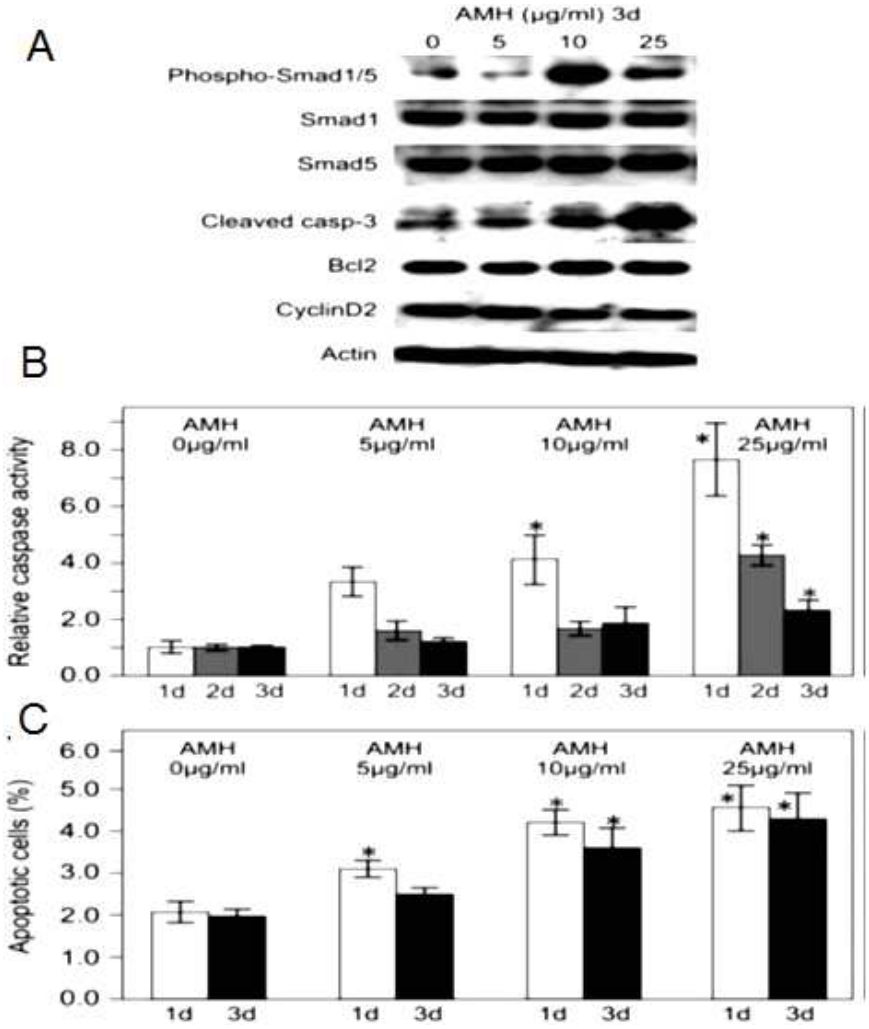


Figure 31 : Induction de l'apoptose dépendante de la concentration en AMH sur les cellules de tumeur de la granulosa
Traitements doses dépendants d'AMH (0–179 nM) des cellules de la granulosa (KGN). A) Western blot des protéines impliquées dans l'apoptose et le cycle cellulaire. B) Test d'activation de la caspase-3/7. C) Nombre de cellules apoptotiques analysées par morphologie nucléaire après coloration DAPI (Anttonen et al., 2011).

Deux études transcriptomiques ont révélé que le traitement de l'AMH sur Les cellules de cancer épithélial (OVCAR8) et de l'endomètre (AN3CA) induisait systématiquement la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose (Nam et al., 2009; Zhang et al., 2008).

L'AMH induit également l'apoptose des cellules du cancer du col de l'utérus (C33A) avec une augmentation des cellules en apoptose précoce (12,9% contre 2% pour le contrôle) et des cellules en apoptose tardive (10% contre 3% pour le contrôle) (Barbie et al., 2003).

3.3.4 Inhibition de la migration

La transition épithélialio-mésenchymateuse est la cause principale de métastases notamment dans le cancer de l'ovaire au cours duquel les cellules migrent dans la cavité péritonéale (Lengyel, 2010). L'AMH est connue pour inhiber la migration des cellules lors de la régression des canaux de Müller. Dans des lignées de cancers ovariens (IGROV-1), du sein (MDA-MB-231) et de carcinome ORL (Hep3) exprimant le récepteur AMHRII, l'hormone est capable d'inhiber fortement l'invasion des cellules cancéreuses alors qu'un traitement par chimiothérapie conventionnelle (Paclitaxel) ne modifie pas ce phénomène (Chang et al., 2011) (**Figure 32**).

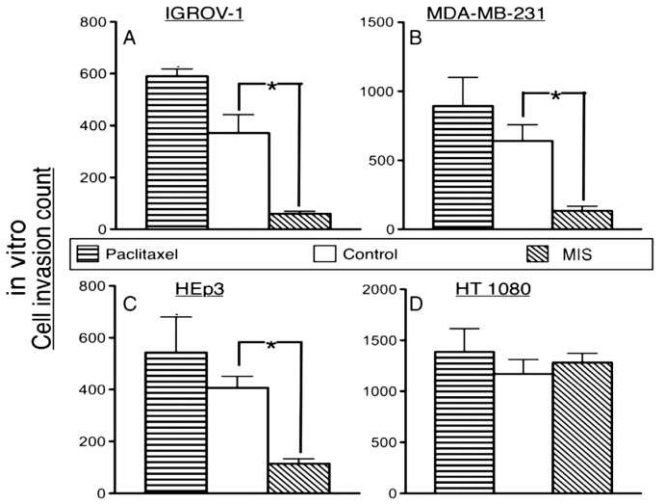


Figure 32 : Effet de l'AMH et du Paclitaxel sur l'invasion des cellules cancéreuses
Test d'invasion en chambre de Boyden des cellules IGROV-1 (A), MDA-MB-231 (B), Hep3 (C) et HT1080 (D) en présence de 50nM d'AMH ou de 1nM de Paclitaxel (Chang et al., 2011).

3.3.5 Combinaison AMH – chiomiothérapies

Dans le traitement des cancers, la chimiothérapie conventionnelle ne permet pas la prise en charge des cellules cancéreuses aux capacités d'invasion et de migration entrainant la formation de métastases. L'association de l'AMH avec la chimiothérapie pourrait également réduire la formation de métastases par l'inhibition des cellules cancéreuses en migration.

Les cancers sont hétérogènes et présentent de nombreuses dérégulations. Un seul traitement contre une unique cible ne semble pas suffisant pour détruire complétement les tumeurs en particulier les plus agressives. Les cancers gynécologiques sont sensibles aux traitements par chimiothérapies mais ils présentent souvent une récidive dans 70% des cas pour les cancers de l'ovaire. Pour pallier à cette récidive, des associations de thérapies ont vu le jour dans le but de réduire l'administration de

chimiothérapies à des doses moins toxiques pour diminuer les effets secondaires tout en gardant un effet sur la réduction tumorale.

Les limites d'efficacité des chimiothérapies conventionnelles dans les cancers de l'ovaire aux stades avancés encouragent à associer celles-ci avec d'autres molécules anti-tumorales agissant sur d'autres voies comme peut le faire l'AMH.

Pieretti et al montre qu'un traitement couplant l'AMH recombinante et la chimiothérapie permet de réduire les doses de chimiothérapies utilisées (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006b). Cependant, l'effet de cette association est dépendant de la nature de la chimiothérapie ainsi que du modèle cellulaire. Ainsi, l'AMH associé au Paclitaxel peut avoir un effet additif ou synergique sur les lignées cancéreuses ovariennes *in vitro* alors qu'avec le Cisplatine l'effet des deux molécules est additif sur la régression tumorale (**Figure 33**A).

L'avantage de l'AMH est son efficacité sur des cellules cancéreuses résistantes au Paclitaxel. La réduction de la croissance des cellules cancéreuses résistantes au Paclitaxel fait de l'AMH une alternative possible lors de récidive avec chimiorésistance. Cependant, des études *in vivo* complémentaires sont nécessaires pour affirmer des effets d'une association entre AMH et chimiothérapie (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006) (**Figure 33**B).

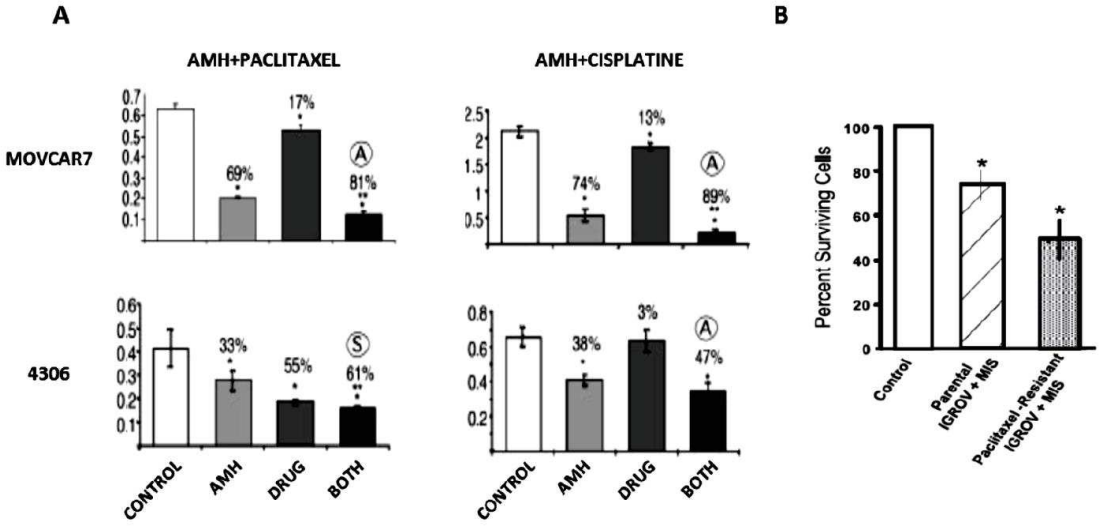


Figure 33 : Effet de l'AMH en association avec la chimiothérapie

A) Données représentatives des effets de la combinaison AMH-chimiothérapie en MTS. Les concentrations en AMH et chimiothérapies ont été constantes et proches de l'IC50. Les cellules MOVCAR7 (lignée cellulaire murine d'adénocarcinome ovarien séreux) ont été traitées avec 35nM d'AMH et/ou Paclitaxel 3nM ou Cisplatine 5nM. Pour la lignée 4306 (lignée cellulaire murine de cancer ovarien endométrioïde), l'AMH a été utilisée à la concentration de 70nM et ou Paclitaxel 4nM ou Cisplatine 10nM. B) Analyse par MTS de l'effet de l'AMH (MIS) sur la lignée IGROV1 et la lignée IGROV1 rendue résistante au Paclitaxel (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006).

3.4 Effet prolifératif de l'AMH

Dans le contexte physiologique, les « bone morphogenic proteins » (BMP), membres de la superfamille du TGF (transforming growth factor) dont fait partie l'AMH, sont des protéines clées dans la régulation du développement, de la croissance, de l'apoptose, de la différenciation et de l'homéostasie de la plupart des types cellulaires et tissulaires. Dans le contexte tumoral, la dérégulation de l'un de ces systèmes est souvent la cause du développement cancéreux. Il est acté aujourd'hui que certains BMP peuvent jouer différents rôles. En effet, par exemple la protéine BMP4 à elle seule est capable de réguler différents types de cellules souches adultes avec des effets différents selon l'espèce considérée. De plus, sur un même type de cellule souche adulte et dans une espèce donnée, BMP4 peut également induire des effets hétérogènes en fonction de sa concentration ou encore de ses partenaires locaux (Sagorny et al., 2012).

Par ailleurs, dans le contexte tumoral, le TGF-β a été décrit comme ayant la capacité d'exercer une double fonctionnalité. En effet, alors qu'il agit comme suppresseur de tumeur dans les cellules normales ou les stades précoces de carcinome, le TGF-β agit comme un agent pro-métastatique dans les stades avancés de cancer, favorisant l'apparition de métastases (Neel et al., 2012).

En condition physiologique au cours de la différentiation masculine, l'AMH est sécrétée par les cellules de Sertoli pour permettre la régression des canaux de Müller par apoptose. Paradoxalement, l'étude de Rehman et al en 2017 montre qu'à faible dose le traitement par l'AMH stimule la prolifération des cellules de Sertoli. En effet, l'AMH à 10ng/ml induit une augmentation de la phosphorylation de ERK ainsi que la transcription de l'ARNm du facteur de transcription du SCF (Stem Cell Factor) (**Figure 34**). L'étude conclut que l'AMH joue un rôle stimulateur dans le développement du devenir cellulaire des cellules de Sertoli (Rehman et al., 2017).

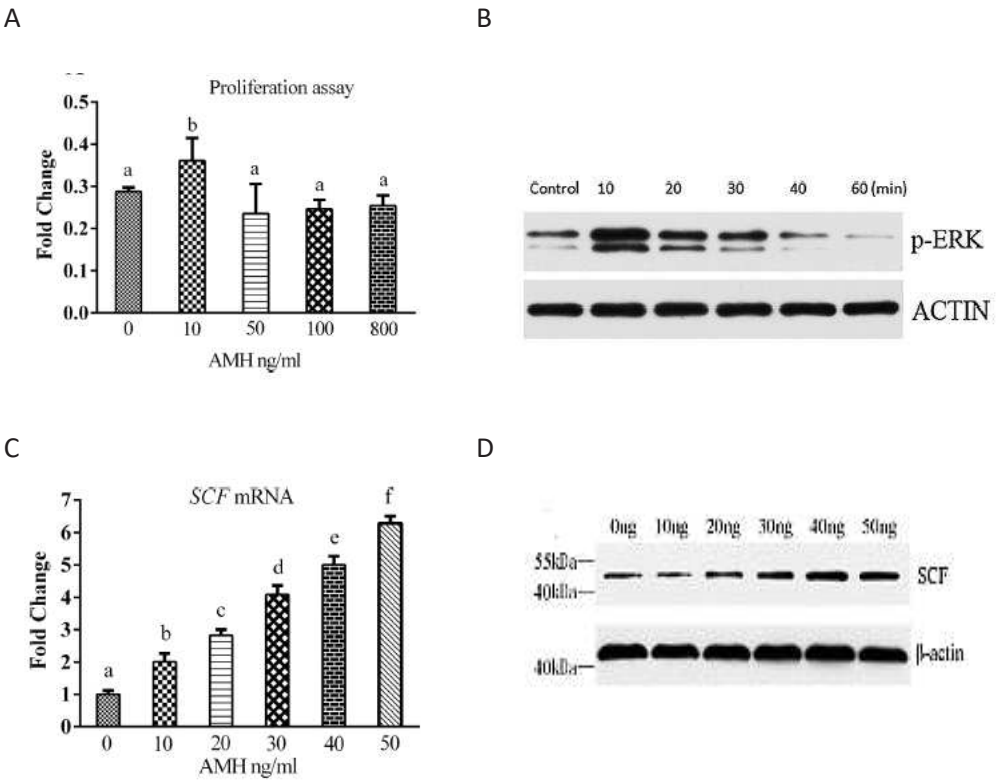


Figure 34: Effet prolifératif de l'AMH à faible dose sur les cellules de Sertoli de souris

A) test de prolifération mesuré par CCK-8 kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc., USA). B) Analyse par Western blot de la p-ERK. Cellules traitées à 10ng/ml (0,15nM) d'AMH de 0 à 60min. C) Effet de l'AMH à différente concentration d'AMH (0-50ng/ml, 0-0,7 nM) sur l'expression du facteur cellules souche (SCF) à 50ng/ml (0,7nM) pendant 48h. D) Analyse en Western blot du facteur SCF (Rehman et al., 2017).

En condition tumorale, des études ont décrit à plusieurs reprises la capacité de l'AMH à inhiber la prolifération des cellules tumorales sur différent modèles *in vitro* et *in vivo*. Cependant, une étude a montré la présence du récepteur AMHRII dans un modèle de cancer du poumons NSCSL (non-small cell lung cancer). Les auteurs observent que l'AMH serait inducteur de survie. En effet, la déplétion du récepteur AMHRII et de son ligand via des siRNA diminue le niveau basal de P-AKT, protéine impliquée dans la survie ainsi que NFkB dont le rôle s'oppose à l'apoptose (Figure 35). Dans ce modèle de cancer du poumon l'AMH régule donc les voies de signalisation de la survie (Beck et al., 2016) (Figure 35).

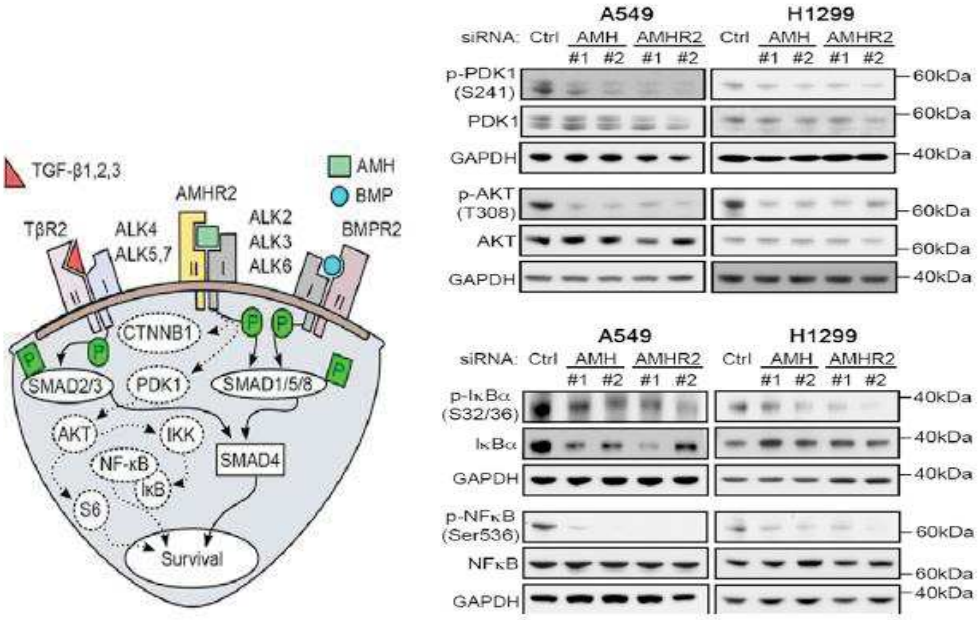


Figure 35 : AMH et AMHRII régulent les voies de survie dans le cancer du poumon NSCLC

A) Schéma de la signalisation des TGF-β, BMP et AMH. B) Western blots représentant l'expression des protéines totales et phosphorylés des voies de survie (AKT-NFkb), lors de la déplétion de l'AMH et de l'AMHRII par siRNA dans les cellules A549 et H1299.

Cette notion de dualité fonctionnelle a été évoquée en condition physiologique et en condition tumorale au travers des deux publications citées ci-dessus. Cet effet potentiel de l'hormone à induire la prolifération ouvre donc un nouveau champ de recherche dans les cancers gynécologiques où le récepteur AMHRII est largement sur-exprimé.

L'ensemble des données présentées dans le chapitre précédant souligne l'intérêt majeur des voies de signalisation de l'AMH dans le traitement des cancers gynécologiques. Depuis quelques années, l'expression tissu spécifique du récepteur AMHRII a favorisé l'émergence de deux stratégies thérapeutiques, l'une avec l'utilisation de l'hormone recombinante et l'autre avec la production d'anticorps monoclonaux ciblant son récepteur (**Figure 36**).

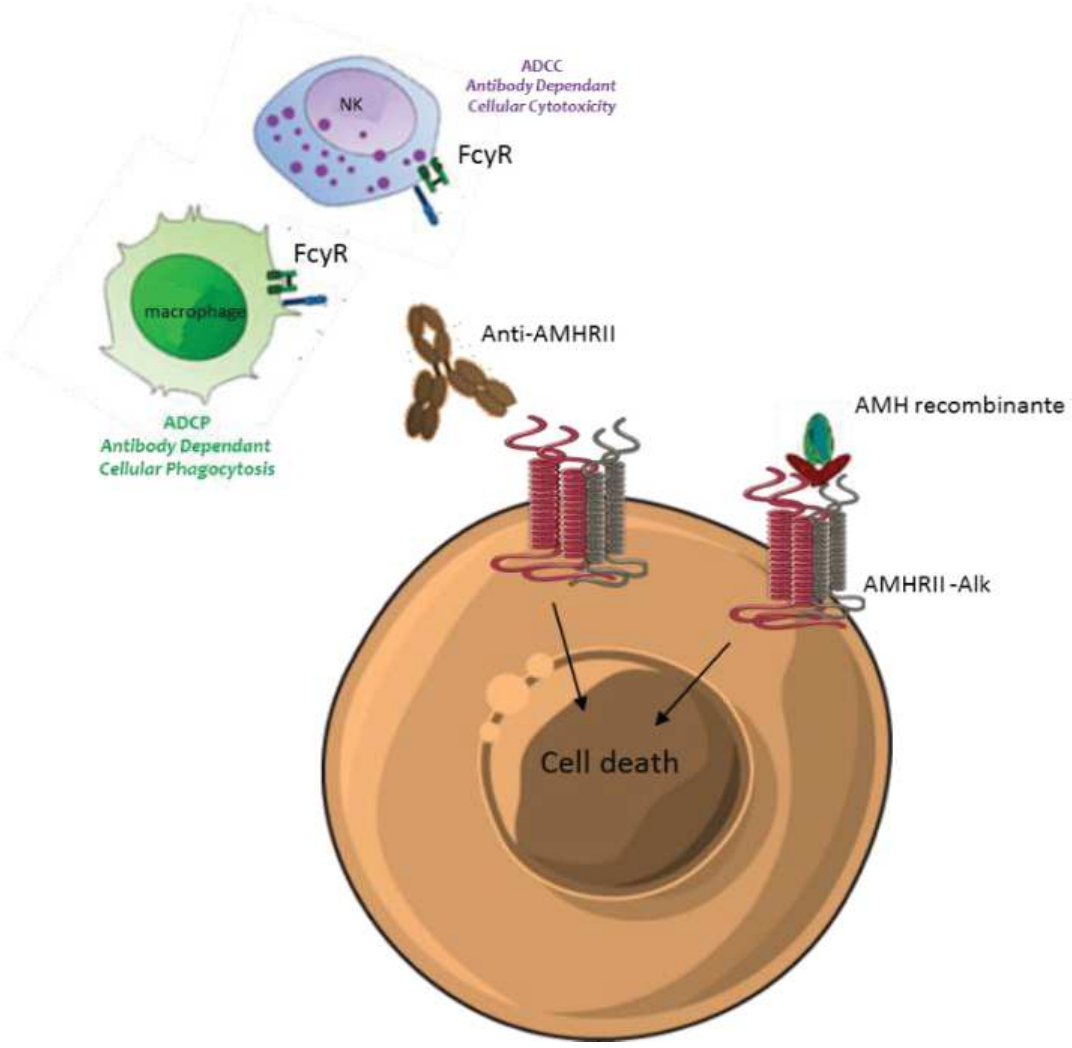


Figure 36 : Schéma des deux stratégies thérapeutiques ciblant la voie de l'AMH

4.1 AMH recombinante

La volonté de l'utilisation de l'hormone en thérapie a conduit à la nécessité de la produire (Fuller et al., 1985 ; Chin et al., 1991). Un obstacle majeur à l'utilisation de l'AMH comme agent thérapeutique est lié aux difficultés de production d'AMH recombinante active en grande quantité pour la clinique (Pépin et al., 2013). Malgré les progrès récents dans ce domaine, cet aspect biotechnologique demeure un verrou. Il est lié à la structure de l'hormone qui agit en dimère dont une partie doit être clivée sans se dissocier avant de se fixer à l'AMHR-II puis se dissocier pour induire la phosphorylation des Smad1/5/8. Pépin et al, en 2013 ont réalisé des modifications sur la séquence peptidique de l'AMH et introduit une mutation Q425R au niveau du site de clivage afin d'augmenter et faciliter ce clivage par l'enzyme et la rendre donc plus active que l'hormone native. De plus, un peptide leader codant pour l'albumine humaine (HSA) est ajouté en début de séquence permettant une production de l'hormone plus importante (**Figure 37**). Les auteurs ont par la suite évalué l'efficacité de cette AMH sur des PDX en thérapie génique par association avec un adénovirus AAV9. Il ressort de ces résultats que la thérapie génique avec l'AMH est une stratégie de traitement potentiellement bien tolérée et efficace pour le cancer de l'ovaire (Pépin et al., 2013, 2015).



Figure 37 : Schéma de l'AMH recombinante
(Pépin et al., 2015)

4.2 Les anticorps monoclonaux

4.2.1 Ingénierie de sélection des anticorps : hybridomes et phage display

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus de deux façons. La première consiste en une approche *in vivo* par la technique d'hybridomes et la seconde en une approche *in vitro* par phage display.

La technique par hybridome consiste à immuniser une souris ou autre modèle animal avec l'antigène d'intérêt, d'en extraire la rate pour récupérer les lymphocytes B capables de se multiplier et de sécréter les anticorps spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes B sont alors fusionnés avec des cellules de myélome qui confèrent l'immortalité pour donner naissance à un hybridome producteur d'anticorps spécifiques. Les premiers anticorps développés ont été d'origine murine. L'utilisation des anticorps murins a été limitée chez les patients par la production d'IgG anti-anticorps de souris. Les progrès techniques ont permis de formater les anticorps en version humanisée.

La technique du « phage display » est actuellement la méthode la plus utilisée pour la sélection de fragments d'anticorps humains recombinants dirigés contre un antigène donné. Les phages expriment à leur surface des fragments d'anticorps (Fab, Fv ou scFv). Pour cela, ils ont été modifié génétiquement par fusion des gènes codants les fragments anticorps avec les protéines pIII ou pVIII du phage. Le phage est alors présenté et incubé avec l'antigène. Après plusieurs lavages, les phages liés sont élués. Les phages sélectionnés sont utilisés pour infecter une culture bactérienne pour permettre l'amplification des phages reconnaissant l'antigène. Une fois amplifiés, les phages produits par la bactérie sont purifiés et titrés pour être utilisés lors d'une nouvelle sélection sur le même antigène. On parle alors de tour de sélection. Trois à quatre tours de sélection sont généralement réalisés sur le même antigène, ce qui permet d'enrichir les phages produits en phages spécifiques de l'antigène (**Figure 38**). L'ADN des phages sélectionnés code pour le fragment d'anticorps d'intérêt et peut être cloné dans en format IgG. La plupart du temps, la production des anticorps est réalisée en cellules de mammifère (CHO/ HEK293T). Grâce à cette technique de phage display, initialement décrite en 1990, le premier anticorps humain, l'adalimumab (Humira™), a été commercialisé en 2002 pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.

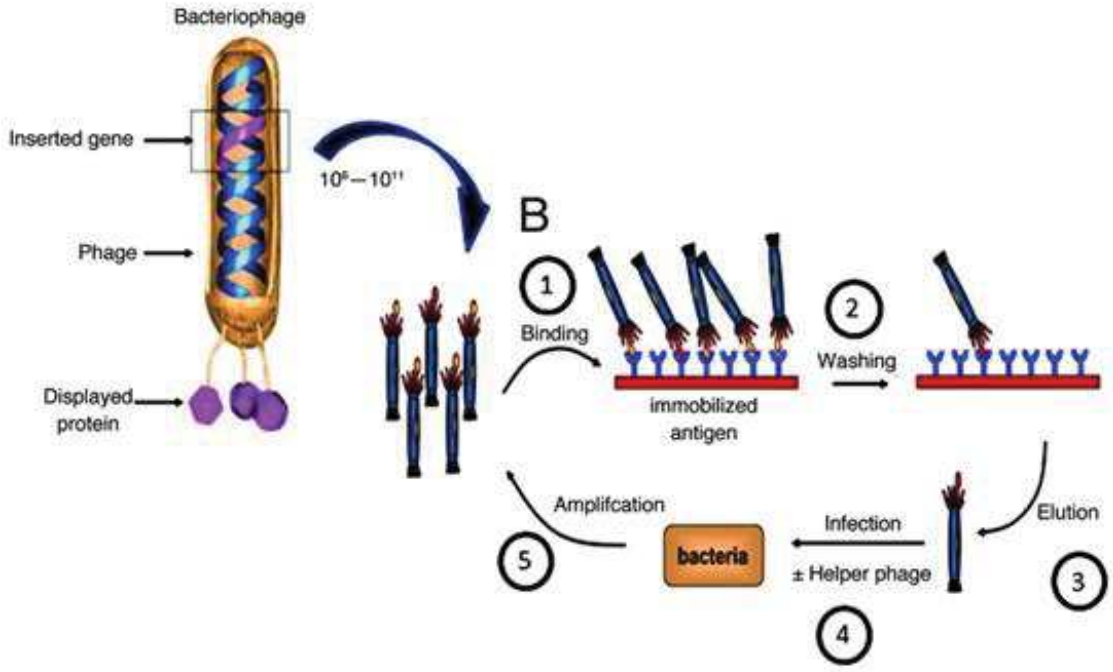


Figure 38: Etape d'un tour de sélection par phage display
A) Structure générale d'un bactériophage. B) Etapes d'un tour de sélection (Nixon et al., 2014)

4.2.2 Les anticorps en clinique

Le nombre d'anticorps en thérapie et en clinique ne cesse de croître depuis ces dernières années. En juin 2019, « Antibody society » recense 81 anticorps ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché, dont 35 sont à usage anticancéreux depuis la mise sur le marché par la FDA (Food and Drug Administration) du Rituximab en 1997 (Marshall et al., 2017).

Du 1er janvier 2018 à juin 2019, 159 anticorps sont entrés en étude clinique dont 128 sont utilisés chez les patients atteints de cancer (**Figure 39**).

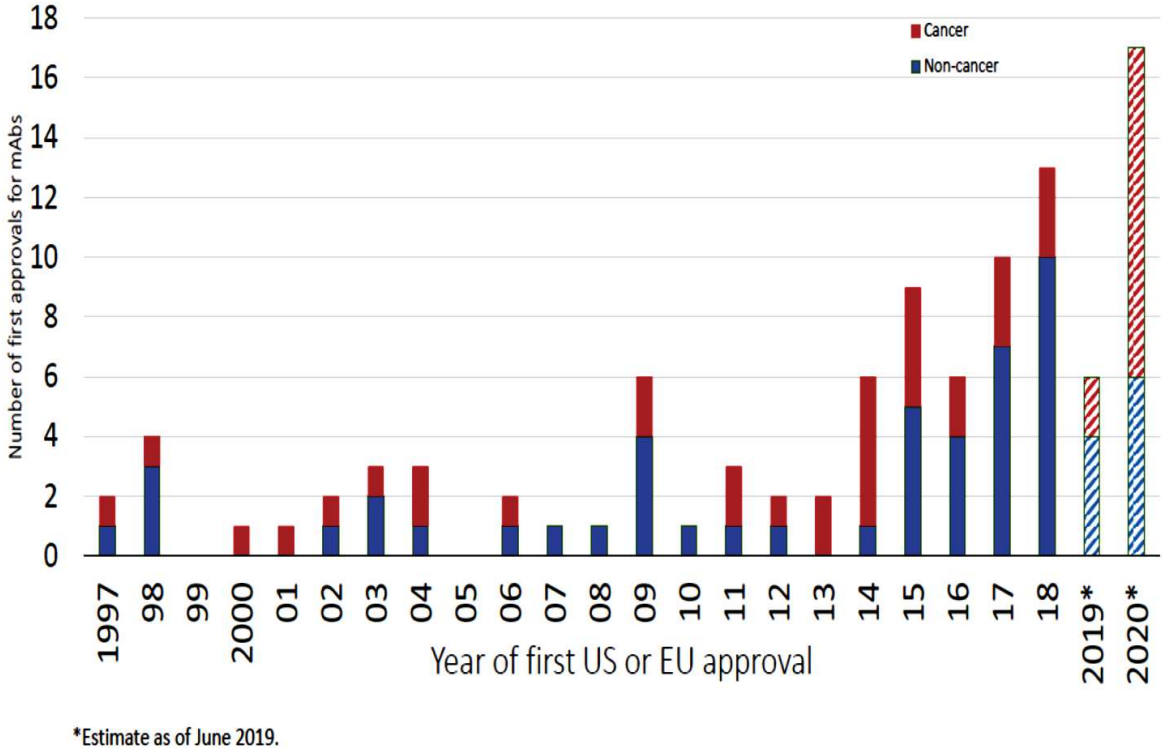


Figure 39: Nombre d'anticorps approuvés en clinique par année
Adapté de la présentation de Janice M. Reichert, Ph.D.Executive Director, The Antibody Society

4.2.3 Fonction des anticorps

Mécanisme Fab dépendant

Une fois liés à leur cible, les anticorps peuvent avoir plusieurs fonctions. Notamment, ils peuvent neutraliser la fixation du ligand et indirectement bloquer l'activation de ce dernier tel que l'anticorps anti-VEGF (Bévacizumab).

Les anticorps peuvent aussi avoir une action antagoniste sur leur cible. Dans ce cas l'anticorps cible spécifiquement un récepteur membranaire et bloque la liaison de son/ses ligands ou de son fonctionnement. En thérapie ont été développés :

- 6 anticorps anti-récepteurs de cytokines (deux anti-IL2R et un anti-IL6R) ou facteurs de croissance (deux anti-EGFR et un anti-HER2)
- 3 anticorps anti-intégrine (anti-gpIIbIIIa, anti-CD11a, anti-VLA4)
- 4 biomédicaments qui interfèrent avec les cellules de l'immunité (anti-CD58-CD2, anti-CTLA4-CD28, anti-CTLA4, anti-BAF)

Enfin, les anticorps peuvent avoir une action agoniste sur leur cible mimant un ligand pour activer les voies de signalisation du récepteur. Comme expliqué précédemment, les anticorps monoclonaux thérapeutiques ont essentiellement été utilisés jusqu'à présent pour leur capacité à bloquer des récepteurs. A présent, ils sont surtout exploités en immunothérapies dans le but de réactiver la réponse immunitaire. Ainsi, les anticorps agonistes qui stimulent les molécules co-activatrices des lymphocytes tels que les CD27, CD40 ou OX40 sont en essai clinique dans plusieurs types de tumeurs solides. Les anticorps agonistes ouvrent donc une nouvelle fenêtre thérapeutique à développer.

Mécanisme Fc-dépendant

En parallèle à l'effet direct (Fab-dépendant), certains anticorps peuvent également induire le recrutement des effecteurs du système immunitaire par le biais de sa partie Fc et ainsi potentialiser l'action anti-tumorale directe de l'anticorps. Le Fc de l'anticorps peut activer la voie classique du complément CDC (cytotxicité dépendant du complément) par liaison au C1q. Il peut également activer les cellules du système immunitaire tel que les NK (Natural Killers) et les macrophages en se liant à leur récepteur FcyR et engendrer une réponse immunitaire de type ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) ou ADCP (phagocytose cellulaire dépendante des anticorps). En clinique, il a été démontré que l'ADCC améliore significativement l'efficacité de divers anticorps monoclonaux, dont le Rituximab (anti-CD20), le Trastuzumab (récepteur 2 (Her2), le Cétuximab ciblant le récepteur (EGFR) (Scott et al., 2012) et plus récemment en essai clinique l'anti-AMHRII, le Murlentamab dont le développement est détaillé ci-dessous (Bougherara et al., 2017; Estupina et al., 2017).

4.3 L'anticorps anti-AMHRII : le 12G4

Des scFv anti-AMHR-II sélectionnés par phage display sur cellules exprimant le récepteur ont été décrits par le laboratoire de G.P. Adams (Yuan et al., 2006, 2008). Cependant, l'effet propre de ces scFv n'a pas été évalué et aucun développement ultérieur n'a été effectué à notre connaissance.

Notre équipe a développé le premier anticorps monoclonal dirigé contre l'AMHR-II, le 12G4, (Salhi et al., 2004). Dans le cadre d'un partenariat industriel, le potentiel thérapeutique du 12G4 a été évalué dans les cancers ovariens (Kersual et al., 2014). La version humanisée de cet anticorps, le 3C23K, a confirmé son intérêt en monothérapie et en association avec les chimiothérapies à base de platine (Bougherara et al., 2017; Estupina et al., 2017). Il a été licencié à la société Gamamabs Pharma qui a débuté les études cliniques de Phase I en 2016 (NCT02978755, NCT03799731). Cette stratégie anticorps permet d'envisager un effet lié à la signalisation intracellulaire (mime de l'effet de l'AMH) mais également un effet dû à l'anticorps lui-même (ADCC, ADCP, CDC). C'est cette dernière option qui est privilégiée par Gamamabs qui développe des anticorps afucosylés optimisés pour l'ADCC (de Romeuf et al., 2008; Sibéril et al., 2006).

4.3.1 Développement du 12G4

Le 12G4 est un anticorps monoclonal d'origine murine. Il a été produit par la technique d'hybridome chez la souris immunisée contre la protéine recombinante du domaine extracellulaire du récepteur AMHRII. L'épitope de l'anticorps a été établi par technique de la membrane SPOT comme étant la séquence DRAQVEM, avec contribution majoritaire des acides aminés Asp53 and Ala55, présents sur la face convexe du récepteur AMHRII. Cet emplacement épitopique est un avantage majeur de cet anticorps car il n'entre pas en compétition avec l'hormone naturelle, dont les sites de fixation sont plus situés sur la face concave (**Figure 40**) (Salhi et al., 2004). En effet, il est donc possible d'envisager une combinaison entre l'anticorps et l'AMH recombinante.

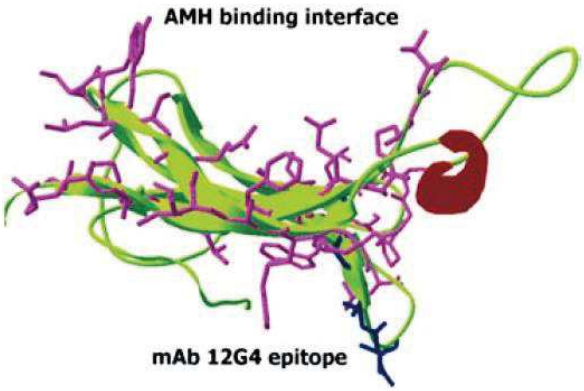
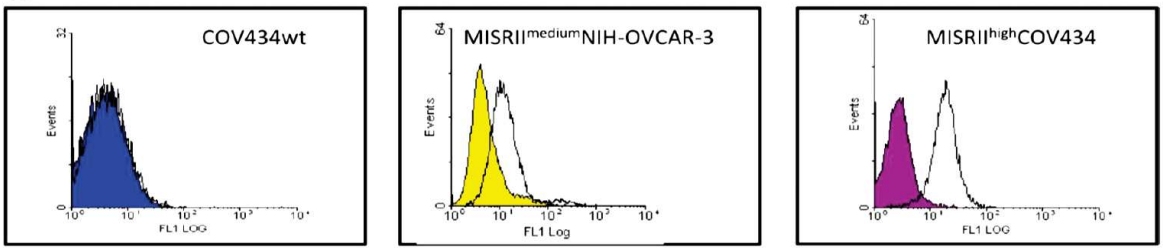


Figure 40: Liaison du 12G4 sur le récepteur AMHRII recombinant par rapport au site de liaison de l'AMH
Vue de dessus du modèle AMHR-II, montrant les côtés concaves (haut) et convexes (bas) ; l'épitope mAb 12G4 (en bleu) est situé sur le côté convexe. La majeure partie des résidus réactifs avec l'AMH (en rose) se trouvent du côté concave. (Salhi et al., 2004)

4.1.1 Rôle de l'anticorps 12G4

L'anticorps 12G4 se lie sur sa cible AMHRII présent sur les lignées de la granulosa COV434 (AMHRII low) et COV434high transfectées avec le récepteur AMHRII ainsi que sur la lignée épithéliale NIH-OVCAR-3 dont l'expression AMHRII est modérée. La liaison a été déterminé par cytométrie en flux (**Figure 41**A). L'anticorps a permis également de mettre en évidence par immunohistochimie la présence du récepteur AMHRII de 18 biopsies sur 20 chez des patientes atteintes de cancers épithéliaux de l'ovaire et de la granulosa (**Figure 41**B) (Kersual et al., 2014).

A



B

Sample n°	Age	Cancer histology	FIGO stage	MISR–II Stained cells	Staining intensity
1	61	Serous adenocarcinoma	IIIc	95%	++/+++
2	59	Serous adenocarcinoma (liver metastasis)	IV	95%	++/+++
3	74	Serous adenocarcinoma	Ic	95%	+/++
4	60	Serous adenocarcinoma	IIIc	95%	+
5	70	Serous adenocarcinoma	IIIc	90%	+
6	64	Serous adenocarcinoma	IIIc	90%	++/+++
7	49	Serous adenocarcinoma	IIIc	70%	+
8	72	Serous adenocarcinoma	IIIc	60%	++
9	67	Serous adenocarcinoma	IIIc	20%	++
10	42	Serous adenocarcinoma	IIIc	rare cells	+
11	58	Serous adenocarcinoma	IIIb	rare cells	+
12	45	Serous adenocarcinoma	IIIc	rare cells	++
13	60	Serous adenocarcinoma	IIIc	0%	0
14	34	Mucinous borderline tumor	Ia	10%	+
15	54	Primary GCT	Ia	95%	++/+++
16	63	Recurrent GCT	IV	95%	+++
17	63	Recurrent GCT	IIIc	95%	+++
18	62	Recurrent GCT	IIIc	80%	+
19	39	Clear cell adecarcinoma	IIIc	95%	+++
20	31	Dysgerminoma	Ia	0%	0

Figure 41 : La liaison du 12G4 sur des modèles cellulaires de cancer ovarien
A) liaison du 12G4 en cytométrie en flux sur des lignée de cancer ovarien de la granulosa (COV434-AMHRII et COV434-WT) et épithéliale (NIH :OVCAR3). B) Utilisation du 12G4 en immunohistochimie sur 20 biopsies de patientes (Kersual et al., 2014)

Kersual et al (2014) montre *in vitro* que le 12G4 exerce son effet principal en induisant la lyse des cellules après reconnaissance de sa partie Fc par les cellules NK (Natural Killer). *In vivo*, le 12G4 à 10mg/Kg réduit significativement la croissance tumorale des cellules de cancers de l'ovaire (COV434-AMHRII et NIH-OVCAR3) xénogréffées chez la souris nude. De plus, le 12G4 à la capacité d'induire le recrutement du système immunitaire via sa partie Fc et induire une cytotoxicité de type ADCC (Antibody Dependant Cell mediated Cytotoxicity).

La pertinence de la cible et l'épitope du 12G4 à conduit cet anticorps à évoluer en version humanisée et à être optimisé pour la thérapie des cancers ovariens par la société Gamamabs.

4.1.2 Version humanisé du 12G4 : le 3C23K

Une version humanisée de l'anticorps a été produite en collaboration avec le LFB et Gamamabs appelé 3C23K. L'épitope du 12G4 et du 3C23K sont identiques. L'humanisation a conduit à une diminution de l'affinité de l'anticorps pour AMHRII. Différentes mutations ont donc été introduites pour retrouver l'affinité initiale dans les domaines variable VH : Q3R et VL : I47T, S49P, E54K. L'ensemble de ces mutations a conduit à un anticorps humanisé dont l'affinité est supérieure à celle du 12G4 d'un facteur 14 (KD = 5,5 × 10^{-11} M contre 7,9 x 10^{-10} M) (**Figure 42**). De plus, des étapes de glyco-ingénieries ont généré un anticorps 3C23K faiblement fucosylé au niveau de son fragment Fc pour améliorer son potentiel dans le recrutement des effecteurs de l'immunité de type l'ADCC/P (**Figure 42**) (Estupina et al., 2017).

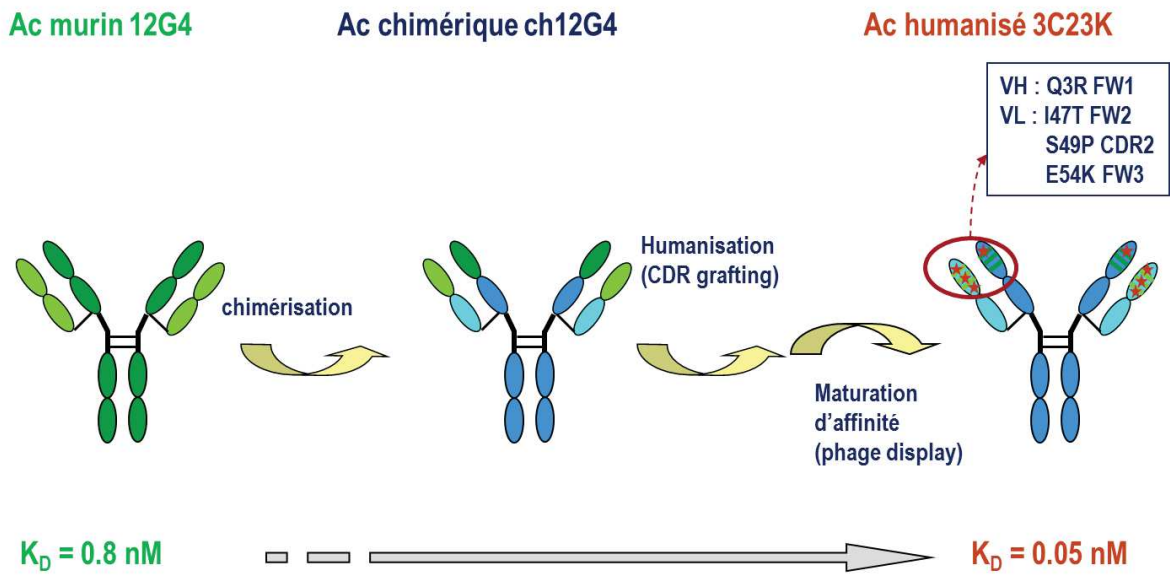


Figure 42 : Etapes de maturation de l'anticorps 12G4 en version humanisé le 3C23K

4.1.3 Effet du 3C23K comparé au 12G4

Grâce aux modifications effectuées pour augmenter l'affinité et les fonctions effectrices, le 3C23K est plus efficace que le 12G4 sur le ralentissement de la croissance tumorale et l'augmentation de la survie des souris (**Figure 43**A). Cet effet est principalement médié par l'activité ADCC car les effets du 3C23K sur la croissance tumorale et la survie ne sont pas retrouvés avec un anticorps 3C23K Fc-KO dénué de fonctions effectrices (**Figure 43**B). De plus, l'association du 3C23K à la chimiothérapie par du carboplatine (traitement de première ligne dans les cancers de l'ovaire) exerce un effet synergique inhibant complètement la croissance tumorale (**Figure 43**C) (Estupina et al., 2017). Les effets du 3C23K sont confirmés et complétés la même année par l'étude de Bougherara et al, où l'activité in vivo du 3C23K seul et en association avec le carboplatine et paclitaxel a été étudiées dans divers PDX de cancer de l'ovaire. L'étude montre une activité anti-tumorale immunodépendante spécifique (Bougherara et al., 2017).

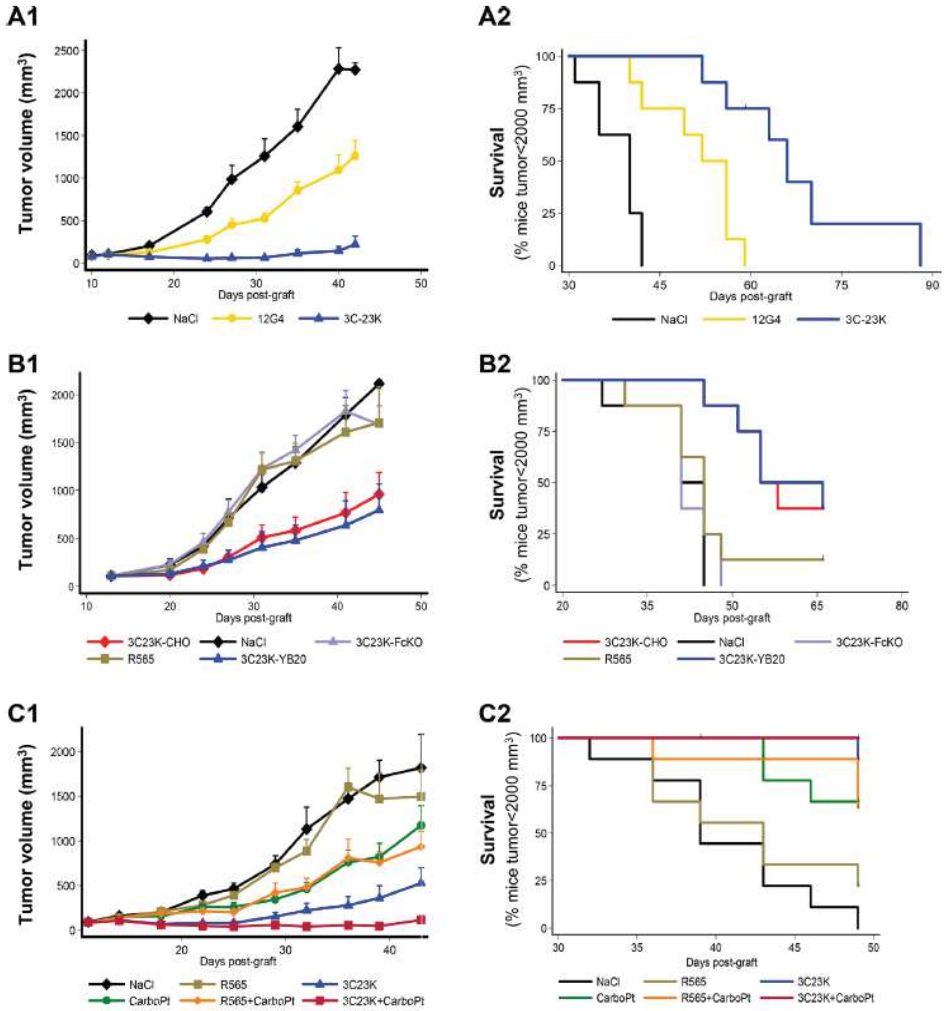


Figure 43 : Essai in vivo de l'anticorps 12G4 murin et sa version humanisé le 3C23K
A) Comparaison entre le 12G4 murin et le 3C23K humanisé ou le NaCl, comme véhicule (7-8 souris/groupe). B) Comparaison avec le 3C23K-CHO (fucosylé), le 3C23K- YB20 (faiblement fucosylé), 3C23K-FcKO (Fc délété) et l'anticorps R565 irrelant (9 souris/groupe). C) Association avec 60 mg/kg de carboplatine (CarboPt). Les résultats sont présentés sous la forme (1) de courbes de croissance tumorale et (2) de Kaplan-Meier (Estupina et al., 2017).

4.1.4 L'anticorps 3C23K en essai clinique : GM102/ Murlentamab

Depuis 2016, le 3C23K est en essai clinique de phase Ia/Ib sous le nom de GM102 ou Murlentamab (NCT02978755).

L'essai a porté sur 68 patientes multi pré-traitées, atteintes de cancers gynécologiques exprimant AMHRII (cancer épithélial de l'ovaire (EOC), tumeurs de la granulosa (GCT), cancers du col de l'utérus et de l'endomètre). Ces patientes ont reçu du Murlentamab en monothérapie (n=59) ou en association avec carboplatine et paclitaxel (n=9).
D'après les premiers résultats présentés à l'ASCO en 2019, aucun problème de tolérance n'a été détecté pour toutes les doses en monothérapie et en association avec la chimiothérapie. En monothérapie, une réponse partielle a été observée chez une patiente présentant une tumeur de la granulosa. En association, quatre patientes sur neuf (44%) ont répondu au traitement (une réponse complète et trois réponses partielles). Parmi les patientes traitées pendant plus de six mois, six patientes sur neuf (67%) atteintes de tumeurs de la granulosa traitées par Murlentamab en monothérapie, et quatre patientes sur cinq (80%) traitées en association avec une chimiothérapie (deux cancers du col de l'utérus et deux cancers de l'endomètre) ont eu une survie sans progression plus longue que sous leur traitement précédent (améliorations moyennes de 3,9 et de 2,1 mois respectivement). Une augmentation des monocytes classiques, ainsi qu'une activation des lymphocytes T et des neutrophiles ont été observées dans le sang périphérique de 25 patientes testées ayant reçu le Murlentamab en monothérapie.
Ces premiers résultats sont très encourageants, en particulier pour les patientes atteintes de tumeurs de la granulosa qui n'ont pas d'alternatives thérapeutiques à ce stade.

L'anticorps Murlentamab fait également l'objet d'étude en essai clinique chez les patients atteints de cancer colorectal (NCT03799731). En effet, des études antérieures ont montré la sur-expression du récepteur AMHRII dans ce type de cancer. Les résultats obtenus aujourd'hui lors de cet essai clinique de phase II montre en association avec la trifluridine/tipiracil (FTD/TPI - Lonsurf®), que la survie sans progression (PFS) est augmentée. Cet effet était particulièrement prononcé chez les patients présentant plus de 20 % de cellules tumorales AMHRII positives. Une diminution de 1,7 fois et de 3,6 fois du taux de croissance tumorale a été observée respectivement avec le Murlentamab en monothérapie et le Murlentamab en association avec la trifluridine/tipiracil,

Une activation immunitaire sous Murlentamab a été également observée de façon constante dans le microenvironnement tumoral (activation des macrophages et des cellules T) et dans le sang périphérique (activation des monocytes et des neutrophiles). Aucun effet indésirable grave lié au murlentamab n'a été signalé.

Dans le but d'améliorer et développer nos thérapies ciblées par anticorps, nous nous sommes intéressés aux anticorps bispécifiques (BsAb) du fait de leur capacité à pouvoir cibler deux antigènes. Dans notre cas il s'agit de cibler le complexe hétérodimérique des récepteurs de l'AMH (AMHRII et ALK). Nous présentons donc les caractéristiques et les avantages qu'offrent les BsAb.

4.2 Les anticorps bispécifiques (BsAb)

Le succès des anticorps thérapeutiques et leurs limites (Carter, 2011) ont conduit au développement d'anticorps de seconde génération : anticorps avec des Fc optimisés tels le 3C23K (Kersual et al., 2014b; Romain et al., 2014), les anticorps couplés à une drogue (ADC) (Wong and Hurvitz, 2014) et les anticorps bispécifiques (BsAbs) (Spiess et al., 2015). Les bispécifiques ont récemment montré leur intérêt dans les thérapies contre les cancers car ils peuvent activer simultanément différents mécanismes d'action grâce au ciblage direct de différents marqueurs d'intérêt thérapeutique. Ils peuvent soit cibler deux antigènes présents à la surface d'une même cellule (Kontermann, 2012), soit présents sur deux cellules différentes comme une cellule tumorale et une cellule de l'immunité, la stratégie la plus développé actuellement (Spiess et al., 2015b). Le BsAb peut également cibler la cellule cancéreuse ainsi qu'un facteur soluble ou bien deux médiateurs solubles d'intérêt. Le concept du format d'anticorps bispécifique n'est pas nouveau (Barr et al., 1989; Glennie et al., 1987) mais son transfert vers la clinique était limité par les techniques d'ingénierie des anticorps disponibles (Kontermann, 2012). Différents formats de BsAb sont maintenant parvenus en clinique (Spiess et al., 2015b) et la recherche est encore très active pour l'optimisation de ces molécules (**Figure 44**).

4.2.1 Les différents formats de BsAb

Plus de 60 formats d'anticorps bispécifiques différents ont été développés. Ils varient en fonction de nombreux critères tel que leur poids moléculaire, le nombre de site de liaison à l'antigène, la relation spatiale entre différents sites de liaison, la valence pour chaque antigène, la demi-vie ainsi que la capacité à induire des fonctions immunitaires secondaires (présence de la partie Fc ou non). Cependant, la tendance actuelle privilégie les formats avec un Fc de manière à bénéficier des mécanismes d'action impliquant le Fc (en particulier, ADCC) et demi-vie plus longue (Chames and Baty, 2009; Spiess et al., 2015).

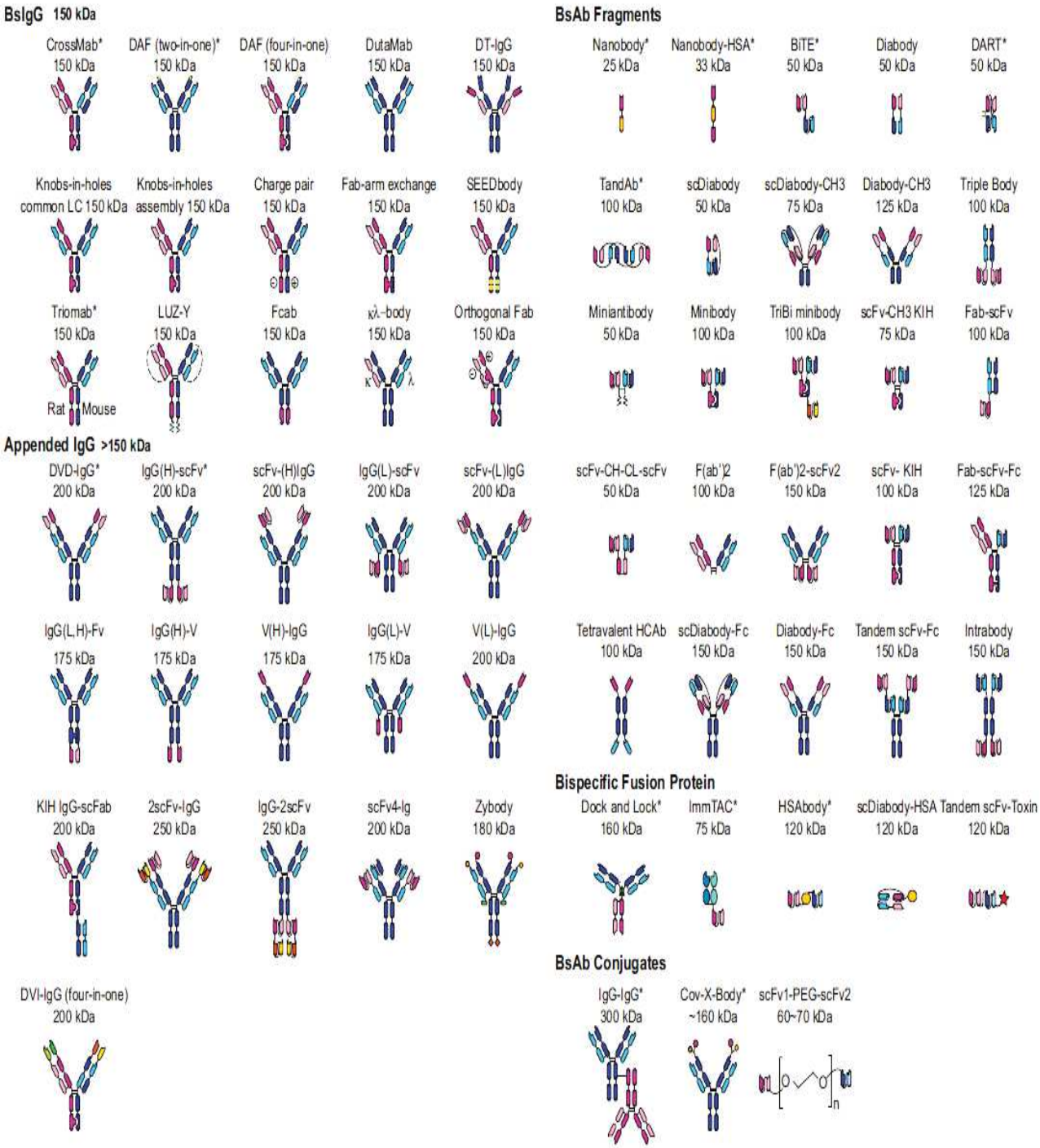


Figure 44 : Représentation des 60 formats de bispécifiques recensés
(Spiess et al., 2015 ; Krishnamurthy et Jimeno et al., 2017)

4.2.2 Les BsAb en clinique

Depuis les années 60, le concept original des BsAb a été développé et n'a cessé d'évoluer en même temps que l'ingénierie des anticorps et leur biologie (**Figure 45**). La plupart des BsAb étudiés en clinique ciblent le marqueur lymphocytaire CD3 ainsi qu'un marqueur d'intérêt présent sur la cellule tumorale. Le CD3 est un corécepteur qui se trouve sur les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et « helper » CD4+ et permet de les recruter au niveau de la tumeur. Deux BsAb sont à présent approuvés en clinique pour le domaine de la cancérologie, le Catumaxomab en 2009 et le Blinatumomab en 2015 et plus de 30 BsAb sont en essai clinique (**Tableau 4**).

- Le Catumaxomab cible CD3 et Epcam un marqueur surexprimé dans les cancers de nature épithéliale, comme énoncé dans le chapitre des thérapies ciblées pour le cancer de l'ovaire, il est prescrit essentiellement dans les carcinoses péritonéales.
- Le Blinatumomab cible CD3 et CD19 exprimé à la surface des cellules de lignée B (lymphocyte B) et utilisé dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique.
-
-

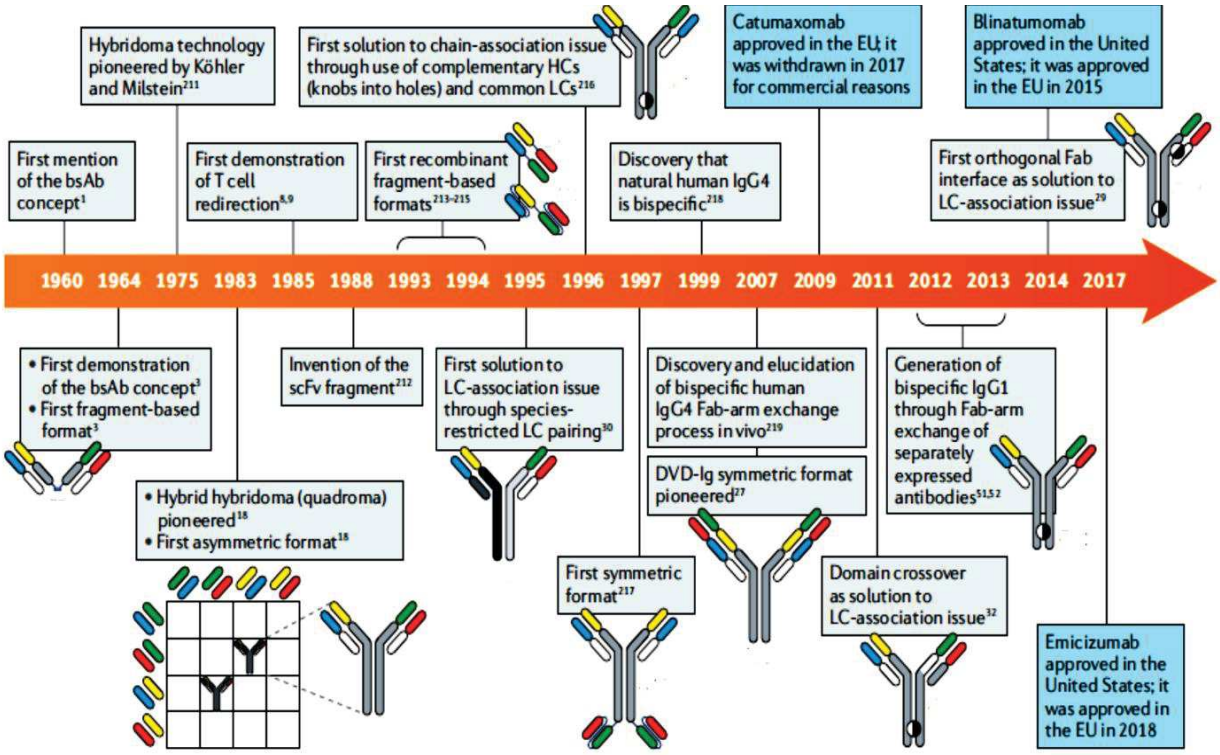


Figure 45 : Chronologie du développement des BsAb
(Labrinj et al., 2019)

Tableau 4 : les BsAb en essai clinique en cancérologie
(Spiess et al., 2015)

BsAb (other names, sponsoring organizations)	BsAb format	Targets	Proposed mechanisms of action	Development stages	Diseases (or healthy volunteers)
Catumaxomab (Removab®, Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm)	BsIgG: Triomab	CD3, EpCAM	Retargeting of T cells to tumor, Fc mediated effector functions	Approved in EU	Malignant ascites in EpCAM positive tumors
Ertumaxomab (Neovii Biotech, Fresenius Biotech)	BsIgG: Triomab	CD3, HER2	Retargeting of T cells to tumor	Phase I/II	Advanced solid tumors
Blinatumomab (Blincyto®, AMG 103, MT 103, MEDI 538, Amgen)	BiTE	CD3, CD19	Retargeting of T cells to tumor	Approved in USA Phase II and III Phase II Phase I	Precursor B-cell ALL ALL DLBCL NHL
Solitomab (AMG 110, MT110, Amgen)	BiTE	CD3, EpCAM	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	Solid tumors
MEDI 565 (AMG 211, MedImmune, Amgen)	BiTE	CD3, CEA	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	Gastrointestinal adenocancinoma
BAY2010112 (AMG 212, Bayer; Amgen)	BiTE	CD3, PSMA	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	Prostate cancer
MGD006 (Macrogenics)	DART	CD3, CD123	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	AML
MGD007 (Macrogenics)	DART	CD3, gpA33	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	Colorectal cancer
AFM11 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD3, CD19	Retargeting of T cells to tumor	Phase I	NHL and ALL
AFM13 (Affimed Therapeutics)	TandAb	CD30, CD16A	Retargeting of NK cells to tumor cells	Phase II	Hodgkin's Lymphoma
GD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	T cells preloaded with BsAb	CD3, GD2	Retargeting of T cells to tumor	Phase I/II	Neuroblastoma and osteosarcoma
pGD2 (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	T cells preloaded with BsAb	CD3, Her2	Retargeting of T cells to tumor	Phase II	Metastatic breast cancer
EGFRBi-armed autologous activated T cells (Roger Williams Medical Center)	T cells preloaded with BsAb	CD3, EGFR	Autologous activated T cells to EGFR-positive tumor	Phase I	Lung and other solid tumors
Anti-EGFR-armed activated T-cells (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)	T cells preloaded with BsAb	CD3, EGFR	Autologous activated T cells to EGFR-positive tumor	Phase I	Colon and pancreatic cancers
rM28 (University Hospital Tübingen)	Tandem scFv	CD28, MAPG	Retargeting of T cells to tumor	Phase II	Metastatic melanoma
IMCgp100 (Immunocore)	ImmTAC	CD3, peptide MHC	Retargeting of T cells to tumor	Phase I/II	Metastatic melanoma
DT2219ARL (NCI, University of Minnesota)	2 scFv linked to diphtheria toxin	CD19, CD22	Targeting of protein toxin to tumor	Phase I	B cell leukemia or lymphoma
Duligotuzumab (MEHD7945A, Genentech, Roche)	DAF	EGFR, HER3	Blockade of 2 receptors, ADCC	Phase I and II Phase II	Head and neck cancer Colorectal cancer
LY3164530 (Eli Lily)	Not disclosed	EGFR, MET	Blockade of 2 receptors	Phase I	Advanced or metastatic cancer
MM-111 (Merrimack Pharmaceuticals)	HSA body	HER2, HER3	Blockade of 2 receptors	Phase II Phase I	Gastric and esophageal cancers Breast cancer
MM-141, (Merrimack Pharmaceuticals)	IgG-scFv	IGF-1R, HER3	Blockade of 2 receptors	Phase I	Advanced solid tumors
RG7221 (RO5520985, Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	Blockade of 2 proangiogenics	Phase I	Solid tumors
RG7716 (Roche)	CrossMab	Ang2, VEGF A	Blockade of 2 proangiogenics	Phase I	Wet AMD
TF2 (Immunomedics)	Dock and lock	CEA, HSG	Pretargeting tumor for PET or radioimaging	Phase II	Colorectal, breast and lung cancers
ABT-981 (AbbVie)	DVD-Ig	IL-1α, IL-1β	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase II	Osteoarthritis
ABT-122 (AbbVie)	DVD-Ig	TNF, IL-17A	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase II	Rheumatoid arthritis
COVA322	IgG-fynomer	TNF, IL17A	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase I/II	Plaque psoriasis
SAR156597 (Sanofi)	Tetravalent bispecific tandem IgG	IL-13, IL-4	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase I	Idiopathic pulmonary fibrosis
GSK2434735 (GSK)	Dual-targeting domain	IL-13, IL-4	Blockade of 2 proinflammatory cytokines	Phase I	(Healthy volunteers)
Ozoralizumab (ATN103, Ablynx)	Nanobody	TNF, HSA	Blockade of proinflammatory cytokine, binds to HSA to increase half-life	Phase II	Rheumatoid arthritis
ALX-0761 (Merck Serono, Ablynx)	Nanobody	IL-17A/F, HSA	Blockade of 2 proinflammatory cytokines, binds to HSA to increase half-life	Phase I	(Healthy volunteers)
ALX-0061 (AbbVie, Ablynx;	Nanobody	IL-6R, HSA	Blockade of proinflammatory cytokine, binds to HSA to increase half-life	Phase I/II	Rheumatoid arthritis
ALX-0141 (Ablynx, Eddingpharm)	Nanobody	RANKL, HSA	Blockade of bone resorption, binds to HSA to increase half-life	Phase I	Postmenopausal bone loss
RG6013/ACE910 (Chugai, Roche)	ART-Ig	Factor IXa, factor X	Plasma coagulation	Phase II	Hemophilia

4.3 L'anticorps bispécifique tétravalent (BsAb)

L'anticorps bispécifique tétravalent développé par l'équipe de Martine Cerutti (CNRS UPS3044) a été choisi pour ce projet de thèse pour ces avantages physico-chimiques décrit ci-dessous. De plus, le format de cet anticorps est bien adapté puisqu'il est bivalent pour chacune de ses cibles. Cela correspond bien aux complexes AMHR-II/AMHR-I qui comportent un dimère de chacun des récepteurs (**Figure 46**). Nous analyserons les propriétés et caractéristiques de ce BsAb à travers la publication de Golay et al 2016, qui détaille le BsAb HLADR-CD5.

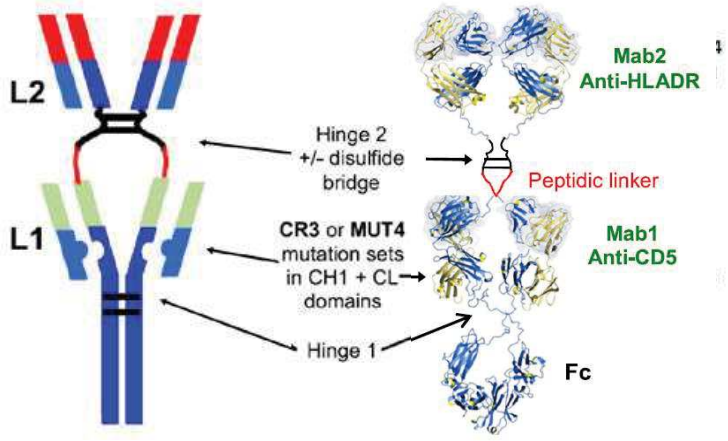


Figure 46: Format de l'anticorps bispécifique (BsAb) tétravalent pour les cibles HLADR et CD5
Schéma et structure 3D du BsAb développé par l'équipe de Martine Cerutti (CNRS UPS3044). Les domaines constants sont en bleu ; les VH/VL du premier anticorps sont en vert ; les VH/VL du deuxième anticorps sont représentés en rouge. (Golay et al.2016).

4.3.1 Format du BsAb tétravalent

Ce nouveau format original de BsAb a un poids moléculaire de 260 kDa (Golay et al., 2016). Sa Structure est analogue à une IgG1 et présente des sites de liaison à l'antigène de type tétramérique avec deux Fab appelés Mab1 et Mab2 superposés et liés par un peptide linker semi-rigide (STPPTPSPSGG) (**Figure 46**).

Des mutations ont été effectuées afin d'obtenir un appariement correct entre les chaines lourdes et légère des Mab1 et 2. Deux stratégies de mutation ont été comparées. La première est d'échanger des acides aminés plus ou moins chargés afin que les charges complémentaires forment un pont (CR3). La

deuxième option est de jouer sur le degré d'hydrophobicité et la polarité afin de renforcer l'appariement (MUT4). Cependant, nous détaillerons seulement les mutations CR3 car ce sont ces mutations qui ont été utilisées pour ce projet.

Dans la partie CH1, les auteurs remplacent l'acide aminé Thréonine^{192} par la glutamine chargée négativement et, dans la partie CL, l'Asparagine^{137} est remplacée par la lysine chargée de façon positive. Ces deux mutations de résidus forment un pont salin. De plus, la Sérine^{114} est substituée par l'alanine dans la partie CL pour éviter les collisions stériques. Ces mutations sont nommées CR3.

De plus, une substitution de paires de cystéine par des sérines est effectuée au niveau de la région charnière du Mab2 permettant au BsAb d'être plus flexible.

4.3.2 La liaison du BsAb tétravalent

La liaison des BsAb (CR3 ou MUT4) a été comparée à la liaison des anticorps monospécifique en cytométrie en flux sur différentes lignées cellulaires présentant les antigènes d'intérêt à des niveaux variables. Ces études ont montré que les mutations CR3 ou MUT4 n'interfèrent pas la liaison du BsAb. Cependant, la liaison du Mab 1 du BsAb (CD5xDR-CR3) est plus faible que son anticorps mono-spécifique (chCD5) (**Figure 47**).

De plus, des études par SPR effectuées pour déterminer les affinités a montré que le BsAb présente un taux de dissociation plus élevé que le monospécifique respectivement 1,11 x 10^{-4} et 1,76 x 10^{-6}. Ces variations de liaison et d'affinité du Mab1 sont dépendants de l'encombrement stérique causé par sa position interne. En revanche, la liaison du Mab2 issue du BsAb est similaire à son anticorps monospécifique.

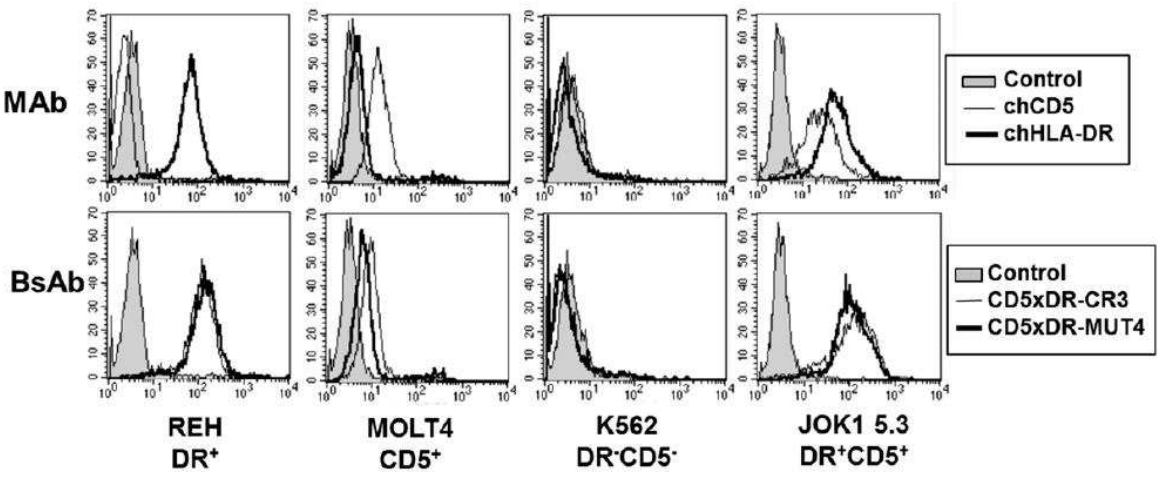


Figure 47 : Liaison des BsAb versus les anticorps parentaux
Cytométrie en flux sur les lignées cellulaires qui expriment plus ou moins les marqueurs CD5 et HLA-DR (Goaly et al., 2016)

4.3.3 La stabilité du BsAb tétravalent

La stabilité et l'agrégation sont souvent des problèmes majeurs dans les modèle de BsAb, car ce sont des molécules qui contiennent des domaine Fv ou ScFv peu stables (clivage protéolytique, ponts disulfure incomplets). Le BsAb tétravalent est de nature stable et présente une agrégation et une dégradation très limitées qui ont été évaluées par chromatographie d'exclusion de taille après stockage du BsAb pendant 16 mois à 4°C. La stabilité du BsAb est mesurée également après incubation de 10 mg/ml de BsAb à 37°C dans du sérum de souris pendant 15 jours. La liaison du BsAb a été mesuré par cytométrie en flux à différents moments et révèle une activité de liaison maintenue à 62% après 15 jours.

4.3.4 Activité du BsAb tétravalent médiée par le Fc

Les portions Fc des différents BsAb testés dans cette étude sont fonctionnels et sont capable d'agir comme médiateur cellulaire de l'immunité. Lors du ciblage simultané de CD5 et HLADR sur des modèles de leucémie, les BsAb induisent une forte activité CDC (cytoticité dépendante du complément), la dégranulation des cellules immunitaires NK ainsi que la phagocytose des cellules médié par les macrophages. Le développement de cet anticorps a déjà montré son efficacité thérapeutique *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de leucémie (Golay et al., 2016a).

Le BsAb tétravalent présente des caractéristiques avantageuses pour l'utiliser en tant que thérapie des cancers. De ce fait, nous avons collaboré avec l'équipe de Martine Cérruti (CNRS UPS3044) afin de mettre au point des bispécifiques qui ciblent à la fois AMHRII et chaque récepteur ALK (2,3,6) que nous utiliserons en traitement sur différents modèles de cancer de l'ovaire.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'effet anti-proliferatif de l'AMH *in vitro* et *in vivo* a été observé sur de nombreux modèles cellulaires, cellules souches ainsi que sur des cultures primaires de type ascites de patientes. Si cet effet est validé auprès de la communauté scientifique, l'effet prolifératif de l'AMH semble controversé. Récemment, deux publications relatent l'implication de l'AMH dans la survie et la prolifération en condition tumorale et physiologique. En 2016, la première montre que l'AMH active les voies de survie avec l'implication de la protéine AKT dans le cancer du poumon. En 2017, la deuxième montre qu'à faible dose l'AMH augmente la prolifération des cellules primaires de Sertoli. Suite à ces observations, l'AMH semble avoir des effets paradoxaux. Ce phénomène a déjà été décrit pour certains ligands de la famille TGF-β dont fait partie l'AMH.

Pour exercer son effet, l'AMH se fixe sur son récepteur spécifique AMHRII qui à son tour recrute un des récepteurs ALK2, ALK3 ou ALK6. Le choix du récepteur de type I (ALK2, ALK3 ou ALK6) qui s'associe à l'AMHR-II lors de la fixation de l'AMH et la conséquence de ce choix n'ont pas été étudiés en détail alors que ces récepteurs sont essentiels pour l'effet biologique de l'AMH. Nous partons de l'hypothèse que l'AMH peut s'associer avec chacun des récepteurs ALK et induire des signalisations différentes selon le récepteur choisi. Nohno et al avait déjà énoncé que différentes combinaisons de récepteurs engendrent différentes signalisations. Les récepteurs ALK sont des cibles potentielles puisqu'ils sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation initiant le développement cancéreux. Cependant, ils sont exprimés de manière ubiquitaire et donc leur ciblage en monothérapie causerait de sérieux effets secondaires. Par l'intermédiaire du récepteur AMHRII sur-exprimé dans les cancers, nous envisageons d'orienter la signalisation de l'AMH vers une voie apoptotique par le biais des anticorps bispécifiques. Sur ce principe nous avons utilisé le format de BsAb créé par l'équipe de Martine Cérutti, CNRS UPS 3044, particulièrement bien adapté puisqu'il est bivalent pour chacune de ses cibles. Cela correspond bien aux complexes AMHRII - ALK qui comportent un dimère de chacun des récepteurs.

Ma thèse se décline en deux parties. Une première partie qui consiste à étudier l'implication des récepteurs ALK2, ALK3 et ALK6 dans la signalisation de l'AMH dans les cancers de l'ovaire. La compréhension de l'implication des récepteurs ALK a conduit à une première stratégie thérapeutique : l'élaboration d'anticorps bispécifiques ciblant AMHRII-ALK2 et AMHRII-ALK3.

La deuxième partie se focalise sur l'effet « pro-tumoral » de l'AMH à faible dose et de son mécanisme d'action dans des modèles de cancers ovariens épithéliaux et de tumeur de la granulosa. Ces résultats ont conduit à développer une deuxième stratégie thérapeutique : la conception d'un anticoprs monoclonal bloquant l'activité de l'AMH.

RESULTATS ET DISCUSSION

Etat des lieux des thérapies ciblant l'axe AMH / AMHRII

L'ensemble des données sur l'expression de l'AMHR-II et sur la signalisation induite par l'AMH font de ce récepteur un candidat attractif pour la thérapie des cancers de l'ovaire.

La première stratégie consiste à utiliser l'AMH elle-même pour induire l'apoptose des cellules tumorales. Les travaux initiaux menés avec de l'AMH purifiée (Fuller et al., 1985) puis de l'AMH recombinante (Chin et al., 1991) ont montré les capacités de l'hormone à réduire la croissance de différents types de tumeurs *in vitro* et *in vivo* (A431, carcinome épidermoïde ; HT-3, carcinome du col utérin ; HEC-1-A, adénocarcinome de l'endomètre ; NIH-OvCar-3, adénocarcinome ovarien ; OM431, mélanome oculaire). Plus récemment, R. Pieretti-Vanmarcke et al. ont montré l'intérêt de l'association de l'AMH avec des chimiothérapies à faibles doses (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006). Enfin, la même équipe de PK. Donahoe a montré l'efficacité de l'AMH sur les cellules progénitrices de cancer permettant d'atteindre les cellules qui ne sont pas sensibles aux agents anti-cancéreux conventionnels (Szotek et al., 2006; Wei et al., 2010b; Meirelles et al., 2012b). Malgré tous ces éléments favorables, il y a un obstacle majeur à l'utilisation de l'AMH comme agent thérapeutique lié aux difficultés de production d'AMH recombinante active en grande quantité pour l'utilisation en clinique (Pépin et al., 2013). Malgré les progrès récents dans ce domaine, cet aspect biotechnologique demeure un verrou lié à la structure de l'hormone (di Clemente et al., 2010b).

La seconde stratégie consiste à développer des anticorps thérapeutiques. Notre équipe a développé le premier anticorps monoclonal dirigé contre l'AMHR-II, le 12G4 (Salhi et al., 2004). Dans le cadre d'un partenariat industriel, nous avons montré le potentiel thérapeutique du 12G4 dans les cancers ovariens (Kersual et al., 2014). La version humanisée de cet anticorps, le 3C23K, a confirmé son intérêt en monothérapie et en association avec les chimiothérapies à base de platine (Bougherara et al., 2017; Estupina et al., 2017b). Il a été licencié par la société Gamamabs Pharma qui a débuté les études cliniques de Phase I en 2016 (NCT02978755) et dont les résultats de phase II publiés en 2019 sont très encourageants. Cependant, ces effets sont essentiellement médiés par son activité ADCC d'où la nécessité de développer des nouveaux outils impliquant d'autres mécanismes d'action. Sur cette base, nos travaux de recherche visent à mieux comprendre les voies impliquées dans la signalisation de l'AMH afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques par anticorps.

Chapitre V : Implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH et stratégie thérapeutique associée

Dans cette première partie, nous mettons en évidence le rôle des récepteurs de type I (ALK2, ALK3, ALK6) dans la signalisation de l'AMH. Ces travaux sont réalisés dans des modèles de lignées cellulaires de cancers de l'ovaire de type stromal et épithélial, ainsi qu'avec des cellules primaires isolées d'ascites de patientes atteintes du cancer de l'ovaire. Le rôle des récepteurs ALK a été étudié au cours du développement et dans d'autres conditions physiologiques. Cependant peu de données existent en oncologie. Basal et al. ont analysé l'expression des récepteurs AMHRII, ALK2, ALK3 et ALK6 dans le cancer épithélial de l'ovaire (analyse immunohistochimique de 262 échantillons), mais n'ont pas évalué leur implication dans la carcinogénèse (Basal et al., 2016). De plus, aucune étude s'est intéressée à la mise en évidence du recrutement préférentiel des récepteurs ALK et de l'impact de leur association à AMHRII dans le cancer de l'ovaire.

Dans ce chapitre, nous détaillons le choix des modèles cellulaires pour notre étude selon l'expression des récepteurs de l'AMH à la membrane. Nous validons par la suite, sur ces différents modèles, l'effet pro-apoptotique de l'AMH recombinante produite selon le brevet de Pépin et al (Pépin et al., 2013). De plus, nous mettons en évidence le rôle des récepteurs ALK par invalidation de leur ARNm.

Ces travaux ont abouti au développement d'une première stratégie thérapeutique par anticorps bispécifiques ciblant à la fois les récepteurs AMHRII et ALK.

5.1 Caractérisation et rationnel des modèles d'étude

5.1.1 Profil d'expression d'AMHRII

5.1.1.1 Expression membranaire et intracellulaire des récepteurs AMHRII, ALK2, ALK3, ALK6 dans les lignées cellulaires

De nombreuses lignées cellulaires issues de cancers de l'ovaire, de l'endomètre, du col de l'utérus, de la prostate et du sein expriment le récepteurs AMHRII. La plupart des publications ont mis en évidence son expression totale par western blot et par PCR. Cependant, dans notre contexte avec l'utilisation des anticorps, une analyse de l'expression à la membrane des récepteurs AMHRII, ALK2, ALK3, ALK6 est indispensable (**Tableau 5**).

Tableau 5 : : Expression extra- et intracellulaire des récepteurs de l'AMH sur les lignées cellulaires de cancers ovariens
L'expression des récepteurs est représentée par l'intensité de fluorescence (Gmean) obtenue par cytométrie en flux. Utilisation d'anticorps isotypiques, d'anticorps anti-AMHRII (3C23K) couplé FITC, et des anti- ALK2,3,6 couplés Alexa fluor 647. Les cellules ont été perméabilisées pour effectuer le marquage intracellulaire.

		Extracellular (Gmean)						Intracellular (Gmean)					
Ovarian cancer type	Cell lines	Isotype	AMHRII	Isotype	ALK2	ALK3	ALK6	Isotype	AMHRII	Isotype	ALK2	ALK3	ALK6
Granulosa	COV434 *	0,64	0,87	0,34	4,7	2,34	2,31	0,63	72,55	0,84	10,5	9,72	9,33
	COV434-AMHRII *	0,46	4,58	0,48	5,06	3,83	2,48	0,63	63,05	0,85	11,85	12,43	9,21
	KGN	0,75	0,81	0,45	2,36	1,54	1,62	1,21	6,0	1,04	3,38	3,1	4,07
Epithelial	SKOV3	0,25	0,28	0,33	1,56	1,23	1,2	0,95	26,55	0,54	3,44	4,42	4,78
	SKOV3-AMHRII	0,39	3,13	0,62	5,3	3,03	3,02	0,94	34,74	0,53	5,15	4,06	6,76
	OVCAR5	0,34	0,48	0,35	0,31	0,36	0,2	0,27	0,43	0,48	1,56	1,65	2,55
	OVCAR8	0,73	0,83	0,34	2,57	3,73	1,49	1,66	70,19	1,32	12,48	13,92	9,75

Low expression — High expression

**COV434 : lignée cellulaire désignée à l'origine comme une lignée cellulaire juvénile de tumeur de la granulosa mais récemment redéfinie comme lignée cellulaire de carcinome ovarien à petites cellules de type hypercalcémique (SCCOHT) (Otte et al., 2012; Wang et al., 2017)*

Dans ce projet, nous avons sélectionné deux lignées cellulaires de la granulosa les COV434 et les KGN ainsi que deux lignées de cellules cancéreuses épithéliales SKOV3 et OVCAR8 afin de représenter les deux types majeurs de cancers de l'ovaire. En effet, le cancer épithélial représente 90% des cancers de l'ovaire et celui de la granulosa est le plus commun des cancers du stroma. La plupart des lignées expriment faiblement le récepteur AMHRII à la membrane. En revanche, la perméabilisation des cellules met en évidence une réserve intracellulaire importante du récepteur AMHRII. Cette réserve intracellulaire est également mise en évidence pour les récepteurs de type I (ALK2, ALK3, ALK6) en cytométrie en flux mais également en immunofluorescence (**Tableau 5** ; **Figure 48**).

Au cours de notre étude, nous avons observé que l'expression d'AMHRII décroit au fil des passages de nos lignées cellulaires. Pour ces raisons, des travaux antérieurs du laboratoire ont établi des lignées exprimant le récepteur AMHRII de manière stable à la membrane dans les COV434 et SKOV3 nommées respectivement, COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII. Nous observons que la transfection du récepteur

AMHRII influence le niveau d'expression des récepteurs ALK particulièrement pour la lignée SKOV3. En effet, la surexpression d'AMHRII augmente à la membrane l'expression d'ALK2 de près de 3,5 fois, ainsi qu'ALK3 et ALK6 d'environ 2,5 fois par rapport à la lignée native SKOV3-WT. En intracellulaire, nous observons également une augmentation de la réserve des récepteurs notamment pour ALK2 et ALK6 (**Figure 48**). Dans la lignée COV434-AMHRII, l'expression de ALK3, semble légèrement augmentée. Ces données mettent en évidence l'interaction des récepteurs ALK avec AMHRII ainsi que leur implication dans la signalisation de l'AMH. De plus, la réserve intracellulaire observée lors de la perméabilisation des cellules suggère une activité importante de ces récepteurs ALK avec un adressage rapide à la membrane.

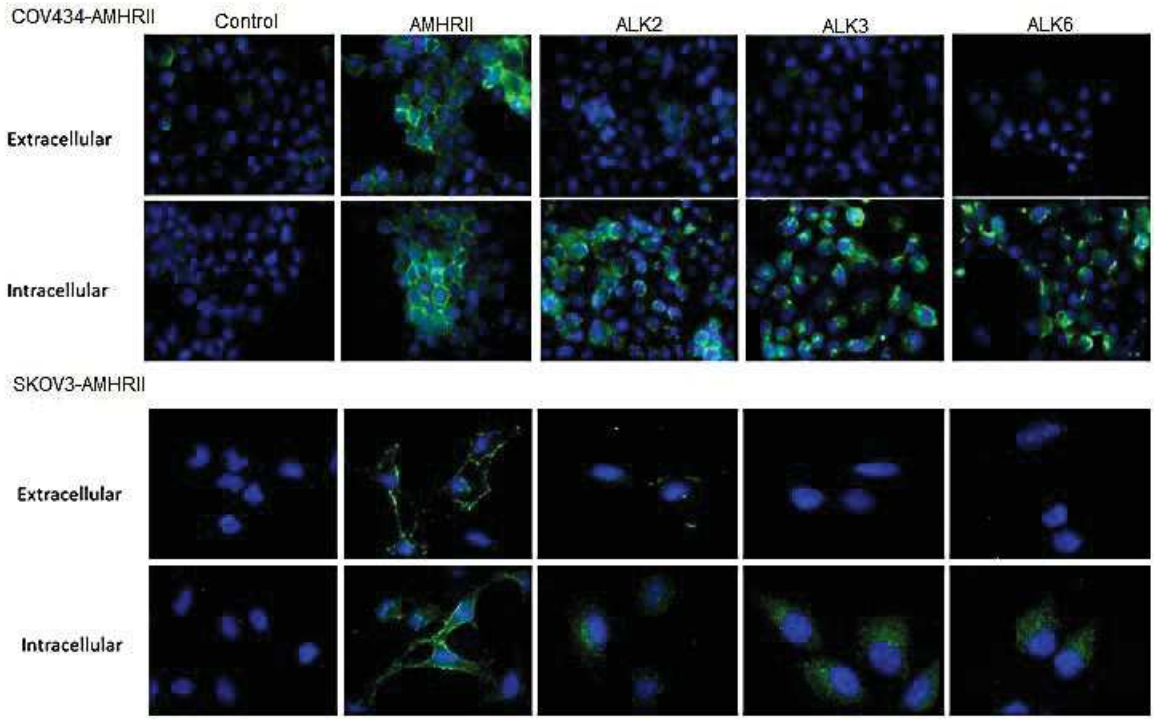


Figure 48 : Expression extra- et intracellulaire des récepteurs AMHRII, ALK2, ALK3 et ALK6 des cellules COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII

Analyse réalisée par immunofluorescence. Utilisation de l'anticorps contrôle négatif (P3X63), AMHRII (12G4), ALK2, ALK3, ALK6 marqués par un anticorps secondaire couplé FITC. N>3

5.1.1.2 Expression membranaire des récepteurs AMHRII, ALK2, ALK3, ALK6 dans les cellules isolées d'ascites de patientes

Pour valider la pertinence clinique de nos recherches, nous utilisons des cellules issues d'ascites de patientes atteintes du cancer ovarien. Grâce à notre collaboration avec l'Institut du Cancer de Montpellier (ICM) et le chirurgien Pierre-Emmanuel Colombo, nous pouvons bénéficier de prélèvements d'ascites de patientes. Nous avons fait le choix de sélectionner des patientes naïves de tout traitement. Dans ce cas, les cellules tumorales survivent mieux lors de la mise en culture. Nous isolons de ces prélèvements d'ascite les cellules tumorales que nous utilisons pour des tests biologiques les jours suivants. Ce modèle cellulaire sera particulièrement important pour relier nos résultats obtenus sur les lignées à la réalité clinique.

Au cours de ce projet, des ascites provenant de 7 patientes différentes nous ont été fournis avec des niveaux d'expression d'AMHRII et ALK variables (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Expression membranaire des récepteurs de l'AMH sur les cellules isolées d'ascites de patientes
L'expression des récepteurs est représentée par l'intensité de fluorescence (Gmean) obtenue par cytométrie en flux. Utilisation d'anticorps isotypiques, d'anticorps anti-AMHRII (3C23K) couplé FITC, et des anti- ALK2,3,6 couplés Alexa fluor 647. Analyse effectuée le premier jour de la réception de l'ascite.

	Extracellular (Gmean)					
Patient	**Isotype**	**AMHRII**	**Isotype**	**ALK2**	**ALK3**	**ALK6**
1	0,67	4,12	1,23	1,91	2,09	1,67
2	0,64	0,68	/	/	/	/
3	0,75	1,18	/	/	/	/
4	4	8,8	/	/	/	/
5	5,3	24,93	3,64	5,96	6,08	2,07
6	27,21	30,58	7,28	49,89	38,05	46,02
7	0,6	2,69	4,02	12,96	11,28	11,5

Low expression — High expression

La présence du récepteur AMHRII est déterminée par cytométrie en flux directement après la réception de l'ascite. Sur 7 prélèvements d'ascite, 6 présentent le récepteur AMHRII à la membrane avec des niveaux d'expressions variables (**Tableau 6**). Cependant, nous observons la perte du récepteur lors de la mise en culture des cellules au fil des passages, phénomène déjà observé dans nos lignées cellulaires (**Figure 49**). La diminution de l'expression du récepteur AMHRII in vitro suggère la présence d'un environnement favorable au maintien de son expression à la membrane en condition in vivo. De cette observation, nous avons donc effectué les tests biologiques d'intérêt dans les premiers jours qui suivent la mise en culture des cellules, période durant laquelle le récepteur AMHRII est toujours exprimé. Différents auteurs dont D. Pépin et al. et E. Basal et al. ont montré également que

de telles cellules expriment fortement l'AMHR-II et peuvent être utilisées pendant 3 à 5 passages après la biopsie.

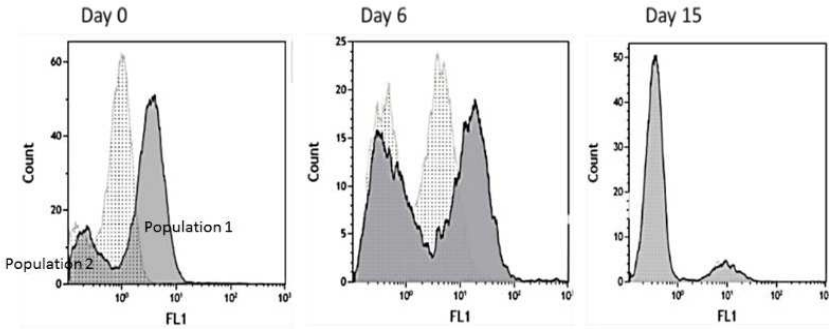


Figure 49: Expression du récepteur AMHRII au cours du temps
L'expression des récepteurs est représentée par le pic d'intensité de fluorescence (Gmean) obtenu par cytométrie en flux (patiente 1). Marquage des cellules par l'anticorps anti-AMHRII (3C23K) couplé FITC. L'analyse est effectuée le jour de la réception de l'ascite, puis 6 et 15 jours après.

Pour les cellules d'ascites des patientes 1 à 4, nous observons qu'au cours du temps les fibroblastes présents en culture prolifèrent plus rapidement et entraine une diminution de la population des cellules tumorales. D'autre part, l'expression d'AMHRII sur les cellules tumorales diminue également au cours du temps (**Figure 49**).

Il a été donc nécessaire d'isoler les cellules tumorales compte tenu de l'hétérogénéité cellulaire présente dans le liquide d'ascite. Par une première approche, nous avons tenté d'isoler les cellules AMHRII positives dans le but d'obtenir une population homogène de cellules tumorales. Cependant, La purification des cellules par billes couplées à l'anticorps anti-AMHRII (12G4) ainsi que le tri cellulaire par cytométrie en flux n'a pas permis d'isoler les cellules tumorales AMHRII positives puisque les cellules ne survivent pas lors de la remise en culture suite à ces essais (**Figure 50**).

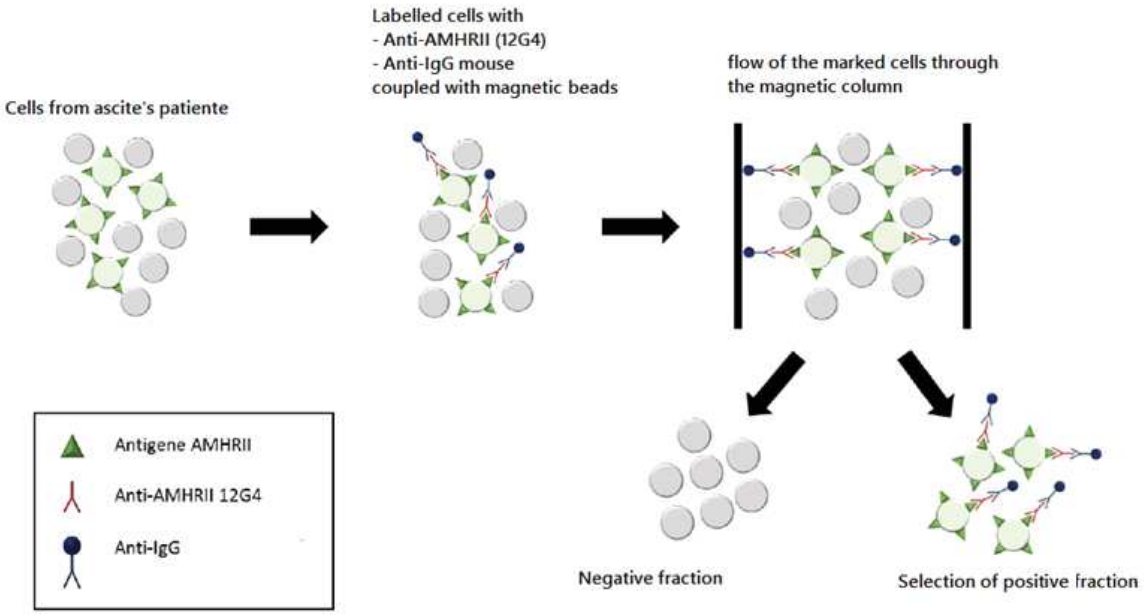


Figure 50 : Etapes du tri cellulaire par billes magnétiques

Dans une seconde approche, basé sur la publication de O'Donelle et al., nous avons ensemencé les cellules d'ascites des patientes 5, 6 et 7 en DMEM F12 complémenté en 10% de SVF. Au bout de 30 min, les cellules en suspension sont récoltées et ensemencées dans une autre boite de culture afin d'éliminer les fibroblastes déjà adhérants. Les cellules sanguines et les débris cellulaires n'adhérent pas dans les boites de culture, et ont pu être éliminés lors des changements de milieu (O Donnell et al., 2014). Après environ deux à trois passages des cellules, nous avons obtenu un enrichissement de cellules adhérentes tumorales et une population relativement homogène (**Figure 51**). Nous avons donc réalisé la plupart de nos tests biologiques sur ces 3 ascites (Patientes 5, 6 et 7).

Nous observons sur les 3 ascites que la morphologie des cellules est relativement similaire. Chez la patiente 5, nous avons obtenu une population homogène, exemptée de fibroblastes (**Figure 51**). De plus, l'expression membranaire des récepteurs AMHRII et ALK représenté par la Gmean de la population 1 est augmenté respectivement d'un facteur 4,7 et d'un facteur 2 en moyenne pour ALK2 et ALK3 par rapport à l'isotype contrôle (**Tableau 6**). Quant aux cellules d'ascites de la patiente 6 et 7 nous observons encore la présence de fibroblastes parmi les cellules tumorales (**Figure 51**). Chez la patiente 6, l'expression d'AMHRII est quasiment nulle (augmentation d'un facteur 1,12). Cependant, l'expression membranaire des récepteurs ALK2, 3, et 6 est élevée (augmentation d'un facteur 7 par rapport à l'isotype contrôle). Pour la patiente 7, l'expression d'AMHRII est augmenté d'un facteur 4,5 et d'un facteur d'environ de 3 pour les récepteurs ALK par rapport au contrôle isotypique (**Tableau 6**).

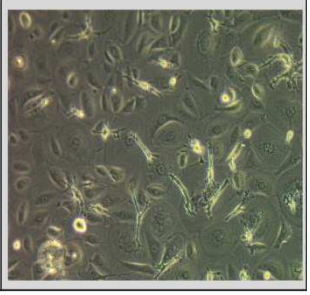
PATIENTS	Patient 5 10-10-18	Patient 6 18-02-19	Patient 7 17-04-19
CANCER TYPE	Epithelial : Serous ovarian carcinoma	Epithelial : Serous ovarian carcinoma	Epithelial : Serous ovarian carcinoma
MORPHOLOGY			

Figure 51 : Morphologie des cellules isolées d'ascites des patientes
Photo de la population cellulaire obtenue après 3 passages. Le niveau d'expression est représenté par le pic d'intensité de fluorescence analysé par cytométrie en flux après enrichissement de la population en cellules tumorales (passage 3).

5.1.2 Régulation de la production de l'AMH

L'AMH est une hormone sécrétée par les cellules de la granulosa pouvant jouer un rôle autocrine. Nous avons caractérisé nos lignées cellulaires par l'expression du récepteur AMHRII mais également par leur capacité à produire de l'AMH.

Conscients que la présence d'AMH bovine dans le SVF peut influencer nos résultats (Cate et al., 1986), nous avons réalisé des dosages de l'AMH dans différentes conditions de milieux de culture afin de déterminer la condition optimale nous permettant de mettre en évidence les effets exogènes de l'AMH recombinante ainsi que la signalisation liée à ces effets. Afin de limiter la concentration basale de l'AMH tout en permettant la croissance cellulaire, nous avons réalisé l'ensemble de nos expériences dans du milieu contenant 1% de SVF. Dans ces conditions, la concentration d'AMH endogène varie entre 5 et 10 pM (Dosages AMH Roche Elecsys e602, CHU Nîmes) largement en dessous des concentrations d'AMH exogènes utilisées (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Dosage de l'AMH dans différentes conditions de culture
Dosage effectué au CHU Nîmes par le kit de dosage Elecsys e602 Roche.

Medium	Conditions	Dosages AMH Roche Elecsys e602 (pM)
DMEM F12 Glutamax	0% SVF	<0.17
DMEM F12 Glutamax + SVF	1% SVF	9.5
DMEM F12 Glutamax + SVF	10% SVF	81.1

Les cellules ont donc été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 1% de SVF. La concentration est mesurée chaque jour durant 5 à 6 jours selon les lignées cellulaires. Dans un premier temps, nous avons comparé les COV434-WT et SKOV3-WT aux cellules transfectées COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII. Les lignées de la granulosa COV434-WT et transféctées COV434-AMHRII ne présentent pas de différences au niveau de leur production d'hormone dans le surnageant. En revanche, et de manière surprenante, l'expression du récepteur AMHRII dans la lignée SKOV3 initie la production d'AMH dans le milieu alors que les cellules SKOV3-WT n'en produisent pas. Nous observons également que les cellules d'ascites de patientes produisent de l'AMH de manière similaires aux lignées cellulaires (**Figure 52**). Cependant, des dosages supplémentaires doivent être effectués pour les lignées cellulaires KGN, OVCAR8 ainsi que les cellules d'ascites afin de confirmer ces premiers résultats. De manière générale, nous observons qu'en condition réduite de SVF (1%), les cellules se mettent à produire de l'AMH, ainsi la concentration d'AMH extracellulaire se stabilise aux alentours de 13 à 15 pM (Figure 52). Ces résultats suggèrent la présence d'une boucle de régulation permettant d'atteindre cet équilibre.

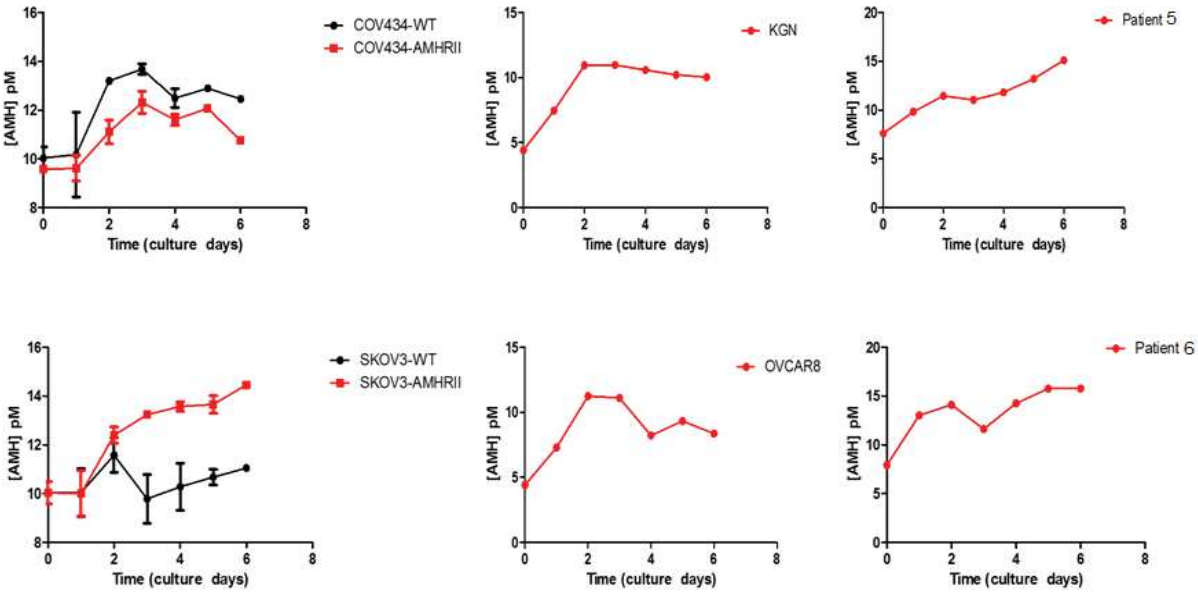


Figure 52 : Dosage de l'AMH dans le surnageant des lignées cellulaires et des cellules d'ascites
Prélèvement du milieu de culture des cellules une fois par jour durant 5 jours. Dosage réalisé par le kit ELISA de Roche Elecys e602. N=2 pour les COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII.

Les études précédentes révèlent qu'en condition appauvrit d'AMH (1%SVF), les cellules se mettent à sécréter l'hormone. A l'inverse, dans un milieu cette fois-ci enrichit en AMH exogène (25nM) nous nous sommes intéressés à la régulation de l'AMH au niveau de l'expression de son ARN messager (**Figure 53**). Sur la lignée cellulaire COV434-AMHRII, nous observons une diminution progressive de l'expression de l'ARNm de l'AMH, 25% à 24H et 50% à 48h. Sur la lignée SKOV3-AMHRII, l'AMH exogène entraine une diminution d'environ 50% de l'ARNm à 24H, en revanche à 48h nous observons un retour de l'expression à un niveau de base. Les cellules SKOV3-AMHRII semblent réguler plus rapidement le niveau d'expression d'AMH dans le milieu extracellulaire que les COV434-AMHRII. La présence d'AMH exogène contrôle la production d'AMH endogène, qui potentiellement exerce une boucle de rétrocontrôle négatif.

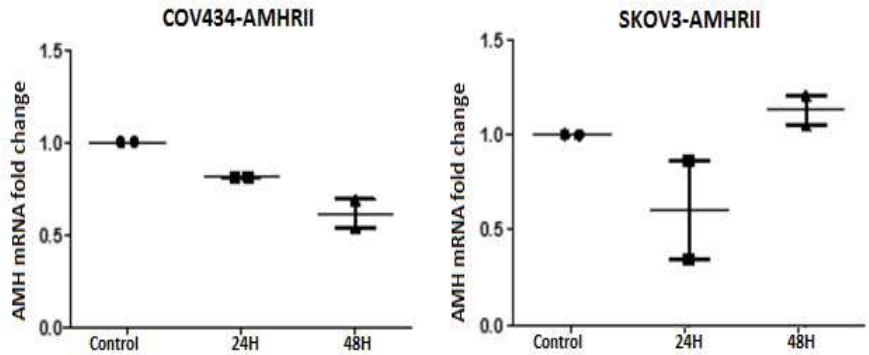


Figure 53 : Expression l'ARNm de l'AMH en présence d'AMH exogène
Les cellules sont traitées pendant 24h et 48h à 25nM de LR-AMH et l'expression de l'ARNm de l'AMH est analysée par RT-qPCR. N=2

5.2 Effet anti-tumoral de l'AMH

5.2.1 Structure et construction de l'AMH recombinante (LR-AMH)

Pour être active l'AMH doit subir un clivage protéolytique entre sa partie N-terminale et C-terminale sans se dissocier avant de se fixer à l'AMHR-II ce qui rend sa production difficile et son coût élevé (di Clemente et al., 2010b). Pour réaliser notre projet, nous avons fait produire de l'AMH recombinante (LR-AMH) fonctionnelle par la société Evitria AG (Zürich) selon le brevet de Pépin et al., (Pépin) . La LR-AMH est optimisée afin d'augmenter (i) sa production grâce à l'ajout d'un peptide codant pour l'albumine humaine et (ii) son activité biologique par l'insertion d'une mutation Q425R permettant d'améliorer le clivage protéolytique (**Figure 54**) (Pépin et al., 2013).



Figure 54 : Construction du vecteur de la LR-AMH
Schéma adapté de la publication de Pépin et al 2015.

La LR-AMH a été produite en cellule CHO par la société Evitria AG. Elle est comparée par Western blot avec l'AMH contrôle commercialisée par Origen (TP308397) (**Figure 55**). La révélation est réalisée avec un anticorps polyclonal anti-AMH (abcam) qui reconnait la partie C-terminale de l'AMH. L'AMH contrôle correspond à la glycoprotéine précurseur, un homodimérique de 140kDa, composé de deux monomères de 70kDa liés par deux ponts disulfures. Quant à la LR-AMH, elle est présente sous forme de monomère de 70 kDa. Nous observons que la LR-AMH est totalement clivée puisqu'un seul fragment est observé à environ 17kDa qui correspond à la partie C-terminal de l'AMH, partie biologiquement active. La LR-AMH est donc produite à 100% sous forme clivée. Un milieu de culture sans SVF a été utilisé comme témoin négatif.

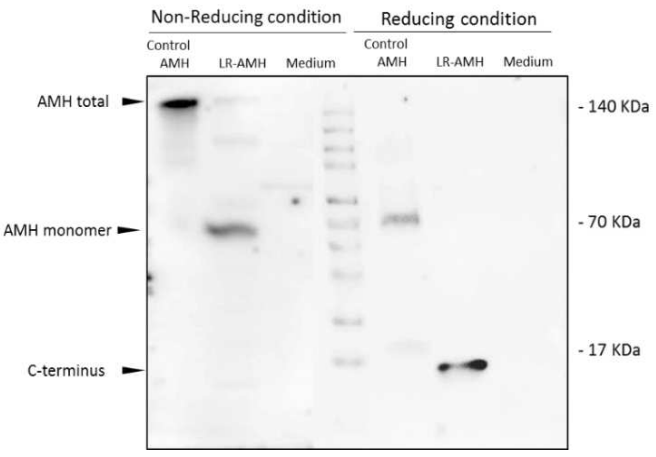


Figure 55 : Analyse par Western blot de la LR-AMH
Comparaison de la LR-AMH et de l'AMH commerciale d'Origen en condition non réduite et réduite.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'effet biologique de l'AMH. Nous avons analysé l'effet de la LR-AMH sur le niveau de la phosphorylation des protéines SMAD1/5 (p-SMAD1/5) au cours du temps et à doses croissantes. Ces résultats nous ont permis de déterminer les conditions expérimentales optimales et de valider la fonctionnalité de la protéine recombinante LR-AMH. De plus, nous avons analysé l'effet biologique de la LR-AMH notamment sa capacité à induire de l'apoptose dans nos modèles de lignées cellulaires COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII.

5.2.2 La signalisation p-SMAD1/5

Les protéines SMAD1/5 sont les premiers effecteurs de la cascade de signalisation de l'AMH. Afin de mieux comprendre le déroulement de cette signalisation au cours du temps, nous avons traité les COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII à 25nM de LR-AMH et observé par western blot le niveau de p-SMAD1/5 au cours du temps (0 à 6h). L'augmentation de p-SMAD1/5 est visible à partir de 30min et 1h, respectivement, pour les COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII. Le niveau de p-SMAD1/5 est maximal entre 3 et 6h (**Figure 56**A). Nous avons également testé le niveau de p-SMAD1/5 sur une gamme de concentration de LR-AMH allant de 0 à 25nM. L'augmentation de la phosphorylation est dose dépendante sur nos deux lignées transfectées et prend effet à partir de 1,6 nM de traitement par la LR-AMH. Nous pouvons également observer cette augmentation pour les COV434-WT mais de manière moins sensible puisque la p-SMAD1/5 augmente à 6,25 nM d'AMH. En revanche, aucun effet n'est visible pour les SKOV3-WT car le récepteur AMHRII n'est pas exprimé à la membrane (**Figure 56**B).

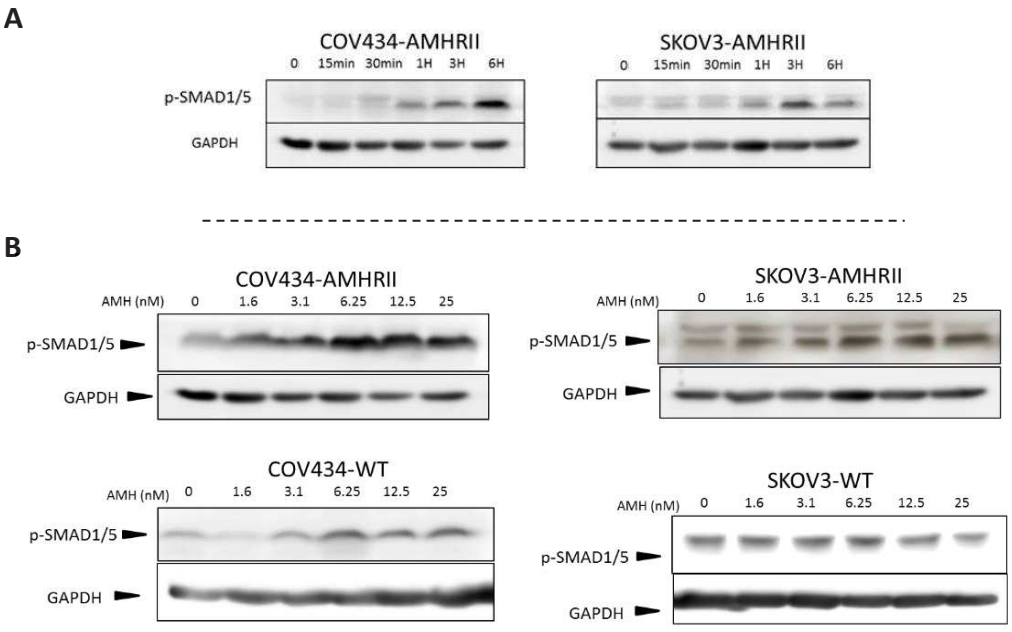


Figure 56 : Effet de la LR-AMH sur la phosphorylation de SMAD1/5
A) Analyse par Western blot du niveau de p-SMAD1/5 évaluée au cours du temps à 25nM de traitement. B) Analyse par Western blot du niveau de p-SMAD1/5 à doses croissantes de LR-AMH (0-25nM) pendant 6h sur les lignées COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII. N>3

5.2.3 Induction de l'apoptose

L'induction de l'apoptose engendrée par l'AMH a été largement étudiée et cela dans de nombreux modèles cellulaires de cancers ovariens, du sein et de la prostate. Nous avons donc validé l'effet apoptotique de la LR-AMH et déterminé les doses auxquelles celle-ci est induite. Pour cela, nous avons traité nos lignées cellulaires à doses croissantes d'AMH de 0 à 25nM et mis en évidence l'induction de l'apoptose selon plusieurs tests biologiques en analysant l'activité enzymatique des caspase 3/7 (**Figure 57**A), le clivage de la caspase 3 et de PARP en Western blot (**Figure 57**B), ainsi que par le kit Annexin V – 7AAD en cytométrie en flux (**Figure 57**C).

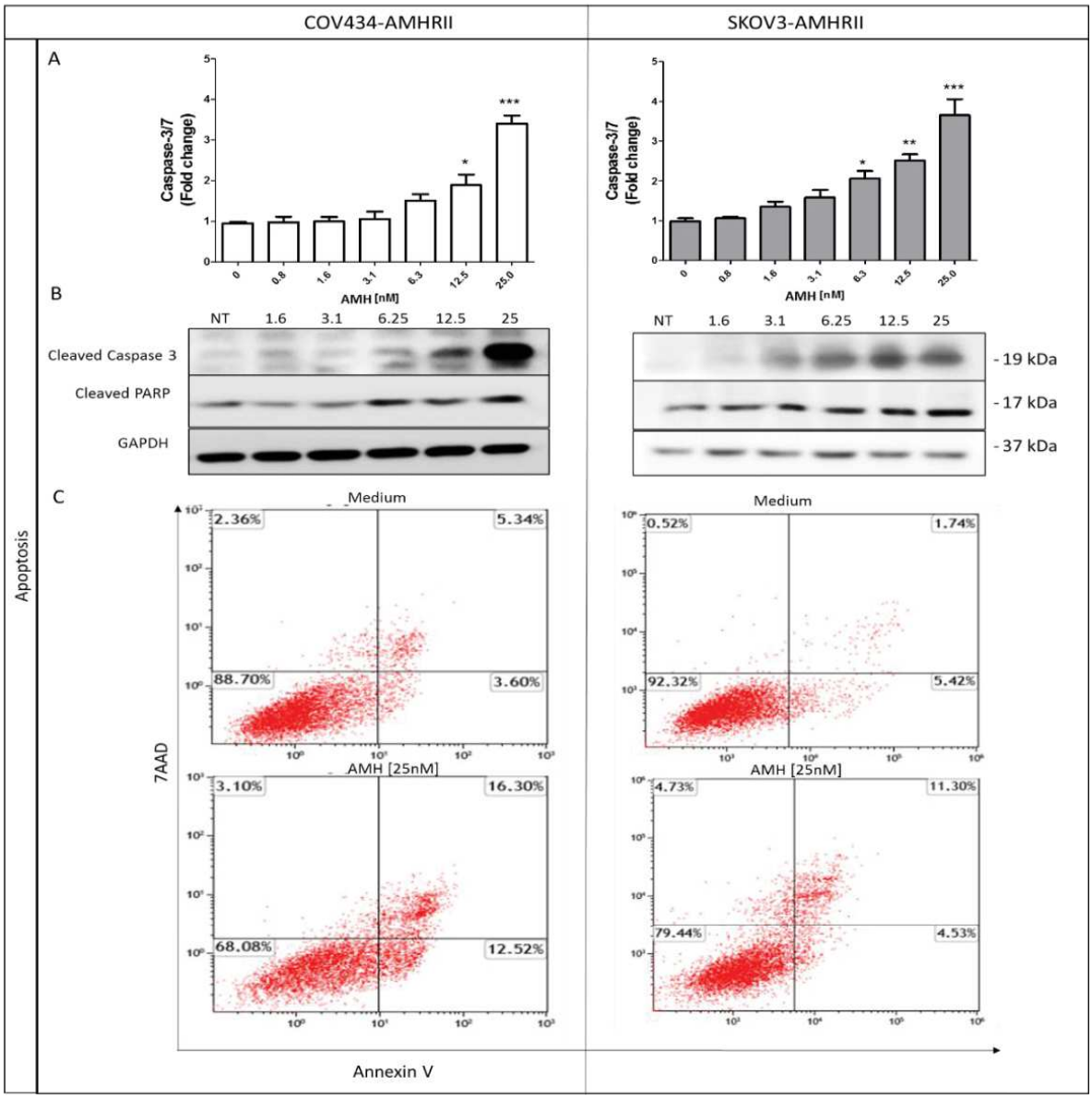


Figure 57 : Induction de l'apoptose des cellules traitées par la LR-AMH
Effet de la LR-AMH à doses croissantes (0 – 25nM) pendant 6h sur les cellules COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII. A) Activité de la caspase 3/7 mesurée par bioluminescence. B) clivage de caspase 3 et PARP en Western blot. C) Apoptose mise en évidence par le kit Annexin V – 7AAD après incubation à 25 nM de LR-AMH pendant 24h et analysée en cytométrie en flux. N>3

Dans un premier temps, nous avons testé à des doses croissantes de LR-AMH l'activité enzymatique de caspase 3/7 par le test de bioluminescence Caspase 3/7 Glo (Promea) ainsi que l'expression en Western blot des protéines impliquées dans la voie apoptotique (clivage de caspase 3 et PARP). D'après les deux techniques, nous observons une augmentation dose dépendante de l'activité enzymatique des caspases 3/7 avec 3,5 fois plus d'activité des caspases dans les cellules traitées avec la LR-AMH (25nM) comparé au contrôle. En accord avec le test d'activité des caspases nous avons mis en évidence l'augmentation du niveau d'expression des protéines caspase 3/7 et PARP clivées en Western blot à 6h de traitement par la LR-AMH.

L'apoptose est caractérisée par la condensation de l'ADN formant des corps apoptotiques et l'apparition de la phosphatidylsérine qui migre du feuillet interne de la membrane au feuillet externe. L'apoptose peut donc être détectée par cytométrie en flux via la fixation spécifique de l'A*nnexine V* (couplée au fluorochrome FITC) sur la phophatidylserine et combinée avec un marqueur de viabilité le 7AAD. L'incubation de la LR-AMH à 25nM pendant 24h induit l'apoptose des cellules COV434-AMHRII par rapport aux cellules non traitées (12,5% contre 3,6% des cellules positives à l'AnnexinV, et 16,3% contre 5,3% de cellules positives à l'AnnexinV/7AAD) et, dans une moindre mesure, également dans les cellules SKOV3-AMHRII (4,5 % contre 5,4 % de cellules positives à l'annexin V et 11,3 % contre 1,7 % de cellules positives à l'Annexin V/7AAD) (Figure 57).

5.2.4 Inhibition de la survie clonogénique

Meirelles et al. en 2012 avait déjà montré via ce test de survie clonogénique la capacité de l'AMH (50µg/ml ; 357 nM) à inhiber la survie des cellules souche issues de lignée OVCAR5. Barbie et al en 2003 observe également l'inhibition de la survie des cellules issues du cancer du col de l'utérus après traitement à l'AMH (71nM), puis Renaud et al en 2005 sur des lignées de l'endomètre.

Nous avons également réalisé des tests de survie clonogénique aux mêmes doses croissantes de LR-AMH. Ce test biologique permet de révéler la capacité d'un traitement à inhiber la survie et la prolifération des cellules. Ce test colorimétrique s'analyse par un comptage des clones qui se développent à partir d'une cellule unique. Dans les cas où les cellules ne forment pas des clones bien isolés nous effectuons une décoloration des cellules marquées au Giemsa.

Dans nos deux modèles cellulaires, COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII, la survie clonogénique est diminuée de manière dépendante à la dose de LR-AMH (0 – 25 nM). Pour la lignée COV434-AMHRII, l'analyse de la survie clonogénique est évaluée par un comptage des clones, la diminution est effective à partir de 1,6nM et diminue de plus de 50% à 25nM de LR-AMH. Pour la lignée SKOV3-AMHRII, la survie clonogénique est estimée par la densité optique (595nM) suite à la décoloration des cellules. La

survie clonogénique est diminuée de 25% à partir de 3,1nM de LR-AMH et décroit jusqu'à 50% à 25nM (**Figure 58**). Ces résultats sont directement corrélés aux effets décrits sur la signalisation p-SMAD1/5 et l'apoptose (**Figure 57**).

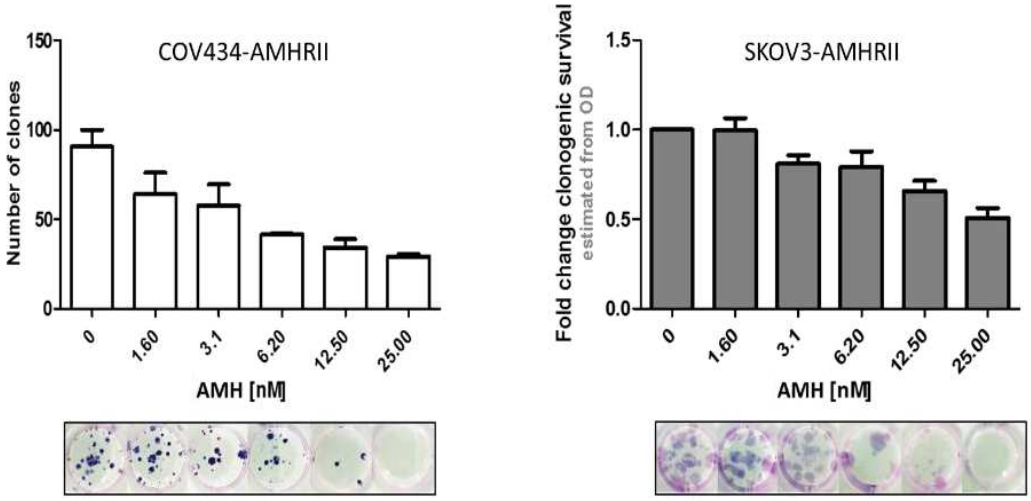


Figure 58 : Inhibition de la survie clonogénique doses dépendantes d'AMH
La survie clonogénique est quantifiée après traitement de 1,6 à 25 nM de LR-AMH pendant 11 jours par comptage direct des clones (cellules COV434-AMHRII) ou par estimation du nombre de clones par densité optique (DO) à 595 nm après décoloration cellulaire (cellules SKOV3-AMHRII). N>3

5.2.5 Inhibition de la migration

En plus des effets directs sur la survie, plusieurs études montrent que l'AMH participe au contrôle de la tumorigenèse en inhibant la migration des cellules tumorales. Dans la fonction reproductrice mâle plusieurs études ont décrit l'implication de la voie WNT/β-caténine. En effet, la β-caténine s'accumule dans le mésenchyme des canaux de Müller et est nécessaire à la régression de ces canaux (Allard et al., 2000; Kobayashi et al., 2011).

Nous avons de ce fait réalisé des tests de « wound healing assays » qui consiste à appliquer une blessure sur le tapis cellulaire à confluence et analyser le temps de cicatrisation en présence ou non d'AMH. Cet essai a été réalisé uniquement sur les lignées épithéliales SKOV3-WT et SKOV3-AMHRII car elles possèdent les capacités migratoires nécessaires pour réaliser ce test contrairement aux cellules COV434. L'effet de la LR-AMH sur la migration est évalué pendant 48h et représenté par le pourcentage de surface de la blessure. Sur les SKOV3-AMHRII, nous observons que le traitement à 25nM de LR-AMH

inhibe la migration cellulaire puisque la surface de la blessure est de 81% au lieu de 49% pour les cellules non traitées. Sur les SKOV3-WT l'effet obtenu de la LR-AMH sur la migration n'est significativement pas différent par rapport aux cellules non traitées (9% au lieu de 0%). A nouveau, les SKOV3-WT ne présentant pas le récepteur AMHRII ne sont pas sensibles aux effets de l'AMH. (**Figure 59**).

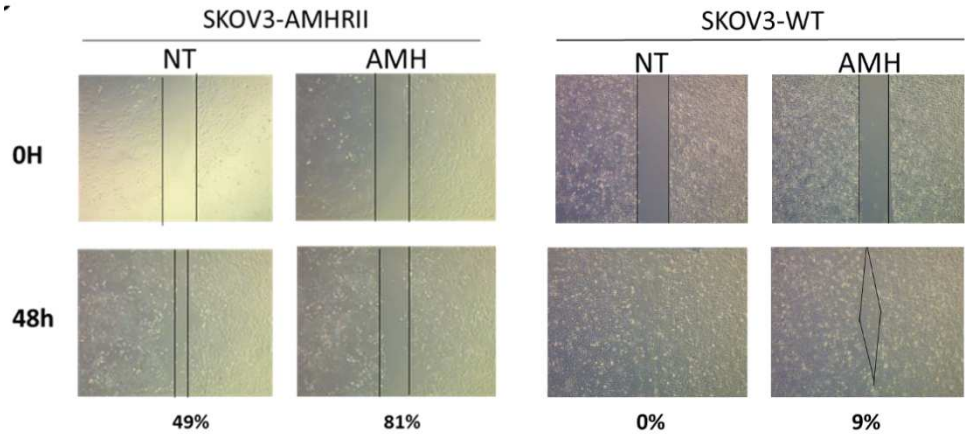


Figure 59 : Inhibition de la migration par la LR-AMH
Migration analysée par le test de « wound healing » en présence ou non de LR-AMH 25 nM pendant 48h. L'aire de la blessure est représentée en % de la surface par rapport à la blessure initiale. Utilisation de la lignée SKOV3-WT comme contrôle négatif. N>3

Au travers de nombreux tests biologiques, nous avons mis en évidence que la LR-AMH inhibe la survie des cellules par l'activation de la voie apoptotique impliquant caspase 3 et PARP clivé. Ces résultats ont confirmé que les cellules COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII sont des modèles pertinents pour étudier la signalisation AMH.

Cet effet a été aussi décrit dans la bibliographie, et fait de cette hormone une cible attractive pour la thérapie des cancers gynécologiques. Cependant, l'étude de sa signalisation se limite à certaines protéines clées comme SMAD1/5, β-caténine et NF-ƙB. De plus, aucune étude en oncologie ne décrit le rôle des récepteurs de l'AMH de type I (ALK2, ALK3, ALK6), pourtant essentielle dans l'induction du signal de l'AMH et dans le devenir cellulaire.

5.3 Implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH

5.3.1 Invalidation des récepteurs ALK par siRNA « small interfering RNA »

Les récepteurs ALK sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires en s'associant avec les récepteurs de type II de différent ligand. L'implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH n'est pas clair, notamment concernant l'association du récepteur ALK avec AMHRII. En condition physiologique, l'hétérodimérisation AMHRII-ALK est dépendante du type cellulaire mais aussi d'une association qui est spatio-temporelle (Zhan et al., 2006). A ce jour dans un contexte tumoral, le rôle des récepteurs ALK associé à AMHRII n'a pas été décrit. Le but de cette étude est de comprendre leurs implications respectives dans différents modèles de cancers ovariens par le biais de siRNA permettant d'invalider le gène de chacun des récepteurs ALK (ALK2, ALK3, ALK6) et ainsi analyser l'impact de ces siRNA sur la signalisation de l'AMH.

En raison de l'importance de ces récepteurs dans différentes fonctions cellulaires essentielles, l'extinction de l'expression de ces récepteurs par shRNA est létale pour ces cellules. L'établissement de lignées shRNA dirigés contre les récepteurs ALK a réduit nettement la croissance cellulaire ou induit la mort cellulaire sur certaines lignées. Le choix s'est donc porté sur l'invalidation des gènes de façon transitoire par le biais de siRNA. L'efficacité des siRNA dirigée contre chacun des récepteurs ALK a été évaluée par RT-PCR et Western blot. Les analyses ont montré qu'un mélange de trois siARNs contre ALK2 (siALK2) et un mélange de trois siARNs contre ALK6 (siALK6) inhibe efficacement leur expression. En revanche, la combinaison des trois siRNAs contre ALK3 (siALK3) est moins efficace, en particulier dans les cellules COV434-AMHRII (**Figure 60**A). Afin d'étudier l'impact des siALK sur la signalisation de l'AMH, les cellules transfectées avec les siRNA ont été traitées avec la LR-AMH à 25nM pendant 6h. Les cellules transfectées siALK2 et siALK6 puis traitées avec la LR-AMH induisent la phosphorylation de SMAD1/5 au même niveau que les cellules contrôles (siMock). A l'inverse, les cellules siALK3 inhibent la p-SMAD1/5 induite par la LR-AMH (**Figure 60**B). De plus, le siAlk3 réduit d'environ 25 % l'activité caspase3/7 et diminue l'expression de caspase 3 et PARP clivé en Western blot par rapport au siRNA témoin (**Figure 60**C) contrairement au siALK2 et siALK6 dont les effets ne sont pas différents du siRNA témoin. Ces résultats indiquent que, malgré une invalidation incomplète du gène ALK3, la signalisation de l'AMH est réduite dans les cellules siALK3. Cela montre qu'ALK3 est le récepteur de type I préférentiellement recruté par AMHRII pour la signalisation de l'AMH dans les cellules cancéreuses ovariennes (**Figure 60**).

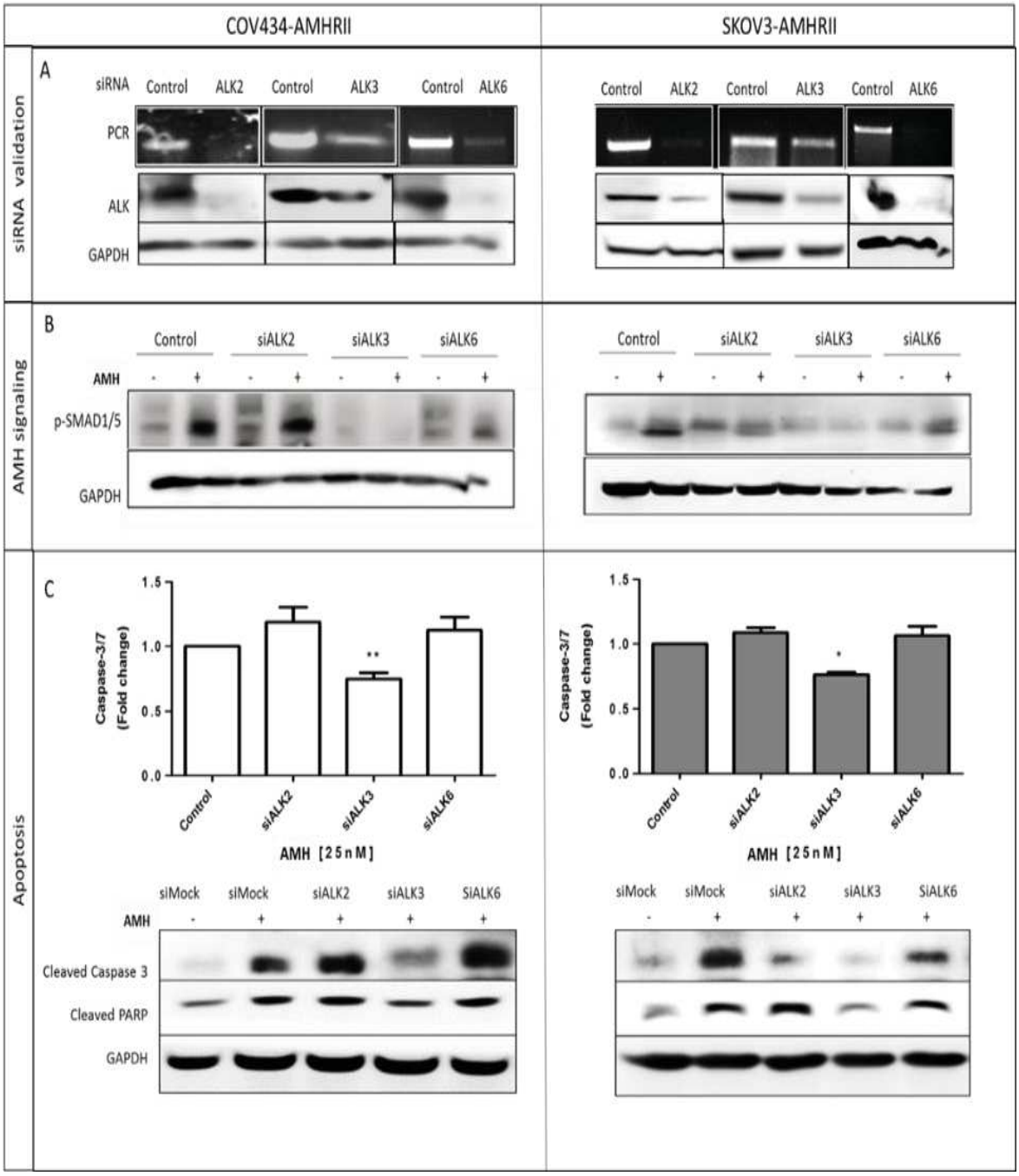


Figure 60 : Implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH

A) Efficacité des différents siRNAs analysée par rt-PCR et Western blot 48 heures après transfection. B) La phosphorylation SMAD1/5 est évaluée après incubation avec 25 nM d'AMH pendant 6 heures (48 heures après transfection de siRNA). C) L'initiation de l'apoptose (activité caspase 3/7 et clivage caspase 3 et PARP) est analysée après incubation avec 25 nM d'AMH pendant 6 heures (48 heures après transfection de siRNA). N >3

5.3.2 Recrutement des récepteurs ALK à la membrane cellulaire en présence d'AMH

Nous avons par la suite étudié l'effet de l'AMH sur l'expression des récepteurs AMHRII, ALK2, ALK3 et ALK6 dans les quatre lignées de cellules cancéreuses ovariennes AMHRII-positives suivantes : COV434-AMHRII (tumeur stromale du cordon sexuel), SKOV3-AMHRII (cancer épithélial), OVCAR8 (cancer épithélial) et KGN (tumeur granulosa). L'analyse par immunofluorescence (IF) a montré qu'AMHRII et ALK2 étaient clairement exprimés dans les quatre lignées cellulaires à l'état basal (1% SVF correspondant à 10 pM AMH). L'expression d'AMHRII n'est pas modulée par l'incubation avec 25 nM de LR-AMH pendant 90 minutes alors que l'expression de ALK2 et ALK3 à la membrane varie. Nous observons que l'expression de ALK2 tend à diminuer alors que l'expression d'ALK3 qui n'est pas détectable par IF à l'état basal est induite par l'addition de la LR-AMH dans les quatre lignées cellulaires. En revanche, ALK6 n'est pas détectable dans les deux conditions expérimentales. Puisque nous avons également montré qu'ALK6 ne semble pas être impliqué dans l'effet induit de l'AMH par le biais de siRNA-ALK6 nous ne l'inclurons pas dans la suite de notre projet (**Figure 61**).

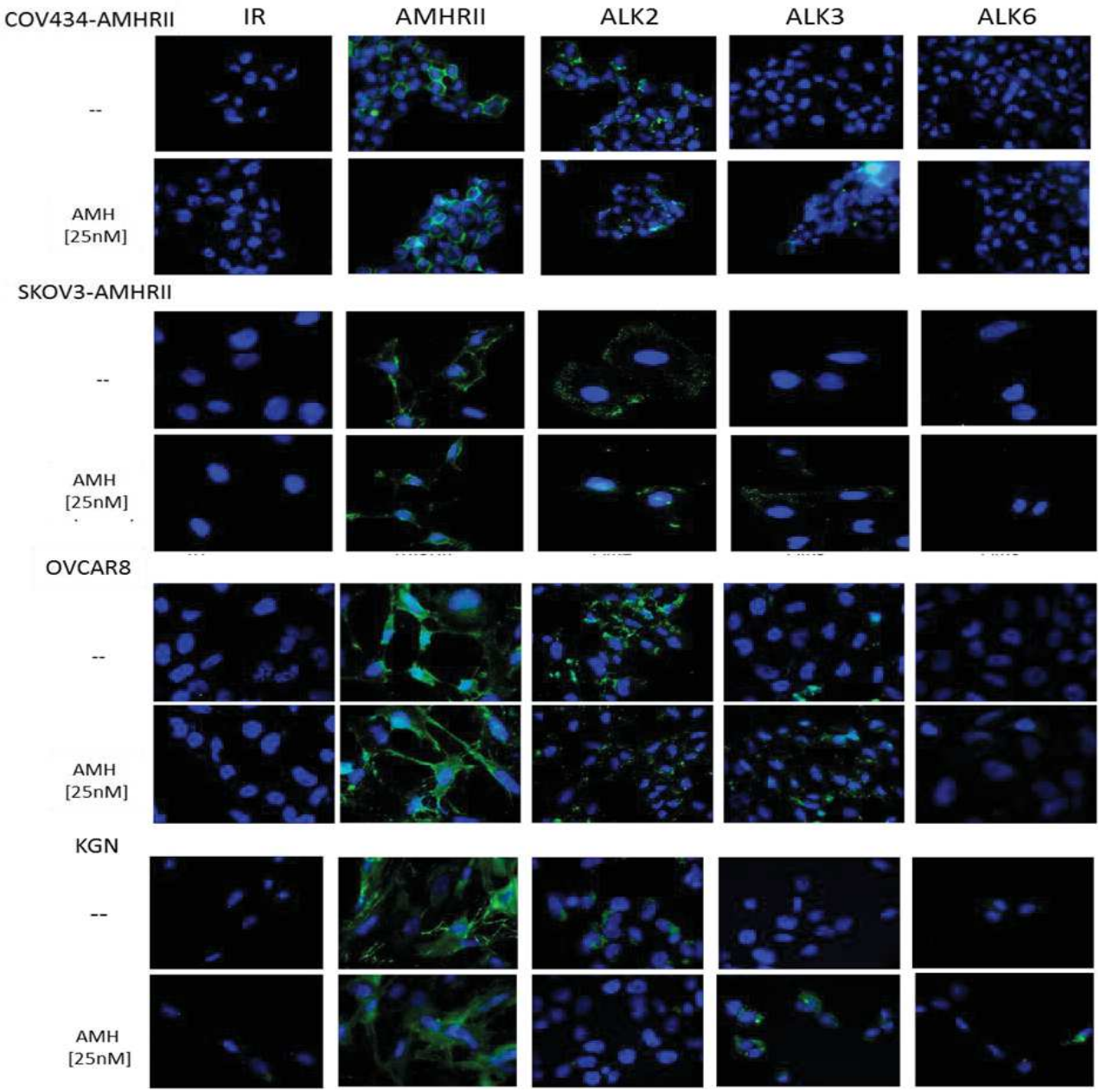


Figure 61 : Expression membranaire des récepteurs AMHRII et ALK2, 3,6 à la membrane des lignées cellulaires
Analyse par immunofluorescence de l'expression d'AMHRII, ALK2, ALK3 et ALK6 dans des conditions basales (-) et après incubation avec 25 nM LR-AMH pendant 90 minutes.

5.3.3 Mise en évidence de l'hétérodimérisation AMHRII-ALK en présence d'AMH

Afin de confirmer les résultats précédents et de mettre en évidence l'hétérodimérisation AMHRII –ALK en présence du ligand nous avons traité au préalable les cellules à 25nM de LR-AMH et réalisé une co-immunoprécipitation (CO-IP). L'anticorps de capture utilisé cible le récepteur AMHRII (3C23K). Nous observons qu'en condition basale (AMH 10 à 15 pM) ALK2 est le récepteur majoritairement représenté avec AMHRII. En revanche, lors du traitement à l'AMH à 25nM, comme visualisé en IF, ALK2 tend à diminuer alors que ALK3 devient le nouveau partenaire AMHRII. Cette observation est nettement montrée par CO-IP pour la lignée COV434-AMHRII et dans une moindre mesure pour les cellules SKOV3-AMHRII (**Figure 62**).

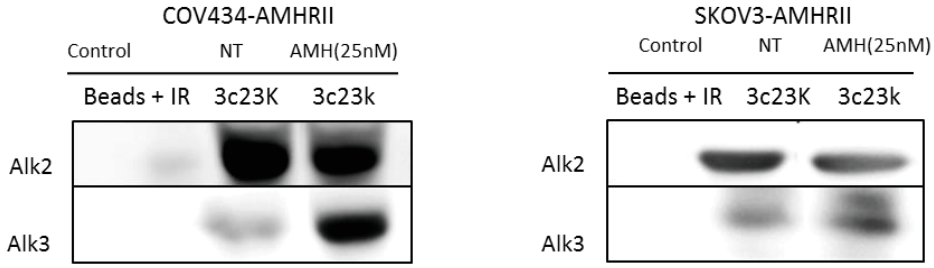


Figure 62 : Mise en évidence de l'hétérodimérisation des récepteurs AMHRII-ALK en présence de LR-AMH
Analyse par Western blot de la co-immunoprécipitation par l'anticorps de capture anti-AMHRII (3C23K), et révélation des récepteurs par des anticorps anti-ALK2 et anti-ALK3. N=2.

5.3.4 Expression des récepteurs ALK2, ALK3 et protéine de signalisation de l'AMH

Afin de déterminer le rôle des récepteurs ALK2 et ALK3, nous avons évalué leur expression et celle des protéines de signalisation de l'AMH par Western blot en condition basale et après incubation avec la LR-AMH (0 - 25 nM) pendant 24h heures. Dans les quatre lignées cellulaires, l'expression basale d'ALK2 est diminuée lors de traitement à doses croissante d'AMH pour devenir quasiment indétectable en présence de la LR-AMH à partir de 6,25 ou 12,5 nM selon la lignée cellulaire. Cette diminution dose dépendante est aussi observée pour la phosphorylation d'AKT qui a été décrite récemment comme étant impliquée dans la signalisation de l'AMH (Beck et al., 2016). Inversement, l'expression de ALK3 augmente sous l'effet de l'AMH. De plus, l'activité de la phosphorylation de SMAD1/5 ainsi que le clivage caspase 3 et PARP sont augmentés parallèlement à l'expression d'ALK3 (**Figure 63**).

Ces résultats confirment que dans les cellules de carcinome ovarien, ALK3 est le principal récepteur de type I associé à AMHRII en présence du ligand pour induire l'apoptose (à partir de 6 nM environ d'AMH). A l'inverse, ALK2 est exprimé en condition basale (environ 10 pM d'AMH) puis son expression est réduite. De manière intéressante, nous mettons en évidence que les récepteurs ALK2 et ALK3 ont des rôles opposés (**Figure 63**).

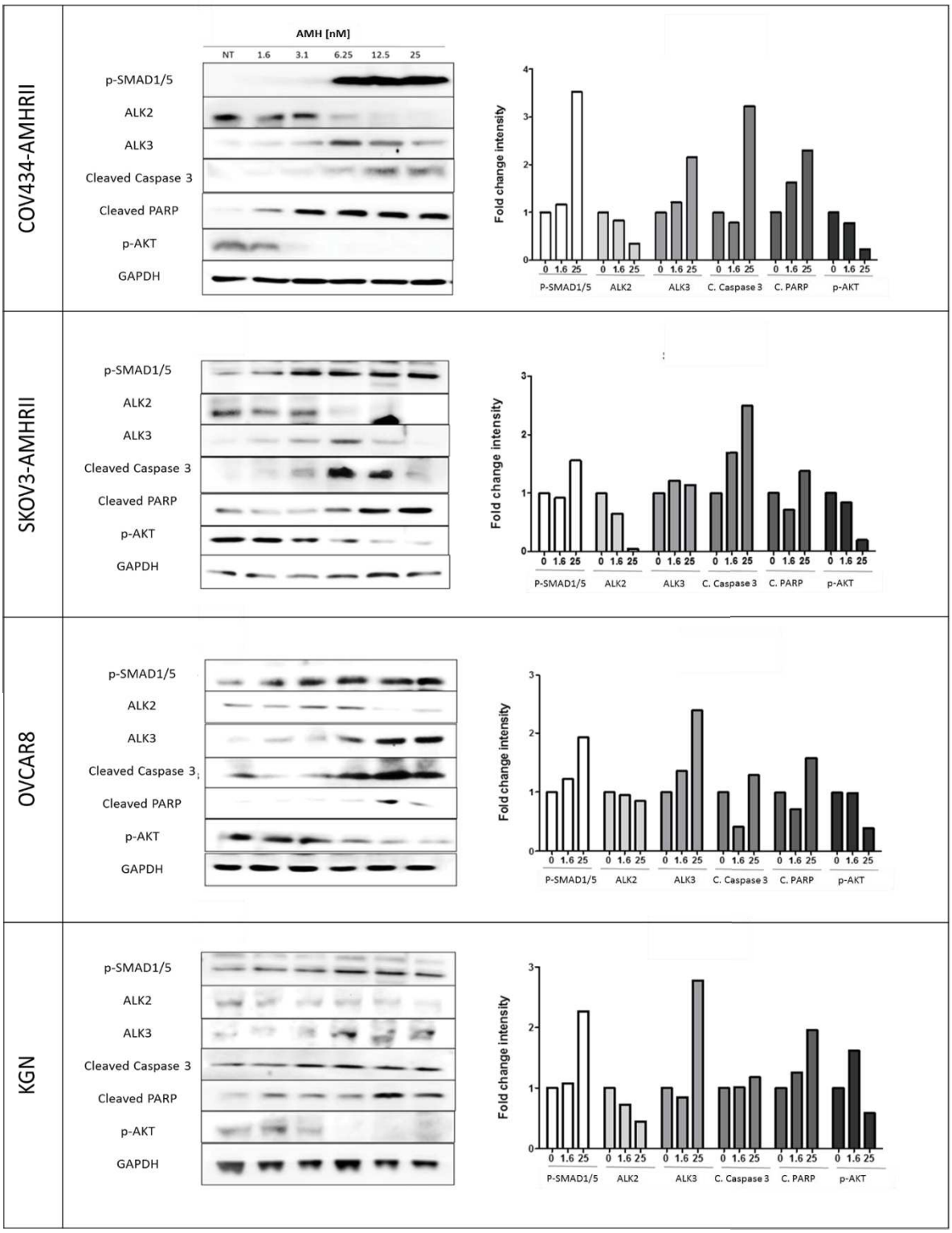


Figure 63 : Modulation de l'expression des récepteurs ALK et des protéines apoptotiques et de survie dans les lignées cellulaires traitées à doses croissante d'AMH

Les lignées cellulaires COV434-AMHRII, SKOV3-AMHRII, OVCAR8 et KGN ont été traitées de 0 à 25nM de LR-AMH pendant 24h. Analyse par Western blot de la signalisation AMH (SMAD1/5 phosphorylé), de l'expression ALK2 et ALK3, de l'induction de l'apoptose (caspase 3 clivée et PARP) et de la phosphorylation. Les données ont été quantifiées avec ImageJ et sont exprimées par rapport à la valeur du contrôle sans AMH.

5.4 Effet de l'AMH sur des cellules isolées d'ascites de patientes atteintes de cancer de l'ovaire

Afin d'évaluer la pertinence de nos résultats obtenus sur des lignées cellulaires, nous avons transposé nos tests sur des cellules primaires isolées d'ascites de patientes. D. Pépin et al. et E. Basal et al. ont montré que de telles cellules expriment fortement l'AMHR-II et peuvent être utilisées pendant 3 à 5 passages après la biopsie (Pépin et al., 2015b) (Basal et al., 2016b). Dans un premier temps, nous avons analysé la sensibilité de ces cellules d'ascites à l'AMH et dans un deuxième temps, à des doses croissantes d'AMH, nous avons évalué l'expression des récepteurs ALK ainsi que les protéines de la signalisation de l'AMH. Au-delà du modèle biologique, l'analyse de l'effet de l'AMH sur de tels prélèvements cliniques conforte l'intérêt de nos résultats (**Figure 64, Figure 65**).

Nous observons que les cellules d'ascites ont des sensibilités différentes face au traitement de la LR-AMH avec une diminution de la viabilité cellulaire de 15%, 40% et 30% respectivement pour les patientes 5, 6 et 7 lors de traitement à 50nM de LR-AMH (**Figure 64**A). Cependant, la viabilité décroit progressivement pour les patientes 5 et 6, en revanche la diminution de la viabilité cellulaire de la patiente 7 est effective dès la dose de 1nM de LR-AMH. De plus, nous observons que l'AMH a un effet cytotoxique uniquement sur les cellules tumorales et non pas sur les fibroblastes (**Figure 64**B). L'analyse de l'expression des récepteurs ALK en Western blot confirme les résultats précédents sur nos lignées cellulaires. En effet, à nouveau ALK2 et ALK3 ont des rôles opposés dépendant de la concentration en AMH. L'expression du récepteur ALK2 diminue de façon corrélée à la diminution de p-AKT alors qu'à l'inverse l'expression du récepteur ALK3 augmente proportionnellement aux protéines impliquées dans l'apoptose (**Figure 65**).

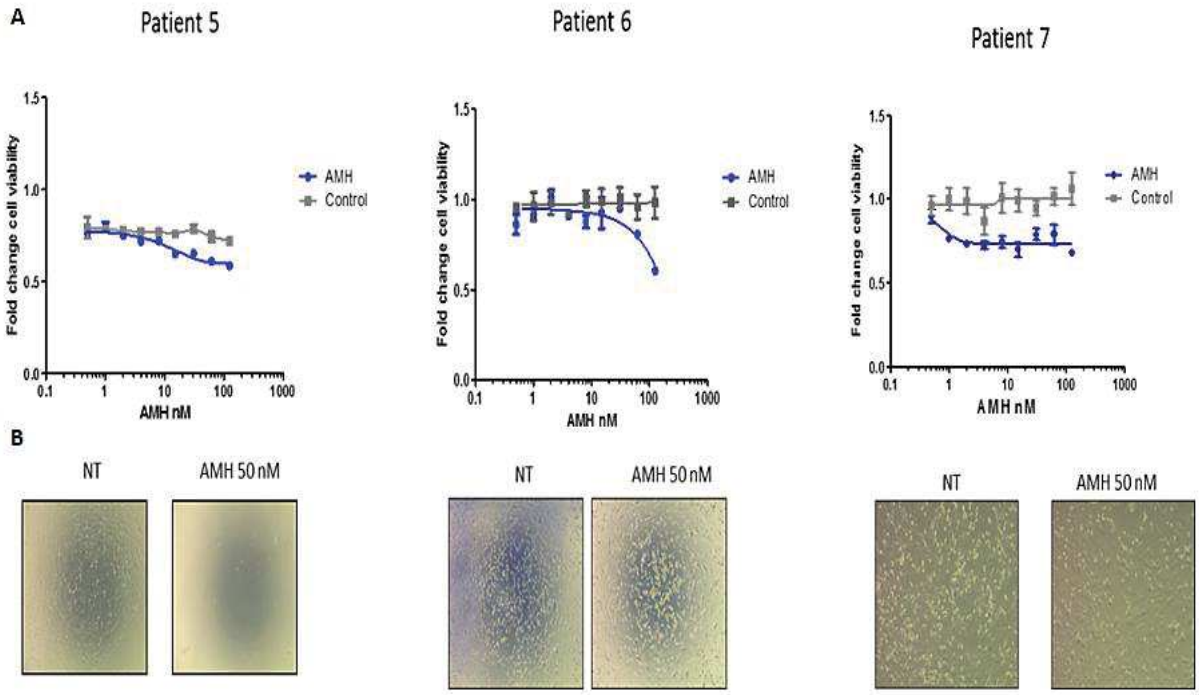


Figure 64 : Effet de l'AMH sur la viabilité cellulaire des cellules isolées d'ascites de patientes
Les cellules sont traitées avec des doses croissantes de LR-AMH (0-50nM) pendant 3 jours et la survie est révélée par le test MTS.

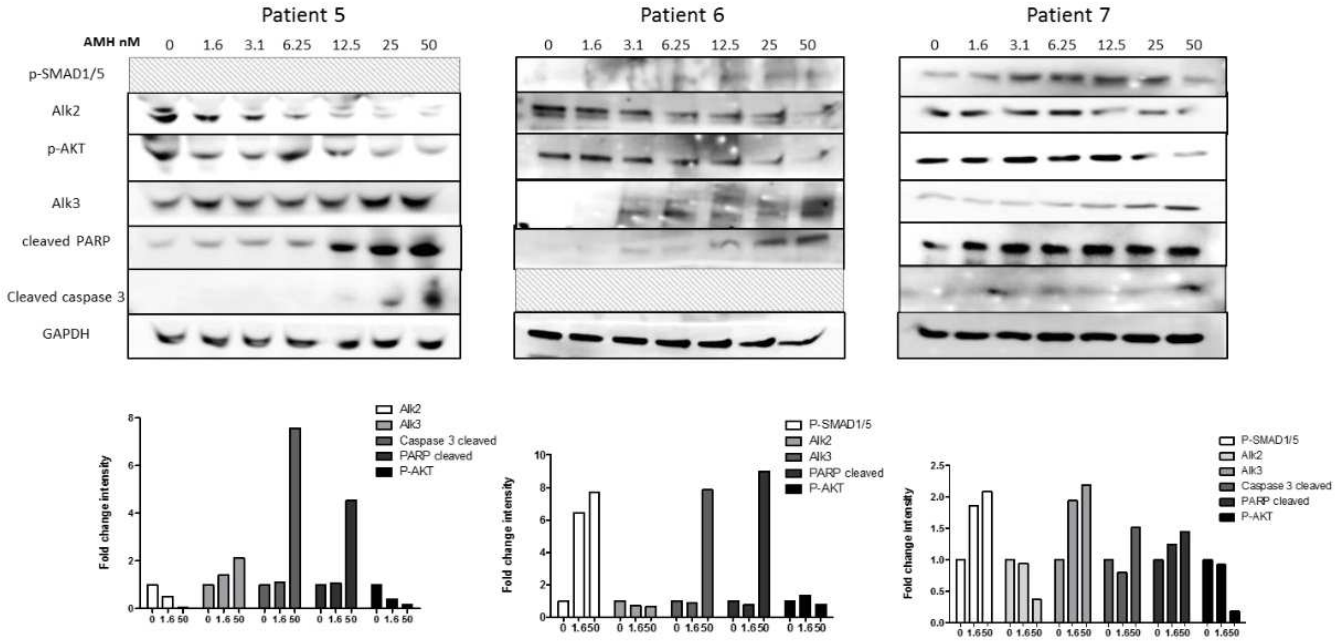


Figure 65 : Effet de l'AMH sur l'expression des récepteurs ALK et des protéines de signalisation impliquées dans la survie et l'apoptose dans les cellules d'ascites
Analyse par Western blot de la signalisation AMH (SMAD1/5 phosphorylé), de l'expression ALK2 et ALK3, de l'induction de l'apoptose (caspase 3 clivée et PARP) et de la phosphorylation AKT après incubation avec 1.6 à 50 nM de LR-AMH pendant 24 heures. Les données ont été quantifiées avec ImageJ sont exprimées par rapport au contrôle sans AMH.

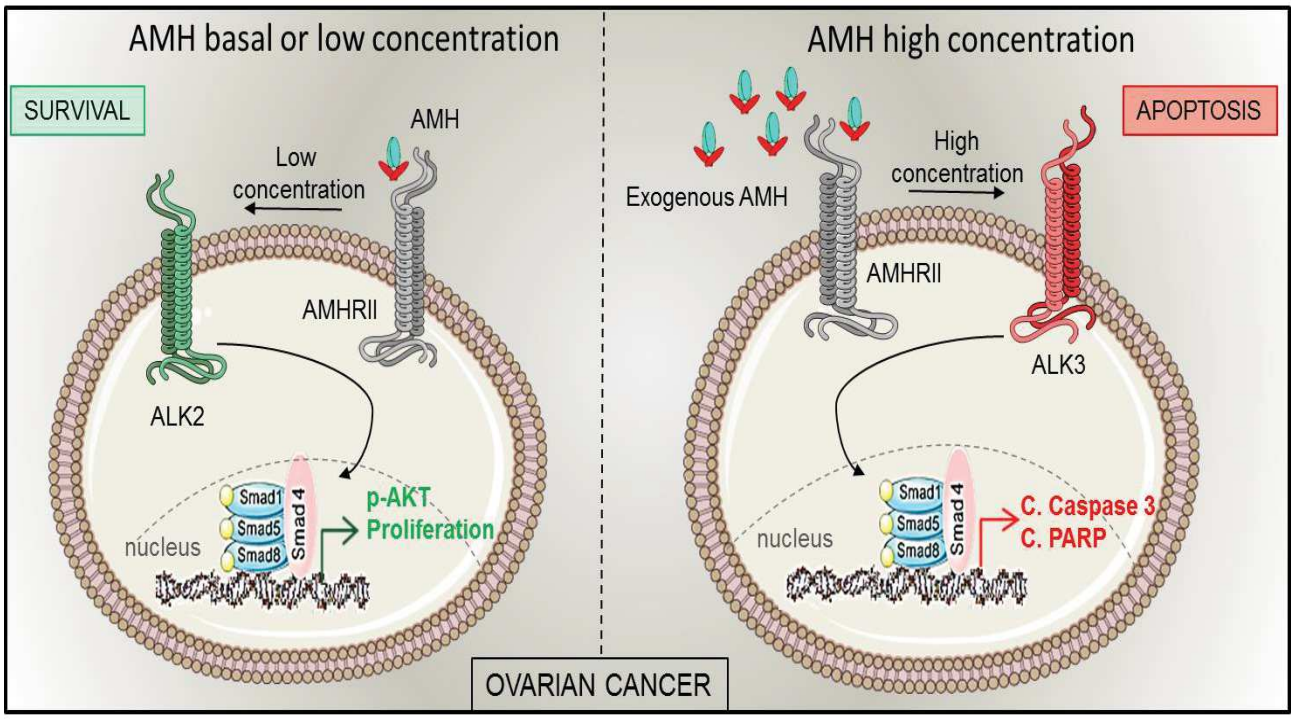


Figure 66 : Schéma bilan de l'effet de l'AMH dans nos conditions expérimentales basales (<10pM) et en présence de concentration élevée d'AMH (25nM)

5.5 Conclusion sur l'implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH

Le choix du récepteur de type I (ALK2, ALK3 ou ALK6) qui s'associe à l'AMHR-II lors de la fixation de l'AMH et les conséquences de ce choix n'ont pas été étudiés en détail dans les cancers ovariens alors que ces récepteurs sont essentiels pour l'effet biologique de l'AMH. Nous avons donc réalisé des siRNA contre chacun de ces récepteurs ALK et montré qu'ALK3 est indispensable à la signalisation de l'AMH pour induire l'apoptose des cellules COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII.

Nous avons également montré en immunofluorescence l'adressage à la membrane du récepteur ALK3 sous l'effet de l'AMH alors qu'ALK2, exprimé en condition basale, tend à diminuer. Pour appuyer ces résultats la co-immunoprécipitation avec un anticorps de capture anti-AMHRII a révélé également qu'ALK2 s'hétérodimérise avec AMHRII à l'état basal et qu'ALK3 devient le nouveau partenaire d'AMHRII en présence d'AMH exogène (25 nM).

Puisque la phosphorylation de SMAD1/5 et l'apoptose augmentent en fonction de la concentration d'AMH, nous avons également analysé l'expression d'ALK2 et ALK3 en Western blot à des doses croissantes d'AMH. ALK2 diminue sous l'effet de l'AMH pour devenir indétectable dans nos conditions expérimentales et, de manière intéressante, l'expression de la phosphorylation d'AKT, protéine de survie, est également diminuée de façon similaire à ALK2. A l'inverse, l'expression d'ALK3, caspase 3 et PARP clivée augmentent proportionnellement à la concentration. Dans les 4 lignées cellulaires de cancers ovariens ainsi que sur les cellules d'ascites, il semble donc qu'ALK2 et ALK3 aient des rôles opposés. En effet, dans nos conditions de culture, à concentration basale d'AMH, ALK2 semble être exprimé à la membrane pour former un hétérodimère avec l'AMHRII et induire une voie de survie. En revanche, lors d'une augmentation de la concentration en AMH exogène, le récepteur ALK3 devient le nouveau partenaire d'AMHRII pour induire la voie apoptotique (**Figure 66**). Ces résultats montrent, pour la première fois dans des modèles de cancers ovariens, l'implication dose dépendante de l'AMH dans le recrutement des récepteurs ALK associés à des fonctions biologiques différentes. De plus, ces résultats soulignent l'intérêt de développer des anticorps bispécifiques qui ciblent spécifiquement les cellules cancéreuses par le biais de l'AMHRII et de la signalisation à travers les récepteurs ALK, afin d'orienter le devenir cellulaire vers les voies d'apoptose.

5.6 Stratégie thérapeutique : Orientation de la signalisation de l'AMH par le biais des anticorps bispécifiques (BsAb) AMHRII –ALK (2,3,6)

Les succès des anticorps thérapeutiques et leurs limites (Carter, 2011) ont conduit au développement d'anticorps de seconde génération : anticorps avec des Fc optimisés tels le 3C23K (Kersual et al., 2014b; Romain et al., 2014), conjugués anticorps-drogue (ADC) (Wong and Hurvitz, 2014) et anticorps bispécifiques (BsAbs) (Spiess et al., 2015b). Ce dernier concept n'est pas nouveau (Barr et al., 1989; Glennie et al., 1987) mais son transfert vers la clinique était limité par les techniques d'ingénierie des anticorps disponibles (Kontermann, 2012). Différents formats d'anticorps BsAb sont maintenant parvenus en clinique (Spiess et al., 2015b) et la recherche est encore très active dans ce domaine. De nombreux BsAbs ont été conçus pour mettre en contact des cellules tumorales avec des cellules du système immunitaires douées d'activité cytotoxique (Kontermann, 2012) , tandis qu'une autre classe de BsAb cible deux antigènes exprimés par les cellules tumorales et impliqués dans la progression tumorale (Spiess et al., 2015b). Il est important de noter, qu'après les formats initiaux de BsAb sans Fc, la tendance actuelle privilégie les formats avec un Fc de manière à bénéficier des mécanismes d'action impliquant le Fc (en particulier, ADCC) et permettre d'augmenter la demi-vie (Spiess et al., 2015b).

Dans ce projet, nous avons utilisé le format de BsAb créé par l'équipe de Martine Cérutti, CNRS UPS 3044, particulièrement bien adapté puisqu'il est bivalent pour chacune de ses cibles (Golay et al., 2016b; Kadouche et al., 2013). Cela correspond bien aux complexes AMHR-II/AMHR-I qui comportent un dimère de chacun des récepteurs. C'est une plateforme générique basée sur des mutations introduites dans les domaines constants CH1 et CL permettant un clonage rapide des domaines variables de différents anticorps (anti-ALK2, 3 et 6 dans notre projet). Enfin, ces BsAbs peuvent être produits en cellules eucaryotes (CHO ou HEK293) à des rendements permettant la réalisation de notre projet.

Les rôles différents de ALK2 et ALK3 dans la signalisation de l'AMH identifiés précédemment nous permettent d'envisager de les utiliser comme cible thérapeutique. Le caractère ubiquitaire de ALK2 et ALK3 limite cette stratégie. Nous avons donc choisi de développer des bispécifiques (BsAb) anti-AMHRII/ anti-Alk2 ou 3. La spécificité tumorale est apportée par le ciblage de l'AMHRII et l'orientation de la signalisation de l'AMH par le ciblage des récepteurs ALK soit en bloquant la voie de survie médié par ALK2 (BsAb antogoniste) soit par l'activation de l'apoptose médiée par ALK3 (BsAb agoniste).

5.6.1 Caractérisation des anticorps anti-ALK2 et anti-ALK3

Les anti-ALK ont été sélectionnés par phage display à partir de la banque d'expression scFv humaine de phages Husc I (Philibert et al., 2007; Robin and Martineau, 2012). La plateforme réalise des tours de sélection sur protéine recombinante permettant un criblage haut débit d'interactions protéiques. L'enrichissement des phages est réalisé sur 3 tours de sélections pour chaque récepteur. Les anticorps sont dirigés contre le domaine extracellulaire des récepteurs ALK. L'homologie entre ALK2 et ALK3 est de 25,9% soit 74,1 % de séquence peptidique non commune permettant de pouvoir les cibler de manière spécifique (**Figure 67**).

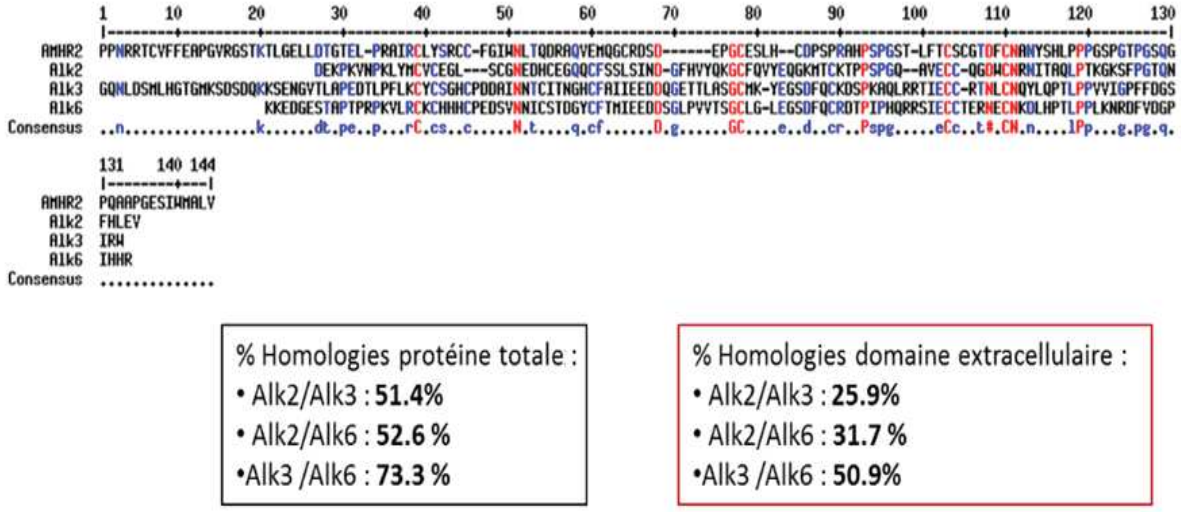


Figure 67 : Homologie des séquences peptidiques des récepteurs ALK

5.6.1.1 Sélection des anticorps anti-ALK

La sélection des scFv a été réalisée contre le domaine extracellulaire des récepteurs recombinants ALK2 (Asp23 - Phe120) et ALK3 (Met1-Arg152). Ces protéines recombinantes proviennent de R&D system et sont fusionnées avec un tag Fc (Fragment constant) d'une IgG1. La plateforme GenAc a sélectionné en moyenne une dizaine de scFv pour chaque récepteur Alk2 et Alk3.

Deux scFv ont été sélectionné pour chaque cible en fonction de plusieurs critères i) de leur liaison en ELISA sur le récepteur ii) de leur séquence peptidique variable afin d'avoir une liaison de l'anticorps différente sur son antigène iii) du nombre de sites potentiels de glycosylation présent dans leur séquence codant pour les domaines variables. En effet, la glycosylation dans les parties variables de l'anticorps peut interférer avec la liaison de l'antigène. Les scFv sélectionnés sont ensuite reformatés en immunoglobulines IgG 1 humaines complètes et produites en cellules eucaryotes (HEK293T). Enfin, les IgG 1 sont testées en ELISA et en cytométrie en flux afin de valider leurs liaisons (**Figure 68**).

L'ensemble des données a permis de porter notre choix sur 2 scFv anti-ALK2, les clones C1 et F9 qui seront nommés tout au long du projet 2C1 et 2F9, le « 2 » fait référence à l'antigène ALK2.

La sélection des scFv anti-ALK3 sur la protéine recombinante (R&D) n'a pas été concluante, seul le clone D7 sort de cette première sélection selon les critères décrit ci-dessous. Une deuxième sélection a donc été réalisée sur la protéine recombinante commerciale de Sino Biological qui contient également le domaine extracellulaire du récepteur ALK3 (Met 1-Arg 152) associé avec un groupement polyhistidine sur la partie C-terminale de la protéine.
Sur le même principe que les scFv anti-ALK2, nous avons sélectionné les clones 3D7 et 3H6. Le clone 3D7 est issu de la première sélection sur la protéine recombinante R&D system et le clone 3H6 est issu de la deuxième sélection sur la protéine ALK3 recombinante de Sino Biological polyhistidine.

5.6.1.2 Caractérisation de la liaison des IgG1 humaines anti-ALK

Les sites de glycosylation sont supprimés par mutagénèse dirigée contre des motifs d'acides aminés potentiellement glycosylable de type N(x)S. Pour tous les anticorps, nous avons effectué la mutation suivante NAT>NAK qui est présente initialement dans la partie constante de l'anticorps. Les autres mutations sont localisées dans les parties variables de l'anticorps. Dans ce cas, nous avons remplacé la sérine par une alanine (NxS > NxA). Ces mutations sont nécessaires afin d'éviter que la glycosylation de ces résidus ne diminue la liaison de l'anticorps sur son antigène. De ce fait, nous observons que la liaison est largement améliorée en ELISA (**Figure 68**A).
Nous avons également analysé la liaison des anti-ALK en ELISA sur les deux protéines recombinantes provenant de chez R&D system et Sino Biological. De manière générale, la protéine commerciale de Sino Biological génère une meilleure liaison des anticorps.
Les récepteurs ALK2 et ALK3 présente 25 % d'homologie. Afin de déterminer la spécificité de nos anticorps, nous avons testé en ELISA la liaison des anticorps anti-ALK2 sur la protéine recombinante ALK3 et inversement, les anticorps anti-ALK3 sur la protéine recombinante ALK2. Nous observons que seul l'anticorps 3H6 à la capacité de se fixer sur ALK3 mais aussi sur le récepteur ALK2 de façon plus faible. Ce résultat sera discuté plus tard en fonction des résultats biologiques obtenus avec cet anticorps. La liaison des IgG1 en cytométrie en flux est également améliorée après mutagénèse dirigée (**Figure 68**B). Cependant, l'efficacité de liaison n'est pas dépendante du nombre de mutations effectuées mais surement due à la localisation des sites de glycosylation au niveau de la liaison anticorps-antigène. En effet, pour le clone 3D7 et 3D7(G)lycosylé, leurs liaisons sont quasiment similaires alors que 4 mutations ont été réalisées, en

revanche pour le clone 2C1, 2 mutations ont été réalisées augmentant considérablement l'intensité de fluorescence (**Figure 68**).

A

		ALK2 ECD2 - Fc (R&D)	ALK2 ECD-HIS6 (sino)	ALK3 ECD2 - Fc (R&D)	ALK3 ECD-HIS6 (sino)
IgG-ALK2	2C1G	0,177	0,294	ND	0,105
	2C1	0,268	0,573	ND	0,127
	2F9G	0,207	2,183	ND	0,112
	2F9	0,277	2,411	ND	0,139
IgG-ALK3	3D7G	ND	0,15	0,746	0,598
	3D7	ND	0,181	0,927	3,208
	3H6G	ND	0,811	0,848	2,439
	3H6	ND	0,584	1,082	2,286
IgG	Control	0,065	0,059	0,126	0,059

G : Anticorps avec sites de glycosylations*

B

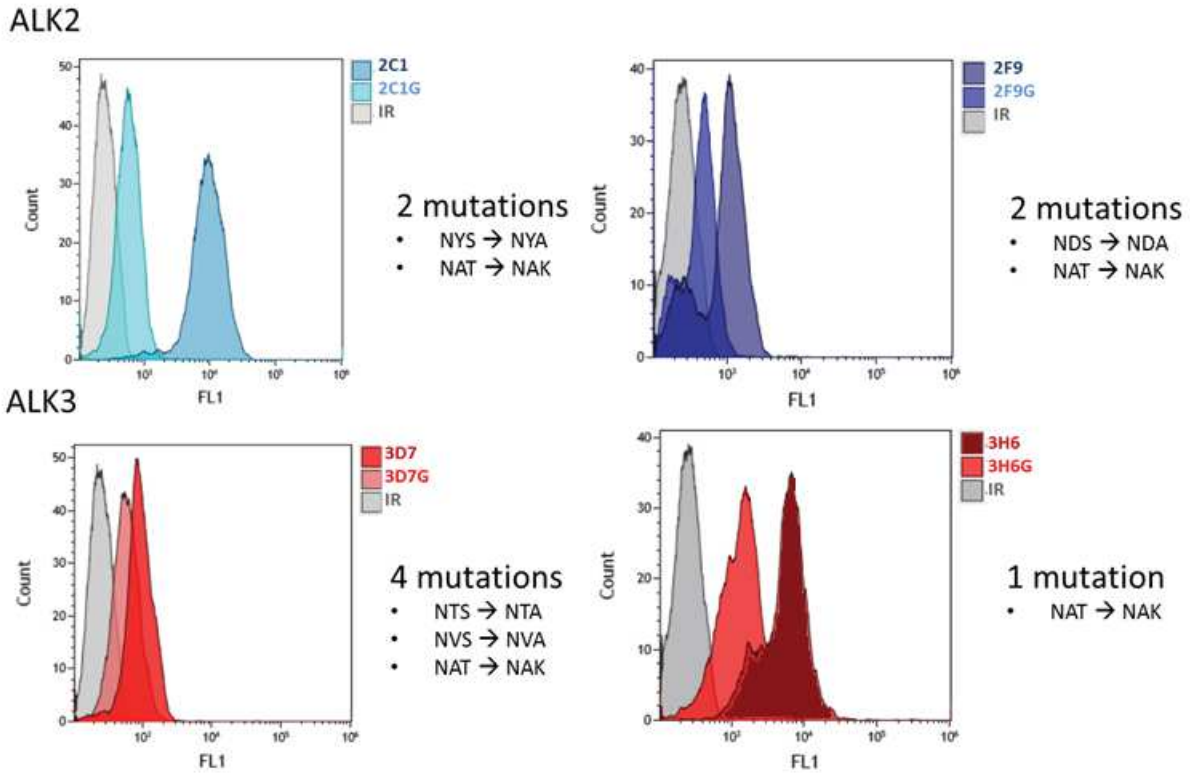


Figure 68 : Liaison des IgG1 anti-ALK glycosylées et aglycosylées.
A) Analyse de la liaison des anti-ALK par ELISA sur le domaine extracellulaire des récepteurs (ECD) ALK2 et ALK3 recombinant commerciaux de R&D system et Sino biological. B) Analyse de la liaison des anti-ALK en cytométrie en flux sur les COV434-AMHRII perméabilisées.

Nous avons ensuite déterminé par ELISA la concentration de l'anticorps où 50 % de l'effet maximal est observé. Les anti-ALK2 ont une EC50 de 29,19 ± 2,8 nM et 72,06 ± 2,55 nM respectivement pour les clones 2C1 et 2F9. Les anti-ALK3 ont une EC50 de 41,05 ± 1,93 et 1,3 ± 1,12 nM pour les clones 3D7 et 3H6 (**Figure 69**). L'EC50 déterminée par ELISA est en adéquation avec les données de cytométrie.

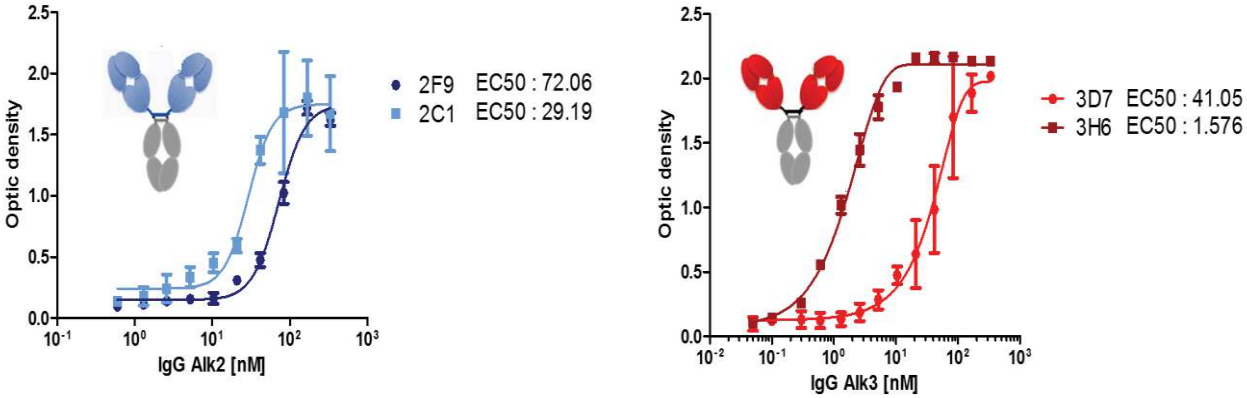


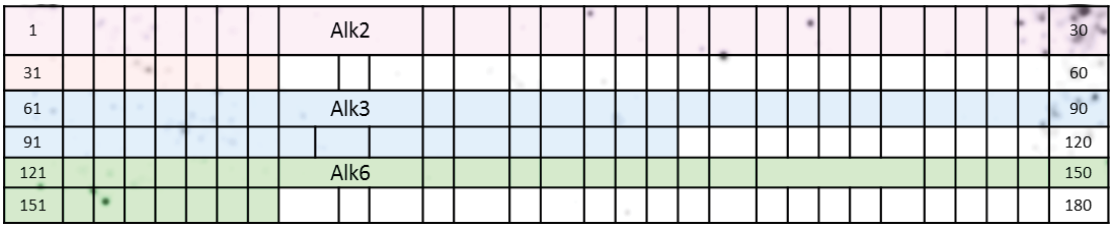
Figure 69 : Affinité des anti-ALK
Analyse par ELISA de l'EC50 des anti-ALK2 et ALK3 sur le domaine extracellulaire de la protéine Sino.

5.6.1.3 Etude des épitopes des anti-ALK

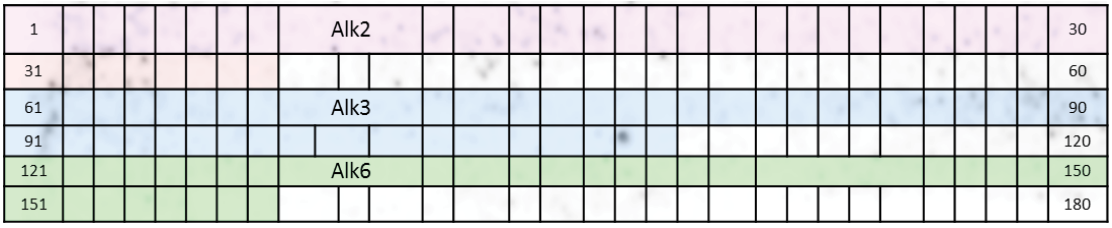
La connaissance des épitopes de nos anticorps sur leur cible peut nous orienter sur leurs mécanismes d'action et ainsi prédire leur effet sur le devenir cellulaire (effet agoniste ou antagoniste). Les épitopes ont été étudiés par membrane SPOT sur laquelle sont greffés les peptides des antigènes étudiés. Chaque SPOT correspond à 15 acides aminés qui sont décalés de 3 acides aminés entre eux. La membrane est incubée en présence des anticorps anti-ALK2 (2C1, 2F9) et ALK3 (3D7, 3H6) puis révélée comme pour la technique du Western blot. Les résultats obtenus montrent l'absence de liaison des anticorps 2C1, 2F9 et 3D7 sur la membrane SPOT et suggèrent qu'ils lient la protéine conformationelle et non la forme linéaire contrairement au contrôle positif, le 12G4, qui cible les peptides suivant : DRAQVEM sur la membrane SPOT de l'AMHRII (Salhi et al., 2004b). Cependant, nous pouvons noter une légère liaison de l'anticorps 3H6 sur des peptides communs au récepteur ALK3 et ALK2 ce qui conforte les résultats obtenus en ELISA sur la réaction croisée qu'a l'anticorps 3H6 sur les deux protéines recombinantes (**Figure 70**). L'absence de liaison suggère une liaison conformationnelle des anticorps et s'explique par des résultats similaires obtenus avec d'autres anticorps sortie de la banque de phage display Husc I (Philibert et al., 2007; Robin and Martineau, 2012).

ALK2 :

2C1

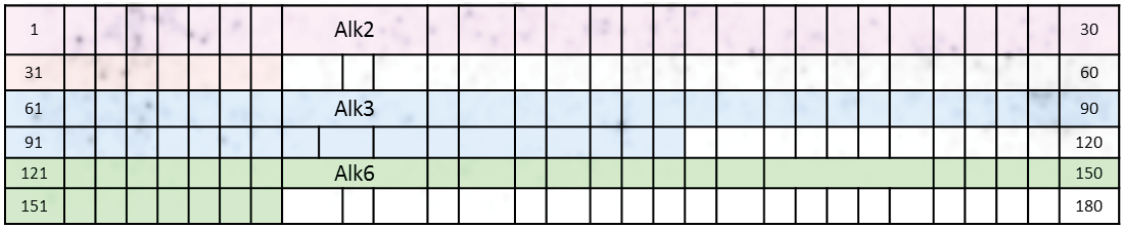


2F9

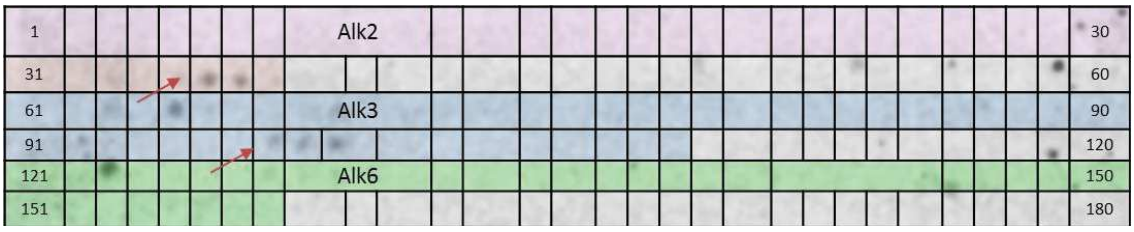


ALK3 :

3D7



3H6



Contrôle positif AMHRII : 12G4

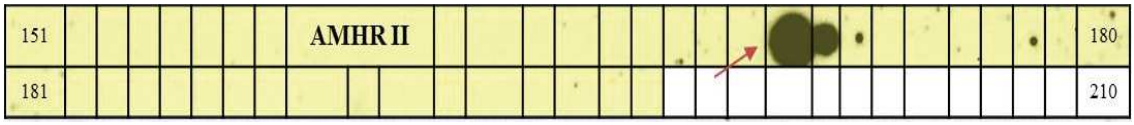


Figure 70 : Détermination des epitopes des anti-ALK
Utilisation de membrane SPOT.

Nous avons montré que les récepteurs ALK ont des rôles essentiels dans la signalisation de l'AMH. Si ALK2 tend à induire la survie des cellules, ALK3 à l'inverse est impliqué dans l'apoptose ce qui fait de ces deux récepteurs des cibles attractives. Cependant, l'intérêt de cibler ces récepteurs en monothérapie par des anticorps est limité du fait de leur expression ubiquitaire dans les tissus. Il faut donc leur associer le ciblage d'un récepteur spécifique tumoral tel que le récepteur AMHRII par le biais d'anticorps bispécifiques AMHRII-ALK.

5.6.2 Clonage au format BsAb pour cibler les récepteurs ALK2 et ALK3

Grâce au récepteur AMHRII qui signe la spécificité tumorale nous avons choisis de développer des anticorps bispécifiques ciblant le complexe hétérodimère AMHRII-ALK (2, 3). Le clonage a été réalisé dans les plasmides de type PiggyBac par l'équipe de Martine Cerutti (CNRS UPS3044). Un premier plasmide contient la région VL de l'anti-ALK et un deuxième plasmide avec les régions variable VH ALK et VH, VL d'AMHRII (**Figure 71**).

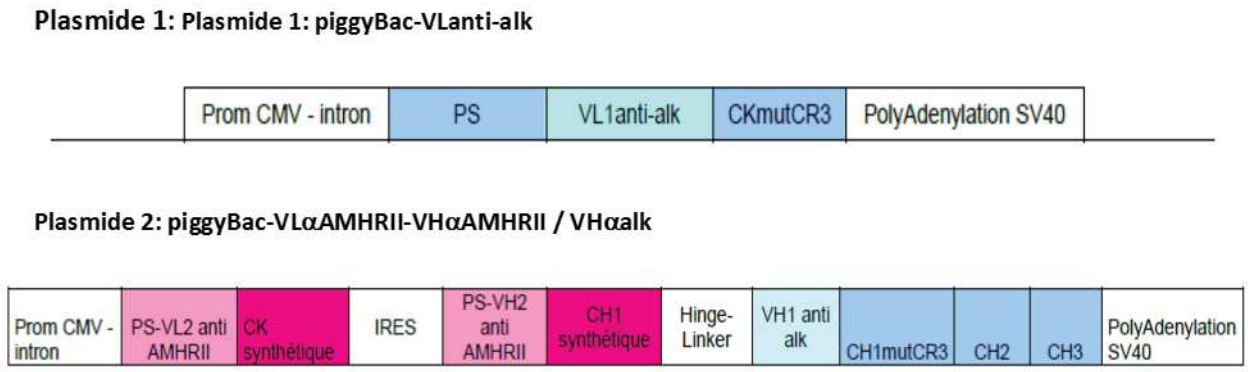


Figure 71 : Construction des plasmides codants pour les BsAb AMHRII-ALK

5.6.2.1 Format et structure des BsAb

Nous avons construit ces BsAbs de manière à conférer une plus grande affinité pour le récepteur AMHRII (le 12G4 : 8 x 10^{-10} M) puisqu'il signe la spécificité du ligand et qu'il est le marqueur des cancers ovariens. Pour cela, le 12G4 est en position 2 par rapport au Fc lui conférant une meilleure liaison à son antigène. En position 1, la plus proche du Fc, nous avons inséré les anti-ALK (2 ou 3) (**Figure 72**). Pour chacun de ces anti-ALK, nous disposons de deux clones de séquence protéique différente dans le domaine variable et présentant des niveaux de liaison variable.

Nous avons sélectionné et produit les 4 BsAbs suivants :

- AMHRII-ALK2 clone C1 = 12G4-2C1
- AMHRII-ALK2 clone F9 = 12G4-2F9
- AMHRII-ALK3 clone D7 = 12G4-3D7
- AMHRII-ALK3 clone H6 = 12G4-3H6

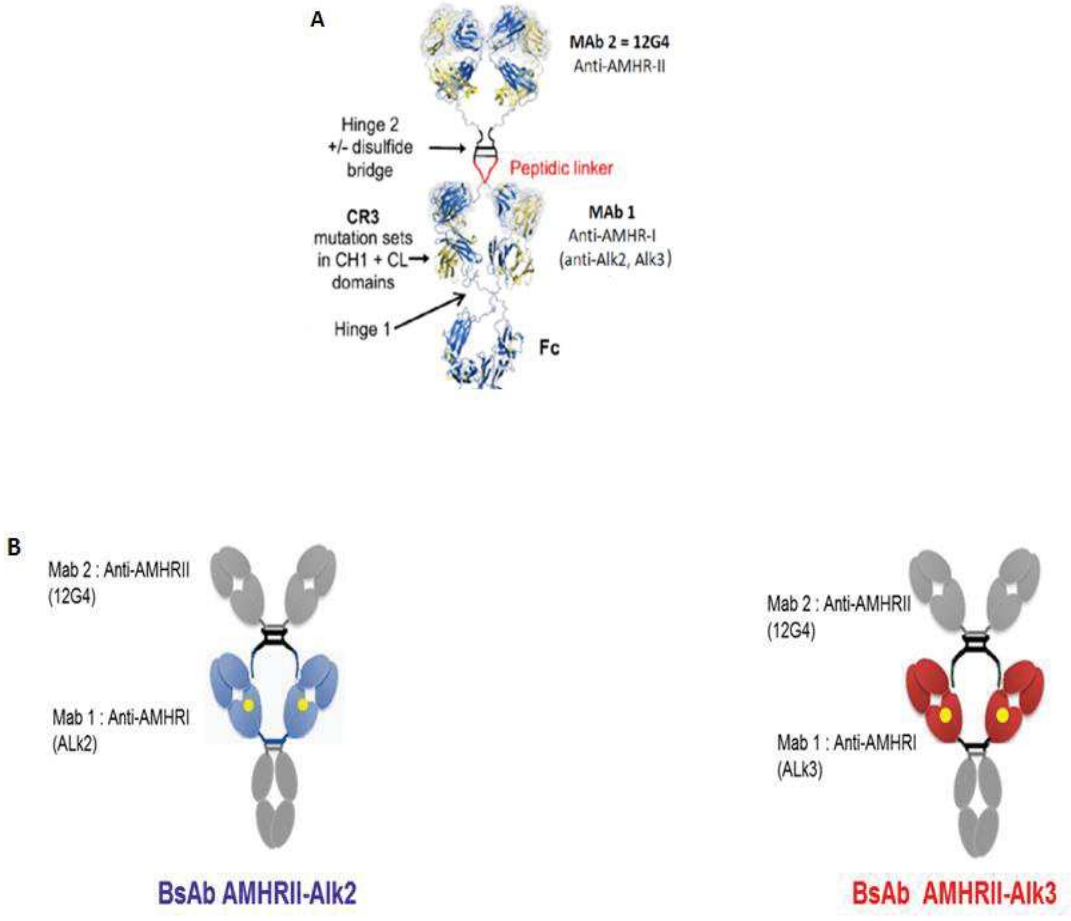


Figure 72 : Format de l'anticorps bispécifique (BsAb)
A) structure 3D du BsAb adapté de la publie de Golay et al., 2016. *B) Schéma utilisé dans le projet.*

5.6.2.2 Caractérisation des BsAb

Les BsAb sont analysés en gel d'acrylamide SDS-page en condition non réductrice et réductrice. Ce sont des molécules tétramériques de 260kDa. Les conditions réductrices permettent de visualiser la chaine lourde de 90kDa et les chaines légères de 26kDa. Les BsAb ont été produis en cellules HEK 293T de manière transitoire et purifiés sur colonne de protéine A (**Figure 73**).

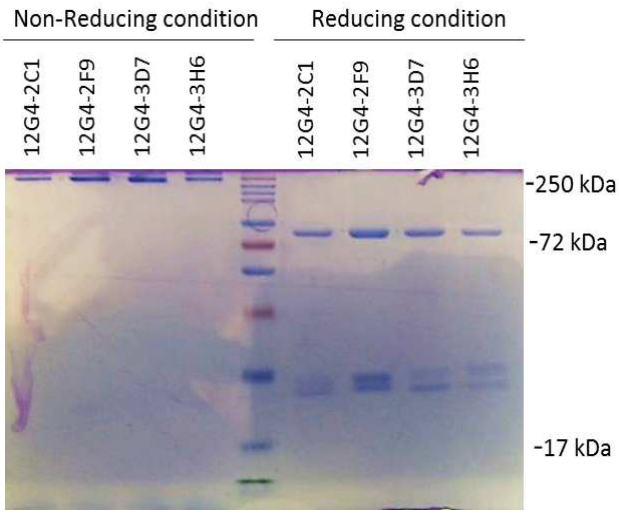


Figure 73 : Analyse des BsAb sur gel d'acrylamide SDS-page en condition réductrice et non réductrice. *Coloration au bleu de Coomassie..*

L'affinité des anticorps parentaux monospécifiques est comparée en ELISA avec celle des bispécifiques associés. D'après la publication de Golay en 2016, l'affinité du Mab 1 est diminuée par rapport aux anticorps parentaux monospécifiques du fait de la position interne dans le bispécifique. Dans notre cas, la liaison déterminée par l'EC50 est peu affectée par la position interne puisque l'EC50 des monospécifique est similaire à celle des bispécifiques. De plus, la liaison des BsAb sur la protéine recombinante AMHRII est identique à celle de l'anticorps monospécifique anti-AMHRII (12G4 chimérique). L'affinité du 12G4 chimérique est comparée à celle du 12G4 murin qui a été déterminée par des études antérieures de BIACORE et nous sert de point de contrôle par rapport aux résultats obtenus en ELISA. Le 12G4 chimérique et le 12G4 murin ont une affinité du même ordre de grandeur respectivement 0,4nM et 0,8 nM. Les données EC50 de l'ELISA et du BIACORE sont donc comparables (**Figure 74**).

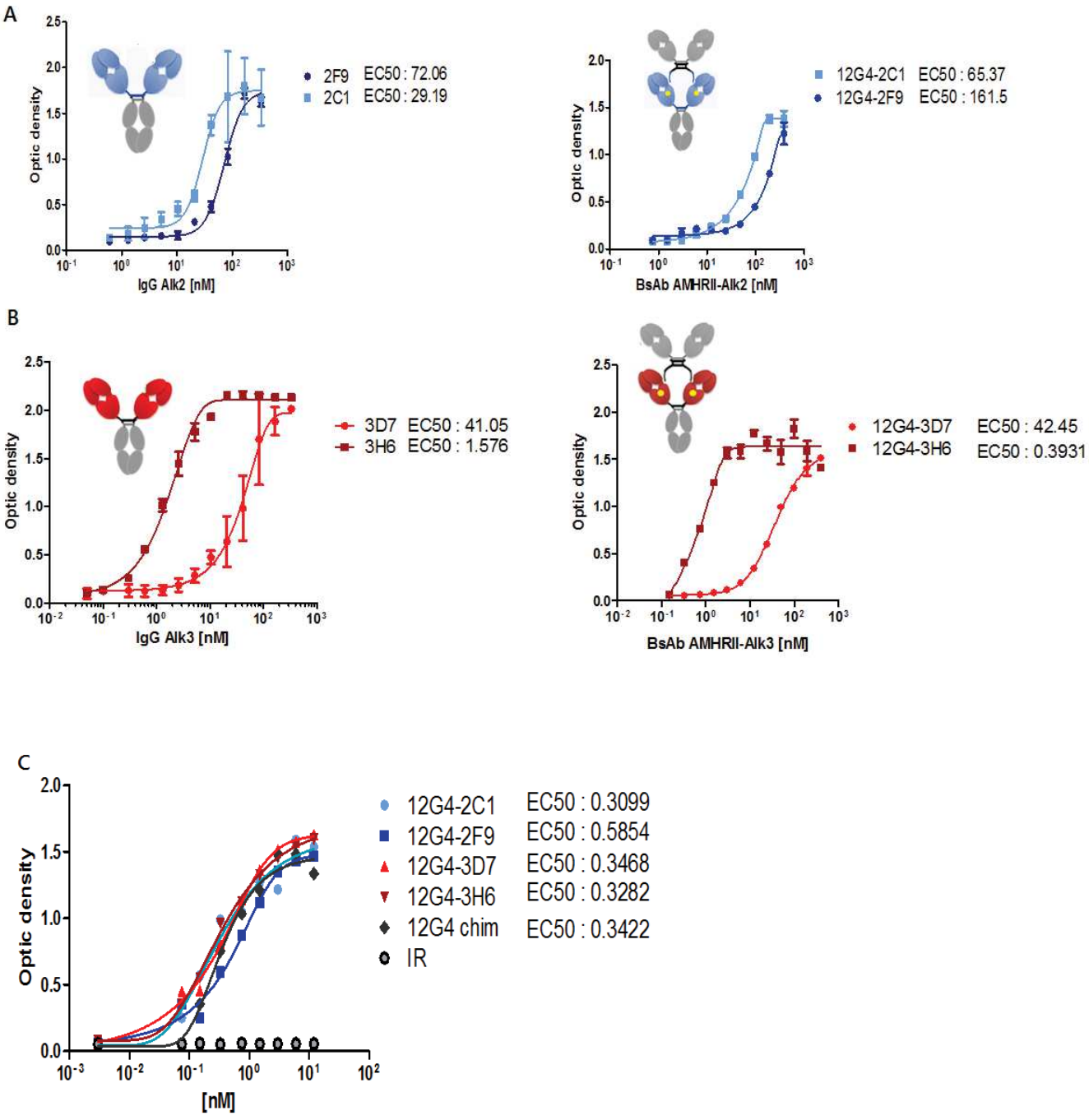


Figure 74 : EC50 des anticorps monospécifiques (MAb) vs bispécifiques (BsAb) déterminée par ELISA

A) Les MAb anti-ALK2 et BsAb anti-AMHRII-ALK2 sont testés en ELISA sur le domaine extracellulaire du récepteur ALK2 recombinant (sino). B) Les Mab anti-ALK3 et BsAb anti-AMHRII-ALK3 sont testés en ELISA sur le domaine extracellulaire du récepteur ALK3 recombinant (sino). C) Le MAb 12G4 chimérique et les BsAb sont testés en ELISA sur le domaine extracellulaire du récepteur AMHRII recombinant (sino).

5.6.3 Effets des BsAb sur les lignées cellulaires de cancers ovariens

5.6.3.1 Les BsAb modulent la signalisation de l'AMH

L'effet des BsAb sur la signalisation de l'AMH a été évalué sur nos deux modèles de lignées cellulaires COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII. Les protéines clés de la signalisation de l'AMH tel que p-SMAD1/5, les protéines apoptotique caspase 3 et PARP clivées ainsi que la protéine impliquée dans la voie de survie p-AKT sont modulées par les BsAb.

En effet, les BsAb anti-AMHRII-ALK3 augmentent le niveau de clivage de caspase 3 et PARP avec un effet plus important du BsAb 12G4-3H6 sur l'activité de caspase 3/7 sur les COV434-AMHRII. En revanche, ce sont les BsAb AMHRII-ALk2 qui induisent une augmentation de phosphorylation d'AKT (**Figure 75**).

De manière surprenante, l'effet des BsAb sur les SKOV3-AMHRII est opposé par rapport au COV434-AMHRII. Sur cette lignée SKOV3-AMHRII, ce sont les BsAb ciblant AMHRII-ALK2 qui induisent une augmentation de l'expression du clivage de Caspase et PARP ainsi qu'une augmentation de l'activité caspase 3/7 et à l'inverse inhibent p-AKT. L'effet des BsAb a été testé à 6h, 24h et 48h. Nous présenterons seulement les temps 24h et 48h respectivement pour les COV434-AMHRII et les SKOV3-AMHRII car ils représentent l'effet maximal des BsAb. Cependant, l'effet des BsAb sont similaires aux différents temps de traitement.

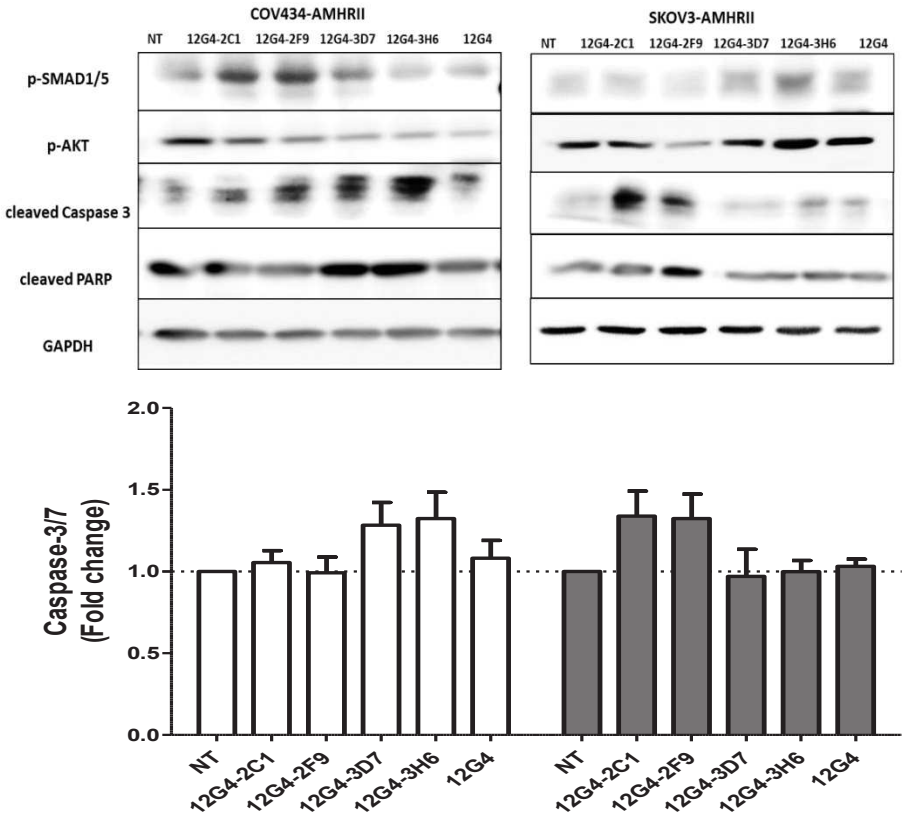


Figure 75 : Effet des BsAb sur la signalisation de l'AMH et l'activité des caspase 3/7
Les cellules COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII sont traitées avec 333 nM d'anticorps respectivement pendant 24H et 48H.

5.6.3.2 Les BsAb inhibent la viabilité et la prolifération cellulaire

L'effet des BsAb sur la viabilité cellulaire est étudié par une méthode colorimétrique dépendante de l'activité métabolique cellulaire due au flux NAD(P)H (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS). Ce test permet donc de déterminer le nombre de cellules viables en prolifération ainsi que le potentiel cytotoxique des molécules. Les BsAb anti-AMHRII-ALK3 ont tendance à diminuer la viabilité de 10% et 25% respectivement pour les clones 12G4-3D7 et 12G4-3H6 sur la lignée cellulaire COV434-AMHRII. A l'inverse, ce sont les BsAb anti-AMHRII-ALK2 qui ont tendance à diminuer la viabilité des cellules SKOV3-AMHRII, de 25% et 15% respectivement pour les clones 12G4-2C1 et 12G4-2F9 au même niveau que l'AMH. On note également que le BsAb 12G4-3H6 qui cible à la fois ALK3 et ALK2 diminue la viabilité des SKOV3-AMHRII de 25% (**Figure 76Figure 76**).

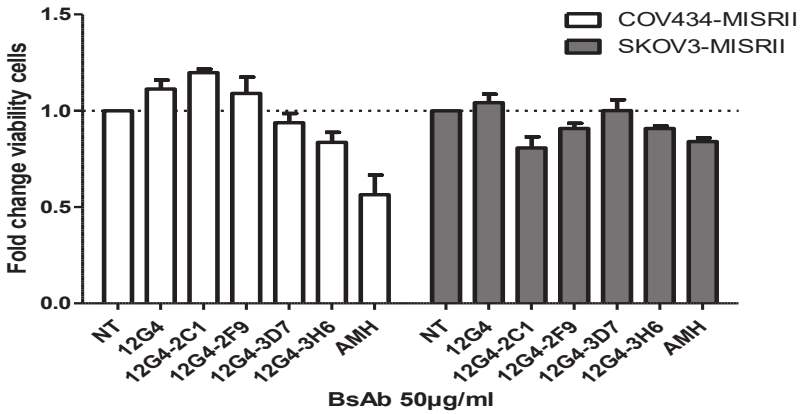


Figure 76 : Effet des BsAb sur la viabilité cellulaire des COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII
Les cellules sont traitées avec 333 nM d'anticorps pendant 3 jours. Révélation de la viabilité cellulaire par le test MTS. N>3.

Comme pour tous les anticorps, le test MTS n'est pas le plus adapté pour mettre en évidence l'effet des BsAb. Nous avons réalisé en parallèle des tests de survie clonogénique qui consistent à étudier la capacité des cellules à proliférer et à former des clones à partir d'une cellule unique. Ce test confirme les résultats précédents de manière significative. En effet, les BsAb AMHRII-ALK3 diminuent la survie clonogénique de plus de 50% sur les COV434-AMHRII. Les BsAb présentent un meilleur effet que celui de l'AMH ainsi que du monospécifique 12G4 chimérique qui induit une diminution de la survie de seulement 20%. Sur ce modèle, l'analyse est réalisée par comptage des clones (**Figure 77**). Sur les SKOV3-AMHRII, les BsAb AMHRII-ALK2 diminuent la survie clonogénique d'environ 40% pour le clone 12G4-2F9 et 20% pour le clones 12G4-2C1. Ces BsAb présentent une efficacité similaire à celle de l'AMH. En revanche, Les BsAb AMHRII-ALK3 et le monospécifique 12G4 ne semblent pas avoir d'activité

dans ces conditions. L'analyse sur cette lignée a été réalisée par la mesure de l'absorbance à 550nm suite à la décoloration des cellules fixées et marquées au Giemsa car les SKOV3 ne forment pas de clones. Ce test de survie clonogénique est parfaitement adapté pour révéler de manière significative l'effet biologique de nos BsAb.

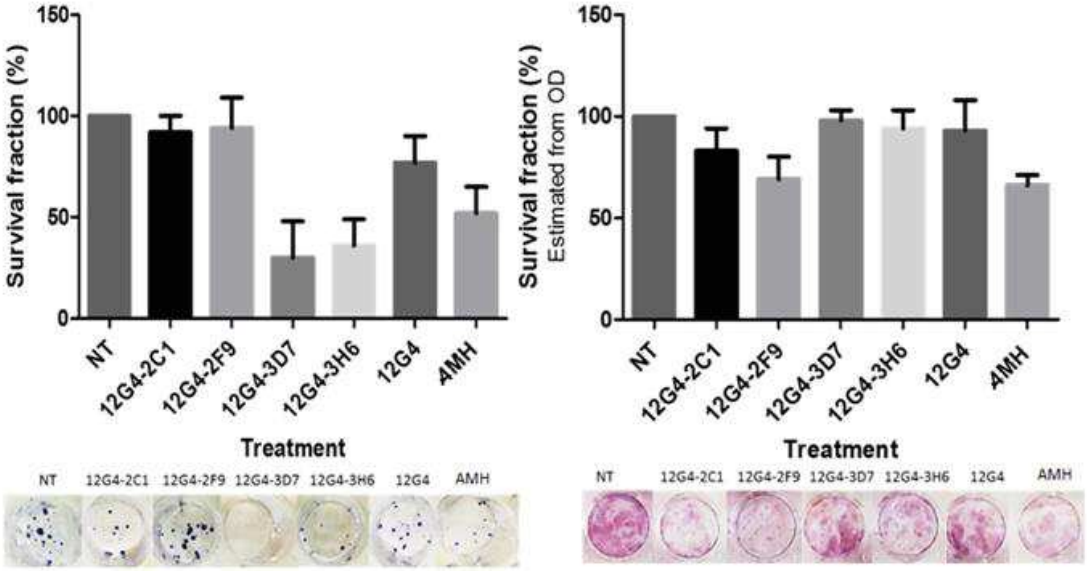


Figure 77 : Effet des BsAb sur la survie clonogénique des COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII
La survie clonogénique est quantifiée après traitement de 333 nM d'anticorps pendant 11 jours par comptage direct des clones (cellules COV434-AMHRII) ou par estimation du nombre de clones par DO à 595 nm après décoloration cellulaire (cellules SKOV3-AMHRII). N>3.

5.6.3.3 Les BsAb anti-AMHRII-ALK2 inhibent la migration des cellules SKOV3-AMHRII

La dissémination des cellules cancéreuses observée dans des lignées de cancers ovariens est une caractéristique fréquente des tumeurs gynécologiques et a pour conséquence l'apparition de cellules tumorales dans le péritoine (Chang et al., 2011). Pour évaluer la pertinence de nos BsAb en thérapie et ainsi comprendre leur fonctionnement dans ce processus de migration, nous avons étudié leurs effets par le test de « Wound healing ». Ce test avait déjà révélé que l'AMH inhibe la migration des cellules SKOV3-AMHRII. Un effet similaire est observé lors du traitement par les BsAb ciblant les récepteur AMHRII-ALK2 contrairement aux BsAb anti-AMHRII-ALk3 (**Figure 78**A). ALK2 semble donc être impliqué dans la migration cellulaire des SKOV3-AMHRII. De plus, l'invalidation du récepteur ALK2 par siRNA entraine une inhibition de la migration (**Figure 78**B). Le processus de migration cellulaire est associé à la voie de signalisation de la β-catenine car elle joue un rôle essentiel dans l'adhérence cellulaire (Allard et al., 2000; Kobayashi et al., 2011; Park et al., 2017). Lorsque nous invalidons le gène de ALK2 par des siRNA nous observons une diminution de la protéine β-caténine et à l'inverse un siRNA contre la β-caténine diminue l'expression du récepteur ALK2 (**Figure 78**C). Le récepteur ALK2 et la β-catenine semblent étroitement liés pour être impliqués dans la migration cellulaire. De plus, au cours de la régression des canaux Müller, ALK2 favorise l'effet migratoire des cellules induit par l'hormone en activant la β-caténine (Zhan et al., 2006).

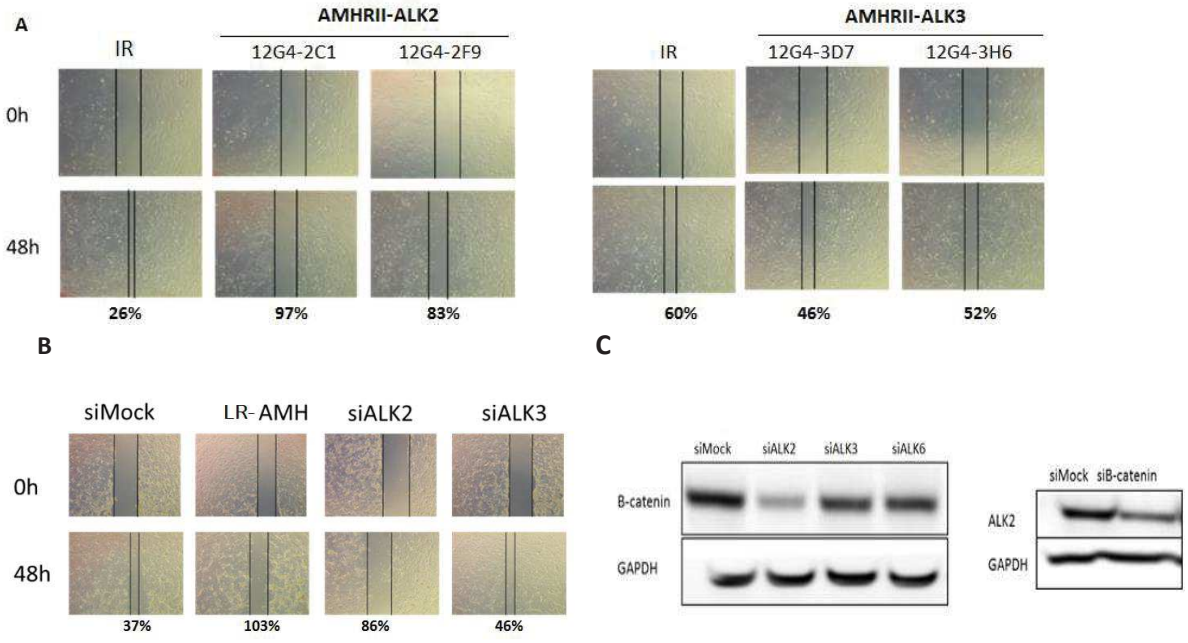


Figure 78 : Effet des BsAb sur la migration cellulaire des SKOV3-AMHRII et implication d'Alk2 dans cet effet
A) Migration analysée par le test de « wound healing » en présence de 333 nM d'anticorps pendant 48h sur la lignée cellulaire SKOV3-AMHRI. B) Migration des cellules transfectées par des siRNA ALK2 et ALK3 (10nM). C) analyse en Western Blot de l'expression de β-catenin et du réceteur ALK2. N=2

5.6.4 Effet des BsAb sur cellules primaires isolées d'ascites de patientes

Nous avons montré que l'effet des BsAb est dépendant du modèle cellulaire. Afin de conforter nos résultats et de se projeter vers des approches cliniques, nous avons testé leur effet sur des cellules d'ascites isolées de 3 patientes (patiente 5, 6 et 7) dans le chapitre V (5.1.1.2). Le but de cette étude est de conforter nos résultats obtenus précédemment sur l'efficacité des BsAb dans des modèles primaires issus de patientes. La survie des cellules a été analysée par Celigo après marquage du noyau de ces dernières par du Hoescht 3342 trichlorydrique. Les résultats obtenus sont représentés par le niveau de confluence (µm2). Nous observons que les BsAb anti-AMHRII-ALK3 induisent une diminution de la confluence que nous corrélons à l'inhibition de la survie et de la prolifération (**Figure 79**). Cet effet est observé sur les cellules des 3 patientes et suivent la même tendance que sur la lignée cellulaire COV434-AMHRII alors que sont des cellules issues de cancers épithéliaux. Cependant, ces cellules semblent perdre leurs caractères mésenchymateux puisqu'elles sont Epcam négatives (EpCAM -) lors de leur passage en cytométrie en flux. Ce résultat pourrait expliquer leur phénotype semblable à la lignée COV434-AMHRII (AMHRII + ; EpCAM -).

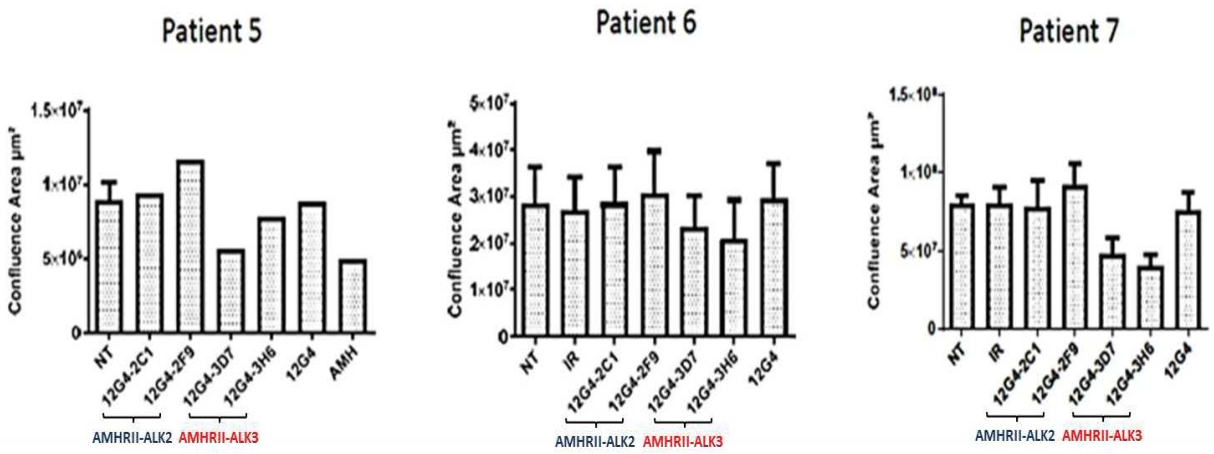


Figure 79 : Effet des BsAb sur les cellules isolées d'ascites de patientes atteintes de cancers ovariens
Cellules traitées avec 333 nM d'anticorps, la survie est représentée par la confluence mesurée avec le Celigo. N=2.

5.6.5 Etude des effets des BsAb in vivo

La mise en place d'un modèle expérimental préclinique est une étape incontournable afin de confirmer *in vivo* les effets démontrés *in vitro* et ainsi valider le potentiel thérapeutique de nos molécules pour un usage en clinique.

Nous avons utilisé le modèle de souris immunodéficientes « Nude » afin que la prise de greffe de cellules humaines cancéreuses soit effective. Les souris sont greffées en sous cutané avec les cellules COV434-AMHRII puis sont traitées lorsque la tumeur a atteint environ 100 mm^3 selon le protocole expérimental ci-dessous (**Tableau 8**).

Sur la base des résultats *in vitro* nous avons décidé d'évaluer l'activité des BsAb anti-AMHRII-ALK3 sur la lignée COV434-AMHRII. L'étude de l'ensemble des BsAb aurait été pertinente mais elle est impossible à ce stade pour des raisons financières. La production des deux BsAb a été réalisée par EVITRIA. L'anticorps monospécifique 12G4 a été choisi comme contrôle positif car ses effets *in vivo* ont déjà été évalués sur la lignée COV434-AMHRII (Kersual et al., 2014). La partie constante du 12G4 a été modifiée en IgG1 humaine afin qu'elle soit identique à celle des BsAb. Afin d'évaluer l'effet du ciblage des récepteurs ALK par les BsAb, nous les avons comparé à un BsAb ciblant AMHRII mais qui est aspécifique (IR BsAb) au niveau de la partie anti-ALK (**Tableau 8**). Ce BsAb aspécifique est un anti-AMHRII-CD5, l'anti-CD5 a été choisi et décrit dans le papier de Golay et al. où ils évaluent l'activité du BsAb HLADR-CD5 dans les lymphomes.

Tableau 8 : Conception de l'essai In vivo

EXPERIMENTATION In Vivo : COV434-AMHRII (greffe SC)					
Souris nude Hsd Athymic 6 semaines 	GROUPES	TRAITEMENTS	DOSES	VOIES	FREQUENCE
	Groupe 1 (10)	NaCl	200µl	Ip	2x/sem durant 4 sem
	Groupe 2 (10)	12G4	10mg/kg	Ip	2x/sem durant 4 sem
	Groupe 3 (10)	12G4-3D7	17mg/kg	Ip	2x/sem durant 4 sem
	Groupe 4 (10)	12G4-3H6	17mg/kg	Ip	2x/sem durant 4 sem
	Groupe 5 (10)	IR BsAb	17mg/kg	Ip	2x/sem durant 4 sem

Les résultats obtenus *in vivo* ne sont pas corrélés aux résultats acquis au préalable *in vitro*. Il est important de souligner qu'au cours de cet essai préliminaire la croissance du groupe contrôle NaCl est plus lente que sur les courbes obtenues sur des expériences antérieures. Dans la publication de Kersual et al., les tumeurs dépassaient les 2000 mm^3 à 33 jours et, dans Estupina et al., 2000 ou 2500 mm^3 à 40 jours. Dans les 2 cas, la prise avait démarré un peu plus vite avec un début de traitement à 11 jours. Dans notre cas, nous avons démarré le traitement à 22 jours avec une moyenne des volumes tumoraux aux environ de 120 mm3. A ce jour, l'essai *in vivo* ne nous permet pas de conclure sur l'efficacité des BsAb en raison de ce problème de croissance du groupe contrôle. Nous n'observons pas de différence significative sur la croissance tumorale ainsi que sur la survie entre le groupe de souris traitées NaCl et les contrôle positif 12G4 et BsAb-CD5 (**Figure 80**). D'autres études *vivo* seront programmées prochainement afin d'approfondir notre étude.

Suite à ces résultats, nous avons évalué l'expression du récepteur AMHRII sur les tumeurs après traitement afin de vérifier la pertinence de notre thérapie ciblant AMHRII. De manière surprenante, l'expression d'AMHRII est augmentée d'un facteur 2 lors que les cellules sont introduites dans un modèle intégré en comparaison aux cellules avant la greffe (**Figure 81**). Ces résultats soulignent l'influence des facteurs du microenvironnement sur la variation d'expression des récepteurs. D'autres études semblent nécessaires pour déterminer également l'influence du microenvironnement sur la variabilité d'expression des récepteurs ALK, variabilité d'expression qui pourrait influencer les résultats de nos thérapies ciblées.

De plus, dans nos conditions *in vitro* la concentration en AMH apportée par le SVF est relativement contrôlée et régulée par les cellules. A l'échelle de l'organisme, nous n'avons aucun recul quant à la concentration d'AMH sécrétée ce qui pourrait également faire varier l'expression de ses récepteurs. Le niveau d'AMH *in vivo* fera l'objet de discussion dans le chapitre VI.

Il est toujours difficile d'extrapoler des résultats en passant d'un modèle cellulaire *in vitro* à un modèle intégré *in vivo*. En effet, l'ensemble des signaux capables de moduler la signalisation, ne serait-ce que par les niveaux d'AMH et les variations d'expression des récepteurs, est autrement plus complexe à étudier à l'échelle de l'organisme. A cela s'ajoute une variabilité dynamique des différents acteurs du microenvironnement tumoral *in vivo* que l'on ne retrouve pas dans nos modèles cellulaires *in vitro*.

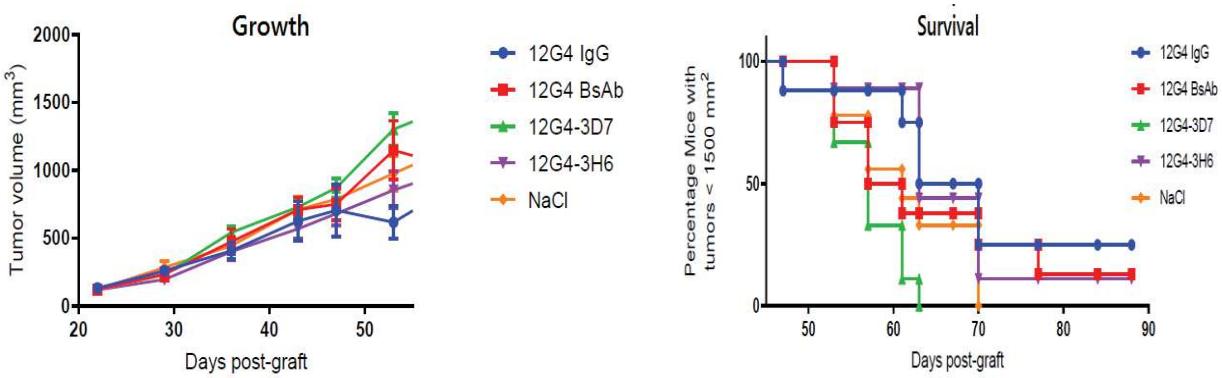


Figure 80 : Kaplan Meier de la survie globale des souris traitées avec les BsAb AMHRII-Alk3
Les souris sont greffées avec les cellules COV434-AMHRII et traitées 2 fois par semaine à 10mg/kg lorsque le volume tumoral atteint environ 100 mm³ pendant 4 semaines. IR : BsAb ciblant AMHRII-CD5. N=1

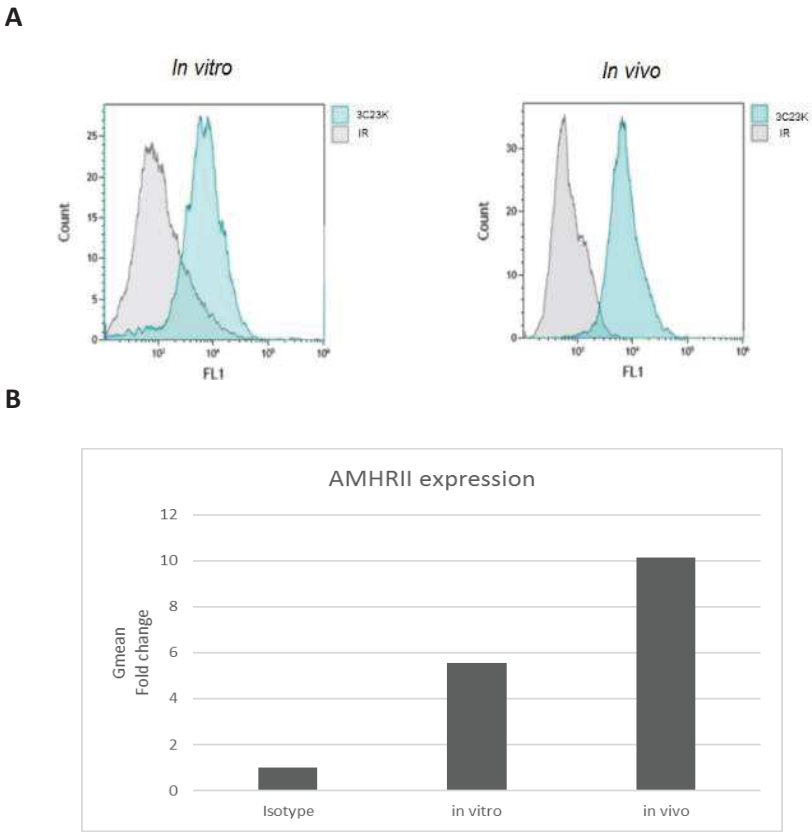


Figure 81 : Expression du récepteur AMHRII en condition in vitro et in vivo
A) Analyse en cytométrie en flux sur les COV434-AMHRII. B) Variation de l'intensité moyenne de fluorescence par rapport à celle de l'isotype contrôle.

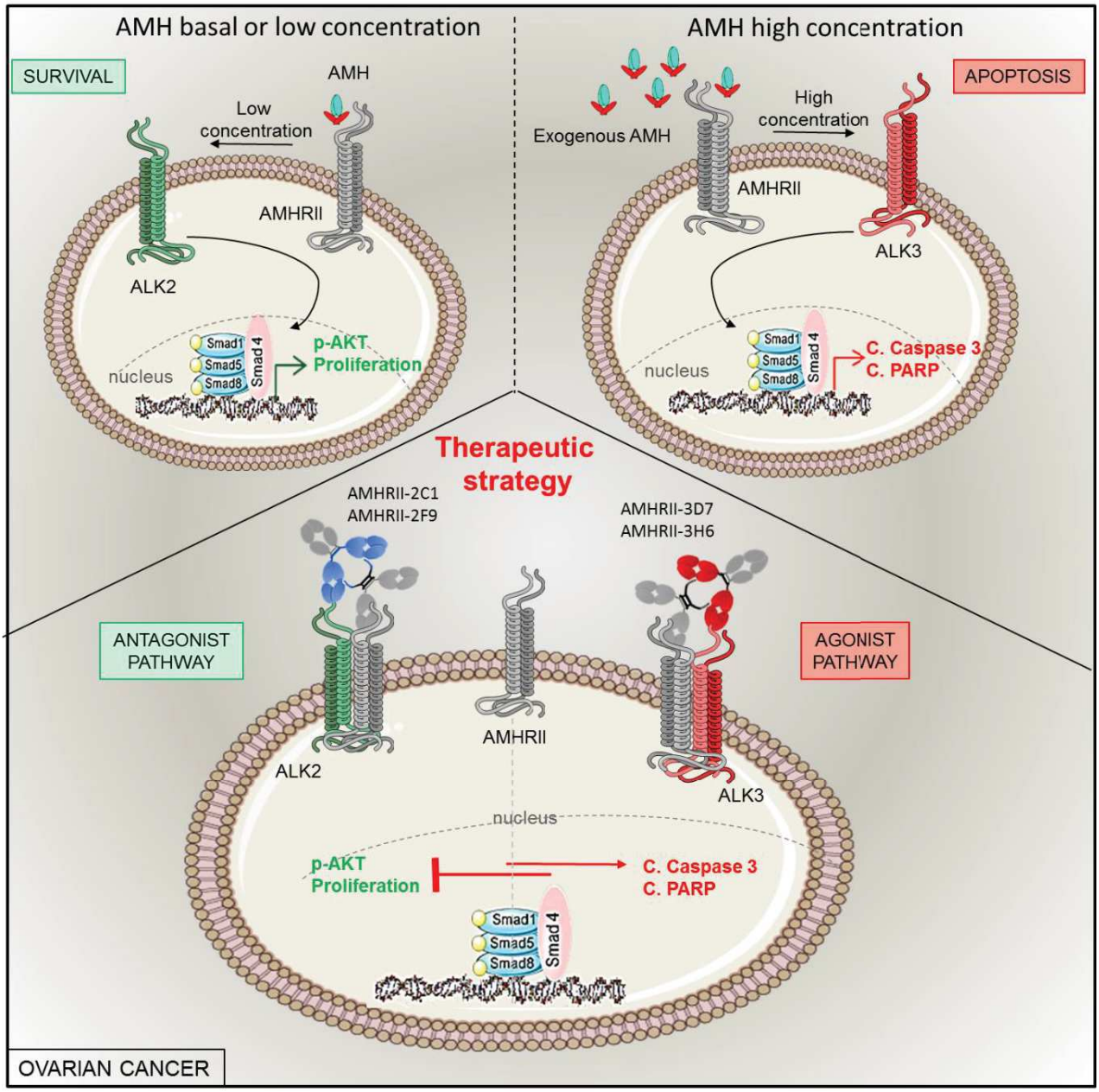


Figure 82 : Bilan de la stratégie des BsAb sur la signalisation de l'AMH

5.7 Conclusion du chapitre V : Implication des récepteurs ALK dans la signalisation de l'AMH et stratégies thérapeutiques associées

La voie de signalisation AMH/AMHRII a été étudiée en détail dans des conditions physiologiques au cours du développement mais l'implication des 3 récepteurs potentiels de type I (ALK2, ALK3 et ALK6) n'est pas complètement élucidée. Les données rapportées les plus importantes concerne la famille du TGF (Horbelt et al., 2012). Dans le contexte tumoral, peu de données sont disponibles. Seul Basal et al. ont analysé l'expression de AMHRII, ALK2, ALK3 et ALK6 par IHC dans 262 échantillons (Basal et al., 2016). L'expression d'AMHRII dans environ deux tiers des cas (73,4% dans cette étude particulière) confirme les données publiées par plusieurs auteurs (Bakkum-Gamez et al., 2008; Mazumder et al., 2017; Salhi et al., 2004). Dans la série de 235 patients évaluables pour l'analyse des 4 récepteurs, 36 % ont exprimé AMHRII/ALK2/ALK3/ALK6, 34 % AMHRII/ALK2/ALK3, 18 % ALK2/ALK3 et 7% ALK2/ALK3/ALK6. Dans cette étude, il n'y a aucune corrélation entre leurs niveaux d'expression et le stade de la maladie ou la survie globale (Basal et al., 2016b). En utilisant 2 lignées cellulaires modèles (COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII), nous avons démontré qu'ALK3 est le récepteur AMHRI préférentiel pour la signalisation de l'AMH et l'induction d'apoptose. Dans un panel de 4 lignées cellulaires (COV434-AMHRII, SKOV3-AMHRII, OVCAR8 et KGN), nous avons montré qu'ALK2 et ALK3 sont modulés en fonction des concentrations d'AMH. En effet, ALK2 présent à la membrane est diminué lors de l'augmentation des doses d'AMH et à l'inverse l'expression d'ALK3 est augmentée pour induire l'apoptose. Ces résultats ont été confirmés dans des cellules tumorales isolées à partir d'ascite de patientes atteintes d'un carcinome ovarien.

Les récepteurs ALK2 et ALK3 jouent donc un rôle essentiel dans l'orientation de la signalisation AMH/AMHRII et constituent donc des cibles thérapeutiques attractives. Cependant, ils sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus et donc leur ciblage en monothérapie entrainerait de sérieux effets secondaires. De ce fait, par l'intermédiaire du récepteur AMHRII surexprimé dans les cancers, nous avons conçu des bispécifiques (BsAb) qui permettent d'orienter la signalisation de l'AMH vers une voie apoptotique. Nous avons utilisé le format de BsAb créé par l'équipe de Martine Cérutti, (CNRS UPS 3044), particulièrement bien adapté puisqu'il est bivalent pour chacune de ses cibles. La stratégie des BsAb apporte une plus-value par rapport au traitement en monothérapie avec l'anti-AMHRII (le 12G4) puisque l'effet du 12G4 est uniquement médié par son activité ADCC (**Figure 82**).

Nous avons évalué l'effet des BsAb sur nos modèles de cancers ovariens *in vitro* et sur des cellules primaires isolées d'ascites de patientes. De manière surprenante, l'effet des BsAb est dépendant de la lignée cellulaire. Les BsAb qui ciblent AMHRII-ALK2 induisent l'apoptose sur la lignée cellulaire SKOV3-AMHRII. A l'inverse, ce sont les BsAb qui ciblent AMHRII-ALK3 qui active la voie apoptotique sur la

lignée COV434-AMHRII. Par western blot, nous avons montré l'induction et l'augmentation des protéines cibles impliquées dans l'apoptose tel que caspase 3 et PARP clivé. L'effet majeur des BsAb a été évalué par le test de survie clonogénique qui révèle de manière significative leur effet inhibiteur. Cependant, les résultats préliminaires *in vivo* des BsAb AMHRII-ALK3 sur la lignée COV434-AMHRII ne permettent pas de conclure sur leurs effets car la croissance tumorale et la survie des souris sont identiques dans le groupe témoin (NaCl) et les groupes contrôles positifs (Mab anti-AMHRII (12G4) et le BsAb AMHRII-CD5 (IR BsAb)). Cependant, nous ouvrons la discussion sur la variabilité d'expression des récepteurs dans un modèle intégré comparé au condition *in vitro*. En effet, nous avons observé que l'expression d'AMHRII est augmenté d'un facteur 2 par rapport aux cellules avant la greffe cela met en évidence l'influence du microenvironnement. Plusieurs facteurs sont donc en prendre en compte pour l'interprétation de nos prochains essais dans un modèle intégré tel que i) la variabilité d'expressions des récepteurs de l'AMH *in vivo* ainsi que ii) la concentration d'AMH présente au niveau de la tumeur. A présent, il est donc essentiel d'effectuer d'autres essais *in vivo* en incluant : les BsAb AMHRII–ALK2, d'autres modèles cellulaires et analyser l'expression de l'AMH et des récepteurs ALK dans un modèle intégré.

CHAPITRE VI : Implication dose dépendante de l'AMH dans la survie cellulaire et stratégie thérapeutique associée

6.1 Effet de l'AMH sur la viabilité cellulaire

Nos résultats ont montré qu'ALK3 est le principal récepteur de type I recruté par AMHRII pour induire l'apoptose lors de l'ajout de concentration croissante d'AMH dans les cellules de carcinome ovarien (à partir de 6 nM d'AMH exogène). A l'inverse, l'expression d'ALK2 diminue de façon similaire à la phosphorylation d'AKT qui a été incluse dans notre analyse des voies non-SMAD. De plus, à l'état basal dans nos conditions expérimentales (10 à 15 pM d'AMH) et aux plus faibles concentrations d'AMH exogène (1,6 à 3,1 nM AMH) Alk2 est exprimé à la membrane et s'hétérodimérise avec AMHRII. Dans ces conditions nous nous intéressons à l'implication du récepteur AMHRII et de l'AMH à de faibles concentrations.

6.1.1 Implication du récepteur AMHRII dans le cancer de l'ovaire

De nombreuses recherches ont montré une surexpression du récepteur AMHRII dans différents cancers, en particulier, dans le cancer de l'ovaire. Afin d'analyser les effets que peut avoir la surexpression du récepteur AMHRII sur le devenir cellulaire, nous avons comparé les lignées cellulaires COV434-AMHRII et COV434-WT ainsi que les SKOV3-AMHRII et SKOV3-WT. Nous avons comparé leurs caractéristiques morphologiques, ainsi que le niveau basal des protéines impliquées dans la signalisation de l'AMH.

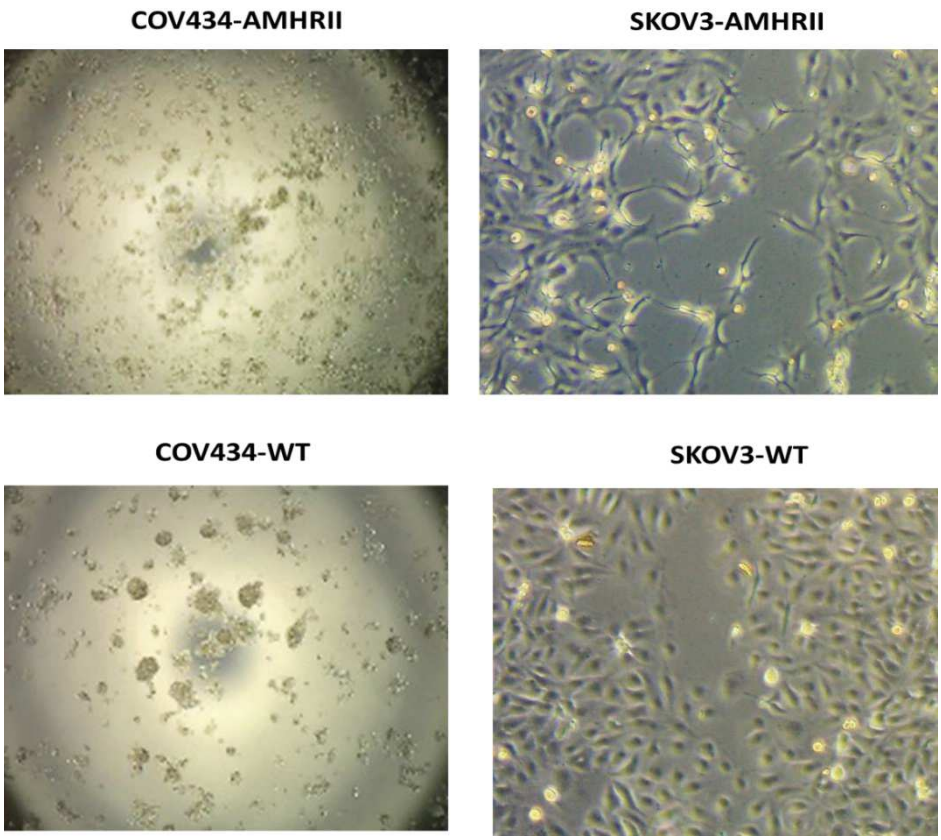
En cytométrie en flux, nous avons montré dans le chapitre V que la transfection du récepteur AMHRII dans la lignée SKOV3 augmente l'expression des récepteurs ALK à la membrane en comparaison à la lignée SKOV3-WT qui n'exprime pas le récepteur AMHRII (**Figure 61**). Ces résultats suggèrent que le récepteur AMHRII recrute à la membrane les récepteurs ALK pour former un complexe hétérodimèrique et donc que leur implication est essentielle dans les effets AMHRII dépendants.

Au niveau morphologique, les cellules transfectées montrent un niveau d'adhérence plus important que les lignées sauvages. Les cellules COV434-WT forment des amas alors que les cellules transfectées COV434-AMHRII s'étalent dans les boites de culture. De manière identique, la transfection d'AMHRII sur ces cellules SKOV3-AMHRII induit un rallongement de la cellule semblable aux cellules dendritiques comparé au SKOV3-WT (**Figure 83**A).

Au niveau de la signalisation, la surexpression du récepteur AMHRII engendre une augmentation de l'expression des récepteurs ALK en comparaison aux lignées sauvages. Les résultats en Western blot confirment ceux obtenus en cytométrie en flux (**Figure 61**).

De plus, nous observons que la transfection d'AMHRII engendre l'augmentation du niveau de base de phosphorylation de la proteine AKT impliquée dans la survie et à l'inverse les protéines clivées caspase 3 et PARP sont diminuées (**Figure 83**B). Ces résultats suggèrent qu'AMHRII induit la survie des cellules par rapport aux lignées « WT » ce qui est cohérant avec son hétérodimérisation avec ALK2 à l'état basal. De ce fait, nous nous sommes intéressés aux concentrations basales et faibles en AMH afin de déterminer si à ces concentrations en AMH pouvait induire la survie et la prolifération des cellules.

A



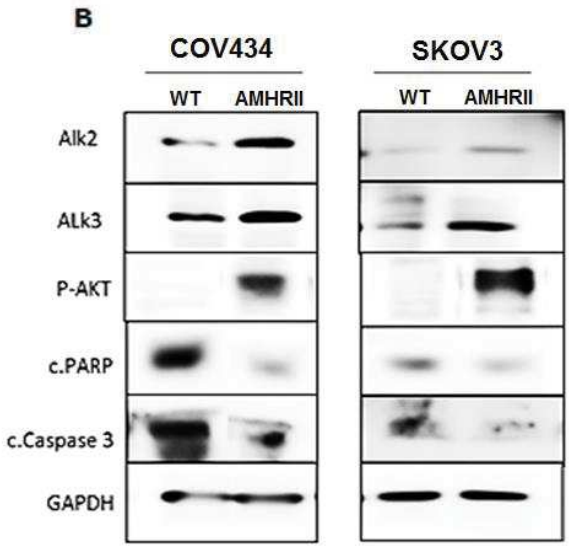


Figure 83 : Comparaison des cellules transfectées avec le récepteur AMHRII vs les cellules WT
A) Morphologie des cellules. B) Analyse par western blot des voies de signalisation de survie et d'apoptose. N=2.

6.1.2 A faible concentration, l'AMH favorise la prolifération cellulaire

Pour analyser plus en détail l'influence de la concentration de l'AMH sur la signalisation, un test de survie (test MTS) a été effectué pour mesurer la prolifération cellulaire. Dans les quatres lignées cellulaires, les doses les plus faibles testées ont augmenté la prolifération cellulaire et les plus élevées l'ont réduite. Selon la lignée cellulaire, cet effet de survie a été observé à 0,8 nM d'AMH de manière significative pour les COV434-AMHRII, et les KGN et jusqu'à 1,6nM pour les SKOV3-AMHRII et 3,2 nM d'AMH pour les OVCAR8 (**Figure 84**A). Cette augmentation de la prolifération a été corrélée à l'augmentation de l'intensité de p-AKT (**Figure 84**B).

Par la suite nous avons transfectées les 4 lignées cellulaire avec un pool de siRNA dirigé contre l'AMH pour diminuer la sécrétion basale d'AMH afin d'évaluer l'effet de l'AMH endogène. En raison d'une synthèse importante de cette hormone, en particulier dans les cellules COV434-AMHRII, et malgré l'utilisation d'un pool de siRNAs préparés à l'endoribonucléase (Kittler et al., 2007), nous n'avons pas complètement invalidé l'AMH comme le montre l'analyse en Western blot (**Figure 84**C). En effet, nous avions déjà observé en cytométrie en flux l'importante réserve intracellulaire d'AMH présent dans le cytoplasme. Cependant, cette inhibition partielle de l'AMH a été suffisante pour réduire la prolifération cellulaire de 20% dans les cellules OVCAR8 à 40% dans les cellules COV434-AMHRII ainsi que la phosphorylation d'AKT avec 1µg de siRNAs transfectés (**Figure 84**D). L'AMH semble donc induire la survie et la prolifération de ces cellules sécrétrices de l'hormone aux doses de 0,8 à 1,6nM selon la lignée cellulaire.

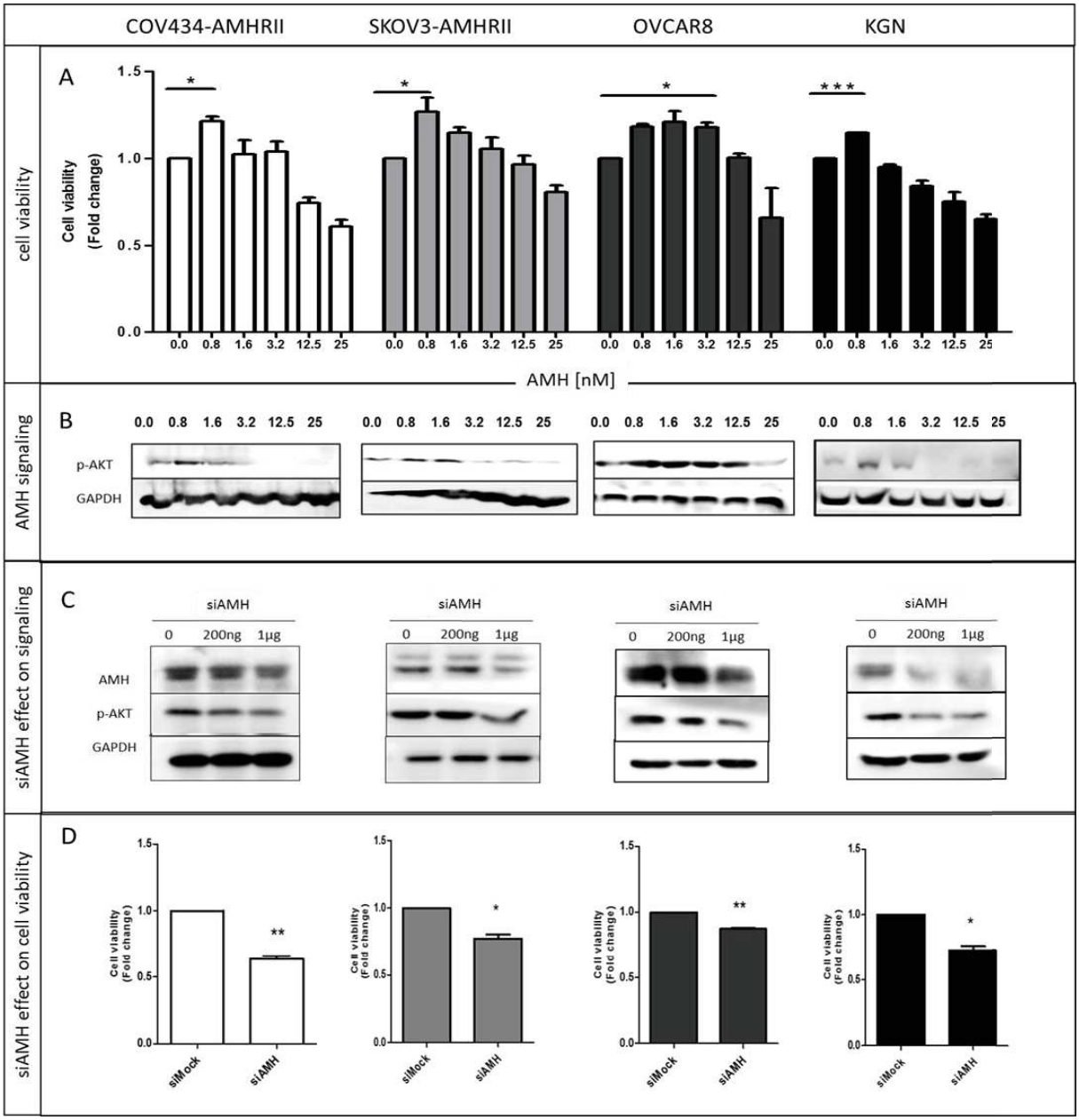


Figure 84 : Effet de la LR-AMH à faible dose

A) Viabilité cellulaire évaluée par le test MTS. (B)Analyse par Western blot de la phosphorylation d'AKT (après incubation avec 0,8 à 25 nM LR-AMH pendant 3 jours. C) Anlayse par Western blot de l'expression de l'AMH et de la p-AKT 48 heures après la transfection de siRNAs contre l'AMH. D) effet de la diminution de l'AMH par le siRNA sur la viabilité cellulaire au jour 3 post-transfection. N>3.

6.2 Stratégie thérapeutique : inhiber l'effet prolifératif de l'AMH endogène par le biais d'anticorps anti-AMH

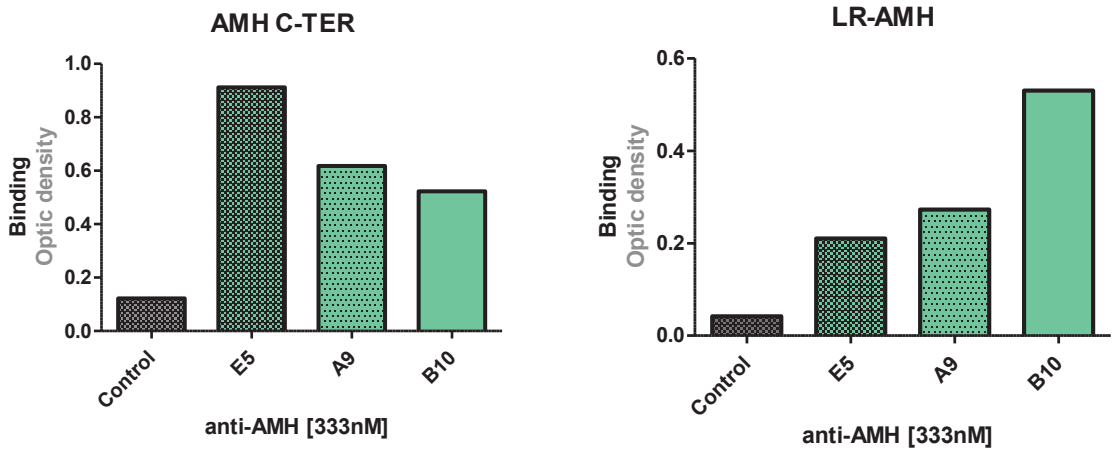
La diminution de la production d'AMH par les siRNAs confirment son implication dans la prolifération cellulaire mais cela ne constitue pas une approche thérapeutique. Nous avons donc conçu un nouvel anticorps dirigé contre la partie C-terminale de l'AMH qui constitue la partie biologiquement active afin d'inhiber ses effets prolifératifs.

6.2.1 Sélection des anticorps anti-AMH

Comme pour les anticorps anti-ALK, les anti-AMH ont été sélectionnés par phage display à partir de la banque d'expression scFv humaine de phages Husc I (Philibert et al., 2007 ; Robin et Martineau, 2012) et dans ce cas ils ont d'abord été clonés au format IgG2a murin. Nous avons testé 3 anticorps anti-AMH par ELISA sur le domaine C-terminal (Ala453-Arg560) de l'AMH et sur la protéine totale recombinante (LR-AMH) ainsi qu'en cytométrie en flux sur la lignée COV434-AMHRII perméabilisée (**Figure 85**A).

La liaison des anticorps sur la partie C-terminale de l'AMH n'est pas corrélée à celle observée sur la protéine totale recombinante (LR-AMH). L'anti-AMH nommé E5 semble avoir une meilleure liaison sur la partie C-ter de l'AMH que sur la protéine entière (LR-AMH) contrairement à l'anti-AMH B10 qui a une meilleure liaison sur la protéine totale que sur la partie C-ter de l'AMH. A des fins thérapeutiques nous faisons le choix de privilégier la liaison sur la protéine recombinante entière car elle représente au mieux la conformation de l'AMH endogène. Il est tout de même nécessaire d'évaluer la liaison des anti-AMH en cytométrie en flux sur l'AMH endogène. La perméabilisation des cellules COV434-AMHRII révèle que seul le B10 à la capacité de lier l'AMH endogène et met en évidence la présence d'une réserve intracellulaire d'AMH ainsi qu'une meilleure liaison du B10 que de l'anti-AMH polyclonal commercialisé d'Abcam (**Figure 85**B).

A



B

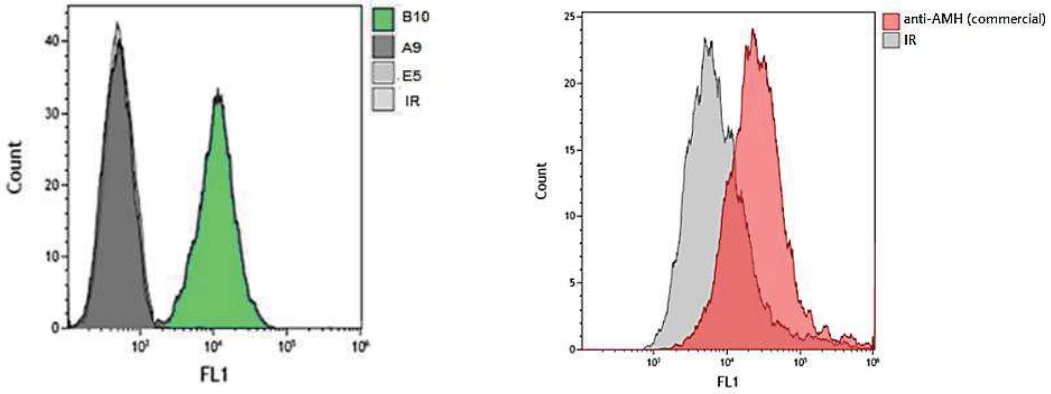


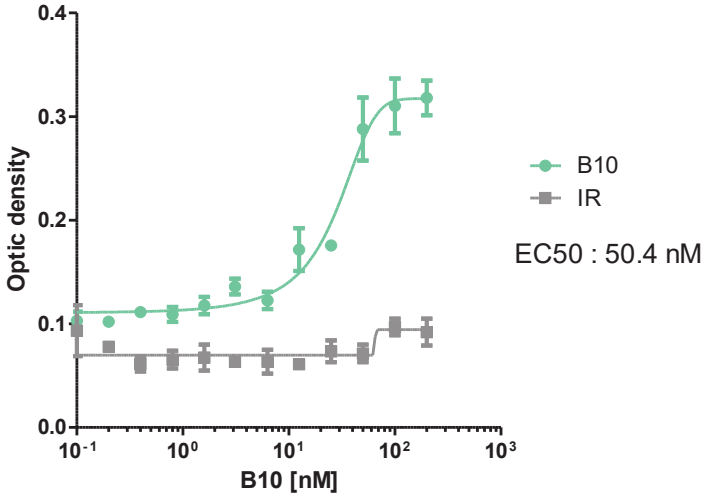
Figure 85 : Liaison des anti-AMH

A) Liaison des anti-AMH sur le domaine C-terminal de l'AMH recombinante ainsi que sur la protéine totale LR-AMH. B) Liaison des anti-AMH (E5, A9, B10) et de l'anti-AMH polyclonal commercialisé d'Abcam en cytométrie en flux sur les COV434-AMHRII perméabilisées.

6.2.2 Caractérisation de l'anticorps anti-AMH (B10)

L'affinité du B10 pour l'AMH est évaluée par ELISA permettant d'estimer l'EC50 du B10 sur le LR-AMH (EC50 = 50.4±1.2 nM) (Figure 86A). Afin d'évaluer sa capacité à induire une déplétion d'AMH et donc réduire l'activité biologique de l'hormone, nous avons utilisé l'induction d'apoptose en mesurant l'activité caspase 3/7. Les cellules COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII sont traitées avec une dose constante de 25nM de LR-AMH qui induit une augmentation de l'activité caspase3/7 (**Figure 57**). En incubant les cellules avec des concentrations croissantes d'anti-AMH B10 (0 – 666nM), cette activité caspase 3/7 est réduite d'environ 40% à partir de 333 nM de B10 dans les cellules COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII (Figure 86B).

A



B

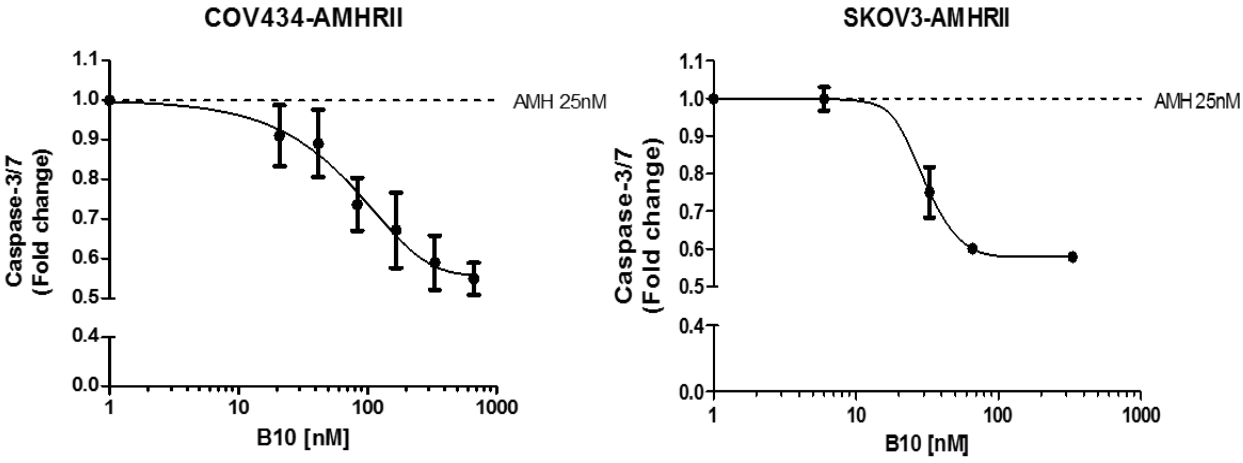


Figure 86 : Caractérisation de l'anticorps anti-AMH (B10)
A) Détermination de l'EC50 par ELISA, les plaques sont recouvertes d'un anticorps polyclonal anti-AMH (Abcam Cat# ab84952) pour capturer l'AMH, et l'anticorps B10 a été ajouté à différentes concentrations pour déterminer son EC50 (50,4±1,2 nM). IR, anticorps irrelevant 13R4 (B) L'anticorps B10 inhibe l'activité caspase 3/7 induite par le traitement à 25 nM de LR-AMH dans des cellules COV434-AMHRII et SKO3-AMHRII.

6.3 Effet biologique de l'anticorps B10

6.3.1 L'anticorps anti-AMH B10 réduit la prolifération cellulaire

Après avoir démontré la déplétion de l'AMH par le B10, nous avons évalué son effet sur la viabilité cellulaire en présence de faibles concentrations d'AMH (5 à 15 pM) qui correspond aux concentrations basales auxquelles l'AMH a un effet prolifératif. En fonction de la lignée cellulaire, le B10 induit une diminution de la viabilité cellulaire de 25 % (OVCAR8) à 50 % (KGN) à des concentrations variant de 3 à 333 nM (**Figure 87**A). Le traitement des cellules à 333 nM de B10 réduit également la survie clonogénique de 57,5 %, 57,1 %, 64,7 % et 37,5 % respectivement pour les cellules COV434-AMHRII, SKOV3-AMHRII, OVCAR8 et KGN (**Figure 87**B). Dans les 4 lignées cellulaires, l'anti-AMH B10 réduit la phosphorylation d'AKT et augmente le clivage de Caspase 3 et PARP. Ce phénomène a été observé uniquement lors du traitement des cellules à des concentrations d'AMH élevées (**Figure 87**C).

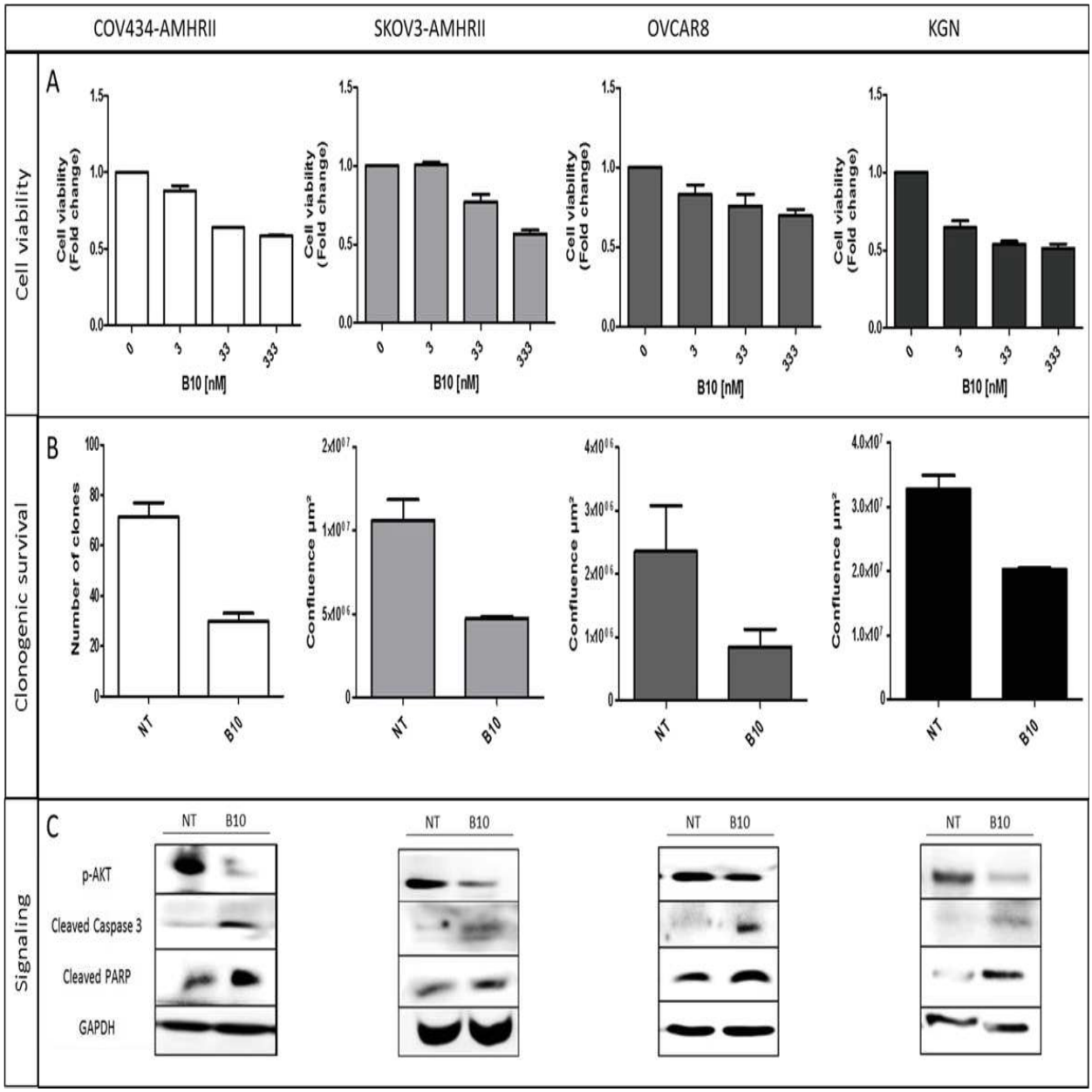


Figure 87 : Inhibition de la viabilité/prolifération et activation des protéines impliquées dans l'apoptose induite par l'anticorps B10

A) La viabilité cellulaire a été analysée (test MTS) après incubation avec 3 à 333 nM B10 pendant 3 jours. B) Survie clonogénique dans les cellules COV434-AMHRII (comptage direct des clones) et dans les cellules SKOV3-AMHRII, OVCAR8 et KGN (mesure de la confluence cellulaire le Celigo Imaging System) après incubation ou non à 333 nM B10 pendant 11 jours. C) Analyse pas Western blot de la phosphorylation d'AKT ainsi que du clivage de caspase 3 et PARP après incubation avec 333 nM B10 pendant 24 heures. N>3

6.3.2 L’anticorps B10 inhibe la prolifération des cellules isolées d’ascites de patiente

Dans une perspective d’application clinique translationnelle, l’effet de l'anticorps anti-AMH B10 est ensuite évalué sur des cellules cancéreuses primaires isolées d’ascites de patientes 5 et 6. L’effet anti-prolifératif est observé dans les deux ascites. La viabilité cellulaire est réduite de 30 % et de 20 % respectivement chez les patients 5 et 6 **(Figure 88**A). L’inhibition de la croissance, estimée par l'aire de confluence, est également réduite de 25 % et 65 % (**Figure 88**B) tandis que l’expression de caspase-3/7 a été multipliée par 3 (**Figure 88**C). Malgré le nombre limité d'échantillons, ces résultats soulignent la perspective préclinique potentielle de notre stratégie anti-AMH.

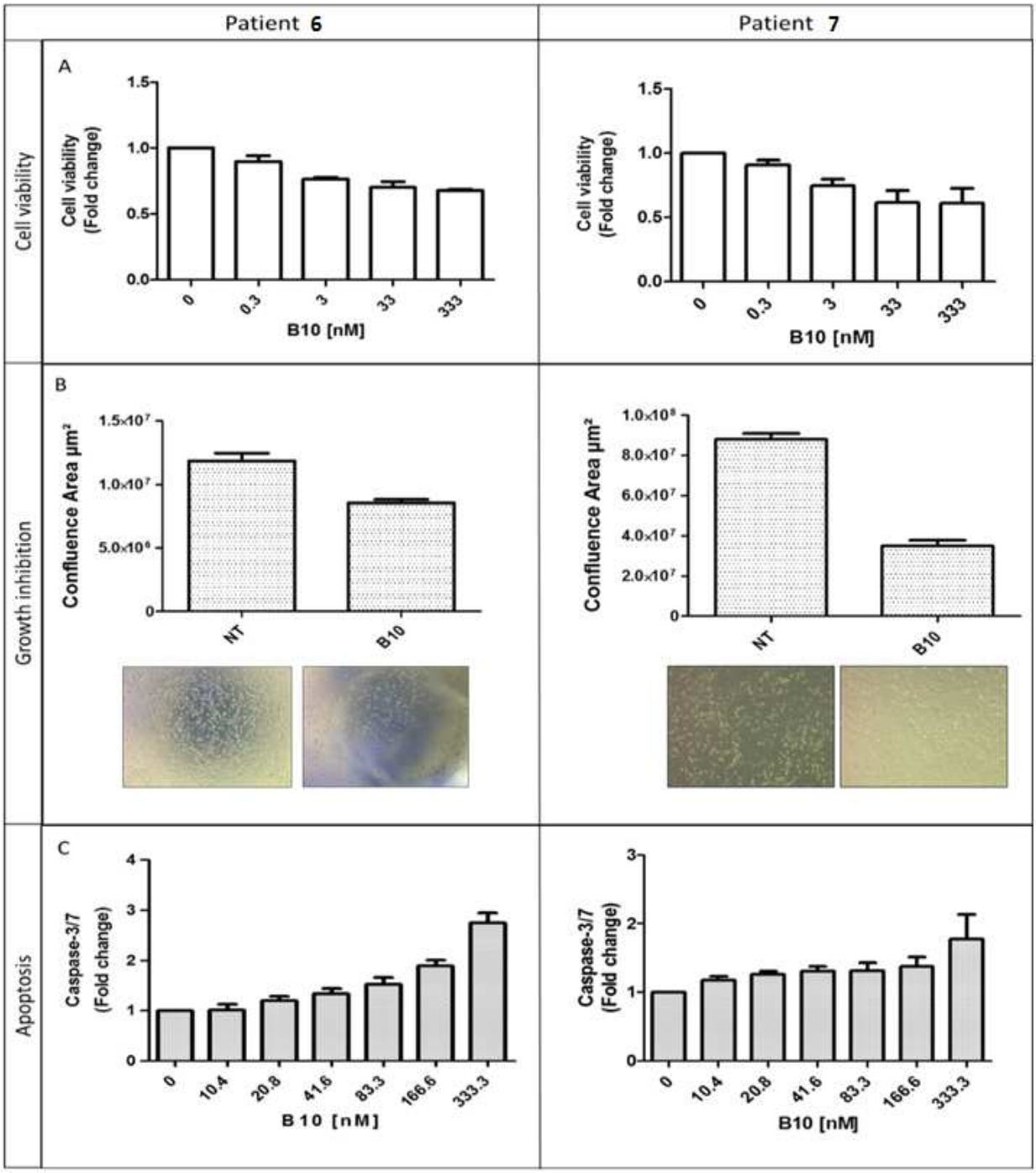


Figure 88 : : Inhibition de la viabilité/prolifération et activation des protéines impliquées dans l'apoptose induite par l'anticorps B10 sur les cellules d'ascites des patientes 6 et 7

A) Viabilité cellulaire analysée avec le test MTS après incubation avec 0,3 à 333 nM de B10 pendant 3 jours. B) Inhibition de la croissance cellulaire (confluence cellulaire mesurée avec le Celigo Imaging System) après incubation ou non (NT) avec 330 nM de B10 pendant 48 heures. C) Induction de l'apoptose (activité caspase 3/7) après incubation ou non avec des concentrations croissantes de B10. N=2.

6.3.3 Contrôle de la croissance tumorale par l'anticorps B10

Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons pas pu exploiter totalement l'activité de l'anti-AMH *B10 in vivo*. Nous avons réalisé une expérience préliminaire sur 6 souris/groupes « nude » greffées avec les cellules COV434-AMHRII. Nous avons utilisé en contrôle positif l'anti-AMHRII (12G4 chimérique). Les souris ont été traitées avec 10mg/kg d'anticorps. Les résultats obtenus avec le B10 montrent un ralentissement de la croissance tumorale. En effet, 60 jours post-greffe le volume tumoral des cellules traitées avec l'anticorps B10 est d'environ 1350 mm^3 et de 1270 mm^3 pour l'anticorps 12G4 comparé à 2011 mm^3 pour le contrôle négatif (NaCl) (Figure 89A). Ce ralentissement de la croissance tumorale est associé à une augmentation de la survie globale des souris 60 jours pour groupe contrôle NaCl, 70 jours pour le groupe traité au B10 et 82 jours pour le groupe traité au 12G4 (**Figure 89**B).

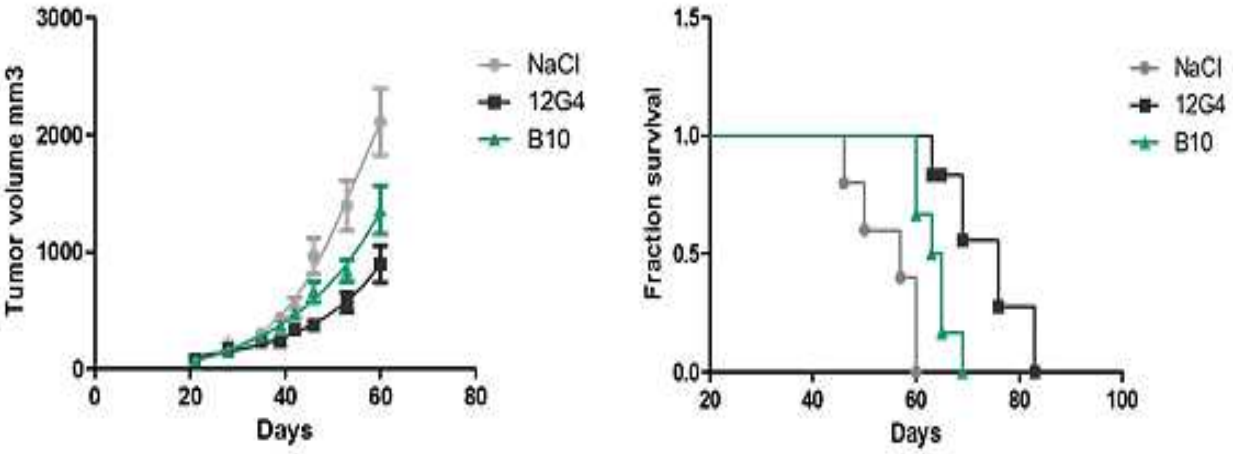


Figure 89 : Contrôle de la croissance tumorale et augmentation de la survie des souris traitées avec les anticorps anti-AMH (B10) et anti-AMHRII (12G4) in vivo
Les souris sont greffées avec les cellules COV434-AMHRII et traitées 2 fois par semaine à 10mg/kg lorsque le volume tumoral atteint environ 100 mm^3 pendant 4 semaines.

Cette expérience préliminaire *in vivo* a permis également d'estimer de manière qualitative l'expression de l'AMH par ELISA au niveau de la circulation sanguine chez les souris contrôles NaCl et traitées avec l'anti-AMH B10 et l'anti-AMHRII 12G4. Lors du sacrifice des animaux, nous avons prélevé le sang au niveau de la veine porte et centrifugé les échantillons pour récupérer le sérum. Le sérum nous a permis de réaliser un ELISA et d'estimer la concentration d'AMH dans chaque condition (**Figure 90**). L'expérience révèle que le niveau d'AMH dans la circulation sanguine pour les souris traitées avec l'anti-AMH est diminuée de moitié par rapport au groupe de souris contrôle (NaCl) et traitées avec le 12G4. Cela suggère que lorsque l'AMH est capturée par l'anticorps, le complexe est dégradé conformément à notre stratégie de diminution de la concentration d'AMHpar un anticorps anti-AMH. Ces résultats préliminaires montrent une réelle efficacité du B10. Cependant, d'autres études *in vivo* sont nécessaires pour valider cet effet.

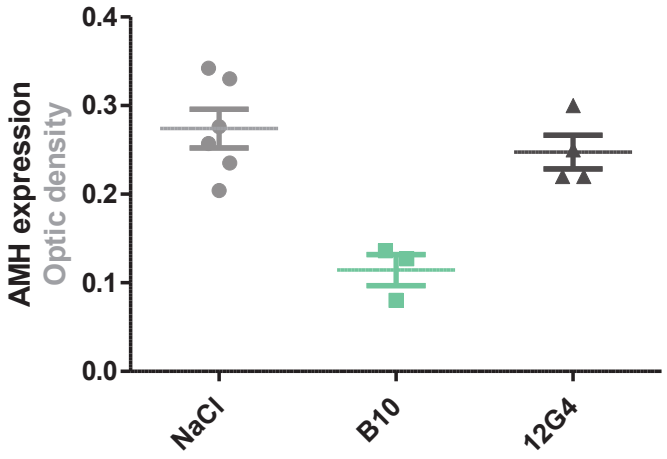


Figure 90 : Estimation de la concentration d'AMH dans le sang périphérique
ELISA réalisé a partir du sérum des souris traitées NaCl, anticorps anti-AMH (B10) et anti-AMHRII (12G4).

Dans la bibliographie, les concentrations en AMH sont évaluées uniquement dans le sang périphérique afin d'analyser la réserve ovarienne chez des patientes ayant des problèmes de fertilité ou pour évaluer l'impact des chimiothérapies sur la reproduction. Dans les tumeurs de la granulosa, cellules productrice d'AMH, la concentration en AMH dans le sang périphérique est évalué pour suivre la croissance tumorale après résection chirurgicale ou chimiothérapie (Chang et al., 2009; Long et al., 2000). L'application du B10 dans ce type de cancer serait justifié compte tenu de l'étroite corrélation entre le niveau d'AMH et la croissance tumorale.

Dans les cancers épithéliaux de l'ovaire, la concentration d'AMH dans le sérum (2,5 – 12 pM) n'est pas corrélée à la croissance tumorale (Walentowicz et al., 2013). Ces derniers résultats cliniques corroborent les concentrations mesurées dans le milieu de nos cultures cellulaires. En effet, nous mettons en évidence une concentration stable aux alentours de 15pM malgré une augmentation de la croissance tumorale (**Figure 52**). Cette concentration stable observée en clinique et dans le surnageant de nos modèles cellulaires suggèrent une régulation contrôlée de la concentration d'AMH dans le microenvironnement tumoral. L'utilisation du B10 serait un moyen pour déréguler cet équilibre et réduire la viabilité cellulaire.

Afin de transposer nos résultats à la clinique, nous collaborons avec l'ICM pour évaluer la concentration d'AMH au niveau de la tumeur chez les patientes atteintes de cancers ovariens et la comparer à la concentration d'AMH dans le sérum, selon la technique EXPEL (Costanza et al., 2018). Ces données consolideront l'intérêt thérapeutique de notre approche.

6.4 Optimisation de l'anticorps B10

Cette première expérience *vivo* nous encourage à développer et améliorer le B10 afin d'augmenter son activité à inhiber l'AMH. Pour cela, nous avons dans un premier temps reformaté l'anticorps en IgG1 humaine puis effectué de la mutagénèse dirigée afin d'enlever les sites potentiels de glycosylation de la même manière que pour les BsAb. Deux mutations ont été effectuées pour le B10. La suppression des sites potentiels de glycosylation dans les domaines variables a permis d'augmenter la liaison pour l'AMH en ELISA (EC50 : 11 ± 1.48) comparée aux anticorps natifs B10 humain (EC50 : 58.96 ± 1.52) et murin (EC50 : 67.07 ± 1.6) (**Figure 91**A). La liaison du B10 (aglycosylé dans les domaines variables) sur l'AMH endogène présente dans les cellules lors de la perméabilisation des COV434-AMHRII est également améliorée en cytométrie en flux avec une augmentation de l'intensité de fluorescence (Gmean) (**Figure 91**B). L'optimisation de l'anticorps a permis d'améliorer l'effet biologique du B10. En effet, le B10 aglycosylé diminue la survie d'environ 80% alors qu'elle est d'environ 50% pour le B10 natif (B10 Humain) (**Figure 92**A). De façon corrélée, le B10 « aglycosylé » augmente l'activité caspase 4/7 sur les cellules d'ascite de la patiente 7 de manière plus efficace que le B10 natif (**Figure 92**B).

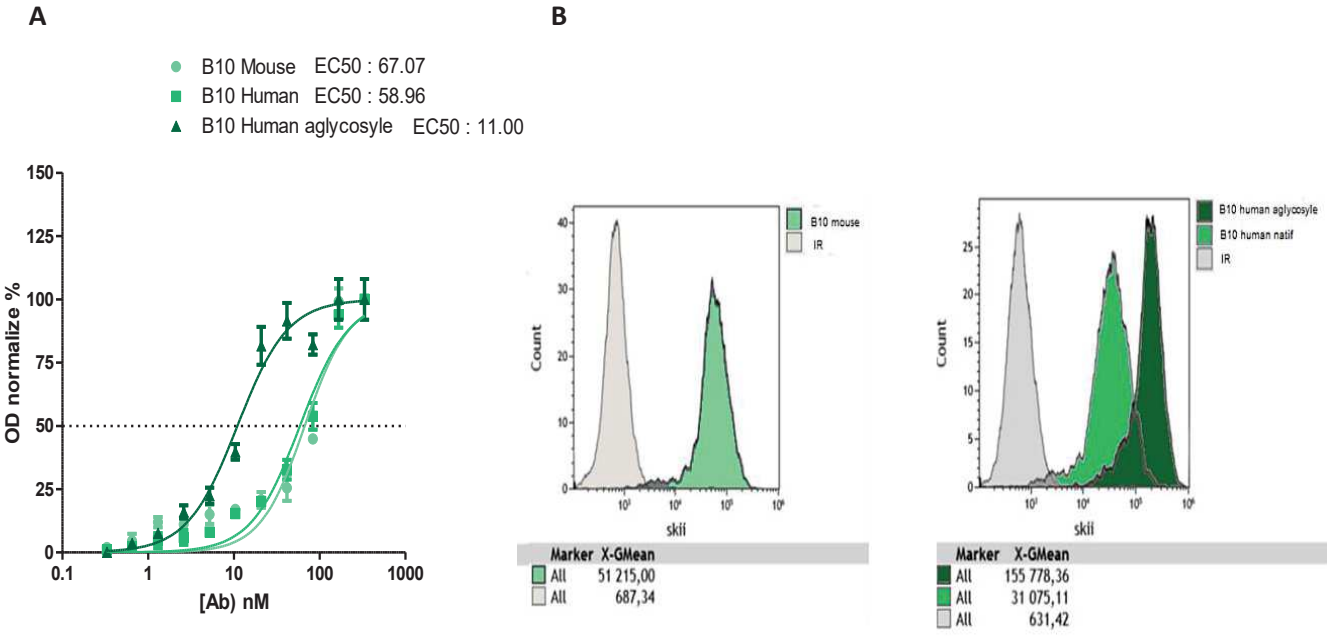


Figure 91 : Liaison des anti-AMH en ELISA et cytométrie en flux
A) ELISA réalisé avec l'anticorps de capture anti-AMH polyclonal d'Abcam et les anti-AMH ont été ajoutés à différentes concentrations (0-333nM). B) liaison des anti-AMH en cytométrie en flux sur les COV434-AMHRII permabilisées. Les anticorps irrelevants utilisés sont le 13R4 humain et le P3X63 murin.

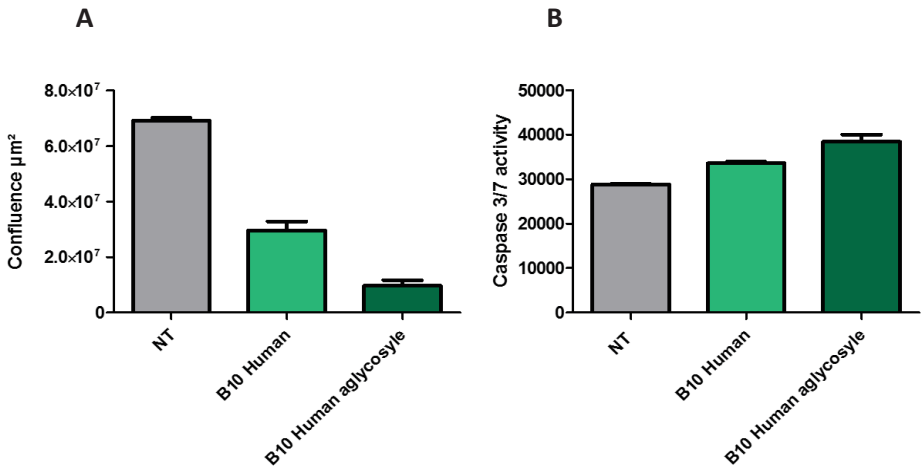


Figure 92 : Effet des anticorps B10 humains natifs et aglycosylés sur la survie et l'activité des caspases 3/7 sur les cellules d'ascites de la patiente 7

A) Traitement des cellules à 333 nM d'anticorps B10 pendant 2 jours, analyse effectuée au Celigo. B) Activité caspase 3/7 évaluée après traitement des cellules à 333nM pendant 6h. N=2.

6.5 Conclusion du chapitre VI : Implication dose dépendante d'AMH dans la survie cellulaire et stratégie thérapeutique associée

L'AMH est proposée comme traitement potentiel des tumeurs gynécologiques depuis 1979 (Donahoe et al., 1979) sur la base de l'observation par RE Scully que les carcinomes épithéliaux de l'ovaire ressemblent histologiquement aux tissus dérivés des canaux de Müller (Scully, 1970). Kim JH et al., ont validé l'application potentielle de l'AMH pour la thérapie des cancers, en partant des cancers de l'ovaire (Fuller et al., 1982; Masiakos et al., 1999; Segev et al., 2002), des cancers du col de l'utérus et de l'endomètre (Barbie et al., 2003; Renaud et al., 2005) jusqu'aux cancers non Müllerien comme le cancer du sein (Gupta et al., 2007) et de la prostate (Hoshiya et al., 2003). Les auteurs ont confirmé que de fortes doses d'AMH peuvent inhiber la croissance des cellules cancéreuses *in vitro* ou *in vivo*, dans les lignées cellulaires ou sur des échantillons de patients. Il est intéressant de noter que des résultats récents suggèrent que l'AMH pourrait être efficace dans les cellules souches cancéreuses et les cellules souches cancéreuses résistantes à la chimiothérapie (Meirelles et al., 2012b; Wei et al., 2010a). Le défi pour passer de ces résultats précliniques à la clinique est clairement la disponibilité de l'hormone au niveau clinique. La stratégie la plus avancée est, à notre connaissance, celle de D. Pépin et al. qui ont décrit une AMH recombinante avec une séquence leader d'albumine et une modification du site de clivage menant à un rendement élevé en AMH bioactive (Pépin et al., 2013). Sur la base de cette publication et du brevet correspondant pour la production d'AMH recombinante active, leur LR-AMH a été utilisée dans notre étude et nous avons confirmé son activité et son potentiel au moins pour les études précliniques.

Le point commun de ces nombreuses études est qu'elles ont toutes utilisé de fortes doses d'AMH pour traiter les cellules cancéreuses, généralement de 25 à 200 nM. Cette concentration doit être comparée à la concentration sérique AMH la plus élevée observée dans la situation physiologique humaine (homme de la naissance à la puberté) qui est inférieure à 1 nM (environ 50 ng/ml). Ceci est parfaitement logique puisque cette stratégie est basée sur l'apoptose induite par l'AMH lors de la régression des canaux de Müller. Nous avons obtenu des résultats similaires dans la présente étude mais nous avons également porté notre attention sur l'observation qu'à faible concentration (jusqu'à 0,8 nM à 6,1 nM selon la lignée cellulaire) l'AMH induit une augmentation de la prolifération cellulaire. Un tel effet paradoxal a été décrit par Rehman ZU et al. dans des cellules de Sertoli chez la souris (Rehman et al., 2017). Outre l'apoptose induite par l'AMH observée de 0,15 à 11,4 nM (10 à 800 ng/ml), la plus faible concentration a favorisé la prolifération des cellules de Sertoli corrélée à des augmentations des taux d'ARNm PCNA et à la phosphorylation ERK. Au-delà de cette situation physiologique dans laquelle l'AMH pourrait jouer un double rôle nécessaire au développement des cellules de Sertoli, Beck TN et al. ont décrit l'implication de la signalisation AMH/AMHRII dans la

transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) du cancer du poumon (Beck et al., 2016). Ils ont suggéré que le rôle de signalisation AMH/AMHRII dans la régulation des EMT était important pour la chimiorésistance. En utilisant des siRNAs anti-AMH, nous avons confirmé l'implication de l'AMH dans la survie des cellules du carcinome ovarien. Nous avons ensuite montré que le nouvel anti-AMH B10 peut réduire la viabilité cellulaire, la survie clonogénique et la phosphorylation AKT dans quatre lignées de cellules cancéreuses ovariennes ainsi que les cellules tumorales isolées à partir d'échantillons d'ascite.

Par ailleurs, dans les cancers de la granulosa l'AMH est un marqueur de la croissance tumorale puisque ces dernières sont des cellules productrices d'AMH. Dans ce cas, la concentration d'AMH est alors corrélée à la prolifération tumorale. En effet, deux études de Long et al et Chang et al ont montré qu'après résection tumorale ou chimiothérapies les concentrations en AMH diminuaient de manière significative. Un argument de plus qui suggère que l'AMH est une bonne cible thérapeutique par anticorps afin de bloquer son activité pro-tumorale.

Sur la base de ces résultats, nous proposons, à l'aide d'anticorps anti-AMH comme le B10, une approche thérapeutique innovante qui tente d'éliminer l'hormone pour supprimer son effet prolifératif plutôt que de surcharger l'organisme par des doses élevées de la même hormone pour induire son effet apoptotique (**Figure 93**). Cette stratégie doit d'abord être évaluée dans les tumeurs gynécologiques où la voie de signalisation AMH/AMHRII est bien décrite mais aussi dans les cancers colorectaux dans lesquels (i) le gène AMH a récemment été montré comme étant surexprimé (Pellatt et al., 2018) et (ii) une expression élevée d'ARN AMH a été rapporté comme un facteur pronostique défavorable chez une série de 597 patients avec un suivi supérieur à 12 ans (Uhlen et al., 2017).

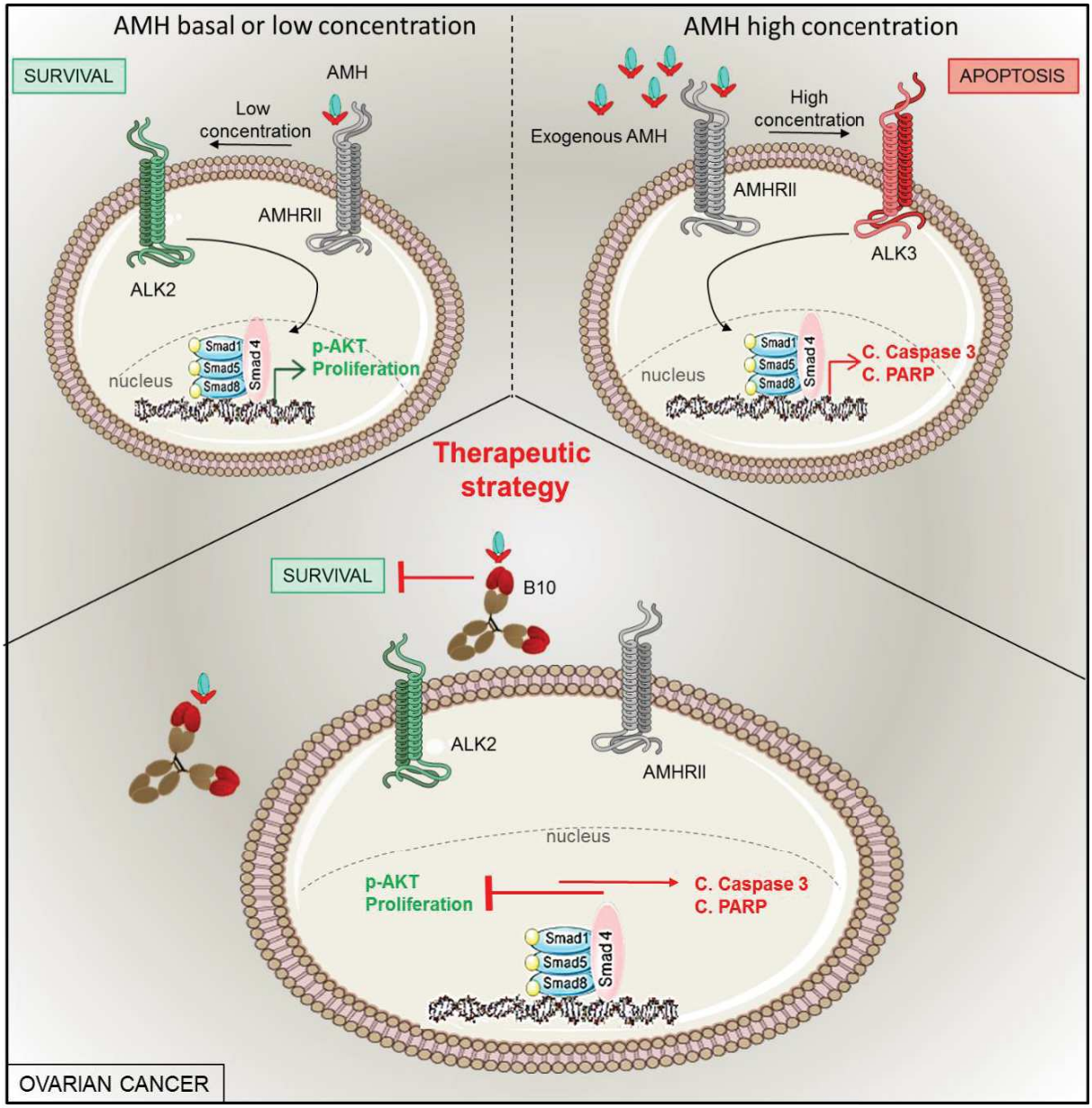


Figure 93 : Bilan de l'effet de l'anti-AMH B10 comme stratégie thérapeutique

CHAPITRE VII : Perspectives sur de nouvelles stratégies thérapeutiques impliquant l'axe AMH/AMHRII

7.1 Combinaison AMH exogène et anticorps anti-AMHRII

Des études antérieures du laboratoire ont montré que l'anticorps anti-AMHRII (12G4) se lie au récepteur sans empêcher la liaison du ligand (Salhi et al., 2004b). Cependant, aucune autre étude sur le possible effet de l'association anticorps anti-AMHRII et AMH recombinante n'a été décrite. Il serait intéressant d'associer le 12G4 dont l'effet est indirect avec le recrutement des effecteurs du système immunitaire avec l'AMH dont l'effet est direct sur l'induction de l'apoptose.

Nos résultats montrent que le 12G4 a peu d'effet en monothérapie *in vitro* sur la phosphorylation de SMAD1/5. En revanche, nous observons que le 12G4 potentialise l'effet de l'AMH puisque nous observons une augmentation plus importante de la phosphorylation des protéines SMAD1/5 et de l'activité caspase qu'en présence d'AMH seule (**Figure 94**). Ces observations permettent d'envisager d'utiliser en thérapie la combinaison du 12G4 avec l'AMH exogène qui ont deux modes d'action différents et complémentaires. De plus, cette association permet d'utiliser des quantités moindre d'AMH qui est une des limites pour la clinique. Une étude *in vivo* permettra de valider nos premières observations et confirmer l'intérêt d'une telle combinaison thérapeutique.

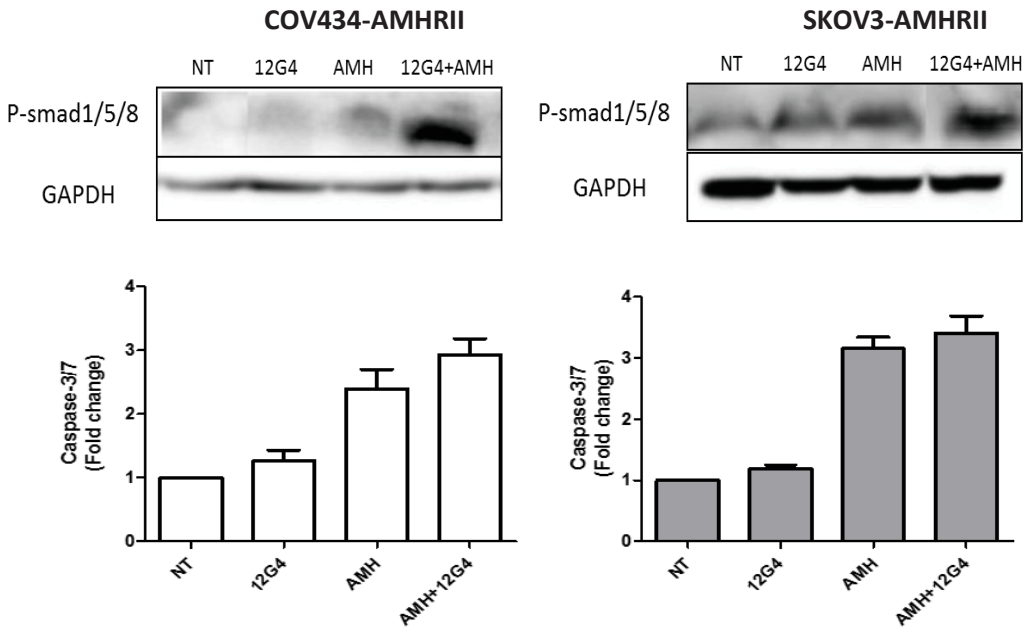


Figure 94 : Effet de la combinaison d'AMH exogène et de l'anti-AMHRII (12G4)
Les cellules sont traitées avec 25nM d'AMH et 333 nM de 12G4 pendant 6H. (A) Analyse par western blot de la p-SMAD1/5 (B) Analyse de l'activité caspase 3/7.

7.2 Interaction du VEGF avec l'axe AMH/AMHRII

L'ovaire humain est un organe hautement vascularisé. Le VEGF joue donc un rôle crucial dans la régulation de la croissance folliculaire, le développement du corps jaune et le maintien des fonctions ovariennes (Kaya et al., 2012). Le VEGF s'exprime dans les cellules de granulosa ovarienne, theca et granulosa lutéine (Abramovich et al., 2012) . Une hypersécrétion du VEGF est fréquemment observée chez les patientes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (Peitsidis and Agrawal, 2010) ainsi que dans le sérum de patients atteints de tumeurs GC primaires (Färkkilä et al., 2011).

L'étude de Fang et al en 2015 montre que l'expression de la protéine AMHRII augmente en réponse à la stimulation du VEGF dans les cellules cancéreuses de la granulosa KGN. Sur la base de cette étude, nous avons traité les KGN et les SKOV3-WT à 10 et 100 ng/ml de VEGF pendant 24h et 48h. Nous avons montré également que le VEGF augmente de manière dose dépendante l'expression du récepteur AMHRII dans ces deux modèles cellulaires (Fang et al., 2016) (**Figure 95**).

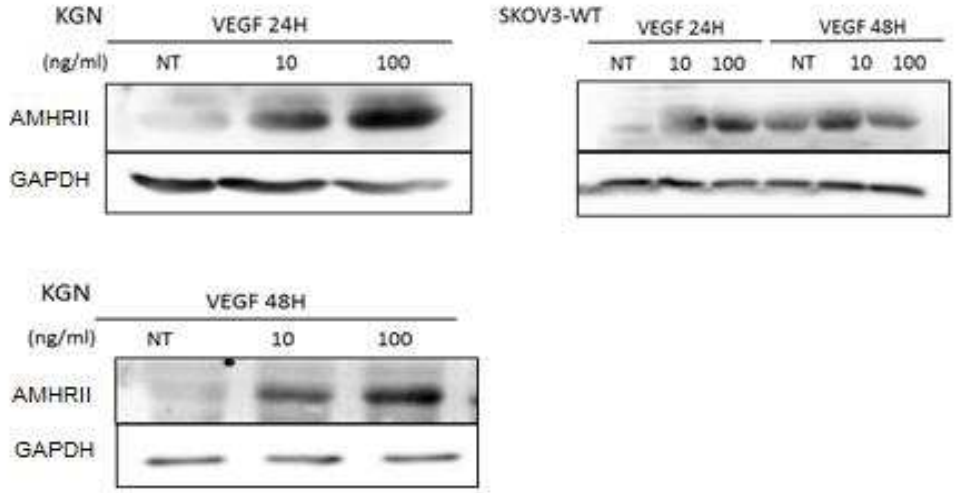


Figure 95 : Effet du VEGF sur l'expression d'AMHRII sur les cellules KGN et les SKOV3-WT

Au cours de ce projet, nous avons observé la perte progressive du récepteur AMHRII *in vitro*. Ce phénomène a été observé sur nos différentes lignées cellulaires mais aussi sur les cellules primaires isolées d'ascites de patientes (**Figure 49**). De plus, nous avons observé lors de nos essais *in vivo* que l'expression d'AMHRII, sur les cellules tumorales greffées chez la souris, est augmenté ce qui suggère la présence d'un facteur favorable au maintien ou à la surexpression du récepteur AMHRII à la membrane (**Figure 95**). L'implication du VEGF dans la tumorigénèse pourrait être un des facteurs principaux favorisant le maintien du récepteur AMHRII au cours du temps. Sur le plan clinique, le Bévacizumab qui cible le VEGF est le premier anticorps utilisé en association avec les chimiothérapies

dans le traitement du cancer de l'ovaire. Nos résultats et ceux de Fang suggèrent que la diminution de la concentration en VEGF pourrait réduire l'expression du récepteur AMHRII. Il serait interessant de comparer la densité antigénique d'AMHRII sur les tumeurs ovariennes de patientes traitées ou pas par du Bévacizumab. Nous nous posons donc la question de la nécessité d'utiliser le Bévacizumab pour les patientes AMHRII positive au détriment du murlentamab (anti-AMHRII en clinique depuis 2016) qui signe la spécificité tumorale. De plus, l'intérêt du Bévacizumab en thérapies est actuellement remis en question compte tenu de son effet modeste et de ses effets secondaires indiqué par les Haute Autorité de Santé.

7.3 Interaction du FcRn (récepteur Fc néonatal) avec l'axe AMH/AMHRII

Dans le cadre du Labex MabImprove, nous collaborons avec l'équipe FRAME du GICC à Tours et plus particulièrement avec le Dr Varérie Gouileux-Gruart responsable de l'équipe dont les travaux portent sur l'implication du FcRn dans le microenvironnement. Nous nous sommes intéressé à l'action que peut avoir l'AMH sur la régulation du FcRn. Le FcRn est connu pour recycler l'albumine et les IgG permettant à ces dernières d'augmenter leur demi vie. En oncologie, dans le cancer du poumon, du sein et de la prostate, il est observé que l'expression du FcRn est réduite par rapport aux tissus sains. Cette diminution d'expression du FcRn a pour conséquence i) une réduction du recyclage de l'albumine dont se servent les cellules cancéreuses pour leur croissance, ii) une diminution du développement et de l'activation des cellules NK dans le microenvironnement tumoral observé dans un modèle de métastase pulmonaire (Castaneda et al., 2018), iii) Un facteur de mauvais pronostic des patients (Dalloneau et al., 2016; Swiercz et al., 2016).

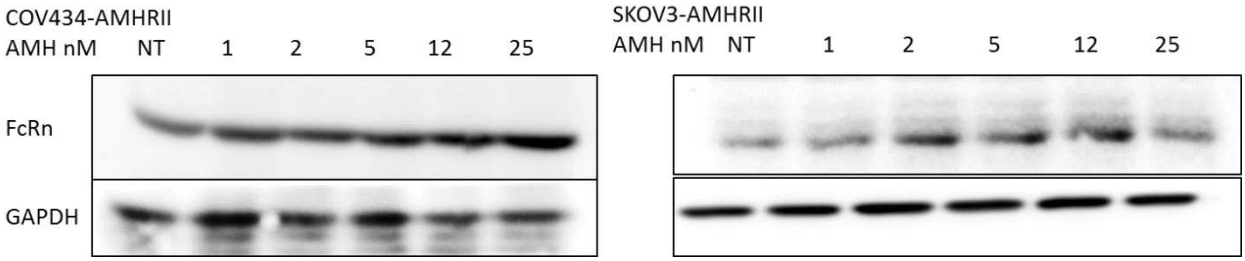
En plus de cette sous-expression du FcRn, il y'a une augmentation de plusieurs protéines solubles pro-tumorales tel que le VEGF, TGF-β, cytokines sécrétées localement. L'AMH est une hormone qui fait partie de la grande famille des TGF-β qui induit la survie et la prolifération des cellules tumorales. Il serait donc intéressant d'analyser l'effet de l'AMH sur l'expression du FcRn sur nos modèles de lignées ovariennes.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de l'ajout d'AMH exogène à doses croissantes (**Figure 96**A), puis invalidé l'AMH par siRNA et par l'anticorps B10 (**Figure 96**B). Enfin, nous avons analysé l'implication de la sur-expression du récepteur AMHRII sur l'expression du FcRn (**Figure 96**C).

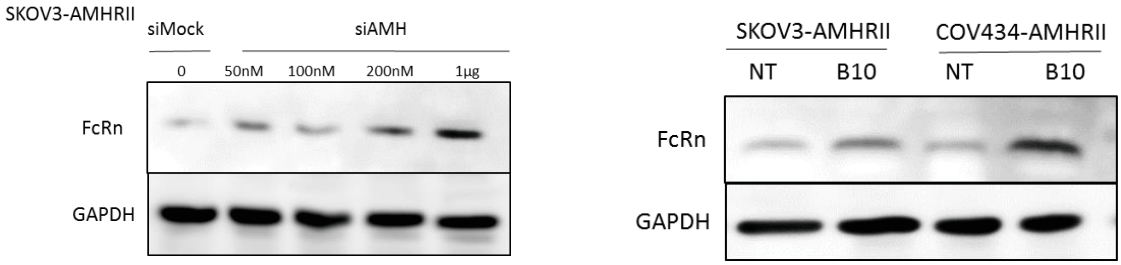
Dans les précédents chapitres, nous avons montré que l'ajout d'AMH exogène ou bien la réduction d'AMH (via siRNA et anti-AMH B10) dans le milieu de culture entraine l'apoptose des cellules. Dans ces deux conditions l'ajout en excès d'AMH ou bien la diminution de l'hormone entraine l'augmentation de l'expression du FcRn (**Figure 96** A et B).

Nous avons montré également que la surexpression du récepteur AMHRII augmente la survie des cellules avec une augmentation de P-AKT et donc en quelque sorte augmente la malignité tumorale. Dans cette partie, nous observons que la surexpression du récepteur AMHRII entraine une diminution de l'expression du FcRn par rapport aux lignées sauvages (**Figure 96**C). Ces résultats sont corrélés à ceux de la publication de Swiercz et al, (2016) qui montre que l'expression du FcRn est diminuée dans les cancers du sein, du poumon et de la prostate par rapport aux tissus sains. La surexpression du récepteur AMHRII et la diminution du FcRn signe la malignité tumorale. Ces résultats montrent que l'expression du FcRn est corrélée à l'AMH et à son récepteur. A ce jour aucune référence n'a décrit cette corrélation entre AMH et FcRn. Ces résultats ouvrent donc un nouveau champ de recherche sur les mécanismes d'action qui découle de cette interaction FcRn-AMH.

A : [AMH] exogene (1 – 25 nM)



B : [AMH] basal (5 - 10pM)



C : [AMH] basal (5 - 10pM)

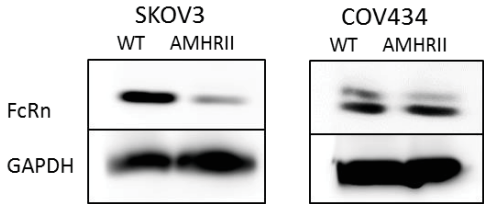


Figure 96 : Implication de l'AMH et AMHRII dans l'expression du FcRn

A) Augmentation de l'expression du FcRn sur les COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII traitées à dose croissante d'AMH. B) Augmentation de l'expression du FcRn induit par l'inhibition de l'AMH par siAMH pour les cellules SKOV3-AMHRII et anticorps anti-AMH (B10) pour les cellules SKOV3-AMHRII et COV434-AMHRII. C) Comparaison entre les cellules WT et transféctées avec le récepteur AMHRII sur l'expression du FcRn

7.4 Conclusion Chapitre VII : Perspectives sur de nouvelles stratégies thérapeutiques associant l'axe AMH/AMHRII

Les tumeurs sont hétérogènes et présentent de nombreuses dérégulations, un seul traitement contre une unique cible ne semble pas suffisant pour détruire complétement les tumeurs, en particulier, les plus agressives.

Pieretti et al montre qu'un traitement couplant l'AMH recombinante et la chimiothérapie permet de réduire les doses de chimiothérapies utilisées. En effet, Les cancers gynécologiques sont sensibles aux traitements par chimiothérapies. Cependant, dans le cancer de l'ovaire, 70% présentent une récidive après traitement. Les limites d'efficacité des chimiothérapies conventionnelles dans les cancers de l'ovaire aux stades avancés encouragent à associer celles-ci avec d'autres molécules anti-tumorales agissant sur d'autres voies comme peut le faire l'AMH (Pieretti-Vanmarcke et al., 2006a).

Les tumeurs sont de véritables pseudo-organes présentant une grande hétérogénéité tant au niveau des cellules tumorales entre elles (variabilité intrinsèque due à de nombreuses dérégulations) qu'au niveau des cellules du microenvironnement qui participent au développement tumoral. Il est donc clair qu'un traitement visant une seule cible ne peut être efficace pour entrainer une rémission complète et durable. Les combinaisons de thérapies semblent un bon moyen pour faire face à cette biologie des cancers hétérogène et complexe.

Dans ce chapitre, il s'agit de réflexions illustrées par des résultats préliminaires qui ouvrent des perspectives sur de nouveaux champs thérapeutiques. Nous nous sommes focalisés sur la combinaison de thérapies ciblant l'axe AMH/ AMHRII associant comme traitement des sources d'AMH exogènes ainsi que l'anticorps 12G4 (anti-AMHRII) potentialisateur de l'effet apoptotique de l'AMH.

Dans un deuxième temps, l'étude des interactions biologiques avec le microenvironnement suite à la perte progressive du récepteur AMHRII au cours du temps nous a permis de mettre en évidence l'interaction de l'axe AMH/AMHRII avec un facteur pro-tumoral, le VEGF qui augmente l'expression du récepteur AMHRII. Le VEGF est un des facteurs qui jouent un rôle essentiel dans la croissance tumorale notamment dans le cancer de l'ovaire qui est un organe hypervascularisé. De ce fait, le Bévacizumab (anti- VEGF) est employé comme thérapie ciblée en première ligne dans le traitement des cancers ovariens (Burger et al., 2011; Oza et al., 2015; Rossi et al., 2017). Cependant, nous suggérons que le Bévacizumab n'est peut-être pas la meilleure stratégie pour les patientes exprimant le récepteur AMHRII.

Nous avons également mis en évidence que l'expression du FcRn est modulée par l'axe AMH / AMHRII. L'étude de Swierce et al a montré que l'expression du FcRn est diminuée dans les cancers comparé au tissus sain (Swiercz et al., 2016). De ce fait, la surexpression du récepteur AMHRII et la présence de l'AMH sont des facteurs « pro-tumoraux » qui entraine la diminution de l'expression du FcRn. Ces

premiers résultats sont les prémices d'un nouveau champ de recherche car actuellement aucune donnée ne fait état d'un lien entre l'AMH et l'expression du FcRn.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'hormone anti-müllérienne (AMH) et ses récepteurs suscitent un intérêt particulier de par son expression augmentée dans les cancers gynécologiques et restreinte dans les tissus sains. Ces observations ont conduit aux développements de nouveaux traitements comme l'anticorps monoclonal Murlentamab dirigé contre le récepteur AMHRII, en essais cliniques actuellement. Cependant, ses effets sont médiés uniquement par sa capacité à recruter le système immunitaire d'où l'importance de développer de nouveaux outils. De ce fait, nous proposons d'impliquer les voies de signalisation de l'AMH par le ciblage des récepteurs ALK2 et ALK3. Nous avons mis en évidence que les récepteurs ALK2 et ALK3 ont des rôles opposés. En effet, ALK2 est recruté par le récepteur AMHRII dans nos conditions basales (5 – 15 pM) et à faible dose d'AMH exogène (0 – 3,1 nM) et semble être impliqué pour induire la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. A l'inverse, à forte concentration d'AMH (6 – 25 nM), ALK3, devient le nouveau partenaire d'AMHRII pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Grâce à nos anticorps bispécifiques ciblant AMHRII-ALK, nous voulons orienter la signalisation vers une voie apoptotique (comme 1ère stratégie thérapeutique). Nous avons mis en évidence *in vitro* que les BsAb anti-AMHRII-ALK3 induisent l'apoptose sur les COV434-AMHRII tandis qu'à l'inverse se sont les BsAb anti-AMHRII-ALK2 qui présentent un meilleur effet dans l'induction de l'apoptose sur les SKOV3-AMHRII. L'effet des BsAb est donc dépendant de la lignée cellulaire et pourrait s'expliquer par les variations d'expression des récepteurs ALK présents à la membrane. Cette modulation de l'expression des récepteurs pourrait également expliquer les effets contradictoires obtenus avec les BsAb AMHRII–ALK3 en condition *in vitro*. Il serait donc essentiel d'analyser l'expression des récepteurs ALK sur les cellules avant et après la xénogreffre. De nombreuse études *in vivo* doivent être encore réalisées afin de caractériser au mieux l'ensemble des BsAb.

Dans le temps imparti de la thèse, nous avons sélectionné seulement deux anticorps anti-ALK pour chaque récepteur sur des critères « physique » comme la liaison en cytométrie en flux et en ELISA ainsi que le nombre de glycosylation. Pour une évaluation plus pertinemente de tous les avantages de cette stratégie de ciblage AMHRII-ALK, il reste à sélectionner un plus grand nombre d'anticorps anti-ALK par leurs effets biologiques comme leur capacité agoniste ou antagoniste des voies de signalisation de l'AMH.

La compréhension de l'implication de l'AMH à différentes doses a révélé qu'elle pouvait exercer des effets opposés, de survie à faible dose médiée par le recrutement d'ALK2 et d'apoptose à forte dose médiée cette fois ci par le recrutement d'ALK3. Pour la première fois dans des modèles différents de cancer de l'ovaire, nous avons décrit l'importance de la concentration en AMH qui joue le rôle de balance entre survie et apoptose. Sur cette base, nous avons conçu un anticorps anti-AMH afin d'inhiber l'effet prolifératif de l'AMH et ainsi perturber cet équilibre. L'anticorps anti-AMH B10 s'est révélé être le meilleur candidat parmi les 3 sélectionnés par la plateforme GenAc de par sa liaison en ELISA sur la protéine recombinante ainsi qu'en cytométrie en flux sur l'AMH endogène. L'anticorps B10 diminue la viabilité cellulaire de presque 50% sur nos 4 modèles de lignée cellulaire ainsi que sur des cellules primaires isolées d'ascites de patientes. *In vivo*, le B10 ralentit la croissance tumorale et augmente la survie de manière significative, sans avoir été optimisé. A des fins thérapeutiques, nous avons donc optimisé le B10 en format IgG1 humaine et mutés les sites potentiels de glycosylation dans les domaines variables de l'anticorps lui permettant une meilleure liaison à l'AMH corrélée à une meilleure efficacité. Comme pour les BsAb, des études *in vivo* complémentaires sont nécessaires afin de valider notre stratégie thérapeutique. De plus, un criblage plus large d'anticorps anti-AMH serait nécessaire afin de choisir le meilleur pour la clinique. Dans le domaine de la reproduction, l'équipe du Dr N. Di Clemente a déposé en 2017 un brevet sur un anticorps anti-AMH nommé 22A2. Son application concerne le domaine de la reproduction principalement dans la détection et le contrôle de la concentration d'AMH en cas d'hyperstimulation ovarienne ainsi que dans le traitement des troubles de la fertilité comme syndrome polykystic des ovaires. L'extension de l'utilisation du 22A2 en parallèle du B10 pour le traitement des cancers ovariens serait intéressant à évaluer dans une étude ultérieure.

Des études ont corrélé des doses croissantes d'AMH avec la croissance et masse tumorale dans le cancer de la granulosa. De plus, selon « human atlas protein » une concentration élevée d'AMH est corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers colorectaux. A ce jour, les niveaux d'AMH ont été mesurés uniquement dans le sérum de patientes. Pour mieux comprendre la biologie de l'AMH dans son ensemble et ses effets au niveau de la tumeur, nous mettons en place une banque de données où sont répertoriées les concentrations au niveau de la tumeur ainsi qu'au niveau périphérique pour les patients atteints des cancers ovariens et colorectaux en collaboration avec l'Institut du Cancer de Montpellier de Val d'Aurèlle et le CHU de Nimes.

Les données obtenues au cours de cette thèse ont permis d'élaborer deux stratégies thérapeutiques différentes par anticorps, la première en mettant en jeux les voies de signalisation de l'AMH en impliquant les récepteurs ALK, la deuxième en bloquant l'effet prolifératif de l'AMH. Nous avons montré leur efficacité sur différents modèles cellulaires, lignées cellulaires de la granulosa, épithéliales, ainsi que sur des cellules primaires d'ascites. Les données sur cellules d'ascites issus de la clinique nous

confortent dans l'efficacité de nos thérapies. Chez les patientes atteintes de cancer ovarien, l'apparition d'ascites (ou la carcinose péritonéale) est une des caractéristiques des stades avancés de la maladie. Actuellement, le bispécifique le Removab (Epcam+/CD3) qui était employé comme traitement de la carcinose péritonéale a été retiré du marché. Un besoin majeur de thérapies est nécessaire d'où l'intérêt dans ce cas de développer de nouveaux outils. Compte tenu de l'effet de nos thérapies ciblées sur ces cellules d'ascites, il serait envisageable de les utiliser dans les cas de carcinose péritonéale.

L'anti-AMH et les BsAb développés dans ce projet font l'objet de trois brevets afin de valoriser ces nouvelles stratégies thérapeutiques dans les traitements des cancers AMH et AMHRII positifs.

- « ANTI-MÜLLERIAN INHIBITING SUBSTANCE TYPE I RECEPTOR ANTIBODIES AND USES THEREOF » (EP19306214.8)
- « USE OF MÜLLERIAN INHIBITING SUBSTANCE INHIBITORS FOR TREATING CANCER » (EP19306215.5)
- « ANTI-MÜLLERIAN INHIBITING SUBSTANCE ANTIBODIES AND USES THEREOF » (EP19306213.0)

De plus, un premier article intitulé « Anti-Müllerian hormone proliferating and apoptotic effects are modulated by its concentration and ALK2 or ALK3 recruitment in ovarian cancer » est en cours de soumission. Un deuxième article concernant l'intérêt des BsAb AMHRII-ALK dans l'arsenal thérapeutiques des cancers ovariens est en préparation.

Ces résultats montrent tout l'intérêt du domaine AMH/AMHRII dans les cancers qu'il s'agisse de biologie fondamentale, de médecine ou de développement de nouveaux biomédicaments. Ce champ exploré de longue date par PK Donahoe et ses collaborateurs suscite actuellement un intérêt important suite à l'entrée en clinique du Murlentamab, premier anticorps thérapeutique dirigé contre l'AMHRII.

Sans pouvoir les traiter en détail, nous avons également abordés rapidement 3 autres axes impliquant la signalisation AMH dans les cancers : (i) la combinaison de l'AMH avec un anticorps anti-AMHRII, (ii) le rôle du VEGF sur l'expression de l'AMHRII et (iii) les liens potentiels entre AMH/AMHRII et FcRn. Tout reste à faire pour valider ou pas l'intérêt de ces axes de recherches.

Il y'a également les pistes envisagées au début de cette thèse et que nous n'avons pas pu explorer. La première concerne l'implication de l'AMH dans la transition épithélio-mésenchymateuse, ses liens avec l'apparition des carcinoses péritonéales. La seconde concerne l'implication de l'AMH et l'expression de l'AMHRII sur les cellules initiatrices de cancer (« cellules souches cancéreuses »),

responsables des récidices dans de nombreux cancers. Là encore le développement de biomédicaments pourrait apporter des solutions.

Au terme de ce travail de thèse, les champs à explorer sur le sujet restent donc nombreux et passionnants. Cela témoigne de son intérêt.

ANNEXE

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 23), pp: 37061-37079

Research Paper

The anti-tumor efficacy of 3C23K, a glyco-engineered humanized anti-MISRII antibody, in an ovarian cancer model is mainly mediated by engagement of immune effector cells

Pauline Estupina[1,2,3,4], Alexandre Fontayne[5], Jean-Marc Barret[6], Nathalie Kersual[1,2,3,4], Olivier Dubreuil[6], Marion Le Blay[1,2,3,4], Alexandre Pichard[1,2,3,4], Marta Jarlier[4], Martine Pugnière[1,2,3,4], Maëva Chauvin[1,2,3,4], Thierry Chardès[1,2,3,4], Jean-Pierre Pouget[1,2,3,4], Emmanuel Deshayes[4], Alexis Rossignol[7], Toufik Abache[5], Christophe de Romeuf[5], Aurélie Terrier[5], Lucie Verhaeghe[5], Christine Gaucher[5], Jean-François Prost[6], André Pèlegrin[1,2,3,4,*], Isabelle Navarro-Teulon[1,2,3,4,*]

[1]IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France

[2]INSERM, U896, Montpellier, F-34298, France

[3]Université Montpellier, Montpellier, F-34298, France

[4]Institut Régional du Cancer de Montpellier, ICM, Montpellier, F-34298, France

[5]LFB Biotechnologies, Loos, F-59120, France

[6]GamaMabs Pharma, Toulouse cedex, F-31106, France

[7]Clean Cells, Boufféré, F-85600, France

[*]These authors are contributed equally to this work

Correspondence to: Isabelle Navarro-Teulon, **email:** isabelle.teulon@inserm.fr

Keywords: *immunotherapy, therapeutic antibody, ovarian cancer, GCT, MISRII*

Received: *November 15, 2016* ***Accepted:*** *February 11, 2017* ***Published:*** *February 24, 2017*

Copyright: Estupina et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Ovarian cancer is the leading cause of death in women with gynecological cancers and despite recent advances, new and more efficient therapies are crucially needed. Müllerian Inhibiting Substance type II Receptor (MISRII, also named AMHRII) is expressed in most ovarian cancer subtypes and is a novel potential target for ovarian cancer immunotherapy. We previously developed and tested 12G4, the first murine monoclonal antibody (MAb) against human MISRII. Here, we report the humanization, affinity maturation and glyco-engineering steps of 12G4 to generate the Fc-optimized 3C23K MAb, and the evaluation of its *in vivo* anti-tumor activity. The epitopes of 3C23K and 12G4 were strictly identical and 3C23K affinity for MISRII was enhanced by a factor of about 14 (K_D = 5.5 × 10^{-11} M vs 7.9 x 10^{-10} M), while the use of the EMABling® platform allowed the production of a low-fucosylated 3C23K antibody with a 30-fold K_D improvement of its affinity to FcγRIIIa. In COV434-MISRII tumor-bearing mice, 3C23K reduced tumor growth more efficiently than 12G4 and its combination with carboplatin was more efficient than each monotherapy with a mean tumor size of 500, 1100 and 100 mm³ at the end of treatment with 3C23K (10 mg/kg, Q3-4D12), carboplatin (60 mg/kg, Q7D4) and 3C23K+carboplatin, respectively. Conversely, 3C23K-FcKO, a 3C23K form without affinity for the FcγRIIIa receptor, did not display any anti-tumor effect *in vivo*. These results strongly suggested that 3C23K mechanisms of action are mainly Fc-related. *In vitro*, antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) and antibody-dependent cell phagocytosis (ADCP) were induced by 3C23K, as demonstrated with human effector cells. Using human NK cells, 50% of the maximal lysis was obtained with a 46-fold lower concentration of low-fucosylated 3C23K (2.9 ng/ml) than of 3C23K expressed in CHO cells (133.35 ng/ml). As 3C23K induced strong ADCC with human PBMC but almost none with murine PBMC, antibody-dependent cell

Anti-Müllerian hormone proliferating and apoptotic effects are modulated by its concentration and ALK2 or ALK3 recruitment in ovarian cancer

Maëva Chauvin[1], Véronique Garambois[1], Pierre-Emmanuel Colombo[1,2], Myriam Chentouf[1], Laurent Gros[1], David-Paul de Brauwere[3], Alain Mangé[1], Karen Dumas[4], Pierre Martineau[1], Isabelle Navarro-Teulon[1], Thierry Chardès[1], André Pèlegrin[1]

[1]IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, F-34298, France; INSERM, U1194, Montpellier, F-34298, France; Université Montpellier, Montpellier, F-34298, France; Institut régional du Cancer de Montpellier, ICM, Montpellier, F-34298, France;

[2]Institut régional du Cancer de Montpellier, ICM, Montpellier, F-34298, France;

[3]Département de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU de Nîmes, Nîmes, France;

[4]SurgiMAb, 10 Parc Club du Millénaire, 1025 Avenue Henri Becquerel, 34000 Montpellier, France

*Corresponding author / Lead contact : André Pèlegrin, andre.pelegrin@inserm.fr

Running title: Paradoxical Effect of Anti-Müllerian Hormone in Ovarian Carcinomas

SUMMARY

In ovarian carcinoma, anti-Müllerian hormone (AMH) type II receptor (AMHRII) and the AMH/AMHRII signaling pathway are potential therapeutic targets. Conversely, the role of the three AMH type I receptors (AMHRI; ALK2, ALK3 and ALK6) in this cancer needs to be clarified. Using four ovarian cancer cell lines and ovarian cancer cells isolated from patients' tumor ascites, we found that ALK2 and ALK3 are the two main AMHRIs involved in AMH signaling at low and high AMH concentrations, respectively. Moreover, whereas high AMH concentrations were, as expected, associated with apoptosis and decreased clonogenic survival, low AMH concentrations improved cancer cell viability. Finally, we showed that AMH siRNA and the anti-AMH antibody B10 inhibited AMH pro-survival effect. These last results open the way to an innovative therapeutic approach to suppress AMH proliferative effect, instead of administering high doses of AMH to induce cancer cell apoptosis.

MATERIELS ET METHODES

Modèles expérimentaux et ascite des patients

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires humaines COV434 (tumeur du stroma / cordon sexuel) (Chan-Penebre et al., 2017 ; Zhang et al., 2000) et KGN (tumeur des cellules granulosa) (Nishi et al., 2001) nous ont été fourni respectivement par le Dr PI Schrier (Département d'Oncologie clinique, Leiden University Medical Center, Pays-Bas) et Dr T Yanase (Kyushu University, Fukuoka, Japon). Les lignées de cellules épithéliales humaines SKOV3 et NIH-OVCAR8 proviennent respectivement de l'ATCC (ATCC® HTB-77) et de la Division of Cancer Treatment and Diagnosis, NCI, Frederick, MD, USA. Les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM F12 sans rouge phénol contenant 10 % de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur (SVF). Les cellules COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII ont été supplémentées avec 0,33 mg/ml de généticine (InvivoGen, ant-gn-1). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO2 et l'entretien des cellules s'effectue deux fois par semaine. Les cellules sont prélevées avec 0,5 mg/ml de trypsine/0,2 mg/ml d'EDTA. Tous les milieux de culture et suppléments ont été achetés auprès de Life Technologies. Inc. (Gibco BRL). Les cellules HEK293K, utilisées pour la production d'anticorps sont cultivées dans du DMEM F12 avec du rouge de phénol contenant 10% de SVF inactivé à la chaleur.

Les lignées cellulaires COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII ont été générées par transfection de l'ADNc codant pour le récepteur AMHRII (Kersual et al., 2014). L'ADNc codant pour l'AMHRII entière est inséré dans le plasmide pCMV6 fournit par J. Teixeira (Pediatric Surgical Research Laboratories, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School). L'ADNc AMHRII a d'abord été sous-cloné dans le vecteur pcADN3.1.myc-His (Invitrogen) en utilisant les sites de restriction EcoRI et XhoI (enzymes de New England BioLabs), puis, en utilisant les sites EcoRI et SalI, dans le vecteur pIRES1-EGFP, fournit par l'IGH-UPR1142 CNRS. Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules COV434 sont ensemencées dans des boîtes de culture cellulaire de 100 mm à 80 % de confluence. Le plasmide contenant la séquence codante AMHRII a été transfectée à l'aide du kit de transfection Fugene conformément au protocole du fabricant. Après 48 heures, le milieu de transfection a été remplacé par un milieu frais contenant 0,5 mg/ml de généticine et a ensuite été changé deux fois par semaine pendant deux semaines. Ensuite, les cellules sont prélevées et triées à l'aide d'un cytomètre FACSAria (Becton Dickinson) dans des plaques de 96 puits. Pour chaque lignée cellulaire, un clone exprimant fortement l'AMHRII pour chaque lignée a été sélectionné et nommé COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII.

Cellules tumorales primaires provenant des ascites de patientes

Les échantillons d'ascites des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ont été prélevés à l'Institut Cancer Montpellier, ICM, conformément aux lois françaises et après leur consentement. Les patientes sont sélectionnées parce qu'elles sont naïves de chimiothérapie. Les ascites fraîchement obtenues ont été aliquotées dans des tubes de 50ml et centrifugés à 1300 rpm/min pendant 5 minutes. Les culots de cellules sont remis en suspension dans un tampon de chlorure d'ammonium et de potassium (tampon de lyse ACK : NH_4Cl 150nM ; $KHCO_3$ 10nM ; Na_2EDTA 0,1nM) pour lyser les globules rouges (RBC) et laissé sur la glace pendant 5 minutes. Le processus a été répété jusqu'à ce que la lyse des RBC soit terminée. Ensuite, les culots de cellules sont ensemmencés dans des boîtes de culture cellulaire de 150 mm avec 20 ml de DMEM F12-Glutamax (Gibco) sans rouge de phénol et 10% de SVF. Après 30min le temps nécessaire à l'adhérence des fibroblastes, les cellules en suspension sont transférées dans de nouvelles boites de cultures afin d'éliminer les fibroblastes (O Donnell et al., 2014). Les cellules à faible passage sont utilisées pour des expériences ou congelées dans de l'azote liquide. Le jour de la réception de l'ascite, environ 500 000 cellules sont prélevées pour évaluer l'expression d'AMHRII par cytométrie en flux.

Analyse de l'expression des récepteurs de l'AMH par cytométrie en flux

Les cellules en culture (DMEM F12 10% SVF) sont décollées à l'aide de la trypsine et repris dans du milieu 10% de SVF pour arrêter la réaction puis les cellules sont lavées avec du PBS. Environ 500 000 cellules sont récoltées pour l'analyse en cytométrie en flux. Pour évaluer l'expression intracellulaire des récepteurs les cellules sont fixées et perméabilisées 40min (kit ebioscience, 72-5774-40). Les cellules sont alors incubées pendant 1h30 à 4°C dans l'obscurité avec l'anticorps d'intérêts ALK couplé au fluorochrome Alexa 647 ou l'anitcorps AMHRII (3C23K) couplé FITC fournit par la société Gamamabs. Les contrôles négatifs utilisés sont des anticorps de même isotypes (Tableau 10). Les cellules sont analysées au cytométre Gallios (Beckman Coulter).

Production et dosage de l'hormone anti-müllerienne (AMH)

L'AMH recombinante active (LR-AMH), décrite dans les travaux de D. Pépin et al (Pépin et al, 2013, 2015) et leur brevet (Pépin, 2014), est utilisée dans notre étude. Elle contient (i) la séquence leader de l'albumine humaine au lieu de la séquence leader de l'AMH pour augmenter la production et la sécrétion, et (ii) le site de consensus RARR/S furin/kex2 au lieu de la séquence native AMH RAQR/S aux positions 423-428 pour améliorer le clivage. Les dosages d'AMH sont effectués par le kit Elecsys® AMH

de Roche. Toutes les expériences impliquant LR-AMH ont été réalisées dans un milieu de culture contenant 1% de SVF car l'AMH bovine peut être signalée par l'AMHRII humaine (Cate et al., 1986). Dans ces conditions expérimentales, la concentration endogène d'AMH variait de 5 à 10 pM en milieu frais à environ 10 à 15 pM après 5 jours de culture cellulaire. Pour déterminer la concentration endogène d'AMH dans les surnageants de culture cellulaire, 10 millions de cellules ont été plaquées dans des boîtes de culture cellulaire de 100 mm dans 10 ml de DMEM F12, 1% SVF. Toutes les 24 heures, 300 µl de milieu ont été prélevés pour doser l'AMH.

Développement et production des anticorps

Les anticorps (anti-ALK et anti-AMH) sont issus de banques synthétiques humaines propriétaires de fragments d'anticorps (scFv humain Husc I) présentés à la surface de phages filamenteux. Par la technique de phage display (Philibert et al., 2007 ; Robin et Martineau, 2012) les scFv sont sélectionnés sur le domaine extracellulaire des protéines recombinantes. Les anti-AMH sont sélectionnés sur le domaine Ala453-Arg560 AMH CTER (R&D). Les anti-ALK2 sur le domaine Asp23 & Phe120 (R&D) et les anti-ALK3 sur le domaine Met1-Arg152 chez les industriels R&D system et Sino Biological. Les anti-AMH sont formatés en IgG2a murine puis en format humain comme pour les anti-ALK. Le choix des anti-AMH s'est porté sur l'anticorps B10 et pour les anti-ALK2 et anti-ALK3 ce sont respectivement les clones 2C1 et 2F9 ainsi que 3D7 et 3H6 car ils présentent les meilleures liaisons en ELISA et en cytométrie en flux.

Les anticorps sont produits dans des cellules HEK293T. Les cellules HEK293T ont été cultivées dans des boite de culture de 150 mm^2 à 70% de confluence. Un mélange 1:1 de 30 µg de plasmide codant pour les anticorps et 2,40 mg de l'agent de transfection polyéthylèneimine PEI (Polyscience) est conservé à température ambiante pendant 10 minutes, puis ajouté aux cellules pendant 6 heures. Ensuite, le milieu de transfection est remplacé par du DMEM sans SVF. Cinq jours plus tard, le surnageant est recueilli et dilué (1:1) avec 40 mM de tampon phosphate de sodium, pH 8, filtré à travers un filtre de 0,22 µm et purifié sur une colonne de protéine A de 1 ml pendant 24 heures. Les anticorps sont élués à pH acide (pH glycine 3) et immédiatement stabilisés avec le tampon Tris, pH 9. Des filtres Centricons avec un seuil de 50 kDa sont utilisés pour concentrer l'anticorps dans le PBS. Deux cents millilitres de culture cellulaire fournissent environ 1 mg d'anticorps purifié.

Tranfections des siRNA

Les séquences de siRNAs ont été conçues avec l'algorithme de Rosetta et sont soutenues par la garantie siRNA pré-conçue par Sigma-Aldrich. Nous avons utilisé un pool de trois siRNAs pour chaque récepteur ALK et pour l'AMH. Les cellules sont ensemmencées dans des plaques de 24 puits à environ 60-80% de confluence. La transfection est effectuée en milieu avec 1% de SVF à l'aide du réactif de transfection Lipofectamine RNAiMax dilué dans le milieu Opti-MEM selon le fournisseur (Thermofisher cat# 13778-150). Les siRNAs sont dilués à 300 ng/ml (siRNAs contre ALK2, ALK3 et ALK6) et à 1 µg/ml (siRNAs contre AMH) dans Opti-MEM, et le mélange siRNA-Lipofectamine (1:1) est ajouté aux cellules pendant 6 h. Les cellules ont été lavées et mises en culture dans DMEM F12 à 1 %SVF.

Les expériences de signalisation sont effectuées avec des cellules siRNA-transfectées à 24h (cellules COV434-AMHRII) et 48h (cellules SKOV3-AMHRII).

Analyse par Western blot

Les cellules sont lavées avec du PBS et icubées dans un tampon de lyse RIPA (Santa Cruz) contenant 200 mM de solution de PMSF, 100 mM de solution d'orthovanadate de sodium et un cocktail d'inhibiteurs de protéase. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide du kit de dosage de la protéine BCA (Interchim). Pour être en condition réductrice du 2-mercaptoéthanol est ajouté aux extraits cellulaires et chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Les extraits protéiques sont déposés sur un gels 10% SDS-PAGE (50 µg de protéines/puits) et transférés sur membranes PVDF (Biorad). Les membranes ont été saturées dans une solution saline tamponnée Tris, contenant 0,1 % de Tween 20 et 5 % de lait en poudre non gras, et incubées avec les anticorps primaires sur la nuit (dilution adapté selon les recommandations du fournisseur. Après lavages, les anticorps secondaires IgG conjugués à la peroxydase sont ajoutés (1/10 000) pendant 1 h à température ambiante. Après lavages, les interactions anticorps-antigène ont été détectées en utilisant un substrat chimioluminescent (Merck). Afin de vérifier la charge homogène de protéine totale sur l'ensemble des puits, un anticorps monoclonal anti-GAPDH (Cell Signaling) est utilisé comme protéine de ménage.

Etude de la signalisation de l'AMH

Les cellules ont été cultivées dans du DMEM F12/ 1% SVF pendant la nuit, puis incubées avec de la LR-AMH (0-25 nM) à 37°C pendant 6 heures. Le Western blot a été effectué à l'aide des anticorps primaires dirigés contre les protéines p-SMAD1/5, p-AKT, caspase 3 et PARP clivé, GAPDH (1:1000 ; Cell signaling). Les anticorps anti-ALK2 et anticorps anti-ALK3 sont utilisés respectivement au 1:200 et 1:1000 (Abcam). Les anticorps secondaires IgG HRP anti-lapin (1:10.000 ; Sigma) sont utilisés pour permettre la révélation en WB.

Essais d'apoptose

L'initiation de l'apoptose est mesurée à l'aide du test Caspase-Glo-3/7 (Promega). Les cellules sont ensemmencées dans des plaques blanches de 96 puits et incubées avec LR-AMH (0 - 25nM) pendant 6 heures. Lors de l'ajout du substrat de caspase-3/7 DEVD-aminoluciférine proluminescent, la caspase-3/7 génère de l'aminoluciférine libre qui, consommée par la luciférase, produit un signal luminescent proportionnel à l'activité caspase-3/7. Le signal luminescent a été quantifié 30 min après l'ajout du substrat avec un lecteur de microplaques PHERASTAR.

Pour une analyse plus complète de l'apoptose, le kit de détection d'apoptose Annexin V-FITC (Beckman Coulter IM3614) a été utilisé. Environ 100 000 cellules sont ensemencées dans des plaques de 24 puits et incubées avec 333nM d'anticorps, 25 nM de LR-AMH ou 150 nM staurosporine (témoin positif) pendant 24 h. Les cellules adhérentes et non adhérentes sont recueillies et centrifugées à 900 rpm pendant 5 minutes. Après les lavages avec du PBS, les cellules sont colorées avec 130 µl d'un mélange contenant 10 µl d'annexin V marquée FITC et 20 µl 7AAD dans 100 µl d'annexin V tampon sur glace dans l'obscurité pendant 15 minutes. Après l'ajout de 400 µl de tampons d'annexin V, les données du signal de fluorescence sont acquises par cytométrie de flux, et analysées avec le logiciel Kaluza Flow Analysis (Beckman Coulter).

Immunofluorescence

Pour chaque essai, 30 000 cellules sont cultivées sur des lamelles de verre carrées de 22 mm dans des boîtes de culture de 35 mm en DMEM F12/10% SVF pendant la nuit. Les cellules sont ensuite déprivées en 1% de SVFpendant 24 h avant incubation avec 25 nM LR-AMH pendant 1h30. Les cellules sont alors fixées dans 3,7 % de paraformaldéhyde/PBS pendant 20min et perméabilisées dans de l'acétone à -20°C pendant 30min. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS/0,1 % BSA et incubées avec le

P3X63 (anticorps irrelevant) (Köhler et al., 1976), les anticorps primaires anti-AMHRII 12G4 et anti-ALK2, antiALK3, anti-ALK6 (R&D) pendant 1h dans le noir. Après un autre lavage, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires de chèvre marqués FITC dans du PBS/0,1% BSA pendant 1h. Ensuite, les lames sont lavées trois fois avec du PBS/0,1 % de BSA et une fois avec du PBS, puis incubées avec du chlorhydrate de 4,6 diaminido-2-phénylindole (DAPI, Sigma, Chemical Co.) pendant 15 minutes, lavés une fois avec du PBS, et préparés pour visualisation microscopique par fluorescence.

Essai de viabilité cellulaire

Pour les essais de viabilité et de prolifération cellulaire, le système CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) a été utilisé conformément aux instructions du fabricant. Cinq mille cellules ont été ensemencées dans chaque puits d'une plaque de 96 puits et cultivées dans 50 µl de DMEM F12/1% de SVF pendant la nuit. Les cellules sont ensuite incubées avec la LR-AMH (0 - 25nM) ou les anticorps (0 – 333nM) pendant 3 jours. Ensuite, 10 µl de réactif CellTiter 96 AQueous One Solution est ajouté par puits, et les plaques sont incubées dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO2 jusqu'à ce que les puits témoins négatifs soient colorés en bruns (de 1 à 2 h, selon la lignée cellulaire). Ensuite, l'absorbance est mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques PHERASTAR. L'essai est réalisé en triplicat pour chaque condition.

Survie clonogénique

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 24 puits (50 cellules/puits) dans du DMEM F12/1% SVF moyen pendant la nuit. LR-AMH (0-25 nM) ou les anticorps (333nM) sont ajoutés pendant 11 jours de culture. Pour les cellules COV434-AMHRII, qui se développent sous forme de clones clairement individualisés, les colonies ont été fixées avec une solution de méthanol/acide acétique (3:1) à 4°C pendant 20 minutes, colorées avec 10% de Giemsa, puis comptées. Pour les cellules SKOV3-AMHRII, OVCAR8, KGN et les cellules d'ascite du patient, le nombre de clones a été estimé à partir de la zone de confluence, déterminée en utilisant le Celigo Imaging System après coloration cellulaire au trihydrate de Hoechst 33342 (Invitrogen H1399, 0,25 µg/ml pendant 15 minutes).

Test ELISA

Le test ELISA a été utilisé pour déterminer l'EC50 des anticorps monospécifiques (B10, 2C1, 2F9, 3D7, 3H6) et bispécifique (12G4-2C1, 12G4-2F9, 12G4-3D7, 12G4-3H6). Pour déterminé l'EC50 de l'anticorps B10, nous avons déposé sur une plaque de 96 puits à haute capacité de liaison aux protéines (Nunc MaxiSorp) des anticorps polyclonaux anti-AMH (Abcam ab 84952) à 500ng/ml durant la nuit. Ensuite, la plaque est lavée 3 fois et saturée d'une solution de PBS - Tween 0.01% - BSA 2% pendant 2 heures. Après chaque étape, la plaque a été lavée 3 fois avec PBS-Tween 0.01%. L'AMH recombinant (25nM) est ajoutée et incubée pendant 2 heures à 37°C. Ensuite, l'anticorps B10 (0-666nM) est ajouté et incubé pendant 1h30 à 37°C. L'anticorps secondaire anti-Fc peroxydase (HRP) de souris est incubé pendant 30 minutes et l'enzyme substrat (Thermofisher TMB) est ajouté. L'absorbance est lue à 450 nm après l'arrêt de la réaction enzymatique par addition d'acide sulfurique.

Pour les anti-ALK et les BsAb, la plaque ELISA est recouverte de leur antigène recombinant ALK respectif ou AMHRII (500ng/ml), la plaque est ensuite lavée 3 fois et incubée 2h avec une solution de PBS - Tween 0.01% - BSA 2% pendant 2 heures. Après chaque étape, la plaque a été lavée 3 fois avec PBS-Tween 0.01% et les anticorps à tester (0-666nM) sont ajoutés et incubé pendant 1h30 à 37°C. L'anticorps secondaire anti-Fc peroxydase (HRP) humain est incubé pendant 30 minutes et l'enzyme substrat (Thermofisher TMB) est ajouté. L'absorbance est lue à 450 nm après l'arrêt de la réaction enzymatique par addition d'acide sulfurique.

SPOT membrane

Afin de déterminer l'épitope de nos anticorps anti-ALK la société Sys2diag (Montpellier) nous a conçu une membrane PVDF ou sont greffés les peptides correspondant au domaine extracellulaire des récepteurs ALK recombinants. Chaque spot représente un peptide de 15 acides aminés et chaque spot est décalé de 3 acides aminés par rapport au spot précédent. La membrane est activée par un bain de méthanol pendant 30s puis rincer avec du PBS-tween 0,01% (PBS-T) puis incubée pendant 2h dans du lait 5% dilué dans ce dernier. La membrane est à nouveau rincée puis incubée avec l'anticorps primaire à 20µg/ml sur la nuit. Après lavage, l'anticorps secondaire HRP est ajouté 1h à température ambiante et la membrane est révélée par le subtrat chimiolunescent comme par Western blot.

Analyse statistique

Des analyses statistiques concernant les différences d'activité caspase-3/7 et de viabilité/prolifération cellulaire ont été réalisées avec le logiciel Prism et ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test).

Analyse de l'expression des récepteur ALK et de l'AMH par RT-PCR et RT-qPCR

Afin d'analyser l'efficacité des siRNA dirigés contre les récepteurs ALK l'ARN des cellules est extrait à l'aide du kit *RNeasy mini kit* (Qiagen) selon le protocole du fabricant, puis 1µg d'ARN est rétrotranscrit (RT) par l'enzyme *SuperScript III Reverse Transciptase* en ADN complémentaire. Pour activer la RT les échantillons sont placé au thermocycleur selon le protocole suivant :

- **25°C pendant 5 min** (hybridation des Random Primers)
- **50°C pendant 60 min**
- **70°C pendant 15 min** (inactivation de la réaction)

L'ADNc amplifié est alors mélangé avec les amorces ALK d'intérêt (Tableau 9 : Amorces utilisées pour l'amplifcation des récepteurs ALK et de l'AMH.Tableau 9) ainsi que le mixe DreamTaq Green PCR (ThermoFisher). Les conditions de PCR sont les suivantes : pré-incubation 95°C 10 min, 40 cycles de PCR : 60 sec à 95°C puis 90 sec à 56,9°C et 90 sec à 72°C puis 5min à 72°C . Le produit PCR est alors déposés sur gel d'agarose 1% et analysé sous lumière UV.

Les expériences de RT-qPCR pour amplifier le gène de l'AMH dans les lignées COV434-AMHRII et SKOV3-AMHRII à 24h et 48h sont réalisés avec le kit SYBR Premix Ex Taq (RR420L, Takara) selon le protocole du fabricant. L'ARN est isolé et rétrotranscript comme décrit précédemment. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage HPRT.

Tableau 9 : Amorces utilisées pour l'amplifcation des récepteurs ALK et de l'AMH.

Gènes Amplifiés	Amorce sens	Amorce anti-sens
AMH	CGCCTGGTGGTCCTACAC	GAACCTCAGCGAGGGTGTT
ALK2	TTAAAAGGCGCAACCAAGA	CGTACAACGATCCCATTTCA
ALK3	TTTATGGCACCCAAGGAAAG	TGGTATTCAAGGGCACATCA
ALK6	CTCAGGGAGCGACCTGGGCA	GCGGCCCCAAATGCAGGGAT
HPRT	TGACCAGTCAACAGGGGACA	ATCCAACACTTCGTGGGGTC

Tableau 10 : Liste des ressources utilisées

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit IgG Isotype polyclonal antibody Alexa fluor 647	BIOSS	Bs-0295P-A647
Rabbit ACTR1 (ALK2) polyclonal Alexa fluor	BIOSS	Bs-12415R-
Goat anti-human activin RIA/ALK-2 polyclonal antibody, unconjugated	R&D Systems	Cat# AF637, RRID:AB_2221999
Rabbit anti-activin receptor type IA polyclonal antibody (ALK2), unconjugated	Abcam	Cat# ab60158, RRID:AB_940118
Rabbit BMPR1A (ALK3) polyclonal antibody Alexa fluor	BIOSS	Bs-1509R-647
Goat anti-human BMPR-IA/ALK-3 polyclonal antibody, unconjugated	R&D Systems	Cat# AF346, RRID:AB_355312
Anti-BMPR1A antibody (ALK3)	Abcam	Cat# ab38560, RRID:AB_722713
Rabbit BMPR1B (ALK6) polyclonal antibody Alexa fluor	BIOSS	Bs-6639R-647
Anti-human BMPR-IB/ALK-6 MAb (Clone 477914) antibody	R and D Systems	Cat# MAB5051, RRID:AB_2064101
Anti-phosphorylated SMAD1/5 (Ser463/465) (41D10) rabbit MAb antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 9516, RRID:AB_491015
Anti-phosphorylated AKT (Ser473) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 9271, RRID:AB_329825
Anti-cleaved caspase-3 (Asp175) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 9661, RRID:AB_2341188
Anti-cleaved PARP (Asp214) (19F4), mouse mAb (human specific) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 9546, RRID:AB_2160593
Anti-GAPDH (D16H11) XP® rabbit MAb (HRP conjugate) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 8884, RRID:AB_11129865

Anti-AMH/MIS antibody	Abcam	Cat# ab84952, RRID:AB_2289533
Anti-AMHRII (3C23K) - FITC	Gamamabs	
Irrelevant MAb P3X63	Köhler et al., 1976	
Irrelevant MAb 13R4	Philibert et al., 2007	
Irrelevant Mab R565	Gamamabs	
Biological Samples		
Patient's ascites	ICM – Val d'Aurelle	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
AMH recombinant hormone	Evitria biotechnology	Patent WO2014164981A1
AMH total	Origen	TP308397
Hoechst 33342 Trihydrochloride	Invitrogen	H1399
Critical Commercial Assays		
CaspaseGlo 3/7	Promega	G8090
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega	G3582
Annexin V 7AAD	Beckman coulter	
Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent	Thermofisher	13778075
Experimental Models: Cell Lines		
COV434	Department of Clinical Oncology. Leiden University Medical Center	Dr. Peter I. Schrier
SKOV3	ATCC	ATCC® HTB-77
OVCAR8	NCI, Frederick, MD, USA	Division of Cancer Treatment and Diagnosis
KGN	Kyushu University, Fukuoka, Japan	Dr. T Yanase
HEK293T	GenAc Platform IRCM	ATCC CRL 1573
Cells from ascites	ICM Val d'Aurelle	
Oligonucleotides		
siAlk2	siRNA Nano Scale Sigma Aldrich	Pool of SIHK0026, SIHK0027, SIHK0028,
siAlk3	siRNA Nano Scale Sigma Aldrich	Pool of SIHK0170, SIHK0171, SIHK0172
siAlk6	siRNA Nano Scale Sigma Aldrich	Pool of SIHK0175, SIHK0173, SIHK0174
siAMH	esiRNA human AMH/MIS (esiRNA1) Sigma Aldrich	EHU121781
Software and Algorithms		
ImageJ	Schneider et al., 2012	https://imagej.nih.gov/ij/
GraphPad – Prism		

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abramovich, D., Irusta, G., Bas, D., Cataldi, N.I., Parborell, F., and Tesone, M. (2012). Angiopoietins/TIE2 system and VEGF are involved in ovarian function in a DHEA rat model of polycystic ovary syndrome. Endocrinology *153*, 3446–3456.

Aghajanian, C., Blank, S.V., Goff, B.A., Judson, P.L., Teneriello, M.G., Husain, A., Sovak, M.A., Yi, J., and Nycum, L.R. (2012). OCEANS: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab in Patients With Platinum-Sensitive Recurrent Epithelial Ovarian, Primary Peritoneal, or Fallopian Tube Cancer. J. Clin. Oncol. *30*, 2039–2045.

Ahmed, N., and Stenvers, K.L. (2013). Getting to Know Ovarian Cancer Ascites: Opportunities for Targeted Therapy-Based Translational Research. Front. Oncol. *3*.

Allard, S., Adin, P., Gouedard, L., Clemente, N. di, Josso, N., Orgebin-Crist, M.C., Picard, J.Y., and Xavier, F. (2000). Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin. Development *127*, 3349–3360.

Allemani, C., Weir, H.K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X.-S., Bannon, F., Ahn, J.V., Johnson, C.J., Bonaventure, A., et al. (2015). Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). Lancet Lond. Engl. *385*, 977–1010.

Anglesio, M.S., Carey, M.S., Köbel, M., MacKay, H., and Huntsman, D.G. (2011). Clear cell carcinoma of the ovary: A report from the first Ovarian Clear Cell Symposium, June 24th, 2010. Gynecol. Oncol. *121*, 407–415.

Anttonen, M., Färkkilä, A., Tauriala, H., Kauppinen, M., Maclaughlin, D.T., Unkila-Kallio, L., Bützow, R., and Heikinheimo, M. (2011). Anti-Müllerian hormone inhibits growth of AMH type II receptor-positive human ovarian granulosa cell tumor cells by activating apoptosis. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *91*, 1605–1614.

Arango, N.A., Lovell-Badge, R., and Behringer, R.R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. Cell *99*, 409–419.

Arango, N.A., Kobayashi, A., Wang, Y., Jamin, S.P., Lee, H.-H., Orvis, G.D., and Behringer, R.R. (2008). A mesenchymal perspective of Müllerian duct differentiation and regression in Amhr2-lacZ mice. Mol. Reprod. Dev. *75*, 1154–1162.

Aström, A.K., Jin, D., Imamura, T., Röijer, E., Rosenzweig, B., Miyazono, K., ten Dijke, P., and Stenman, G. (1999). Chromosomal localization of three human genes encoding bone morphogenetic protein receptors. Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc. *10*, 299–302.

Aunoble, B., Sanches, R., Didier, E., and Bignon, Y.J. (2000). Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). Int. J. Oncol. *16*, 567–576.

Austin, H.B. (1995). DiI analysis of cell migration during müllerian duct regression. Dev. Biol. *169*, 29–36.

Baarends, W.M., van Helmond, M.J., Post, M., van der Schoot, P.J., Hoogerbrugge, J.W., de Winter, J.P., Uilenbroek, J.T., Karels, B., Wilming, L.G., and Meijers, J.H. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. Dev. Camb. Engl. *120*, 189–197.

Bai, D., Ueno, L., and Vogt, P.K. (2009). Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *125*, 2863–2870.

Baichwal, V.R., and Baeuerle, P.A. (1997). Apoptosis: Activate NF-κB or die? Curr. Biol. *7*, R94–R96.

Bakkum-Gamez, J.N., Aletti, G., Lewis, K.A., Keeney, G.L., Thomas, B.M., Navarro-Teulon, I., and Cliby, W.A. (2008). Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers. Gynecol. Oncol. *108*, 141–148.

Banerjee, S., and Kaye, S.B. (2013). New Strategies in the Treatment of Ovarian Cancer: Current Clinical Perspectives and Future Potential. Clin. Cancer Res. *19*, 961–968.

Bapat, S.A., Mali, A.M., Koppikar, C.B., and Kurrey, N.K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. Cancer Res. *65*, 3025–3029.

Barbie, T.U., Barbie, D.A., MacLaughlin, D.T., Maheswaran, S., and Donahoe, P.K. (2003). Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 15601–15606.

Barkett, M., and Gilmore, T.D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-κB transcription factors. Oncogene *18*, 6910–6924.

Barr, I.G., Miescher, S., von Fliedner, V., Buchegger, F., Barras, C., Lanzavecchia, A., Mach, J.P., and Carrel, S. (1989). In vivo localization of a bispecific antibody which targets human T lymphocytes to lyse human colon cancer cells. Int. J. Cancer J. Int. Cancer *43*, 501–507.

Basal, E., Ayeni, T., Zhang, Q., Langstraat, C., Donahoe, P.K., Pepin, D., Yin, X., Leof, E., and Cliby, W. (2016a). Patterns of Müllerian Inhibiting Substance Type II and Candidate Type I Receptors in Epithelial Ovarian Cancer. Curr. Mol. Med. *16*, 222–231.

Bats, A.-S., Larousserie, F., Le Frère Belda, M.-A., Metzger, U., and Lécuru, F. (2009). Tumeurs non épithéliales malignes de l'ovaire. Gynécologie Obstétrique Fertil. *37*, 627–632.

Beck, T.N., Korobeynikov, V.A., Kudinov, A.E., Georgopoulos, R., Solanki, N.R., Andrews-Hoke, M., Kistner, T.M., Pépin, D., Donahoe, P.K., Nicolas, E., et al. (2016). Anti-Müllerian Hormone Signaling Regulates Epithelial Plasticity and Chemoresistance in Lung Cancer. Cell Rep. *0*.

Behringer, R.R., Finegold, M.J., and Cate, R.L. (1994). Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. Cell *79*, 415–425.

Belville, C., Jamin, S.P., Picard, J.-Y., Josso, N., and di Clemente, N. (2005). Role of type I receptors for anti-Müllerian hormone in the SMAT-1 Sertoli cell line. Oncogene *24*, 4984–4992.

Bildik, G., Akin, N., Senbabaoglu, F., Esmalian, Y., Sahin, G.N., Urman, D., Karahuseyinoglu, S., Ince, U., Palaoglu, E., Taskiran, C., et al. (2018). Endogenous c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity marks the boundary between normal and malignant granulosa cells. Cell Death Dis. *9*, 421.

Bougherara, H., Némati, F., Nicolas, A., Massonnet, G., Pugnière, M., Ngô, C., Le Frère-Belda, M.-A., Leary, A., Alexandre, J., Meseure, D., et al. (2017). The humanized anti-human AMHRII mAb 3C23K exerts an anti-tumor activity against human ovarian cancer through tumor-associated macrophages. Oncotarget *8*, 99950–99965.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA. Cancer J. Clin. *68*, 394–424.

Brederlau, A., Faigle, R., Elmi, M., Zarebski, A., Sjöberg, S., Fujii, M., Miyazono, K., and Funa, K. (2004). The Bone Morphogenetic Protein Type Ib Receptor Is a Major Mediator of Glial Differentiation and Cell Survival in Adult Hippocampal Progenitor Cell Culture. Mol. Biol. Cell *15*, 3863–3875.

Broekmans, F.J., Visser, J.A., Laven, J.S.E., Broer, S.L., Themmen, A.P.N., and Fauser, B.C. (2008). Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction. Trends Endocrinol. Metab. TEM *19*, 340–347.

Brotelle, T., and Bay, J.-O. (2016). La voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR : description, développement thérapeutique, résistances, marqueurs prédictifs/pronostiques et applications thérapeutiques en cancérologie. Bull. Cancer (Paris) *103*, 18–29.

Burger, R.A., Brady, M.F., Bookman, M.A., Fleming, G.F., Monk, B.J., Huang, H., Mannel, R.S., Homesley, H.D., Fowler, J., Greer, B.E., et al. (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. N. Engl. J. Med. *365*, 2473–2483.

Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., and Leal, J.F.M. (2008). The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. Curr. Cancer Drug Targets *8*, 187–198.

Carter, P.J. (2011). Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. Exp. Cell Res. *317*, 1261–1269.

Castaneda, D.C., Dhommée, C., Baranek, T., Dalloneau, E., Lajoie, L., Valayer, A., Arnoult, C., Demattéi, M.-V., Fouquenet, D., Parent, C., et al. (2018). Lack of FcRn Impairs Natural Killer Cell Development and Functions in the Tumor Microenvironment. Front. Immunol. *9*.

Cate, R.L., Mattaliano, R.J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N.M., Cheung, A., Ninfa, E.G., Frey, A.Z., Gash, D.J., Chow, E.P., et al. (1986). Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. Cell *45*, 685–698.

Chames, P., and Baty, D. (2009). Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel? mAbs *1*, 539–547.

Chang, H.L., Pahlavan, N., Halpern, E.F., and MacLaughlin, D.T. (2009). Serum Müllerian Inhibiting Substance/anti-Müllerain Hormone levels in patients with adult granulosa cell tumors directly correlates with aggregate tumor mass as determined by pathology or radiology. Gynecol. Oncol. *114*, 57–60.

Chang, H.L., Pieretti-Vanmarcke, R., Nicolaou, F., Li, X., Wei, X., MacLaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (2011). Mullerian Inhibiting Substance inhibits invasion and migration of epithelial cancer cell lines. Gynecol. Oncol. *120*, 128–134.

Chellappan, D.K., Leng, K.H., Jia, L.J., Aziz, N.A.B.A., Hoong, W.C., Qian, Y.C., Ling, F.Y., Wei, G.S., Ying, T., Chellian, J., et al. (2018). The role of bevacizumab on tumour angiogenesis and in the management of gynaecological cancers: A review. Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother. *102*, 1127–1144.

Chen, V.W., Ruiz, B., Killeen, J.L., Coté, T.R., Wu, X.C., and Correa, C.N. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. Cancer *97*, 2631–2642.

Chin, T.W., Parry, R.L., and Donahoe, P.K. (1991). Human müllerian inhibiting substance inhibits tumor growth in vitro and in vivo. Cancer Res. *51*, 2101–2106.

Chung, Y.J., Kim, H.J., Park, S.H., Yoon, J.H., Kim, M.R., Nam, S.W., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Kim, J.H. (2015). Transcriptome analysis reveals that Müllerian inhibiting substance regulates signaling pathways that contribute to endometrial carcinogenesis. Int. J. Oncol. *46*, 2039–2046.

Clarke, T.R., Hoshiya, Y., Yi, S.E., Liu, X., Lyons, K.M., and Donahoe, P.K. (2001). Müllerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *15*, 946–959.

di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J.Y., Vigier, B., Josso, N., and Cate, R. (1994). Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *8*, 1006–1020.

di Clemente, N., Jamin, S.P., Lugovskoy, A., Carmillo, P., Ehrenfels, C., Picard, J.-Y., Whitty, A., Josso, N., Pepinsky, R.B., and Cate, R.L. (2010a). Processing of Anti-Müllerian Hormone Regulates Receptor Activation by a Mechanism Distinct from TGF-β. Mol. Endocrinol. *24*, 2193–2206.

Cortez, A.J., Tudrej, P., Kujawa, K.A., and Lisowska, K.M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. Cancer Chemother. Pharmacol. *81*, 17–38.

Costanza, B., Turtoi, A., Bellahcène, A., Hirano, T., Peulen, O., Blomme, A., Hennequière, V., Mutijima, E., Boniver, J., Meuwis, M.-A., et al. (2018). Innovative methodology for the identification of soluble biomarkers in fresh tissues. Oncotarget *9*, 10665–10680.

Cuatrecasas, M., Erill, N., Musulen, E., Costa, I., Matias-Guiu, X., and Prat, J. (1998). K-ras mutations in nonmucinous ovarian epithelial tumors: a molecular analysis and clinicopathologic study of 144 patients. Cancer *82*, 1088–1095.

Dadmarz, R.D., Ordoubadi, A., Mixon, A., Thompson, C.O., Barracchini, K.C., Hijazi, Y.M., Steller, M.A., Rosenberg, S.A., and Schwartzentruber, D.J. (1996). Tumor-infiltrating lymphocytes from human ovarian cancer patients recognize autologous tumor in an MHC class II-restricted fashion. Cancer J. Sci. Am. *2*, 263–272.

Dalloneau, E., Baroukh, N., Mavridis, K., Maillet, A., Gueugnon, F., Courty, Y., Petit, A., Kryza, T., Del Rio, M., Guyetant, S., et al. (2016). Downregulation of the neonatal Fc receptor expression in non-small cell lung cancer tissue is associated with a poor prognosis. Oncotarget *7*, 54415–54429.

Desgrosellier, J.S., Mundell, N.A., McDonnell, M.A., Moses, H.L., and Barnett, J.V. (2005). Activin receptor-like kinase 2 and Smad6 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation. Dev. Biol. *280*, 201–210.

Dewulf, N., Verschueren, K., Lonnoy, O., Morén, A., Grimsby, S., Vande Spiegle, K., Miyazono, K., Huylebroeck, D., and Ten Dijke, P. (1995). Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. Endocrinology *136*, 2652–2663.

ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzén, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1993). Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. Oncogene *8*, 2879–2887.

Donahoe, P.K., Swann, D.A., Hayashi, A., and Sullivan, M.D. (1979). Müllerian duct regression in the embryo correlated with cytotoxic activity against human ovarian cancer. Science *205*, 913–915.

Dudas, M., Sridurongrit, S., Nagy, A., Okazaki, K., and Kaartinen, V. (2004). Craniofacial defects in mice lacking BMP type I receptor Alk2 in neural crest cells. Mech. Dev. *121*, 173–182.

Edson, M.A., Nalam, R.L., Clementi, C., Franco, H.L., DeMayo, F.J., Lyons, K.M., Pangas, S.A., and Matzuk, M.M. (2010). Granulosa Cell-Expressed BMPR1A and BMPR1B Have Unique Functions in Regulating Fertility but Act Redundantly to Suppress Ovarian Tumor Development. Mol. Endocrinol. *24*, 1251–1266.

Enomoto, T., Weghorst, C.M., Inoue, M., Tanizawa, O., and Rice, J.M. (1991). K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. Am. J. Pathol. *139*, 777–785.

Estupina, P., Fontayne, A., Barret, J.-M., Kersual, N., Dubreuil, O., Blay, M.L., Pichard, A., Jarlier, M., Pugnière, M., Chauvin, M., et al. (2017a). The anti-tumor efficacy of 3C23K, a glyco-engineered humanized anti-MISRII antibody, in an ovarian cancer model is mainly mediated by engagement of immune effector cells. Oncotarget *8*, 37061–37079.

Fang, Y., Lu, X., Liu, L., Lin, X., Sun, M., Fu, J., Xu, S., and Tan, Y. (2016). Vascular endothelial growth factor induces anti-Müllerian hormone receptor 2 overexpression in ovarian granulosa cells of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection patients. Mol. Med. Rep. *13*, 5157–5162.

Färkkilä, A., Anttonen, M., Pociuviene, J., Leminen, A., Butzow, R., Heikinheimo, M., and Unkila-Kallio, L. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 are highly expressed in ovarian granulosa cell tumors. Eur. J. Endocrinol. *164*, 115–122.

Feeley, K.M., and Wells, M. (2001). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. Histopathology *38*, 87–95.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int. J. Cancer *136*, E359-386.

Frampton, J.E. (2012). Catumaxomab: in malignant ascites. Drugs *72*, 1399–1410.

Fujino, A., Arango, N.A., Zhan, Y., Manganaro, T.F., Li, X., MacLaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (2009). Cell migration and activated PI3K/AKT-directed elongation in the developing rat Müllerian duct. Dev. Biol. *325*, 351–362.

Fuller, A.F., Guy, S., Budzik, G.P., and Donahoe, P.K. (1982). Mullerian inhibiting substance inhibits colony growth of a human ovarian carcinoma cell line. J. Clin. Endocrinol. Metab. *54*, 1051–1055.

Fuller, A.F., Krane, I.M., Budzik, G.P., and Donahoe, P.K. (1985a). Mullerian inhibiting substance reduction of colony growth of human gynecologic cancers in a stem cell assay. Gynecol. Oncol. *22*, 135–148.

Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T., and Stevenson, G.T. (1987). Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *139*, 2367–2375.

Golay, J., Choblet, S., Iwaszkiewicz, J., Cérutti, P., Ozil, A., Loisel, S., Pugnière, M., Ubiali, G., Zoete, V., Michielin, O., et al. (2016a). Design and Validation of a Novel Generic Platform for the Production of Tetravalent IgG1-like Bispecific Antibodies. J. Immunol. *196*, 3199–3211.

González Martín, A., Oza, A.M., Embleton, A.C., Pfisterer, J., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Bertrand, M.A., Beale, P., Cervantes, A., et al. (2019). Exploratory outcome analyses according to stage and/or residual disease in the ICON7 trial of carboplatin and paclitaxel with or without bevacizumab for newly diagnosed ovarian cancer. Gynecol. Oncol. *152*, 53–60.

Gouédard, L., Chen, Y.-G., Thevenet, L., Racine, C., Borie, S., Lamarre, I., Josso, N., Massagué, J., and Clemente, N. di (2000). Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor. J. Biol. Chem.

Gupta, V., Yeo, G., Kawakubo, H., Rangnekar, V., Ramaswamy, P., Hayashida, T., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Maheswaran, S. (2007). Mullerian-inhibiting substance induces Gro-beta expression in breast cancer cells through a nuclear factor-kappaB-dependent and Smad1-dependent mechanism. Cancer Res. *67*, 2747–2756.

Ha, T.U., Segev, D.L., Barbie, D., Masiakos, P.T., Tran, T.T., Dombkowski, D., Glander, M., Clarke, T.R., Lorenzo, H.K., Donahoe, P.K., et al. (2000). Müllerian Inhibiting Substance Inhibits Ovarian Cell Growth through an Rb-independent Mechanism. J. Biol. Chem. *275*, 37101–37109.

Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., Higuchi, T., Yagi, H., Takakura, K., Minato, N., et al. (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 3360–3365.

He, X.C., Zhang, J., Tong, W.-G., Tawfik, O., Ross, J., Scoville, D.H., Tian, Q., Zeng, X., He, X., Wiedemann, L.M., et al. (2004). BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt–β-catenin signaling. Nat. Genet. *36*, 1117–1121.

Horbelt, D., Denkis, A., and Knaus, P. (2012). A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. Int. J. Biochem. Cell Biol. *44*, 469–474.

Hoshiya, Y., Gupta, V., Segev, D.L., Hoshiya, M., Carey, J.L., Sasur, L.M., Tran, T.T., Ha, T.U., and Maheswaran, S. (2003). Mullerian Inhibiting Substance induces NFkB signaling in breast and prostate cancer cells. Mol. Cell. Endocrinol. *211*, 43–49.

Ingraham, H.A., Hirokawa, Y., Roberts, L.M., Mellon, S.H., McGee, E., Nachtigal, M.W., and Visser, J.A. (2000). Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. Recent Prog. Horm. Res. *55*, 53-67; discussion 67-68.

Ishisaki, A., Yamato, K., Hashimoto, S., Nakao, A., Tamaki, K., Nonaka, K., ten Dijke, P., Sugino, H., and Nishihara, T. (1999). Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. J. Biol. Chem. *274*, 13637–13642.

Itóh, S., Landström, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C.H., Heldin, N.E., and ten Dijke, P. (1998). Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. J. Biol. Chem. *273*, 29195–29201.

Jamin, S.P., Arango, N.A., Mishina, Y., Hanks, M.C., and Behringer, R.R. (2002). Requirement of Bmpr1a for Müllerian duct regression during male sexual development. Nat. Genet. *32*, 408–410.

Jamin, S.P., Arango, N.A., Mishina, Y., Hanks, M.C., and Behringer, R.R. (2003). Genetic studies of the AMH/MIS signaling pathway for Müllerian duct regression. Mol. Cell. Endocrinol. *211*, 15–19.

Jindal, V., Arora, E., Gupta, S., Lal, A., Masab, M., and Potdar, R. (2018). Prospects of chimeric antigen receptor T cell therapy in ovarian cancer. Med. Oncol. *35*, 70.

Josso, N., and Clemente, N. di (2003). Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF-β family. Trends Endocrinol. Metab. *14*, 91–97.

Josso, N., Rey, R.A., and Picard, J.-Y. (2013). Anti-müllerian hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist. Int. J. Endocrinol. *2013*, 674105.

JOST, A. (1953). Problems of fetal endocrinology : The gonadal and hypophyseal hormones. Recent Progr Horm. Res *8*, 379–413.

Kabawat, S.E., Bast, R.C., Welch, W.R., Knapp, R.C., and Colvin, R.B. (1983). Immunopathologic characterization of a monoclonal antibody that recognizes common surface antigens of human ovarian tumors of serous, endometrioid, and clear cell types. Am. J. Clin. Pathol. *79*, 98–104.

Kadouche, J., Mach, J.-P., Michielin, O., Zoete, V., Iwaszkiewicz, J., Cerutti, M., Choblet, S., and Golay, J. (2013). Multispecific Antibodies WO2013005194 (A2) — 2013-01-10.

Kamiya, N., Ye, L., Kobayashi, T., Mochida, Y., Yamauchi, M., Kronenberg, H.M., Feng, J.Q., and Mishina, Y. (2008). BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. Dev. Camb. Engl. *135*, 3801–3811.

Kaplan, F.S., Xu, M., Seemann, P., Connor, J.M., Glaser, D.L., Carroll, L., Delai, P., Fastnacht-Urban, E., Forman, S.J., Gillessen-Kaesbach, G., et al. (2009). Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. Hum. Mutat. *30*, 379–390.

Kappes, S., Milde-Langosch, K., Kressin, P., Passlack, B., Dockhorn-Dworniczak, B., Röhlke, P., and Löning, T. (1995). p53 mutations in ovarian tumors, detected by temperature-gradient gel electrophoresis, direct sequencing and immunohistochemistry. Int. J. Cancer *64*, 52–59.

Kaps, C., Hoffmann, A., Zilberman, Y., Pelled, G., Häupl, T., Sittinger, M., Burmester, G., Gazit, D., and Gross, G. (2004). Distinct roles of BMP receptors Type IA and IB in osteo-/chondrogenic differentiation in mesenchymal progenitors (C3H10T1/2). BioFactors Oxf. Engl. *20*, 71–84.

Katsumata, N., Yasuda, M., Takahashi, F., Isonishi, S., Jobo, T., Aoki, D., Tsuda, H., Sugiyama, T., Kodama, S., Kimura, E., et al. (2009). Dose-dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3 weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet Lond. Engl. *374*, 1331–1338.

Kaya, A., Atabekoglu, C.S., Kahraman, K., Taskin, S., Ozmen, B., Berker, B., and Sonmezer, M. (2012). Follicular fluid concentrations of IGF-I, IGF-II, IGFBP-3, VEGF, AMH, and inhibin-B in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation using GnRH agonist or GnRH antagonist. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. *164*, 167–171.

Kersual, N., Garambois, V., Chardès, T., Pouget, J.-P., Salhi, I., Bascoul-Mollevi, C., Bibeau, F., Busson, M., Vié, H., Clémenceau, B., et al. (2014a). The human Müllerian inhibiting substance type II receptor as immunotherapy target for ovarian cancer. mAbs *6*, 1314–1326.

Kim, J.H., MacLaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (2014). Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors. Obstet. Gynecol. Sci. *57*, 343–357.

Kipps, E., Tan, D.S.P., and Kaye, S.B. (2013). Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. Nat. Rev. Cancer *13*, 273–282.

Kobayashi, A., Stewart, C.A., Wang, Y., Fujioka, K., Thomas, N.C., Jamin, S.P., and Behringer, R.R. (2011). β-Catenin is essential for Müllerian duct regression during male sexual differentiation. Dev. Camb. Engl. *138*, 1967–1975.

Komatsu, Y., Scott, G., Nagy, A., Kaartinen, V., and Mishina, Y. (2007). BMP type I receptor ALK2 is essential for proper patterning at late gastrulation during mouse embryogenesis. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *236*, 512–517.

Kontermann, R.E. (2012). Dual targeting strategies with bispecific antibodies. mAbs *4*, 182–197.

Kurman, R.J. (2013). Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. *24 Suppl 10*, x16-21.

Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2008). Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. Int. J. Gynecol. Pathol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Pathol. *27*, 151–160.

Lavery, K., Swain, P., Falb, D., and Alaoui-Ismaili, M.H. (2008). BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J. Biol. Chem. *283*, 20948–20958.

Lebeurrier, N., Launay, S., Macrez, R., Maubert, E., Legros, H., Leclerc, A., Jamin, S.P., Picard, J.-Y., Marret, S., Laudenbach, V., et al. (2008). Anti-Mullerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. J. Cell Sci. *121*, 3357–3365.

Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. Am. J. Pathol. *177*, 1053–1064.

Lin, S., Svoboda, K.K.H., Feng, J.Q., and Jiang, X. (2016). The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone. Bone Res. *4*.

Linke, R., Klein, A., and Seimetz, D. (2010). Catumaxomab. mAbs *2*, 129–136.

Liu, J., Wilson, S., and Reh, T. (2003). BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina. Dev. Biol. *256*, 34–48.

Long, W., Wang, W., and Rey, R. (2000a). [Study on the anti-müllerian hormone served as a marker for granulosa cell tumor of ovary]. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi *35*, 356–358.

Long, W.-Q., Ranchin, V., Pautier, P., Belville, C., Denizot, P., Cailla, H., Lhommé, C., Picard, J.-Y., Bidart, J.-M., and Rey, R. (2000b). Detection of Minimal Levels of Serum Anti-Müllerian Hormone during Follow-Up of Patients with Ovarian Granulosa Cell Tumor by Means of a Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Endocrinol. Metab. *85*, 540–544.

Lurie, G., Thompson, P.J., McDuffie, K.E., Carney, M.E., and Goodman, M.T. (2009). Prediagnostic symptoms of ovarian carcinoma: A case-control study. Gynecol. Oncol. *114*, 231–236.

Luvero, D., Milani, A., and Ledermann, J.A. (2014). Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential. Ther. Adv. Med. Oncol. *6*, 229–239.

Ma, D., and Gu, M.J. (1991). Immune effect of tumor-infiltrating lymphocytes and its relation to the survival rate of patients with ovarian malignancies. J. Tongji Med. Univ. Tong Ji Yi Ke Xue Xue Bao *11*, 235–239.

MacLaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (2010). Müllerian Inhibiting Substance/anti-Müllerian hormone: a potential therapeutic agent for human ovarian and other cancers. Future Oncol. Lond. Engl. *6*, 391–405.

MacLaughlin, D.T., Hudson, P.L., Graciano, A.L., Kenneally, M.K., Ragin, R.C., Manganaro, T.F., and Donahoe, P.K. (1992). Mullerian duct regression and antiproliferative bioactivities of mullerian inhibiting substance reside in its carboxy-terminal domain. Endocrinology *131*, 291–296.

Marquez, R.T., Baggerly, K.A., Patterson, A.P., Liu, J., Broaddus, R., Frumovitz, M., Atkinson, E.N., Smith, D.I., Hartmann, L., Fishman, D., et al. (2005). Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *11*, 6116–6126.

Marshall, M.J.E., Stopforth, R.J., and Cragg, M.S. (2017). Therapeutic Antibodies: What Have We Learnt from Targeting CD20 and Where Are We Going? Front. Immunol. *8*.

Martin Lluesma, S., Wolfer, A., Harari, A., and Kandalaft, L.E. (2016). Cancer Vaccines in Ovarian Cancer: How Can We Improve? Biomedicines *4*.

Masiakos, P.T., MacLaughlin, D.T., Maheswaran, S., Teixeira, J., Fuller, A.F., Shah, P.C., Kehas, D.J., Kenneally, M.K., Dombkowski, D.M., Ha, T.U., et al. (1999). Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *5*, 3488–3499.

Massagué, J., and Gomis, R.R. (2006). The logic of TGFbeta signaling. FEBS Lett. *580*, 2811–2820.

Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. Genes Dev. *19*, 2783–2810.

Mazumder, S., Johnson, J.M., Swank, V., Dvorina, N., Martelli, E., Ko, J., and Tuohy, V.K. (2017). Primary Immunoprevention of Epithelial Ovarian Carcinoma by Vaccination against the Extracellular Domain of Anti-Müllerian Hormone Receptor II. Cancer Prev. Res. Phila. Pa *10*, 612–624.

McCluggage, W.G. (2011). Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. Pathology (Phila.) *43*, 420–432.

Meirelles, K., Benedict, L.A., Dombkowski, D., Pepin, D., Preffer, F.I., Teixeira, J., Tanwar, P.S., Young, R.H., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., et al. (2012a). Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 2358–2363.

Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N., and Behringer, R.R. (1995). Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. Genes Dev. *9*, 3027–3037.

Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M.J., Matzuk, M.M., Josso, N., Cate, R.L., and Behringer, R.R. (1996). Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. Genes Dev. *10*, 2577–2587.

Mok, S.C.-H., Bell, D.A., Knapp, R.C., Fishbaugh, P.M., Welch, W.R., Muto, M.G., Berkowitz, R.S., and Tsao, S.-W. (1993). Mutation of K-ras Protooncogene in Human Ovarian Epithelial Tumors of Borderline Malignancy. Cancer Res. *53*, 1489–1492.

Moore, K.N., Martin, L.P., O'Malley, D.M., Matulonis, U.A., Konner, J.A., Vergote, I., Ponte, J.F., and Birrer, M.J. (2017). A review of mirvetuximab soravtansine in the treatment of platinum-resistant ovarian cancer.

Morales-Vásquez, F., Pedernera, E., Reynaga-Obregón, J., López-Basave, H.N., Gómora, M.J., Carlón, E., Cárdenas, S., Silva-Ayala, R., Almaraz, M., and Méndez, C. (2016). High levels of pretreatment CA125 are associated to improved survival in high grade serous ovarian carcinoma. J. Ovarian Res. *9*, 41.

Moriya, T., Mikami, Y., Sakamoto, K., Endoh, M., Takeyama, J., Suzuki, T., Mochizuki, S., Watanabe, M., Monobe, Y., and Sasano, H. (2003). Endocervical-like mucinous borderline tumors of the ovary: clinicopathological features and electron microscopic findings. Med. Electron Microsc. Off. J. Clin. Electron Microsc. Soc. Jpn. *36*, 240–246.

Mullen, R.D., and Behringer, R.R. (2014). Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ. *8*, 281–296.

Nachtigal, M.W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D.L., Flanagan, J.N., Hammer, G.D., and Ingraham, H.A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. Cell *93*, 445–454.

Nam, S.W., Jo, Y.S., Eun, J.W., Song, J.Y., Ryu, K.S., Lee, J.Y., Lee, J.M., Maclaughlin, D.T., and Kim, J.H. (2009). Identification of large-scale characteristic genes of Müllerian inhibiting substance in human ovarian cancer cells. Int. J. Mol. Med. *23*, 589–596.

Namkung, J., Song, J.Y., Jo, H.H., Kim, M.R., Lew, Y.O., Donahoe, P.K., MacLaughlin, D.T., and Kim, J.H. (2012). Mullerian inhibiting substance induces apoptosis of human endometrial stromal cells in endometriosis. J. Clin. Endocrinol. Metab. *97*, 3224–3230.

Nilsson, E.E., Schindler, R., Savenkova, M.I., and Skinner, M.K. (2011). Inhibitory actions of Anti-Müllerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly. PloS One *6*, e20087.

Nohno, T., Ishikawa, T., Saito, T., Hosokawa, K., Noji, S., Wolsing, D.H., and Rosenbaum, J.S. (1995). Identification of a Human Type II Receptor for Bone Morphogenetic Protein-4 That Forms Differential Heteromeric Complexes with Bone Morphogenetic Protein Type I Receptors. J. Biol. Chem. *270*, 22522–22526.

O Donnell, R.L., McCormick, A., Mukhopadhyay, A., Woodhouse, L.C., Moat, M., Grundy, A., Dixon, M., Kaufman, A., Soohoo, S., Elattar, A., et al. (2014). The use of ovarian cancer cells from patients undergoing surgery to generate primary cultures capable of undergoing functional analysis. PloS One *9*, e90604.

Obata, K., Morland, S.J., Watson, R.H., Hitchcock, A., Chenevix-Trench, G., Thomas, E.J., and Campbell, I.G. (1998). Frequent PTEN/MMAC Mutations in Endometrioid but not Serous or Mucinous Epithelial Ovarian Tumors. Cancer Res. *58*, 2095–2097.

Orvis, G.D., Jamin, S.P., Kwan, K.M., Mishina, Y., Kaartinen, V.M., Huang, S., Roberts, A.B., Umans, L., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., et al. (2008). Functional Redundancy of TGF-beta Family Type I Receptors and Receptor-Smads in Mediating Anti-Müllerian Hormone-Induced Müllerian Duct Regression in the Mouse. Biol. Reprod. *78*, 994–1001.

Otte, A., Göhring, G., Steinemann, D., Schlegelberger, B., Groos, S., Länger, F., Kreipe, H.-H., Schambach, A., Neumann, T., Hillemanns, P., et al. (2012). A tumor-derived population (SCCOHT-1) as cellular model for a small cell ovarian carcinoma of the hypercalcemic type. Int. J. Oncol. *41*, 765–775.

Oza, A.M., Cook, A.D., Pfisterer, J., Embleton, A., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M.S., Beale, P., Cervantes, A., et al. (2015). Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. Lancet Oncol. *16*, 928–936.

Panchision, D.M., Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.-H., Turner, P.A., Hazel, T.G., and McKay, R.D.G. (2001). Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. Genes Dev. *15*, 2094–2110.

Park, S.H. (2005). Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads. J. Biochem. Mol. Biol. *38*, 9–16.

Park, C., Lavine, K., Mishina, Y., Deng, C.-X., Ornitz, D.M., and Choi, K. (2006). Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation. Dev. Camb. Engl. *133*, 3473–3484.

Park, S.H., Chung, Y.J., Song, J.Y., Kim, S.I., Pépin, D., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Kim, J.H. (2017). Müllerian inhibiting substance inhibits an ovarian cancer cell line via β-catenin interacting protein deregulation of the Wnt signal pathway. Int. J. Oncol. *50*, 1022–1028.

Peitsidis, P., and Agrawal, R. (2010). Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: a systematic review. Reprod. Biomed. Online *20*, 444–452.

Pellatt, A.J., Mullany, L.E., Herrick, J.S., Sakoda, L.C., Wolff, R.K., Samowitz, W.S., and Slattery, M.L. (2018). The TGFβ-signaling pathway and colorectal cancer: associations between dysregulated genes and miRNAs. J. Transl. Med. *16*, 1–22.

Pépin, D. Modified mullerian inhibiting substance (mis) proteins and uses thereof for the treatment of diseases.

Pépin, D., Hoang, M., Nicolaou, F., Hendren, K., Benedict, L.A., Al-Moujahed, A., Sosulski, A., Marmalidou, A., Vavvas, D., and Donahoe, P.K. (2013a). An albumin leader sequence coupled with a cleavage site modification enhances the yield of recombinant C-terminal Mullerian Inhibiting Substance. Technol. Elmsford N *1*, 63–71.

Pépin, D., Sosulski, A., Zhang, L., Wang, D., Vathipadiekal, V., Hendren, K., Coletti, C.M., Yu, A., Castro, C.M., Birrer, M.J., et al. (2015a). AAV9 delivering a modified human Mullerian inhibiting substance as a gene therapy in patient-derived xenografts of ovarian cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. *112*, E4418–E4427.

Perren, T.J., Swart, A.M., Pfisterer, J., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M.S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C., et al. (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. N. Engl. J. Med. *365*, 2484–2496.

Philibert, P., Stoessel, A., Wang, W., Sibler, A.-P., Bec, N., Larroque, C., Saven, J.G., Courtête, J., Weiss, E., and Martineau, P. (2007). A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm. BMC Biotechnol. *7*, 81.

Picard, J.-Y., and Josso, N. (1984). Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. Mol. Cell. Endocrinol. *34*, 23–29.

Picard, J.Y., Benarous, R., Guerrier, D., Josso, N., and Kahn, A. (1986). Cloning and expression of cDNA for anti-müllerian hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. *83*, 5464–5468.

Pieretti-Vanmarcke, R., Donahoe, P.K., Szotek, P., Manganaro, T., Lorenzen, M.K., Lorenzen, J., Connolly, D.C., Halpern, E.F., and MacLaughlin, D.T. (2006a). Recombinant human Mullerian inhibiting substance inhibits long-term growth of MIS type II receptor-directed transgenic mouse ovarian cancers in vivo. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *12*, 1593–1598.

Pierreux, C.E., Nicolás, F.J., and Hill, C.S. (2000). Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. Mol. Cell. Biol. *20*, 9041–9054.

Pignolo, R.J., Shore, E.M., and Kaplan, F.S. (2011). Fibrodysplasia ossificans progressiva: clinical and genetic aspects. Orphanet J. Rare Dis. *6*, 80.

Pujade-Lauraine, E., Hilpert, F., Weber, B., Reuss, A., Poveda, A., Kristensen, G., Sorio, R., Vergote, I., Witteveen, P., Bamias, A., et al. (2014). Bevacizumab Combined With Chemotherapy for Platinum-Resistant Recurrent Ovarian Cancer: The AURELIA Open-Label Randomized Phase III Trial. J. Clin. Oncol. *32*, 1302–1308.

Rajpert-De Meyts, E., Jørgensen, N., Græm, N., Müller, J., Cate, R.L., and Skakkebæk, N.E. (1999). Expression of Anti-Müllerian Hormone during Normal and Pathological Gonadal Development: Association with Differentiation of Sertoli and Granulosa Cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. *84*, 3836–3844.

Regan, S.L.P., Knight, P.G., Yovich, J.L., Stanger, J.D., Leung, Y., Arfuso, F., Dharmarajan, A., and Almahbobi, G. (2016). Dysregulation of granulosal bone morphogenetic protein receptor 1B density is associated with reduced ovarian reserve and the age-related decline in human fertility. Mol. Cell. Endocrinol. *425*, 84–93.

Renaud, E.J., MacLaughlin, D.T., Oliva, E., Rueda, B.R., and Donahoe, P.K. (2005). Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian Inhibiting Substance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 111–116.

Rey, R.A., Lhommé, C., Marcillac, I., Lahlou, N., Duvillard, P., Josso, N., and Bidart, J.M. (1996). Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: Comparative study with serum α-inhibin and estradiol. Am. J. Obstet. Gynecol. *174*, 958–965.

Rigueur, D., Brugger, S., Anbarchian, T., Kim, J.K., Lee, Y., and Lyons, K.M. (2015). The type I BMP receptor ACVR1/ALK2 is required for chondrogenesis during development. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. *30*, 733–741.

Robin, G., and Martineau, P. (2012). Synthetic customized scFv libraries. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *907*, 109–122.

Romain, G., Senyukov, V., Rey-Villamizar, N., Merouane, A., Kelton, W., Liadi, I., Mahendra, A., Charab, W., Georgiou, G., Roysam, B., et al. (2014). Antibody Fc engineering improves frequency and promotes kinetic boosting of serial killing mediated by NK cells. Blood *124*, 3241–3249.

de Romeuf, C., Dutertre, C.-A., Le Garff-Tavernier, M., Fournier, N., Gaucher, C., Glacet, A., Jorieux, S., Bihoreau, N., Behrens, C.K., Béliard, R., et al. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of FcgammaRIIIA/CD16. Br. J. Haematol. *140*, 635–643.

van Rooij, I. a. J., Broekmans, F.J.M., te Velde, E.R., Fauser, B.C.J.M., Bancsi, L.F.J.M.M., de Jong, F.H., and Themmen, A.P.N. (2002). Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. Hum. Reprod. Oxf. Engl. *17*, 3065–3071.

Rossi, L., Verrico, M., Zaccarelli, E., Papa, A., Colonna, M., Strudel, M., Vici, P., Bianco, V., and Tomao, F. (2017). Bevacizumab in ovarian cancer: A critical review of phase III studies. Oncotarget *8*, 12389–12405.

Sagorny, K., Chapellier, M., Laperrousaz, B., and Maguer-Satta, V. (2012). [BMP and cancer: the Yin and Yang of stem cells]. Médecine Sci. MS *28*, 416–422.

Salhi, I., Cambon-Roques, S., Lamarre, I., Laune, D., Molina, F., Pugnière, M., Pourquier, D., Gutowski, M., Picard, J.-Y., Xavier, F., et al. (2004a). The anti-Müllerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand. Biochem. J. *379*, 785–793.

Schepers, G., Wilson, M., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2003). SOX8 Is Expressed during Testis Differentiation in Mice and Synergizes with SF1 to Activate the Amh Promoter in Vitro. J. Biol. Chem. *278*, 28101–28108.

Schille, C., Heller, J., and Schambony, A. (2016). Differential requirement of bone morphogenetic protein receptors Ia (ALK3) and Ib (ALK6) in early embryonic patterning and neural crest development. BMC Dev. Biol. *16*, 1.

Schock, H., Lundin, E., Vääräsmäki, M., Grankvist, K., Fry, A., Dorgan, J.F., Pukkala, E., Lehtinen, M., Surcel, H.M., and Lukanova, A. (2014). Anti-Mullerian hormone and risk of invasive serous ovarian cancer. Cancer Causes Control *25*, 583–589.

Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. J. Allergy Clin. Immunol. *125*, S41-52.

Schumer, S.T., and Cannistra, S.A. (2003). Granulosa cell tumor of the ovary. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *21*, 1180–1189.

Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. Nat. Rev. Cancer *12*, 278–287.

Sèdes, L., Leclerc, A., Moindjie, H., Cate, R.L., Picard, J.-Y., di Clemente, N., and Jamin, S.P. (2013). Anti-Müllerian Hormone Recruits BMPR-IA in Immature Granulosa Cells. PLoS ONE *8*.

Segev, D.L., Hoshiya, Y., Stephen, A.E., Hoshiya, M., Tran, T.T., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Maheswaran, S. (2001). Müllerian Inhibiting Substance Regulates NFκB Signaling and Growth of Mammary Epithelial Cells in Vivo. J. Biol. Chem. *276*, 26799–26806.

Segev, D.L., Hoshiya, Y., Hoshiya, M., Tran, T.T., Carey, J.L., Stephen, A.E., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Maheswaran, S. (2002). Mullerian-inhibiting substance regulates NF–κB signaling in the prostate in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 239–244.

Seimetz, D., Lindhofer, H., and Bokemeyer, C. (2010). Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. Cancer Treat. Rev. *36*, 458–467.

Shen-Gunther, J., and Mannel, R.S. (2002). Ascites as a Predictor of Ovarian Malignancy. Gynecol. Oncol. *87*, 77–83.

Shore, E.M., Xu, M., Feldman, G.J., Fenstermacher, D.A., Cho, T.-J., Choi, I.H., Connor, J.M., Delai, P., Glaser, D.L., LeMerrer, M., et al. (2006). A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. Nat. Genet. *38*, 525–527.

Sibéril, S., de Romeuf, C., Bihoreau, N., Fernandez, N., Meterreau, J.-L., Regenman, A., Nony, E., Gaucher, C., Glacet, A., Jorieux, S., et al. (2006). Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc gamma R functions. Clin. Immunol. Orlando Fla *118*, 170–179.

Sieben, N.L.G., Macropoulos, P., Roemen, G.M.J.M., Kolkman-Uljee, S.M., Jan Fleuren, G., Houmadi, R., Diss, T., Warren, B., Al Adnani, M., De Goeij, A.P.M., et al. (2004). In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. J. Pathol. *202*, 336–340.

Singer, G., Oldt, R., Cohen, Y., Wang, B.G., Sidransky, D., Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. *95*, 484–486.

Singhatanadgit, W., and Olsen, I. (2011). Endogenous BMPR-IB signaling is required for early osteoblast differentiation of human bone cells. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. *47*, 251–259.

Soliman, P.T., Slomovitz, B.M., Broaddus, R.R., Sun, C.C., Oh, J.C., Eifel, P.J., Gershenson, D.M., and Lu, K.H. (2004). Synchronous primary cancers of the endometrium and ovary: a single institution review of 84 cases. Gynecol. Oncol. *94*, 456–462.

Spiess, C., Zhai, Q., and Carter, P.J. (2015a). Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol. Immunol. *67*, 95–106.

Stephen, A.E., Masiakos, P.T., Segev, D.L., Vacanti, J.P., Donahoe, P.K., and MacLaughlin, D.T. (2001). Tissue-engineered cells producing complex recombinant proteins inhibit ovarian cancer in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 3214–3219.

Suh, D.H., Kim, M., Lee, K.H., Eom, K.Y., Kjeldsen, M.K., Mirza, M.R., and Kim, J.W. (2018). Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2017. J. Gynecol. Oncol. *29*, e31.

Swiercz, R., Mo, M., Khare, P., Schneider, Z., Ober, R.J., and Ward, E.S. (2016). Loss of expression of the recycling receptor, FcRn, promotes tumor cell growth by increasing albumin consumption. Oncotarget *8*, 3528–3541.

Szotek, P.P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P.T., Dinulescu, D.M., Connolly, D., Foster, R., Dombkowski, D., Preffer, F., Maclaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (2006). Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 11154–11159.

Tanwar, P.S., Commandeur, A.E., Zhang, L., Taketo, M.M., and Teixeira, J.M. (2012). The Müllerian inhibiting substance type 2 receptor suppresses tumorigenesis in testes with sustained β-catenin signaling. Carcinogenesis *33*, 2351–2361.

Taube, J.M., Klein, A., Brahmer, J.R., Xu, H., Pan, X., Kim, J.H., Chen, L., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., and Anders, R.A. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *20*, 5064–5074.

Teixeira, J., He, W.W., Shah, P.C., Morikawa, N., Lee, M.M., Catlin, E.A., Hudson, P.L., Wing, J., Maclaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (1996). Developmental expression of a candidate müllerian inhibiting substance type II receptor. Endocrinology *137*, 160–165.

Teixeira, J., Fynn-Thompson, E., Payne, A.H., and Donahoe, P.K. (1999). Müllerian-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. Endocrinology *140*, 4732–4738.

Teneriello, M.G., Ebina, M., Linnoila, R.I., Henry, M., Nash, J.D., Park, R.C., and Birrer, M.J. (1993). p53 and Ki-ras Gene Mutations in Epithelial Ovarian Neoplasms. Cancer Res. *53*, 3103–3108.

Tremblay, J.J., and Viger, R.S. (2003). A mutated form of steroidogenic factor 1 (SF-1 G35E) that causes sex reversal in humans fails to synergize with transcription factor GATA-4. J. Biol. Chem. *278*, 42637–42642.

Vang, R., Shih, I.-M., and Kurman, R.J. (2009). Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. Adv. Anat. Pathol. *16*, 267–282.

te Velde, E.R., and Pearson, P.L. (2002). The variability of female reproductive ageing. Hum. Reprod. Update *8*, 141–154.

Visser, J.A., Olaso, R., Verhoef-Post, M., Kramer, P., Themmen, A.P.N., and Ingraham, H.A. (2001). The Serine/Threonine Transmembrane Receptor ALK2 Mediates Müllerian Inhibiting Substance Signaling. Mol. Endocrinol. *15*, 936–945.

Walentowicz, P., Sadlecki, P., Krintus, M., Sypniewska, G., Mankowska-Cyl, A., Grabiec, M., and Walentowicz-Sadlecka, M. (2013). Serum Anti-Müllerian Hormone Levels in Patients with Epithelial Ovarian Cancer. Int. J. Endocrinol. *2013*, e517239.

Wang, P.-Y., Koishi, K., McGeachie, A.B., Kimber, M., Maclaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and McLennan, I.S. (2005). Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 16421–16425.

Wang, Y., Chen, S.Y., Karnezis, A.N., Colborne, S., Santos, N.D., Lang, J.D., Hendricks, W.P., Orlando, K.A., Yap, D., Kommoss, F., et al. (2017). The histone methyltransferase EZH2 is a therapeutic target in small cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type. J. Pathol. *242*, 371–383.

Webb, J.R., Milne, K., Kroeger, D.R., and Nelson, B.H. (2016). PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. Gynecol. Oncol. *141*, 293–302.

Weenen, C., Laven, J.S.E., von Bergh, A.R.M., Cranfield, M., Groome, N.P., Visser, J.A., Kramer, P., Fauser, B.C.J.M., and Themmen, A.P.N. (2004). Anti-Müllerian hormone expression pattern in the

human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. Mol. Hum. Reprod. *10*, 77–83.

Wei, X., Dombkowski, D., Meirelles, K., Pieretti-Vanmarcke, R., Szotek, P.P., Chang, H.L., Preffer, F.I., Mueller, P.R., Teixeira, J., MacLaughlin, D.T., et al. (2010a). Müllerian inhibiting substance preferentially inhibits stem/progenitors in human ovarian cancer cell lines compared with chemotherapeutics. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 18874–18879.

Wilson, C.A., di Clemente, N., Ehrenfels, C., Pepinsky, R.B., Josso, N., Vigier, B., and Cate, R.L. (1993). Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *7*, 247–257.

Wong, D.J.L., and Hurvitz, S.A. (2014). Recent advances in the development of anti-HER2 antibodies and antibody-drug conjugates. Ann. Transl. Med. *2*, 122.

Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-β receptor. Nature *370*, 341–347.

Wu, X., Zhang, N., and Lee, M.M. (2012). Müllerian Inhibiting Substance Recruits ALK3 to Regulate Leydig Cell Differentiation. Endocrinology *153*, 4929–4937.

Yi, S.E., Daluiski, A., Pederson, R., Rosen, V., and Lyons, K.M. (2000). The type I BMP receptor BMPRIB is required for chondrogenesis in the mouse limb. Dev. Camb. Engl. *127*, 621–630.

Yi, S.E., LaPolt, P.S., Yoon, B.S., Chen, J.Y., Lu, J.K., and Lyons, K.M. (2001). The type I BMP receptor BmprIB is essential for female reproductive function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 7994–7999.

Yuan, Q., Simmons, H.H., Robinson, M.K., Russeva, M., Marasco, W.A., and Adams, G.P. (2006). Development of engineered antibodies specific for the Müllerian inhibiting substance type II receptor: a promising candidate for targeted therapy of ovarian cancer. Mol. Cancer Ther. *5*, 2096–2105.

Yuan, Q.-A., Robinson, M.K., Simmons, H.H., Russeva, M., and Adams, G.P. (2008). Isolation of anti-MISIIR scFv molecules from a phage display library by cell sorter biopanning. Cancer Immunol. Immunother. CII *57*, 367–378.

Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. (2003). BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. Nat. Med. *9*, 964–968.

Zhan, Y., Fujino, A., MacLaughlin, D.T., Manganaro, T.F., Szotek, P.P., Arango, N.A., Teixeira, J., and Donahoe, P.K. (2006). Müllerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Müllerian duct regression. Development *133*, 2359–2369.

Zhang, S., Balch, C., Chan, M.W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J.M., Yan, P.S., Huang, T.H.-M., and Nephew, K.P. (2008). Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. Cancer Res. *68*, 4311–4320.

Zhou, X.P., Woodford-Richens, K., Lehtonen, R., Kurose, K., Aldred, M., Hampel, H., Launonen, V., Virta, S., Pilarski, R., Salovaara, R., et al. (2001). Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. Am. J. Hum. Genet. *69*, 704–711.

Résumé :

Les travaux récents de l'équipe ont permis de mettre à jour l'intérêt thérapeutique du ciblage par anticorps du récepteur à l'hormone anti-mullerienne (AMHRII) dans les cancers gynécologiques notamment dans les cancers de l'ovaire où les thérapies sont souvent limitées du fait d'un fort taux de récidive (70%). Le récepteur AMHRII est sur-exprimé dans les cancers et restreint dans les tissus sains. De ce fait, le laboratoire a développé le premier anticorps anti-AMHRII actuellement en clinique sous le nom de Murlentamab dont les premiers retours de phases cliniques sont très encourageant, avec notamment un recrutement significatif du système immunitaire

au niveau de la tumeur. Le récepteur AMHRII s'hétérodimérise avec les récepteurs de type I qui inclue ALK2, ALK3, ALK6. Cependant, aucune étude en oncologie a mis en évidence l'implication de ces récepteurs, pourtant essentiel à la signalisation de l'AMH. Dans le but d'améliorer et développer nos thérapies ciblées nous nous sommes intéressés aux rôles des récepteurs ALK associés au récepteur AMHRII dans la signalisation de l'AMH. Ce qui nous a conduit à développer une nouvelle stratégie thérapeutique par le biais d'anticorps bispécifiques ciblant les récepteurs AMHRII-ALK afin d'orienter la signalisation de l'AMH vers une voie apoptotique

De plus, La signalisation de l'AMH est connue en embryologie pour induire la régression des canaux Müller par apoptose. Par cet effet physiologique pro-apoptotique, de nombreuses études se sont servis de ce mécanisme d'action « naturel » de l'AMH pour l'utiliser en thérapies dans le traitement des cancers gynécologiques. Le point commun de ces études est l'emploi de l'AMH à forte dose par rapport aux concentrations physiologiques retrouvées chez l'homme et la femme. Cependant, nous montrons au cours de cette étude que l'AMH à un effet paradoxal à faible doses. C'est pourquoi, nous avons axé nos recherches sur le rôle de l'AMH par l'étude de ces voies de signalisation et de son effet à différentes concentrations. Ces résultats ont conduit à l'élaboration d'une deuxième stratégie thérapeutique par anticorps ligand « trapping » .

Abstract :

The team's recent work has revealed the therapeutic value of targeting anti-müllerian hormone receptor antibody (AMHRII) in gynaecological cancers, particularly in ovarian cancers, where therapies are often limited due to a high recurrence rate (70%). The AMHRII receptor is overexpressed in cancers and restricted in healthy tissues. As a result, the laboratory has developed the first anti-AMHRII antibody currently in clinical use under the name Murlentamab, which has very encouraging early returns from clinical phases, including significant recruitment of the immune system at the tumor level. The AMHRII receptor is heterodimerized with type I receptor that include ALK2, ALK3, ALK6. However, no oncology studies have shown the involvement of these receptors, which are essential for the signalling of AMH. In order to improve and develop our targeted therapies, we have focused on the roles of ALK receptors associated with the AMHRII receptor in AMH signaling. This led us to develop a new therapeutic strategy using bispecific antibodies targeting AMHRII-ALK receptors to drive AMH signaling towards an apoptotic pathway.

In addition, AMH signaling is known in embryology to induce regression of Müllerian ducts by apoptosis. Through this pro-apoptotic physiological effect, many studies have used this "natural" mechanism of action of the AMH to use it in therapies for the treatment of gynaecological cancers. However, we show in this study that the AMH has a paradoxical effect at low doses. For this reason, we have focused our research on the role of AMH by studying these signaling pathways and its effect at different concentrations. These results led to the development of a second therapeutic strategy using ligand antibody "trapping".