UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

VERS UNE MEILLEURE COMPRÉHENSION DE LA SENSIBILITÉ THÉRAPEUTIQUE DANS LES CANCERS GYNÉCOLOGIQUES: ANALYSES QUANTITATIVES, DYNAMIQUES ET FONCTIONNELLES DE CELLULES CANCÉREUSES DE L'OVAIRE ET DE L'ENDOMÈTRE.

THÈSE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR

LÉA-ISABELLE RENAUD

Août 2026

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (DOCTORAT)

Direction de recherche

Éric ASSELIN, Ph. D.	Directeur de recherche
Monique CADRIN, Ph. D.	Codirectrice de recherche

Jury d'évaluation :

Éric ASSELIN, Ph. D.	Directeur de recherche
Monique CADRIN, Ph. D.	Codirectrice de recherche
Patrick NARBONNE, Ph. D.	Président du jury
Yannick AUDET-DELAGE, Ph. D.	Évaluateur interne
Jacques BERNIER, Ph. D.	Évaluateur externe

Thèse soutenue le 06/05/2026

Remerciements

Je dédie cette thèse à mon père, qui a toujours été à mes côtés, me guidant avec bienveillance et passion depuis mon plus jeune âge. Dès mon enfance, c'est lui qui a éveillé en moi l'amour des études, m'emmenant à l'université et dans ses cours lorsque j'étais malade et que je ne pouvais pas aller à l'école. Il m'a offert un soutien sans faille, une confiance inébranlable et un amour constant, illuminant mes moments de doute et me donnant le courage de persévérer. Chaque pas de cette aventure scientifique a été, à sa manière, un pas partagé avec lui. D'abord marchant dans ses traces, puis sculptant ma propre voie en choisissant la biologie, je termine aujourd'hui en ayant bâti, à ses côtés, une collaboration qui nous unit dans ce chemin scientifique. Je suis profondément émue et fière d'avoir eu l'honneur de publier mon tout premier article scientifique à ses côtés, avec lui en second auteur, symbolisant ce lien unique qui m'accompagne dans tous mes projets.

Je remercie chaleureusement mes collègues et stagiaires, de part et d'autre de l'Atlantique, qui ont partagé avec moi ce parcours semé d'embûches. Merci pour les rires, les échanges, les discussions profondes et les instants de complicité qui ont transformé cette aventure scientifique en une expérience profondément humaine, lumineuse et précieuse.

À ma toute première stagiaire, Élisabeth — devenue au fil du temps une amie, une relectrice attentive de chacun de mes manuscrits et une collaboratrice de confiance — j'adresse un immense merci. Je suis profondément reconnaissante que nos échanges se poursuivent encore aujourd'hui et que notre collaboration continue de s'épanouir.

Merci à ma meilleure amie, Coralie, avec qui nous avons su bâtir une collaboration scientifique et humaine, en partageant les défis de la recherche entre Marseille et Trois-Rivières. Je suis immensément fière de ce que nous avons réussi à construire ensemble.

Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude envers les projets scientifiques qui ont jalonné et nourri ces quatre années de doctorat. L'*Experimentarium*, le programme *Chercheurs de demain*, *Écosavoir* et le *ComSciCon* ont été bien plus que des engagements parallèles : ils m'ont permis de me projeter dans l'avenir, de redéfinir mon rapport à la science et de comprendre que le doctorat ne se limite pas à la recherche, mais qu'il s'enracine aussi dans le partage des connaissances, le dialogue et la transmission, en particulier auprès des plus jeunes générations.

Merci à toutes celles et ceux qui ont illuminé ce parcours par leur patience,

leurs encouragements et leur présence bienveillante, même sans toujours comprendre ce que je faisais. Votre soutien, discret ou bruyant, a été essentiel. Une pensée toute particulière pour Camille : merci pour ton appui indéfectible, qui m'a permis de traverser les longues heures de travail avec sérénité... et toujours l'estomac plein.

Finalement, je tiens à remercier David arrivé tardivement dans cette aventure, mais au moment où j'en avais le plus besoin. Son soutien, sa patience et sa bienveillance ont été une véritable force dans les derniers mois de cette thèse, et m'ont aidée à franchir cette étape avec plus de calme et de solidité. Il m'a permis de garder la passion intacte, même lorsque les défis semblaient insurmontables.

Enfin, je remercie toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont cru en moi, m'ont accompagnée ou m'ont inspirée. Cette thèse n'est pas seulement le fruit de mes efforts, mais le reflet de l'amour, de la confiance et du soutien de ceux qui ont cheminé à mes côtés.

Je confirme qu'aucun outil d'intelligence artificielle (IA), y compris, mais sans s'y limiter, ChatGPT, n'a été utilisé pour la rédaction, la rédaction ou la révision de cette proposition de recherche. Toutes les contributions intellectuelles sont le fruit de l'effort et de l'expertise humaine. La présente thèse a été corrigée par Antidote et ChatGPT, mais aussi par des personnes externes au comité afin de limiter les fautes ou divergences d'orthographes.

Je remercie aussi ma direction de recherches pour les fonds accordés pour mes recherches.

Résumé

Les cancers de l'ovaire et de l'endomètre se caractérisent par une forte hétérogénéité biologique, qui contribue aux réponses variables observées face aux traitements anticancéreux. Cette hétérogénéité représente un défi majeur pour la compréhension des mécanismes d'action et de résistance aux thérapies. L'objectif principal de cette thèse était de caractériser de manière dynamique et multi-paramétrique la réponse de cellules cancéreuses ovariennes et endométriales à différents traitements, en combinant la vidéo-microscopie à des approches expérimentales classiques.

Pour ce faire, sept lignées cellulaires ont été étudiées, incluant les lignées endométriales (Ishikawa, KLE et HEC-1-A) et ovariennes (Cov-362, Ovcar-4, Caov-3 et Ovsaho). La réponse aux traitements a été évaluée à l'aide de la vidéo-microscopie en temps réel, permettant l'analyse dynamique du comportement cellulaire, et complétée par des approches non-dynamiques telles que des tests de clonogénicité, des western blots, des tests de croissance tridimensionnelle et des essais de migration de type scratch.

Afin de standardiser et d'optimiser l'analyse des données issues de la vidéo-microscopie, un logiciel dédié, *Toto-Cell*, a été développé en langage C++. Cet outil permet une analyse automatisée et reproductible des données dynamiques. En parallèle, une étude méthodologique a été menée afin d'évaluer la variabilité inter-utilisateur dans l'analyse des données de vidéo-microscopie. Quarante étudiantes et étudiants ont ainsi participé à une comparaison des méthodes d'analyse, donnant lieu à une publication scientifique.

Les résultats obtenus mettent en évidence une hétérogénéité marquée des réponses aux traitements entre les différentes lignées étudiées. L'approche par vidéo-microscopie a permis d'identifier des différences de comportements cellulaires donnant des pistes, dans certains cas, l'efficacité ou l'inefficacité des traitements, informations qui ne sont pas accessibles par les seules méthodes statiques. Par ailleurs, l'étude comparative des analyses entre utilisateurs révèle une variabilité importante, soulignant la nécessité d'une formation rigoureuse ou de l'utilisation d'outils logiciels dédiés afin d'uniformiser et fiabiliser l'interprétation des données.

En conclusion, cette thèse démontre l'intérêt pour la vidéo-microscopie pour la caractérisation fine des réponses cellulaires aux traitements anticancéreux et met en lumière l'importance de la standardisation des analyses pour une exploitation optimale des données dynamiques. Ces travaux contribuent à une des hypothèse menant vers une meilleure compréhension de l'hétérogé-

néité tumorale et ouvrent des perspectives pour l'amélioration des approches précliniques en oncologie.

Liste des publications

Articles publiés pendant la durée de la thèse (Janvier 2022-Février 2026)

— P. Adam, L. Tardif, F. Fabi, D. Likonza Lokengo, **L.I. Renaud**, S. Parent, M. Cadrin, D. Boerboom et E. Asselin, «Redundant roles of AKT1 and AKT2 in fertility, estrous cyclicity and endometrial gland development», Reproduction, t.165, Mai 2023. doi : 10.1530/REP-22-0353

— **L.I. Renaud**, C. Renaud, S. Delepoulle et E. Asselin, « Toto-Cell : A new software to analyze cellular events during video-microscopy », PLOS ONE,t. 19, no6, p. 1-15, juin 2024. doi :10.1371/journal.pone.0302042.

— **L.I. Renaud**, K. Béland, et E. Asselin, «Video microscopy : an old story with a bright biological future.», BioMed Eng OnLine 24, 44. Avril 2025. doi :10.1186/s12938-025-01375-8.

— P. Adam, F. Fabi, S. Parent, **L.I. Renaud**, M. Cadrin, et E. Asselin, «The roles of AKT isoforms in decidualization and embryo implantation using a Progesterone Receptor-Cre mouse model», Biology of Reproduction, t.112, juin 2025. doi :10.1093/biolre/ioaf062

— O. Le Saux, R. Sabatier, I. Treilleux, **L.I. Renaud**, PE. Brachet, A. Martinez, JS. Frenel, C. Abdeddaim J. Berthet, S. Barrin, A. Colombe-Vermorel, L. Odeyer, A. Lainé, C. Caux, B. Dubois, et I. Ray-Coquard, «Immune landscape and TAM density in endometrial cancer : implications for immune checkpoint inhibitors efficacy», Therapeutic Advances in Medical Oncology, v.17, août 2025. doi :10.1177/17588359251347364.

— **L.I. Renaud**, E. St-Laurent, C. Compare, R.Proulx, J. Nolan, E. Asselin, «Endometrial cancer : from clinical reality to molecular treatment», Discover Oncology, 16(1), Oct. 14 2025, doi :10.1007/s12672-025-03652-3.

Articles en préparation pendant la durée de la thèse (Janvier 2022-Février 2026)

— Aligning the human eye and the algorithm : a multi-user, multi-software study in video microscopy. **Léa-Isabelle Renaud**, Kelliane Béland,

Christophe Renaud, Coralie Compare, Raphaëlle Proulx, Elisabeth Saint-Laurent, Emna Bouaine et Eric Asselin.

— Impact of AKT 3's isoform on miRNA'expression in uterus tissues. **Léa-Isabelle Renaud** and Pascal Adam, Kelliane Béland, Maélla Darina Ankely Kengni, Sophie Parent, Monique Cadrin, Eric Asselin.

— Impact of AKT 3's isoform on decidualization : Study by RNA sequencing. **Léa-Isabelle Renaud** and Pascal Adam, Kelliane Béland, Elisabeth Saint-Laurent, Jasmine Nolan, Maélla Darina Ankely Kengni, Sophie Parent, Monique Cadrin, Eric Asselin.

— Targeting chemoresistance in Endometrial and Ovarian Cancers : Insights from 2D, 3D, and live-cell Imaging Models. **Léa-Isabelle Renaud**, Coralie Compare, Kelliane Béland, Elisabeth Saint Laurent, Raphaëlle Proulx, Christophe Renaud, Monique Cadrin, Eric Asselin.

Table des matières

1 Introduction **28**

1.1 Le cancer : bases génériques. 28
1.2 Résistance du cancer : mécanismes généraux. 29
1.2.1 Mécanismes cellulaires et moléculaires. 29
1.2.2 Influence du micro-environnement tumoral. 30
1.2.3 Résistance croisée et persistance. 30
1.3 Cancers gynécologiques et cancer colorectal : contexte et liens moléculaires. 30
1.3.1 Cancers gynécologiques : Où en-est-t'on ? 31
1.3.1.1 Cancer de l'ovaire. 31
1.3.1.2 Cancer de l'endomètre. 31
1.3.1.3 Cancer du col utérin. 31
1.3.1.4 Cancer du vagin. 32
1.3.2 Cancers coloréctaux. 32
1.3.3 Et le syndrome de Lynch ? 33
1.3.4 Bilan. 33
1.3.5 Résistance des cancers de l'ovaire et de l'endomètre. . . 33
1.3.5.1 Résistance au cisplatine et aux taxanes dans le cancer de l'ovaire. 34
1.3.5.2 Résistance hormonale et au platine dans le cancer de l'endomètre. 34
1.3.5.3 Conclusion. 35
1.4 Agents thérapeutiques utilisés et leur rôle dans la chimio-résistance. 35
1.4.1 Cisplatine. 35
1.4.2 Doxorubicine. 36
1.5 Thérapies ciblées. 37
1.5.1 AZD5363 (*Capivasertib*). 37
1.5.2 KPT-330 (*Selinexor*). 37
1.5.3 TRAIL (*TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand*). . . . 39
1.5.4 Bilan. 40
1.6 La protéine AKT : fonctions, régulation et implication en oncologie gynécologique. 40
1.6.1 Structure et isoformes. 40
1.6.2 Activation de la voie PI3K/AKT/mTOR. 40

1.6.3 Rôle d'AKT dans la physiologie féminine et la reproduction. 41
1.6.4 Implication d'AKT dans les cancers gynécologiques. . . 41
1.6.5 AKT et résistance thérapeutique. 42
1.6.6 Conclusion. 42
1.7 Protéines cibles impliquées dans la chimiorésistance. 42
1.7.1 Par-4 (Prostate Apoptosis Response-4). 42
1.7.1.1 Structure fonctionnelle et régulation. 43
1.7.1.2 Fonctions et interactions moléculaires. 43
1.7.1.3 Par-4 et résistance thérapeutique. 44
1.7.2 CRM1 / XPO1 (*Chromosomal Region Maintenance 1 / Exportin-1*) 45
1.7.2.1 Structure et domaines fonctionnels. 45
1.7.2.2 CRM1 et cancérogenèse. 45
1.7.2.3 Inhibition pharmacologique : du Leptomycin B aux SINEs. 46
1.7.2.4 CRM1, résistance et perspectives thérapeutiques. 46
1.7.2.5 Conclusion. 46
1.8 Transition vers la problématique de recherche. 47

2 Cancer de l'ovaire **48**
2.1 Statistiques, classifications et facteurs de risques. 48
2.1.1 Les sous-types épithéliaux. 49
2.1.1.1 Les carcinomes ovariens séreux de haut grade (HGSOC). 50
2.1.1.2 Les carcinomes ovariens séreux de bas grade (LGSOC). 50
2.1.1.3 Les carcinomes ovariens de types endométrioïdes (ENOC). 51
2.1.1.4 Les carcinomes à cellules claires (OCCC). . . 51
2.1.1.5 Les carcinomes ovariens mucineux (MOC). . . 52
2.1.2 Les sous-types non-épithéliaux 52
2.1.2.1 Les tumeurs des cellules germinales. 52
2.1.2.2 Les tumeurs du cordon sexuel ovarien-stromal (SCST) 54
2.1.2.3 Les sarcomes ovariens 54
2.2 Dépistages, rechutes et résistances aux traitements 55
2.3 La voie PI3K-PTEN-AKT-mTOR dans le cancer de l'ovaire . 64

3 Cancer de l'endomètre **66**
3.1 Introduction. 66
3.1.1 Facteurs de risque et enjeux de prévention. 66
3.1.2 De la classification histologique à la classification moléculaire. 67
3.1.3 Enjeux thérapeutiques et translationnels. 68

3.2 Contexte épidémiologique et clinique. 68
3.2.1 Incidence et mortalité dans le monde. 68
3.2.2 Facteurs de risque. 69
3.2.2.1 Facteurs génétiques. 69
3.2.2.2 Facteurs hormonaux. 69
3.2.2.2.1 Facteurs métaboliques et modifiables : 71
3.3 Physiopathologie et classifications. 71
3.3.1 Bases physiopathologiques. 71
3.3.2 Classification FIGO (stades cliniques). 72
3.3.3 Classification histologique (OMS). 72
3.3.4 Classification moléculaire (TCGA et ProMisE). 73
3.3.5 Altérations moléculaires associées au cancer de l'endomètre. 73
3.3.5.1 PTEN. 73
3.3.5.2 PIK3CA et PI3KR1. 73
3.3.5.3 AKT. 74
3.3.5.4 mTOR. 74
3.3.5.5 KRAS et voie MAPK. 74
3.3.5.6 ARID1A et remodelage de la chromatine. . . 75
3.3.5.7 CTNNB1 et voie WNT/β-caténine. 75
3.3.5.8 TP53. 75
3.3.5.9 Autres altérations émergentes. 75
3.3.5.10 Synthèse et implications cliniques. 76
3.3.6 Interactions entre voies moléculaires dans le cancer de l'endomètre. 76
3.3.6.1 PI3K/AKT/mTOR et MAPK : convergence de la signalisation proliférative. 76
3.3.6.2 PI3K et WNT/β-caténine : coopération tumorale. 77
3.3.6.3 ARID1A et p53 : remodelage de la chromatine et instabilité génomique. 77
3.3.6.4 MMR, POLE et immunogénicité. 77
3.3.6.5 Réseaux d'interaction et résistance thérapeutique. 77
3.3.7 Altérations épigénétiques et microARNs dans le cancer de l'endomètre. 78
3.3.7.1 Méthylation de l'ADN. 78
3.3.7.2 Modifications des histones. 78
3.3.7.3 Rôle des microARN (miARN). 78
3.3.7.4 Long non-coding RNAs (lncRNAs) et autres ARN non codants. 79
3.3.7.5 Implications cliniques et thérapeutiques. . . . 79
3.3.8 Conclusion de la section physiopathologie et classifications. 80
3.4 Diagnostic du cancer de l'endomètre. 80
3.4.1 Présentation clinique. 80

3.4.2 Méthodes de détection et d'évaluation. 81
3.4.2.1 Examen clinique et gynécologique. 81
3.4.2.2 Biopsie endométriale et hystéroscopie. 81
3.4.2.3 Imagerie médicale. 81
3.4.2.4 Marqueurs biologiques et moléculaires. 81
3.4.2.5 Dépistage et populations à risque. 82
3.4.3 Techniques innovantes et perspectives diagnostiques. . 83
3.4.3.1 Biopsie liquide. 83
3.4.3.2 Imagerie fonctionnelle et intelligence artificielle. 83
3.4.3.3 Panels multi-omiques. 83
3.4.4 Limites et défis actuels. 83
3.5 Prise en charge thérapeutique du cancer de l'endomètre. . . . 85
3.5.1 Principes généraux et objectifs thérapeutiques. 85
3.5.2 Traitement local : chirurgie. 85
3.5.2.1 Procédure chirurgicale standard. 85
3.5.2.2 Évaluation ganglionnaire. 85
3.5.2.3 Spécificités histologiques. 85
3.5.2.4 Conservation de la fertilité. 85
3.5.3 Traitement adjuvant : radiothérapie et curiethérapie. . 86
3.5.4 Chimiothérapie. 86
3.5.4.1 Schéma standard. 86
3.5.4.2 Association avec radiothérapie. 86
3.5.5 Hormonothérapie. 86
3.5.5.1 Contexte physiologique et rationnel thérapeutique. 86
3.5.5.2 Indications cliniques de l'hormonothérapie. . . 87
3.5.5.3 Agents hormonaux utilisés. 87
3.5.5.4 Résultats cliniques et fertilité. 87
3.5.5.5 Facteurs prédictifs de réponse. 88
3.5.5.6 Suivi et évaluation. 88
3.5.5.7 Tolérance et effets indésirables. 88
3.5.5.8 Perspectives et recherches en cours. 88
3.5.6 Immunothérapie. 88
3.5.6.1 Tumeurs MSI-H / dMMR. 88
3.5.6.2 Tumeurs MSS / pMMR. 89
3.5.6.3 Immunothérapie en première ligne. 89
3.5.7 Thérapies ciblées. 90
3.5.7.1 HER2. 90
3.5.7.2 Voie PI3K/AKT/mTOR. 91
3.5.7.3 Autres cibles. 91
3.5.8 Maladie récidivante ou métastatique. 91
3.6 Modèles expérimentaux et perspectives de recherche dans le cancer de l'endomètre. 91
3.6.1 Importance des modèles pré-cliniques. 91
3.6.2 Modèles cellulaires *in vitro*. 92

3.6.2.1 Lignées cellulaires classiques. 92
3.6.2.2 Cultures primaires et sphéroïdes. 93
3.6.3 Modèles animaux. 93
3.6.3.1 Xénogreffes et modèles dérivés de patient (PDX). 93
3.6.3.2 Modèles génétiquement modifiés (GEMM). . . 94
3.6.4 Nouveaux modèles expérimentaux. 95
3.6.4.1 Organoïdes et cultures 3D. 95
3.6.4.2 Co-cultures et modèles immunocompétents. . 95
3.6.4.3 Bio-puces et organes-sur-puce. 95
3.6.5 Perspectives de recherche. 95
3.6.5.1 Stratégies thérapeutiques innovantes. 95
3.6.5.2 Médecine de précision. 95
3.6.5.3 Limites et défis. 96
3.7 Perspectives cliniques et futures directions. 96
3.7.1 Intégration de la classification moléculaire dans la pratique. 96
3.7.2 Vers une désescalade thérapeutique ciblée. 96
3.7.3 Nouvelles stratégies combinatoires. 96
3.7.4 Innovations diagnostiques et suivi personnalisé. 97
3.7.5 Défis actuels et priorités de recherche. 97
3.8 La voie PI3K/AKT et ses isoformes dans le cancer de l'endomètre. 98
3.8.1 Activation de la voie. 98
3.8.2 Isoformes d'AKT. 98
3.8.3 Interaction avec les altérations moléculaires du CE . . 99
3.8.4 Conséquences biologiques et cliniques. 99
3.8.5 Perspectives thérapeutiques. 100
3.9 Conclusion générale. 100
3.10 Transition vers la problématique de recherche. 101

4 Vidéo-microscopie **105**
4.1 Introduction. 105
4.2 Contexte historique et fondements théoriques. 106
4.2.1 Les origines de la microscopie. 106
4.2.2 Les jalons de la vidéo-microscopie. 107
4.2.3 L'évolution des technologies d'imagerie cellulaire. . . . 108
4.3 Techniques et principes de la vidéo-microscopie. 108
4.3.1 Principes fondamentaux de l'optique en microscopie. . 108
4.3.2 Composants spécifiques de la vidéo-microscopie. 109
4.3.2.1 Types de caméras. 109
4.3.2.2 Traitement numérique. 109
4.3.3 Modes d'imagerie et d'illumination. 110
4.3.4 Préparation des échantillons vivants. 110
4.3.5 Acquisition et analyse des images. 111
4.3.5.1 Logiciels et algorithmes. 111
4.4 Applications de la vidéo-microscopie en biologie et médecine. . 111
4.4.1 Biologie cellulaire. 111

4.4.2 Biologie du développement. 112
4.4.3 Neurosciences. 112
4.4.4 Microbiologie. 112
4.4.5 Cancérologie et médecine personnalisée. 113
4.5 Limites et défis actuels. 113
4.5.1 Contraintes techniques. 113
4.5.2 Contraintes analytiques. 114
4.5.3 Tentatives de résolution. 114
4.5.3.1 Innovations optiques. 114
4.5.3.2 Développements logiciels 115
4.5.3.3 Automatisation et standardisation. 115

5 Matériels et méthodes 116
5.1 Réactifs. 116
5.2 Techniques utilisées et mises au point. 117
5.2.1 Western Blot. 117
5.2.2 Vidéo-microscopie confocale en conditions de culture. . 117
5.2.3 Test de *tracking-back*. 118
5.2.3.1 Description. 118
5.2.3.2 En pratique. 118
5.2.3.3 En bref. 119
5.2.4 Test de mycoplasmes. 120
5.2.5 Immunohistochimie sur cellules. 120
5.2.6 Test de Clonogénicité. 120
5.2.7 Test 3D post-traitement. 121

6 Article 1 129
6.1 Résumé (traduction de l'abstract). 129
6.2 Contexte et justification. 130
6.3 Développement de *Toto-Cell*. 130
6.4 Méthodologie expérimentale. 130
6.5 Fonctionnalités de **Toto-Cell**. 131
6.6 Résultat obtenus. 131
6.7 Applications et perspectives. 131
6.8 Accès au logiciel. 132

7 Article 2 148
7.1 Résumé (traduction de l'abstract). 149
7.2 Méthodologie expérimentale. 149
7.2.1 **Analyses manuelles et organisation des groupes d'utilisateurs** 149
7.2.2 **Évaluation des logiciels d'analyse automatisée** . 150
7.2.3 **Critères d'évaluation communs** 151

8 Résultats : cancer de l'ovaire **205**
8.1 Introduction. 205
8.2 Résultats. 206

9 Résultats : cancer de l'endomètre **217**
9.1 Introduction. 217
9.2 Résultats. 218
9.2.1 Lignée HEC-1-A. 220
9.2.2 Lignée KLE. 223
9.2.3 Lignée Ishikawa. 224

10 Discussion **238**
10.1 Rappel synthétique des objectifs et principaux résultats. . . . 238
10.2 Interprétation des résultats des lignées ovariennes. 240
10.2.1 OVCAR-4 240
10.2.2 Ovsaho 241
10.2.3 Cov-362 243
10.2.4 Caov-3 244
10.3 Interprétation des résultats sur les lignées endométriales. . . . 246
10.3.1 HEC-1-A 246
10.3.2 KLE 248
10.4 Ishikawa 249
10.5 Synthèse. 250
10.6 Perspectives et directions futures. 251
10.6.1 Intégration de l'intelligence artificielle et du *Deep Learning.* 251
10.6.2 Développement de systèmes automatisés et accessibles. 252
10.6.3 Vers l'expérimentation *in silico* et la modélisation cellulaire. 252
10.6.4 Accessibilité, coûts et démocratisation des technologies. 252
10.7 Limites de l'étude et pistes de recherches futures. 253
10.8 Conclusion synthétique de la discussion. 256

A Annexes **298**

Table des figures

1.1 **Représentation schématique de la voie PI3K/AKT sous l'effet de l'AZD5363** 38
1.2 **Représentation schématique de la structure de Par-4.** . 44

2.1 Organigramme de la classification des cancers de l'ovaire. Les cancers sont répartis en groupe et sous-groupes et explorés dans les sous-parties suivantes. 49
2.2 Représentation schématique de la granulosa dans un follicule de De Graaf 54
2.3 Représentation schématique des mécanismes de résistance aux médicaments 58

3.1 Représentation schématique de la voie de la protéine d'AKT dans le cancer de l'endomètre. 99
3.2 Représentation schématique conclusive du cancer de l'endomètre : de la biologie aux perspectives cliniques. 104

5.1 Deux exemples de photographie des cellules Ovcar-4 avant fixation et après fixation avec la paraformaldéhyde. 123
5.2 Photographie des cellules Ovcar-4 après fixation à la paraformaldéhyde et après révélation d'immunofluorescence. 124
5.3 Représentation schématique des différentes étapes de la technique de *tracking back* 125
5.4 Illustration de la procédure de test de clonogénécité et étapes de détourages des images. 126
5.5 Représentation des différentes étapes d'aggrégation d'un sphéroïde 127
5.6 Représentation des différentes stades d'un sphéroïde 128
5.7 Représentation des différentes étapes d'une croissance de sphéroïde, démontrant les différentes étapes du cycle cellulaire que suivent les cellules 128

8.1 Fermeture du test de cicatrice des OVCAR-4 sous 5 jours . . . 207
8.2 Fermeture du test de cicatrice des OVCAR-4 à 24h, 48h et 120h 207
8.3 Fermeture du test de cicatrice des Caov-3 sous 5 jours 208
8.4 Fermeture du test de cicatrice des Caov-3 à 24h, 48h et 120h . 208
8.5 Fermeture du test de cicatrice des Cov362 sous 5 jours 209
8.6 Fermeture du test de cicatrice des Cov-362 à 24h, 48h et 120h 209

8.7 Surface occupée par les colonies d'Ovcar-4 et d'Ovsaho après 11 jours de pousse 210
8.8 Surface occupée par les colonies de Cov362 et de Caov-3 après 11 jours de pousse 211
8.9 Photographies représentatives de sphéroïdes 3D de la lignées Ovsaho 212
8.10 Photographies représentatives de sphéroïdes 3D de la lignée Cov362 213
8.11 Photographies représentatives de sphéroïdes 3D de la lignées Caov-3 213
8.12 Expression des biomarqueurs dans les lignées ovariennes à l'aide d'anticorps anti-lapin et anti-souris 214
8.13 Photographies représentatives d'une vidéo-microscopie d'OVCAR-4 sans traitement 215
8.14 Photographies représentatives d'une vidéo-microscopie d'Ovsaho sans traitement 215
8.15 Photographies représentatives d'une vidéo-microscopie de Cov362 sans traitement 216
8.16 Photographies représentatives d'une vidéo-microscopie de Caov-3 sans traitement 216

9.1 Expression des bio-marqueurs dans les cellules HEC-1-A à l'aide d'anticorps anti-lapin et anti-souris. 219
9.11 Nombre de cycles mitotiques observés sur la lignée HEC-1-A post-traitement sous 3 jours d'observations 223
9.12 Nombre de fusions observées sur la lignée HEC-1-A post-traitement sous 3 jours d'observations 223
9.2 Expression des bio-marqueurs dans les cellules KLE à l'aide d'anticorps anti-lapin et anti-souris. 226
9.3 Expression des bio-marqueurs dans les cellules Ishikawa à l'aide d'anticorps anti-lapin et anti-souris. 227
9.4 Fermeture du test de cicatrice des HEC-1-A à 24h, 48h et 120h. 228
9.5 Fermeture du test de cicatrice des HEC-1-A sous 5 jours. . . . 228
9.6 Surface occupée par les colonies après 11 jours de pousse (24h de traitement) de la lignée cellulaire HEC-1-A 229
9.7 Photographies de sphéroïdes de la lignée cellulaire HEC-1-A . 229
9.8 Longueur moyenne entre T0 et la première division et longueur moyenne entre deux cycles, observées sur la lignée HEC-1-A post-traitement 230
9.9 Nombre de mitoses totales, non-dichotomiques, normales et anormales observées sur la lignée HEC-1-A post-traitement. . 231
9.10 Nombre de morts total, sans mitose et après mitose, observées sur la lignée HEC-1-A post-traitement 232
9.13 Fermeture du test de cicatrice des KLE à 24h, 48h et 120h. . . 233
9.14 Fermeture du test de cicatrice des KLE sous 5 jours 233

9.15 Surface occupée par les colonies après 11 jours de pousse (24h de traitement) de la lignée cellulaire KLE 234
9.16 Photographies de sphéroïdes de la lignée cellulaire KLE 234
9.17 Western Blot de la lignée KLE, après 24h de traitement en monothérapie 235
9.18 Fermeture du test de cicatrice des Ishikawa à 24h, 48h et 120h. 235
9.19 Fermeture du test de cicatrice des Ishikawa sous 5 jours 236
9.20 Surface occupée par les colonies après 11 jours de pousse (24h de traitement) de la lignée cellulaire Ishikawa 236
9.21 Photographies de sphéroïdes de la lignée cellulaire Ishikawa . . 237
9.22 Western Blot de la lignée Ishikawa, après 24h de traitement en monothérapie 237

Liste des tableaux

2.1 Tableau résumant les différentes sous-types de cancers ovariens épithéliaux et leurs particularités. 53
2.2 Synthèse des différents sous-types de tumeurs du cordon sexuel ovarien-stromal et de leurs particularités 55
2.3 Tableau résumant les différentes sous-types de sarcomes ovariens et leurs particularités 56
2.4 Les différents effets des miRNAs sur les résistances aux drogues dans les cancers de l'ovaire. 59
2.5 Les différents utilisations des miRNAs pour combattre les résistances aux drogues dans les cancers de l'ovaire 63
2.6 Tableau résumant les essais cliniques avec les checkpoints immunitaires actuels dans les cancers de l'ovaire 64
2.7 Tableau résumant les essais cliniques ciblant la voie PI3K/PTEN/AKT/mTOR dans les cancers de l'ovaire 65

3.1 Tableau comparatif des méthodes diagnostiques du cancer de l'endomètre. 82
3.2 Tableau résumant les bio-marqueurs émergents dans le cancer de l'endomètre. 84
3.3 Tableau comparatif des essais cliniques chez les patientes atteintes de CE recevant une immunothérapie 90
3.4 Tableau comparatif des essais cliniques chez les patientes atteintes de CE sans profil moléculaire spécifique 92
3.5 Tableau comparatif des essais cliniques chez les patientes atteintes de CE avec récepteurs aux facteurs de croissance . . . 93
3.6 Tableau comparatif des essais cliniques chez les patientes atteintes de CE ciblant les voies de signalisation 94
3.7 Tableau de comparaison des modèles expérimentaux dans le cancer de l'endomètre 103

Glossaire

Biologie du cancer et concepts fondamentaux

Apoptose et régulation

APAF-1 : Facteur apoptotique activant les caspases, essentiel à l'assemblage de l'apoptosome et à l'activation de la caspase-9.

BAK1 : Protéine pro-apoptotique de la famille BCL-2, favorisant la perméabilisation mitochondriale.

BAG3/miR-29b/MCL-1 : Axe de régulation dans lequel BAG3 stabilise MCL-1 et inhibe l'apoptose ; miR-29b peut cibler cette voie.

BCL-2 : Protéine anti-apoptotique empêchant la libération du cytochrome c. Sa surexpression inhibe l'apoptose mitochondriale.

BCL10 : Protéine impliquée dans l'activation de NF-κB et la survie cellulaire.

Caspase-3 / Caspase-7 / Caspase-8 : Protéases clés de l'exécution apoptotique.

DISC : Complexe DISC induit l'activation de la caspase-8 dans la voie extrinsèque de l'apoptose.

FLIP : Protéine inhibant la caspase-8 en bloquant le DISC.

MCL-1 : Protéine anti-apoptotique de la famille BCL-2, régulatrice majeure de la chimiorésistance.

PDCD4/caspase-3 et caspase-8 : Interaction favorisant l'activation des caspases et l'apoptose.

Surexpression de FLIP : Inhibe l'activation du DISC et bloque l'apoptose.

TRAIL : Ligand inducteur d'apoptose via les récepteurs TRAIL-R1/R2. La résistance au TRAIL résulte de la dérégulation du DISC, de l'augmentation de FLIP, BCL-2, MCL-1 ou de l'activation de voies de survie.

Par-4 : Prostate apoptosis response-4, protéine suppresseur de tumeur impliquée dans l'induction de l'apoptose et la sensibilisation des cellules cancéreuses aux traitements anticancéreux.

CRM1 : Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1/XPO1), protéine d'export nucléaire responsable du transport de nombreuses protéines du noyau vers le cytoplasme, souvent surexprimée dans les cancers.

Concepts évolutifs et hétérogénéité

Évolution clonale : Processus dynamique dans lequel des sous-clones tumoraux émergent sous pression de sélection.

Principe de la sélection clonale : Modèle selon lequel les cellules mutées ayant un avantage sélectif prolifèrent préférentiellement.

Métabolisme tumoral

Effet Warburg : Métabolisme glycolytique accru même en présence d'oxygène.

HIF-1 : Facteur de transcription induit par l'hypoxie, régulateur du métabolisme tumoral.

Voies de signalisation oncogéniques

CIC/ETV4 : Axe de transcription impliqué dans la progression tumorale.

HIPK2/MDR1/P-gp : Régulation de la résistance par contrôle transcriptionnel de MDR1.

IL-6R/STAT3/miR-204/IL-6R : Boucle d'amplification favorisant l'inflammation et la survie cellulaire.

NFIX et HNRNPC : Facteurs influençant l'épissage et la régulation post-transcriptionnelle.

Notch 3 / NOTCH1 : Récepteurs importants dans la différenciation cellulaire et l'oncogenèse.

SFRP1/Wnt-5a/β-caténine : Régulation de la voie Wnt dans la tumorigenèse.

WNT2B : Ligand Wnt impliqué dans la croissance tumorale.

MST1, SAV1/YAP, TAZ : Composants de la voie Hippo régulant la prolifération.

TRIM27 : Régulateur post-traductionnel favorisant la tumorigenèse.

Génétique tumorale

Amplification d'ERBB2 : Augmentation du nombre de copies du gène HER2.

Mutation HRD : Altération de la recombinaison homologue (*Homologous Recombination Deficiency*).

Mutations CTNNB1 : Affectent la β-caténine et activent la voie Wnt.

Mutations TP53 : Altèrent la stabilité génomique.

PPP2R1A : Affectent la régulation de PP2A.

Modèles précliniques et expérimentation

Lignées et modèles animaux

Nude, NOD/SCID : Souris immunodéprimées utilisées pour la xénogreffe tumorale.

PDX (Patient-Derived Xenograft) : Modèles dérivés directement des tumeurs de patients.

Modèles génétiquement modifiés : Souris ou organismes porteurs de modifications ciblées pour mimer des altérations spécifiques.

Cellules et organes

Cellules souches : Cellules capables d'auto-renouvellement et de différenciation.

Cellules de la granulosa : Cellules ovarienne productrice d'hormones.

Transporteurs et résistance médicamenteuse

ABCG2 : Transporteur d'efflux impliqué dans la chimiorésistance.

Cav1/p-gp/macrophage M2 : Interaction favorisant un microenvironnement tumoral tolérant.

CD97 sur JAK2/STAT3 : Activation favorisant l'inflammation et la résistance.

HIPK2/MDR1/P-gp : Boucle de régulation des pompes d'efflux.

Transporteurs ABC : Famille de protéines d'efflux impliquées dans la résistance.

Thérapies – principes et mécanismes

Effets indésirables et risques associés

Troubles thrombo-emboliques : Événements pathologiques liés à la formation ou à la migration de caillots sanguins, pouvant être favorisés par certaines hormonothérapies ou situations oncologiques.

Chimiothérapies

Carboplatine : Agent alkylant induisant des adduits ADN.

Docétaxel : Taxane stabilisant les microtubules.

Paclitaxel : Taxane perturbant la dynamique des microtubules.

Hormonothérapie

Dispositif intra-utérin au lévonorgestrel (LNG-IUD) : Système intra-utérin libérant localement du lévonorgestrel, utilisé pour les hyperplasies et certains cancers hormono-sensibles.
Medroxy-progestérone acétate : Progestatif utilisé en hormonothérapie.
Megestrol acétate : Progestatif utilisé pour les cancers hormono-sensibles.

Radiothérapie

Curiethérapie vaginale : Irradiation locale par source radioactive interne.

Thérapies ciblées

Thérapie ciblée : Traitements dirigés contre des mutations ou voies précises.

Anatomopathologie, classifications et marqueurs cliniques

Classifications et systèmes

FIGO : Classification internationale des cancers gynécologiques.
OMS / WHO : Organisation Mondiale de la Santé.
ProMisE : Méthode de classification moléculaire des cancers de l'endomètre.
TCGA : Classification moléculaire basée sur le génome.

Biomarqueurs

CA125 : Marqueur tumoral utilisé pour le suivi des cancers ovariens.

Réponse thérapeutique

CBR : Clinical Benefit Rate.
CR : Réponse complète.
ORR : Taux de réponse objective.
OS : Survie globale.
PFS : Survie sans progression.
PR : Réponse partielle.
SD : Maladie stable.

Chirurgie oncologique

Laparotomie : Ouverture chirurgicale de la cavité abdominale.
Lymphadénectomie : Retrait des ganglions lymphatiques.
Marges positives : Présence de cellules tumorales sur le bord du prélèvement.
Omentectomie : Retrait de l'omentum.
Salpingo-ovariectomie bilatérale : Retrait des deux ovaires et trompes.

Syndromes associés

Syndrome de Gorlin : Prédisposition génétique aux carcinomes basocellulaires.
Syndrome de Meigs : Triade fibrome ovarien + ascite + pleurésie.
Syndrome de Lynch : Prédisposition génétique héréditaire liée à des mutations des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR), augmentant notamment le risque de cancers colorectaux, de l'endomètre et de l'ovaire.

Molécules, protéines et facteurs spécifiques

AGO2, AXL, PRKRA/PACT, SKP2, BCL9 : Régulateurs de signalisation post-transcriptionnelle.
CIC : Facteur de transcription impliqué dans la régulation d'ETV4.
E-cadhérine : Molécule d'adhésion cellulaire.
GOLPH3 et WLS : Protéines impliquées dans le trafic vésiculaire.
IGF2BP1 : Protéine liant les ARN et favorisant l'oncogenèse.
N-cadhérine : Molécule d'adhésion associée à l'EMT.
XIAP, BIRC3, BCL2, BCL2L2, MCL1 : Inhibiteurs majeurs de l'apoptose.
HDAC1 : Histone désacétylase régulant la transcription.
Dicer1 : Enzyme clé de la biogenèse des miRNAs.

ARN non codants

miR / microARNs : Régulateurs post-transcriptionnels jouant un rôle central dans la résistance aux traitements.
Implication des microARNs dans la résistance : Modulation des voies apoptotiques, EMT, transporteurs ABC.
lncRNAs : ARN longs non codants impliqués dans la régulation épigénétique.

Autres concepts biologiques

Cycle de la femme : Ensemble des variations physiologiques hormonales cycliques.

Endométriose : Présence ectopique de tissu endométrial.

Transporteurs ABC : Pompes d'efflux responsables de la chimiorésistance.

Chapitre 1

Introduction

Le terme « patiente » est utilisé dans ce manuscrit pour désigner les personnes présentant un appareil reproducteur féminin, indépendamment de l'identité de genre.

1.1 Le cancer : bases génériques.

Le cancer est une maladie multiforme caractérisée par une prolifération cellulaire incontrôlée, une évasion des mécanismes de mort cellulaire et une capacité d'invasion et de métastases [1, 2]. Il résulte de l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques touchant les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, et la signalisation de survie. Selon Hanahan et Weinberg, le développement tumoral repose sur plusieurs « *hallmarks of cancer* » [3] :

— l'échappement à la mort cellulaire programmée,
— la stimulation de la prolifération autonome,
— l'insensibilité aux signaux inhibiteurs,
— l'immortalité réplicative,
— l'angiogenèse,
— l'invasion et la métastase,
— la reprogrammation métabolique,
— et l'évitement du système immunitaire.

Ces capacités résultent d'une dérégulation profonde des voies de signalisation intracellulaires telles que RAS/MAPK, PI3K/AKT/mTOR, WNT/β-caténine et p53, qui contrôlent la croissance, la différenciation et la survie cellulaire [4]. Le micro-environnement tumoral joue également un rôle majeur, fournissant des signaux inflammatoires et des facteurs de croissance (VEGF, TGF-β, IL-6) qui soutiennent la prolifération et la résistance thérapeutique [5].

Sur le plan thérapeutique, la compréhension de ces processus a conduit au développement de thérapies ciblées, visant des enzymes ou des récepteurs spécifiques (tyrosine kinases, PARP, PI3K, AKT). Toutefois, la plasticité tumorale et les mécanismes de résistance adaptative limitent encore leur

efficacité à long terme [6]. Les cellules cancéreuses augmentent l'expression de pompes d'efflux telles que P-glycoprotéine (ABCB1/MDR1), MRP1, ou BCRP, qui réduisent la concentration intracellulaire des agents cytotoxiques [6, 7]. Ces transporteurs sont particulièrement impliqués dans la résistance aux anthracyclines et aux taxanes [7].

1.2 Résistance du cancer : mécanismes généraux.

La résistance aux traitements anticancéreux constitue l'un des principaux obstacles à la réussite thérapeutique. Elle peut être intrinsèque, lorsque la tumeur est initialement non réceptive à un traitement, ou acquise, apparaissant après une exposition prolongée à la chimiothérapie [6, 7]. Ce phénomène résulte d'une combinaison complexe de mécanismes moléculaires, cellulaires et micro-environnementaux, qui permettent aux cellules tumorales d'échapper à la cytotoxicité tout en conservant leur potentiel prolifératif.

1.2.1 Mécanismes cellulaires et moléculaires.

Les mécanismes de résistance peuvent être classés en plusieurs catégories interdépendantes :

- Altération de l'absorption et de l'efflux du médicament. Les cellules cancéreuses augmentent l'expression de pompes d'efflux telles que P-glycoprotéine (ABCB1/MDR1), MRP1, ou BCRP, qui réduisent la concentration intracellulaire des agents cytotoxiques [6, 7]. Ces transporteurs sont particulièrement impliqués dans la résistance aux anthracyclines et aux taxanes.
- Réparation accrue des dommages à l'ADN. Les agents alkylants et les dérivés du platine provoquent des liaisons covalentes à l'ADN, activant les voies de recombinaison homologue (HR) et de réparation par excision de nucléotides (NER). La sur-expression de gènes comme ERCC1, BRCA1/2 et RAD51 favorise la réparation rapide des adduits de cisplatine et limite l'apoptose [7]. L'inactivation du système MMR (*Mismatch Repair*), via la perte de MLH1 ou MSH2, réduit également la reconnaissance des dommages et favorise la tolérance au cisplatine [6, 8].
- Altérations de la mort cellulaire programmée. De nombreuses cellules tumorales acquièrent des mutations de TP53, BAX, ou sur-expriment des protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2, BCL-XL et XIAP, bloquant la cascade caspasique [6]. Parallèlement, la dérégulation de la voie PI3K/AKT/mTOR renforce les signaux de survie et interfère avec la réponse apoptotique.
- Modification du métabolisme cellulaire et du stress oxydatif. Les cellules résistantes adaptent leur métabolisme énergétique pour tolérer le stress

induit par les drogues. L'activation d'AMPK, la réduction de la production de ROS et l'induction d'une autophagie protectrice permettent de maintenir la viabilité malgré les dommages oxydatifs [9, 10].

— Altérations du trafic nucléaire. L'exportation cytoplasmique excessive de protéines suppresseuses de tumeur (p53, FOXO1, Par-4) par la CRM1 empêche leur action pro-apoptotique nucléaire [11]. Ce mécanisme est devenu un marqueur fonctionnel de résistance dans plusieurs cancers, dont ceux de l'ovaire et de l'endomètre.

1.2.2 Influence du micro-environnement tumoral.

Le micro-environnement tumoral joue également un rôle déterminant dans la résistance. Les fibroblastes associés au cancer (CAF), les macrophages TAMs, et les cellules endothéliales sécrètent des cytokines (IL-6, TNF-α, TGF-β) activant les voies de survie STAT3, NF-κB et AKT. Ces signaux paracrines renforcent la plasticité des cellules tumorales et favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), souvent associée à une résistance accrue aux agents cytotoxiques et au TRAIL [5, 12]. Les cellules souches cancéreuses (CSC), dotées de capacités d'auto-renouvellement, sont particulièrement résistantes, grâce à une activité élevée des transporteurs ABC et à une activation constitutive d'AKT et de NF-κB. Elles contribuent aux rechutes tumorales et à la maladie résiduelle minimale après chimiothérapie [3, 6].

1.2.3 Résistance croisée et persistance.

Ces mécanismes coopèrent pour générer une résistance croisée : une cellule devenue résistante à un médicament acquiert souvent une tolérance vis-à-vis d'autres drogues agissant sur des voies distinctes. Ainsi, une activation de PI3K/AKT ou une sur-expression de CRM1 peut conférer une résistance simultanée au cisplatine, à la doxorubicine, et au TRAIL [11, 13]. De plus, certaines cellules adoptent un état de dormance ou de persistance, caractérisé par une prolifération ralentie, une faible consommation métabolique et une insensibilité transitoire aux agents cytotoxiques [11, 13]. Ces cellules dites « *persisters* » constituent une réserve clonale capable de relancer la tumeur après traitement [11, 13].

1.3 Cancers gynécologiques et cancer colorectal : contexte et liens moléculaires.

L'étude des parallèles moléculaires entre le cancer de l'endomètre et le cancer colorectal, notamment en lien avec le déficit de réparation des mésappariements de l'ADN, permet de mieux comprendre leurs mécanismes communs et d'envisager des stratégies thérapeutiques transversales.

1.3.1 Cancers gynécologiques : Où en-est-t'on ?

Les cancers gynécologiques regroupent principalement les cancers de l'ovaire, de l'endomètre, du col utérin, et du vagin. Ensemble, ils constituent un groupe hétérogène de tumeurs issues des organes de l'appareil reproducteur féminin, représentant un fardeau majeur de santé publique à l'échelle mondiale [14-16]. Malgré des progrès significatifs en dépistage, en chirurgie et en chimiothérapie, leur mortalité demeure élevée, notamment en raison des résistances acquises aux traitements cytotoxiques classiques.

1.3.1.1 Cancer de l'ovaire.

Le cancer épithélial de l'ovaire (EOC) est souvent diagnostiqué à un stade avancé, du fait de l'absence de symptômes spécifiques et de marqueurs de dépistage fiables. Il constitue la première cause de mortalité par cancer gynécologique [15]. Le traitement standard repose sur la chirurgie cyto-réductrice et la chimiothérapie à base de platine et de taxanes. Bien que la réponse initiale soit élevée, plus de 70% des patientes rechutent dans les deux ans, conséquence d'une résistance au platine [16]. Sur le plan moléculaire, l'EOC est caractérisé par une forte hétérogénéité génétique : mutations de TP53, BRCA1/2, dérégulation des voies PI3K/AKT/mTOR et anomalies de la recombinaison homologue [17]. La sur-expression de CRM1 et l'exclusion nucléaire de Par-4 observées dans les lignées ovariennes résistantes soutiennent l'hypothèse d'une dérégulation du trafic nucléaire dans la chimio-résistance [11, 13].

1.3.1.2 Cancer de l'endomètre.

Le cancer de l'endomètre (CE) est le plus fréquent des cancers gynécologiques dans les pays industrialisés [18]. La majorité des patientes sont diagnostiquées à un stade précoce, conférant un bon pronostic. En revanche, les formes avancées ou récidivantes présentent une résistance marquée à la chimiothérapie, notamment au cisplatine et au paclitaxel. Le CE est classé selon le consortium TCGA en quatre sous-types moléculaires : POLE ultra-muté, MSI-H (instabilité micro-satellitaire), *Copy-number low* (CNL) et *Copy-number high* (CNH) [18]. Les altérations de la voie PI3K/AKT et la perte de PTEN sont fréquentes et participent à la survie cellulaire, à la progression tumorale et à la résistance [18]. Les cancers endométriaux MSI-H ou associés au syndrome de Lynch présentent une immunogénicité accrue et une meilleure réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire [19, 20].

1.3.1.3 Cancer du col utérin.

Le cancer du col de l'utérus est majoritairement causé par une infection persistante au virus du papillome humain (HPV), notamment les souches oncogènes HPV-16 et HPV-18 [11, 21]. Les onco-protéines virales E6 et E7 inactivent respectivement p53 et pRb, favorisant l'immortalisation cellulaire et

la transformation maligne. Le traitement repose sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie à base de platine. Cependant, les formes métastatiques ou récidivantes présentent un pronostic défavorable, souvent lié à l'activation constitutive de la voie AKT et à une sur-expression de CRM1, favorisant l'exportation cytoplasmique des suppresseurs tumoraux [11].

1.3.1.4 Cancer du vagin.

Le cancer du vagin est une tumeur rare, représentant moins de 2% des cancers gynécologiques [22]. Il survient le plus souvent chez des patientes âgées, mais peut également apparaître chez des femmes plus jeunes exposées à des facteurs de risque similaires à ceux du cancer du col, notamment une infection persistante au HPV. Le carcinome épidermoïde est le sous-type le plus fréquent, suivi de l'adénocarcinome à cellules claires, parfois associé à une exposition *in utero* au diéthylstilbestrol (DES). Les mécanismes moléculaires du cancer du vagin restent peu documentés, mais plusieurs études ont mis en évidence une activation de la voie PI3K/AKT, une sur-expression de CRM1, et une perte de l'expression nucléaire de Par-4, analogues à celles observées dans les cancers du col et de l'endomètre [11, 13]. Cette convergence suggère que le cancer vaginal partage les mêmes voies de survie et de résistance, ce qui en fait un modèle complémentaire pour l'étude des altérations du transport nucléaire et de la signalisation apoptotique. Le traitement repose sur la chirurgie et la radiothérapie, mais les formes avancées ou récidivantes restent peu sensibles à la chimiothérapie conventionnelle, renforçant l'intérêt de thérapies ciblées dirigées contre AKT ou CRM1.

1.3.2 Cancers coloréctaux.

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer le plus fréquent et la seconde cause de décès par cancer dans le monde [14]. Il se développe selon la séquence adénome–carcinome classique, caractérisée par une accumulation progressive d'anomalies génétiques, ou par des mécanismes d'instabilité génétique plus spécifiques, tels que l'instabilité micro-satellitaire (MSI).

Trois grands mécanismes d'instabilité sont distingués [23] :

— Instabilité chromosomique (CIN), avec gains et pertes de régions chromosomiques ;
— Instabilité micro-satellitaire (MSI), résultant d'un déficit des gènes de réparation MMR ;
— Phénotype méthylateur (CIMP), lié à une hyper-méthylation aberrante des promoteurs de gènes suppresseurs.

Les CCR MSI-H (∼15% des cas) sont fortement mutés, immunogènes et souvent associés à une étiologie héréditaire telle que le syndrome de Lynch [8]. Les mutations récurrentes affectent APC, KRAS, PIK3CA et TP53, perturbant les voies WNT, RAS/RAF/MEK et PI3K/AKT/mTOR [24]. Ces altérations conduisent à une activation accrue d'AKT, une résistance au cisplatine et

une dérégulation du transport nucléaire CRM1-dépendant, analogues à celles observées dans les cancers gynécologiques [11, 13].

1.3.3 Et le syndrome de Lynch ?

Le syndrome de Lynch, ou cancer colorectal héréditaire non-polyposique (HNPCC), est la forme la plus fréquente de prédisposition héréditaire au cancer colorectal [25]. Il est causé par des mutations germinales dans les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) ou dans EPCAM, entraînant une instabilité micro-satellitaire élevée (MSI-H) [25]. Les individus porteurs présentent un risque accru de développer un cancer colorectal précoce, mais également des cancers extra-coloniques, notamment les cancers de l'endomètre (40–60% des cas), de l'ovaire, et plus rarement du vagin, illustrant la dimension gynécologique du syndrome [19, 20].

Chez les femmes, le cancer de l'endomètre MSI-H constitue souvent le premier signal clinique du syndrome, précédant la survenue d'un cancer colorectal [19]. Les tumeurs associées au syndrome de Lynch présentent une perte d'expression d'un ou plusieurs gènes MMR, détectable par immuno-histochimie, et une accumulation de mutations *frameshift* dans les micro-satellites. Cette instabilité favorise la formation de néo-antigènes, rendant ces tumeurs hautement immunogènes, mais aussi la dérégulation de voies de survie, telles que PI3K/AKT et CRM1, et la perturbation du transport nucléaire de Par-4 [11, 13]. Ainsi, le syndrome de Lynch constitue un modèle intégratif reliant la carcinogenèse colorectale et gynécologique, par des mécanismes communs d'instabilité génétique, de dérégulation apoptotique et de résistance thérapeutique.

1.3.4 Bilan.

Les cancers gynécologiques (ovaire, endomètre, col, vagin) et le cancer colorectal partagent des mécanismes moléculaires convergents, centrés sur la dérégulation des voies PI3K/AKT/mTOR, la perte de fonction des systèmes MMR, et l'hyper-activité de CRM1, entraînant une délocalisation cytoplasmique de protéines clés comme Par-4. Le syndrome de Lynch illustre parfaitement ce continuum, reliant les cancers féminins et colorectaux par un socle commun d'instabilité micro-satellitaire et de résistance apoptotique. L'étude parallèle de ces entités constitue ainsi un cadre pertinent pour le développement de thérapies combinatoires ciblant la signalisation AKT/CRM1/Par-4, dans le but de restaurer la sensibilité aux agents cytotoxiques classiques et d'améliorer le pronostic des patientes.

1.3.5 Résistance des cancers de l'ovaire et de l'endomètre.

Les cancers gynécologiques, notamment les cancers de l'ovaire et de l'endomètre, représentent des modèles particulièrement pertinents pour l'étude

de la résistance acquise aux traitements. Celle-ci est associée à l'émergence d'altérations moléculaires récurrentes affectant plusieurs voies clés, telles que la signalisation PI3K/AKT, le transport nucléaire via CRM1, ainsi que les voies apoptotiques dépendantes de Par-4 et TRAIL [26-28].

1.3.5.1 Résistance au cisplatine et aux taxanes dans le cancer de l'ovaire.

Le cisplatine, pilier du traitement du cancer de l'ovaire, agit en provoquant des adduits à l'ADN. La résistance au platine repose sur plusieurs niveaux [29] :

- Réduction de l'accumulation intracellulaire du médicament, via une altération des transporteurs du cuivre (CTR1) et une augmentation des pompes d'efflux (ATP7A/B) [29] ;
- Réparation accrue des lésions par activation de la recombinaison homologue et de la NER (ERCC1, BRCA1/2) [26, 27] ;
- Inactivation de p53 et sur-expression de BCL-2 et XIAP, empêchant la mort cellulaire [26, 27] ;
- Activation constitutive d'AKT et export CRM1-dépendant de protéines pro-apoptotiques, dont Par-4 et FOXO1, limitant la translocation nucléaire nécessaire à l'apoptose [26, 27].

Les cellules d'ascite des patientes atteintes de cancer ovarien avancé montrent une activation persistante de PI3K/AKT et une résistance marquée au TRAIL, phénomène réversible par l'inhibition d'AKT ou de CRM1 [11, 30]. L'association d'inhibiteurs d'AKT (AZD5363) et d'inhibiteurs de CRM1 (Selinexor) a démontré une synergie apoptotique et une restauration de la sensibilité au platine et au TRAIL *in vitro* [28, 31].

1.3.5.2 Résistance hormonale et au platine dans le cancer de l'endomètre.

Dans le cancer de l'endomètre, les résistances thérapeutiques sont influencées à la fois par des facteurs hormonaux et par des altérations des voies de survie. Les tumeurs hormono-dépendantes (sous-type CNL) peuvent devenir résistantes au traitement progestatif par une perte de l'expression des récepteurs de la progestérone (PR) ou une activation compensatoire d'AKT et de mTOR [32]. Les formes séreuses de haut grade (CNH), quant à elles, présentent des mutations de TP53 et une sur-expression de CRM1, associées à une perte nucléaire de Par-4 et à une résistance accrue au cisplatine et au paclitaxel [11, 26]. Les cancers endométriaux MSI-H (souvent liés au syndrome de Lynch) se distinguent par une instabilité génomique importante, mais paradoxalement, ils peuvent montrer une résistance aux agents cytotoxiques en raison d'une activation immuno-inflammatoire de la voie NF-κB et d'un métabolisme oxydatif adapté [8, 19]. Des travaux récents suggèrent que la restauration de la localisation nucléaire de Par-4, par inhibition simultanée d'AKT et de CRM1,

pourrait réactiver la voie apoptotique et re-sensibiliser ces tumeurs aux agents conventionnels [11, 26, 33]. L'étude de ces interactions constitue ainsi un levier prometteur pour contourner la résistance multi-factorielle propre aux cancers de l'ovaire et de l'endomètre.

1.3.5.3 Conclusion.

La résistance au cancer est un phénomène multi-dimensionnel, associant des altérations génétiques, épigénétiques et fonctionnelles, qui convergent vers la désactivation des voies apoptotiques et la promotion de la survie cellulaire. Dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre, la synergie entre la voie AKT, l'export CRM1-dépendant et la perte nucléaire de Par-4, constitue une signature caractéristique de la résistance. Ces constats ouvrent la voie à des approches combinatoires ciblant simultanément ces axes — en particulier par l'usage d'inhibiteurs d'AKT (AZD5363), de CRM1 (Selinexor) et de ligands pro-apoptotiques (TRAIL) — dans l'objectif de restaurer la sensibilité thérapeutique et d'améliorer la survie des patientes.

1.4 Agents thérapeutiques utilisés et leur rôle dans la chimio-résistance.

1.4.1 Cisplatine.

Le cisplatine est l'une des premières molécules de chimiothérapie à avoir révolutionné le traitement des cancers solides. Synthétisé initialement par Michele Peyrone en 1844, son activité antiproliférative a été mise en évidence par Barnett Rosenberg en 1965, lorsqu'il observa l'inhibition de la division cellulaire d'*Escherichia coli* exposée à un complexe de platine [34]. Ces observations ont ensuite conduit à l'évaluation du cisplatine sur des cellules eucaryotes, puis dans des modèles précliniques et cliniques, confirmant son efficacité anticancéreuse. Depuis, le cisplatine et ses dérivés, tels que le carboplatine et l'oxaliplatine, sont largement utilisés dans le traitement de cancers du testicule, de l'ovaire, du poumon et du col de l'utérus[35, 36]. Le mode d'action du cisplatine repose principalement sur sa capacité à se lier de manière covalente à l'ADN, formant des adduits intra- et inter-brins au niveau des bases puriques. Ces adduits interfèrent avec la réplication et la transcription, activant ainsi des cascades apoptotiques dépendantes de p53 et de la signalisation calcique [34]. Une modulation du stress oxydatif et de la réponse immunitaire a également été observée [36]. Une fois dans la circulation sanguine, la molécule interagit avec des groupements sulfhydryles et des acides nucléiques, tandis que dans la cellule, elle forme environ 90% d'adduits avec les bases puriques de l'ADN.

Cependant, un des principaux défis associés au cisplatine est le développement de résistances, tant intrinsèques qu'acquises. Ces résistances peuvent découler d'une réparation accrue des dommages à l'ADN, notamment par la

voie de la recombinaison homologue. Des mutations sur les gènes BRCA1 et BRCA2 favorisent ce mécanisme, rendant la molécule moins efficace [34, 35]. De même, le complexe de MMR (*Mismatch Repair*), bien qu'incapable de réparer directement les adduits du cisplatine, joue un rôle crucial dans leur reconnaissance. Une régulation négative des MMR sensibilise les cellules colorectales au platine et aux inhibiteurs de PARP, tandis qu'une hyper-méthylation de MLH1 entraîne une résistance accrue, notamment dans les cancers colorectaux et endométriaux [36]. Le gène TP53, régulateur majeur du cycle cellulaire, est un autre acteur clé : sa mutation confère un avantage sélectif aux cellules cancéreuses exposées au cisplatine [36]. D'autres mécanismes, comme une réduction de l'accumulation intracellulaire du médicament, une activation des métallothionéines, ou une sur-expression des transporteurs du cuivre, participent également à cette résistance. Enfin, les effets secondaires majeurs du cisplatine, tels que la néphrotoxicité, la neurotoxicité, et la cardiotoxicité, limitent son utilisation prolongée [34]. Ces limitations justifient la recherche de combinaisons thérapeutiques nouvelles capables de restaurer la sensibilité tumorale, tout en diminuant la toxicité systémique.

1.4.2 Doxorubicine.

La doxorubicine, ou *Adriamycine*, est un anthracycline isolé de *Streptomyces peucetius* dans les années 1960. Son efficacité contre de nombreux cancers (sein, ovaire, endomètre, lymphomes) repose sur un mécanisme d'action complexe impliquant l'intercalation dans l'ADN, l'inhibition de la topoisomérase II et la génération de radicaux libres [37-39]. Ces effets aboutissent à un blocage de la réplication, de la transcription et, *in fine*, à l'apoptose.

Une fois à l'intérieur de la cellule, la doxorubicine diffuse passivement et s'associe au protéasome cytoplasmique avant de migrer vers le noyau, où elle se dissocie et se lie préférentiellement à l'ADN [39]. Sa conversion métabolique en semi-quinone, un intermédiaire instable, provoque la libération massive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables d'un stress oxydatif intense et d'une mort cellulaire programmée.

Malgré son efficacité, la doxorubicine souffre d'une toxicité cumulative élevée, en particulier cardio-toxique, ce qui restreint son utilisation chez les patientes âgées ou poly-médicamentées [37, 38]. Classée en catégorie D par la FDA pour ses effets tératogènes, elle présente également une gonado-toxicité et une néphro-toxicité marquées.

Les mécanismes de résistance à la doxorubicine sont multiples. Le plus fréquent concerne une altération de la topoisomérase II : la molécule se lie normalement à son isoforme α, indispensable à son effet apoptotique. Sa réduction oblige la doxorubicine à interagir avec la forme β, beaucoup moins sensible [39]. D'autres résistances proviennent d'une diminution de l'accumulation intracellulaire du médicament, d'une inhibition de l'autophagie, ou d'une mutation de p53, modulant la réponse apoptotique. De nouveaux dérivés hybrides de doxorubicine sont actuellement développés pour diminuer

la cardio-toxicité et contourner la résistance [37].

1.5 Thérapies ciblées.

1.5.1 AZD5363 (*Capivasertib*).

L'AZD5363, également connu sous le nom de *Capivasertib*, est un inhibiteur pan-AKT à potentiel thérapeutique élevé, actuellement évalué dans plusieurs essais cliniques de phases I à III [32, 40, 41]. AKT, une sérine/thréonine kinase, agit comme un pivot entre les voies PI3K et mTOR, régulant la croissance, le métabolisme et la survie cellulaire. Ces voies sont fréquemment dérégulées dans les cancers gynécologiques, souvent via la sur-expression de PI3KCA ou la perte du suppresseur tumoral PTEN [32].

L'AZD5363 agit en inhibant la phosphorylation d'AKT et de ses cibles en aval, comme GSK3β et PRAS40, ce qui bloque la survie cellulaire et la prolifération [40, 42]. Il s'agit d'un inhibiteur ATP-compétitif, capable de cibler les trois isoformes d'AKT, contrairement à d'autres inhibiteurs plus sélectifs. Son activité se distingue également par une augmentation paradoxale de la phosphorylation sur la sérine 473, empêchant la phosphorylation des substrats situés plus bas dans la cascade (voir figure 1.1). Les essais cliniques ont démontré que les traitements intermittents sont mieux tolérés que les traitements continus [41, 43]. Les effets secondaires les plus fréquents incluent diarrhées, hyperglycémie et nausées, généralement contrôlables par une prise en charge prophylactique [33, 40, 41, 43]. Dans les cancers ovariens et endométriaux, la surexpression de p-AKT est associée à un mauvais pronostic. Les lignées chimio-résistantes présentent souvent une activation constitutive d'AKT, ce qui rend son inhibition particulièrement intéressante [40, 44]. L'AZD5363 a montré une capacité à re-sensibiliser ces lignées au cisplatine et au paclitaxel, bien que son efficacité en monothérapie reste limitée. Des combinaisons avec des inhibiteurs de PARP, comme l'*Olaparib*, ont donné des résultats prometteurs sans toxicité accrue [40, 45]. Ainsi, le *Capivasertib* apparaît comme un candidat de choix pour retarder ou surmonter la résistance à la chimiothérapie dans les cancers gynécologiques [43].

1.5.2 KPT-330 (*Selinexor*).

Le *Selinexor* (KPT-330) est un inhibiteur sélectif de l'export nucléaire (SINE) ciblant la protéine CRM1/XPO1, responsable du transport cytoplasmique de nombreuses protéines suppressives de tumeurs [46, 47]. L'inhibition de cette exportine rétablit la localisation nucléaire de protéines clés telles que p53, BRCA1, et le récepteur à l'œstradiol, favorisant ainsi la réactivation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses [11, 48].

Le mécanisme d'action du *Selinexor* repose sur sa liaison réversible à la cystéine 528 de CRM1, empêchant la fixation du signal d'export nucléaire (NES) [27, 49]. Ce blocage conduit à l'accumulation intranucléaire des protéines

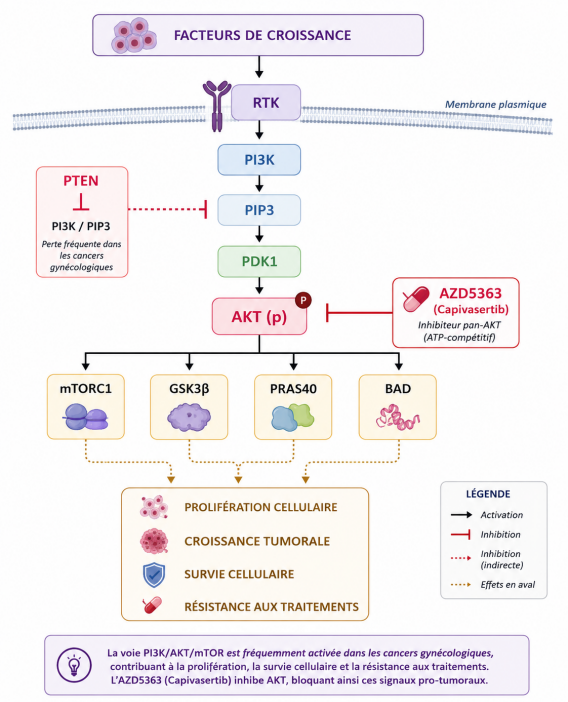


FIGURE 1.1 – **Représentation schématique de la voie PI3K/AKT sous l'effet de l'AZD5363**
Représentation schématique de la voie PI3K/AKT sous l'effet de l'AZD5363 avec effets sur les différentes cibles basses - image générée par ChatGPT sous sources de [32, 40, 41].

cargos et déclenche l'apoptose. L'inhibition est transitoire : *in vitro*, le temps de liaison est d'environ 20 minutes, et *in vivo*, la demi-vie du médicament est de 6 à 8 heures [27]. Les effets secondaires observés sont principalement digestifs (nausées, vomissements, anorexie) et hématologiques (thrombocytopénie, anémie), souvent atténuables par des traitements prophylactiques tels que la thrombopoïétine ou l'*olanzapine* [50, 51]. Des études cliniques de phase I et II ont validé son efficacité en monothérapie et en combinaison dans les cancers gynécologiques, notamment dans l'ovaire, l'endomètre et le col utérin (NCT01607905, NCT02025985) [27, 52]. En association avec le carboplatine ou le paclitaxel, le *Selinexor* a démontré un taux de réponse global (ORR) de 83% contre 50% pour la chimiothérapie seule [53]. Les études pré-cliniques ont confirmé une synergie significative avec le cisplatine et la gemcitabine, particulièrement dans les lignées chimio-résistantes, par restauration de la localisation nucléaire de FOXO1 et par l'inhibition de la voie AKT [31, 54]. Ainsi, le *Selinexor* offre une perspective thérapeutique unique pour contourner la résistance au platine et restaurer l'apoptose via la modulation du trafic nucléaire.

1.5.3 TRAIL (*TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand*).

Le TRAIL est une cytokine appartenant à la super-famille du TNF (*Tumor Necrosis Factor*), connue pour induire une apoptose sélective dans les cellules cancéreuses, tout en épargnant les cellules normales [55]. Le ligand se lie à ses récepteurs de mort, DR4 et DR5, déclenchant l'activation de la caspase-8 et la formation du complexe DISC, initiant la cascade apoptotique intrinsèque et extrinsèque [56]. Cependant, malgré un profil de tolérance favorable, les essais cliniques de TRAIL en monothérapie ont échoué à démontrer une efficacité durable, en raison de résistances rapides [55, 57]. Ces résistances découlent souvent de l'activation compensatoire de voies de survie comme NF-κB, PI3K/AKT, ou MAPK [57]. Dans les cancers ovariens, la présence d'ascites active la voie PI3K/AKT, contribuant à la résistance au TRAIL via une réduction de l'expression de BID et une inhibition de l'apoptose [30, 58]. Inversement, la combinaison de TRAIL avec des agents chimiothérapeutiques, tels que le paclitaxel ou le cisplatine, améliore la sensibilité tumorale et renforce la mort cellulaire programmée [59]. Des effets synergiques marqués ont été observés selon les lignées, certaines étant TRAIL-sensibles mais chimio-résistantes, ou inversement [60, 61]. Dans les cancers de l'endomètre, la résistance est corrélée à une réduction de l'expression des récepteurs de mort [62]. Enfin, des approches combinatoires, intégrant TRAIL avec des inhibiteurs d'AKT ou de CRM1, sont actuellement explorées pour exploiter ces voies de vulnérabilité [11, 63].

1.5.4 Bilan.

Ces cinq agents — cisplatine, doxorubicine, AZD5363, KPT-330, et TRAIL — représentent des piliers dans la compréhension et la modulation de la chimiorésistance dans les cancers gynécologiques. Chacun agit sur des cibles distinctes, mais inter-connectées, allant de la réparation de l'ADN à la signalisation apoptotique. Leurs combinaisons potentielles offrent un levier majeur pour restaurer la sensibilité thérapeutique des cellules cancéreuses et améliorer la survie des patientes.

1.6 La protéine AKT : fonctions, régulation et implication en oncologie gynécologique.

1.6.1 Structure et isoformes.

La protéine kinase B (PKB/AKT) est une sérine/thréonine kinase centrale dans la régulation de la survie cellulaire et du métabolisme. Elle existe sous trois isoformes codées par des gènes distincts : AKT1, AKT2, et AKT3, partageant une homologie de séquence de plus de 80% [64].

- AKT1 est principalement impliquée dans la croissance cellulaire et la survie [64].
- AKT2 joue un rôle clé dans le métabolisme du glucose et la signalisation insulinique [64].
- AKT3 est plus exprimée dans le cerveau et certains tissus reproducteurs [64].

Chaque isoforme contient trois domaines fonctionnels [64, 65] :

- un PH domain (pleckstrin homology), permettant la liaison à la phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) générée par PI3K ;
- un domaine kinase central ;
- et un domaine hydrophobe régulateur (HM) impliqué dans la phosphorylation finale par mTORC2.

1.6.2 Activation de la voie PI3K/AKT/mTOR.

La voie PI3K/AKT/mTOR est activée par des récepteurs tyrosine kinases (RTK), des récepteurs hormonaux ou des G-protéines. L'activation de PI3K entraîne la production de PIP3, qui recrute AKT à la membrane plasmique via son domaine PH. AKT est ensuite activée par deux phosphorylations clés : Thr308 (par PDK1) et Ser473 (par mTORC2) [66].

Une fois activée, AKT régule de nombreux substrats impliqués dans :

- la croissance et la prolifération (via mTOR, GSK3β, p21, p27) [67],
- la survie cellulaire (inhibition de BAD, caspase-9, et activation de NF-κB) [67],
- et le métabolisme énergétique (activation de mTORC1 et régulation de GLUT4) [67].

La signalisation AKT est finement contrôlée par le suppresseur tumoral PTEN, qui déphosphoryle PIP3 en PIP2, limitant ainsi son activation [67].

1.6.3 Rôle d'AKT dans la physiologie féminine et la reproduction.

Chez la femme, AKT joue un rôle essentiel dans la fonction ovarienne, la croissance folliculaire, la décidualisation endométriale et la réponse hormonale [68]. Dans l'ovaire, AKT régule la survie des follicules primordiaux et la croissance des cellules de la granulosa en réponse aux gonadotrophines (FSH, LH). Une activation transitoire d'AKT favorise la prolifération et la stéroïdogenèse, tandis qu'une activation prolongée peut inhiber l'apoptose et altérer la qualité ovocytaire [69]. Dans l'endomètre, AKT participe à la prolifération épithéliale et à la préparation du tissu à l'implantation embryonnaire, en coordination avec les récepteurs de la progestérone et des œstrogènes [70]. Une activation excessive d'AKT, souvent induite par des altérations de PTEN, peut conduire à une hyperplasie endométriale et favoriser la carcinogenèse [71]. Dans le myomètre, AKT intervient dans la régulation contractile et la croissance cellulaire, notamment pendant la gestation, en réponse à des signaux hormonaux et mécaniques [72]. Ainsi, AKT constitue un point de convergence entre signalisation hormonale, métabolisme énergétique et contrôle de la survie cellulaire dans les tissus reproducteurs féminins.

1.6.4 Implication d'AKT dans les cancers gynécologiques.

La dérégulation d'AKT est l'un des événements les plus fréquents dans les cancers de l'appareil reproducteur féminin. Dans le cancer de l'endomètre, la perte de PTEN ($\sim$60% des cas) et les mutations de PIK3CA entraînent une activation constitutive d'AKT [71, 73]. Cette hyper-activation favorise la prolifération, inhibe Par-4 et bloque l'apoptose. Dans le cancer de l'ovaire, une activation aberrante d'AKT est associée à la résistance au platine et au paclitaxel [11, 74]. Elle régule la translocation de FOXO1 et Par-4, deux médiateurs de la mort cellulaire, et active mTOR, contribuant à la survie des cellules tumorales dans l'ascite [75]. Dans le cancer du sein, AKT interagit avec les récepteurs hormonaux (ERα et PR), modulant la croissance dépendante des œstrogènes et la réponse au traitement hormonal [76]. Enfin, dans le cancer du col, l'activation d'AKT est souvent liée à l'expression des onco-protéines E6/E7 du HPV, renforçant la résistance à l'apoptose et la prolifération cellulaire [77]. L'activité d'AKT est également impliquée dans la migration cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et l'angiogenèse tumorale, notamment via la régulation de VEGF et HIF-1α [74]. Ces processus soutiennent la progression métastatique et expliquent en partie la résistance croisée observée entre plusieurs agents cytotoxiques.

1.6.5 AKT et résistance thérapeutique.

L'activation d'AKT favorise la résistance à la chimiothérapie en :
— inhibant l'apoptose mitochondriale (via BAD, caspase-9, Par-4) [40, 78, 79] ;
— augmentant l'efflux médicamenteux (via P-gp et MRP1) [40, 78, 79] ;
— et stimulant la réparation de l'ADN par la phosphorylation de Chk1 et ATR [40, 78, 79].

Des études pré-cliniques ont montré que l'inhibition pharmacologique d'AKT, notamment par AZD5363 (*Capivasertib*), restaure la sensibilité des lignées ovariennes et endométriales au cisplatine et au TRAIL [40, 78, 79]. Cette approche est particulièrement prometteuse en association avec les inhibiteurs de CRM1 (KPT-330), permettant de re-localiser Par-4 dans le noyau et de réactiver la voie apoptotique [11, 75].

1.6.6 Conclusion.

La protéine AKT occupe une position centrale dans la régulation du métabolisme, de la reproduction et de la survie cellulaire. Dans les tissus féminins, elle relie les signaux hormonaux à la prolifération et à la différenciation, mais sa dérégulation transforme cette voie en un puissant mécanisme de survie oncogénique. Son hyper-activation (qu'elle soit due à des mutations de PIK3CA, à une perte de PTEN, ou à des stimuli micro-environnementaux) constitue un marqueur clé de résistance dans les cancers gynécologiques. Le ciblage combiné d'AKT avec d'autres acteurs de la signalisation apoptotique, tels que Par-4, CRM1 ou TRAIL, représente aujourd'hui une stratégie thérapeutique majeure pour surmonter la résistance et restaurer la sensibilité des tumeurs aux traitements conventionnels.

1.7 Protéines cibles impliquées dans la chimio-résistance.

1.7.1 Par-4 (Prostate Apoptosis Response-4).

La protéine Par-4, est un facteur pro-apoptotique sélectif, initialement découvert pour sa capacité à induire l'apoptose spécifiquement dans les cellules cancéreuses sans affecter les cellules normales [74]. Elle agit à la fois comme facteur de transcription et comme médiateur de signalisation intracellulaire, et constitue une cible émergente dans la lutte contre la chimio-résistance des cancers gynécologiques [74].

Dans les cellules normales, Par-4 est localisée dans le cytoplasme. Son absence ou sa faible expression est corrélée à un pronostic défavorable, alors que sa restauration permet d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à la chimio-thérapie et à la radio-thérapie [74]. Dans les tumeurs, cette protéine est fréquemment mutée, silencée transcriptionnellement ou exclue du noyau,

menant à une perte de son activité pro-apoptotique. En particulier, dans les cancers de l'endomètre et de l'ovaire, 90% des tumeurs exprimant Par-4 présentent une exclusion nucléaire anormale de la protéine, signe d'un dérèglement du transport nucléo-cytoplasmique [74]. La sur-expression de Par-4 dans les lignées ovariennes SKOV-3 permet de restaurer la sensibilité au taxol, soulignant son rôle dans la régulation de la réponse chimio-thérapeutique [74]. De plus, le faible taux de mutation et de délétion du gène en fait une cible thérapeutique attractive. Son activité est fortement dépendante de sa localisation nucléaire, la translocation de Par-4 dans le noyau étant une étape indispensable à l'induction de l'apoptose [74].

1.7.1.1 Structure fonctionnelle et régulation.

Par-4 comporte plusieurs domaines fonctionnels essentiels (figure 1.2) :
- Le domaine SAC (*Selective for Apoptosis induction in Cancer cells*), spécifique à l'induction d'apoptose dans les cellules cancéreuses ;
- Le domaine SPRY, impliqué dans les interactions protéine-protéine ;
- La thréonine 163 (T163), site de phosphorylation par PKA, nécessaire à la translocation nucléaire ;
- La sérine 228 (S228), phosphorylée par AKT, qui bloque au contraire cette entrée nucléaire ;
- Le *leucine zipper domain*, régulant l'activité de dimérisation et la stabilité de la protéine ;
- Le NES (*Nuclear Export Signal*), responsable de sa sortie du noyau ;
- Enfin, le fragment clivé (*cleaved Par-4*), activé lors de l'entrée en apoptose et essentiel à la cascade de mort cellulaire [74].

La phosphorylation de Par-4 par PKA favorise sa translocation nucléaire et l'induction de l'apoptose, tandis que la phosphorylation par AKT empêche ce processus, reliant ainsi Par-4 à la voie PI3K/AKT, largement impliquée dans la survie tumorale. Dans les cancers endométriaux, Par-4 a été montré comme capable d'interagir directement avec BCL-2, inhibant cette protéine anti-apoptotique et rétablissant la mort cellulaire programmée. D'autres études suggèrent que NF-κB, en plus d'être inhibé par Par-4, pourrait également promouvoir son expression dans certains adénocarcinomes et lignées cervicales, illustrant la complexité de cette régulation croisée [74].

1.7.1.2 Fonctions et interactions moléculaires.

Par-4 agit à plusieurs niveaux :
- Inhibition de NF-κB : en réduisant l'expression de BCL-2, Par-4 lève les verrous anti-apoptotiques.
- Inhibition d'AKT1 : Par-4 bloque les signaux de survie cellulaire dépendants d'AKT, favorisant l'apoptose.
- Interaction avec PKC : selon le contexte, cette interaction peut induire soit la prolifération et l'autophagie, soit une apoptose dépendante de p53.

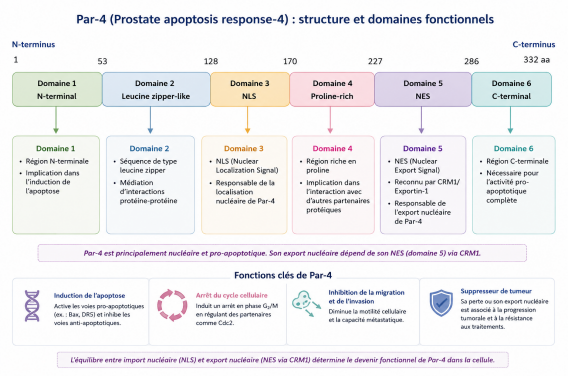


FIGURE 1.2 – **Représentation schématique de la structure de Par-4.** Représentation schématique de la Par-4 avec les différents domaines et leurs rôles - image générée par ChatGPT sous sources de [74].

— Activation de la voie intrinsèque de l'apoptose : via la libération du cytochrome c mitochondrial et la caspase-9.
— Lien avec la voie extrinsèque : Par-4 peut potentialiser la signalisation induite par TRAIL, en particulier dans les cancers ovariens et endométriaux traités au cisplatine [74].

Par ailleurs, Par-4 agit en aval de la voie TGF-β, pouvant paradoxalement promouvoir l'EMT dans certains cancers cervicaux ou endométriaux. Cette dualité souligne que Par-4, selon sa localisation et son état de phosphorylation, peut être soit un inducteur d'apoptose, soit un modulateur de plasticité cellulaire. Enfin, une corrélation hormonale a été observée : l'œstradiol régule négativement les niveaux d'ARNm de Par-4, notamment dans le cancer du sein, tandis que l'absence de récepteurs hormonaux semble améliorer les effets thérapeutiques liés à Par-4 [74].

1.7.1.3 Par-4 et résistance thérapeutique.

Au niveau thérapeutique, la forme clivée de Par-4 (*cleaved Par-4*) est particulièrement intéressante : elle est stabilisée par le cisplatine et potentialisée par l'inhibition de la voie AKT, augmentant la sensibilité au TRAIL, à la doxorubicine et à d'autres agents cytotoxiques. Son interaction avec XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) est aussi déterminante : XIAP, souvent sur-exprimé dans les tumeurs résistantes, induit une résistance aux traitements pro-apoptotiques. Par-4, en diminuant XIAP, contribue à re-sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies [74]. Ainsi, Par-4 se positionne comme une cible pivot dans la restauration de l'apoptose, agissant en lien étroit avec les voies AKT, NF-κB et TRAIL. Son potentiel thérapeutique repose sur sa capacité à inverser la résistance aux agents chimio-thérapeutiques tout en préservant la spécificité pour les cellules tumorales.

1.7.2 CRM1 / XPO1 (*Chromosomal Region Maintenance 1 / Exportin-1*)

CRM1 (*Chromosomal Region Maintenance 1*), également appelée exportine-1 (XPO1), est une protéine d'export nucléaire appartenant à la famille des karyophérines-β. Elle régule la localisation sub-cellulaire des protéines suppressives de tumeurs (TSPs) et joue un rôle central dans le transport nucléo-cytoplasmique, un mécanisme souvent dérégulé dans les cancers [11, 27, 75, 80-82]. CRM1 est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes et reconnaît les protéines contenant une séquence d'export nucléaire riche en leucines. Ces protéines, généralement supérieures à 40 kDa, ne peuvent pas diffuser librement à travers le pore nucléaire et nécessitent donc un transporteur actif comme CRM1. Le mécanisme repose sur la formation d'un complexe tri-moléculaire entre CRM1, le cargo à exporter, et Ran-GTP, qui stabilise l'interaction dans le noyau. Ce complexe traverse le pore nucléaire (NPC), puis Ran-GTP est hydrolysé en Ran-GDP dans le cytoplasme, libérant ainsi le cargo [11, 75].

1.7.2.1 Structure et domaines fonctionnels.

CRM1 est composée de 1071 acides aminés organisés en 21 motifs HEAT répétés, formant une structure hélicoïdale flexible [11]. Le site de liaison au NES est localisé entre les répétitions HEAT 11 et 12, à la surface de la protéine. Cette interface de reconnaissance est fonctionnellement accessible dans le noyau, où CRM1 interagit avec ses cargos contenant un signal d'export nucléaire (NES). Le domaine C-terminal contribue quant à lui à la régulation de l'affinité de CRM1 pour ses substrats. Une mutation ponctuelle notable, E571K, localisée près de ce site, modifie la charge locale (glutamate $\rightarrow$ lysine), renforçant l'interaction avec le NES et augmentant l'efficacité d'export des cargos [11, 75]. CRM1 est impliquée dans l'exportation de nombreuses protéines critiques pour la survie tumorale, incluant p53, BRCA1, le récepteur aux œstrogènes, et le rétinoblastome (Rb) [11, 83]. Leur exportation excessive du noyau vers le cytoplasme empêche leur fonction de contrôle du cycle cellulaire et favorise la transformation maligne. De plus, CRM1 module également la maturation nucléaire des micro-ARNs, en contrôlant la transition nucléo-cytoplasmique des miRNAs matures [81].

1.7.2.2 CRM1 et cancérogenèse.

L'expression aberrante de CRM1 est documentée dans de nombreux cancers, dont les cancers ovariens et cervicaux, où elle est corrélée à un mauvais pronostic clinique, une taille tumorale plus importante, et la présence de métastases à distance [11]. Son hyper-activité conduit à une exportation cytoplasmique excessive des TSPs, favorisant la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, CRM1 est considérée comme un régulateur central de la résistance thérapeutique, par délocalisation des protéines pro-apoptotiques et activation indirecte des voies de survie [11, 84].

1.7.2.3 Inhibition pharmacologique : du Leptomycin B aux SINEs.

Le premier inhibiteur connu de CRM1, le Leptomycin B (LMB), est une molécule naturelle bactérienne se liant de manière covalente à la cystéine 528 du site de liaison NES [11]. Bien que puissante, son utilisation clinique a été abandonnée en raison d'une toxicité élevée. Les SINEs (*Selective Inhibitors of Nuclear Export*), comme le Selinexor (KPT-330), ont ensuite été développés pour surmonter ces limites [80]. Ces petiteCes petites molécules peuvent également interagir avec la cystéine 528 de CRM1 de manière réversible et stérique, bloquant la fixation des cargos sans formation de liaison covalente avec la protéine. Cette liaison transitoire réduit la toxicité observée avec le LMB, tout en conservant une forte activité anti-tumorale [49, 80]. Le *Selinexor* bloque l'exportation nucléaire de protéines comme p53 et FOXO1, entraînant leur accumulation nucléaire, l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction d'apoptose [11, 75]. Les études pré-cliniques ont montré que les cellules ovariques chimio-résistantes deviennent particulièrement sensibles au KPT-330 seul ou en combinaison avec le cisplatine. Le traitement induit une localisation nucléaire accrue de FOXO1 et restaure la réponse apoptotique [11, 75].

1.7.2.4 CRM1, résistance et perspectives thérapeutiques.

Le rôle de CRM1 dans la résistance thérapeutique est double : d'une part, il empêche l'action des protéines suppresseuses de tumeur en les exportant hors du noyau ; d'autre part, il participe à la régulation de voies de signalisation de survie (AKT, NF-κB, mTOR). Les inhibiteurs comme le *Selinexor* permettent de réactiver les voies apoptotiques endogènes, notamment en synergie avec des agents comme Par-4, TRAIL, ou les inhibiteurs de PARP. Les essais cliniques de phase I/II ont déjà confirmé le potentiel du *Selinexor* dans plusieurs cancers gynécologiques, avec une tolérance globalement meilleure que celle des inhibiteurs historiques [11, 27]. La réversibilité de la liaison et l'absence d'effets secondaires majeurs ouvrent la voie à des thérapies combinées visant à restaurer la signalisation nucléaire des protéines pro-apoptotiques, tout en contrant les mécanismes de résistance chimique.

1.7.2.5 Conclusion.

La hiérarchie fonctionnelle entre Par-4 et CRM1 ne peut être formellement établie en l'absence d'analyses d'épistasie ; leur interaction semble plutôt refléter un réseau régulatoire interconnecté impliqué dans la chimiorésistance. La compréhension de leur interaction — notamment la relation entre Par-4 nucléaire et exportation CRM1-dépendante — ouvre des perspectives prometteuses pour le développement de thérapies combinées, capables de restaurer la sensibilité tumorale aux agents cytotoxiques classiques.

1.8 Transition vers la problématique de recherche.

L'ensemble de ces observations souligne le rôle central des mécanismes de régulation de la localisation subcellulaire et de la signalisation apoptotique dans le développement de la résistance aux traitements anticancéreux. Dans la continuité de cette introduction générale, trois chapitres seront consacrés à la présentation plus détaillée des principaux concepts et modèles ayant servi de cadre aux travaux de cette thèse. Le chapitre 2 abordera le cancer de l'ovaire, le chapitre 3 le cancer de l'endomètre, tandis que le chapitre 4 présentera les principes et applications de la vidéo-microscopie utilisés dans le cadre de cette recherche.

Chapitre 2

Cancer de l'ovaire

2.1 Statistiques, classifications et facteurs de risques.

Le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus meurtrier : 314 000 nouveaux cas se déclarent par an, pour 207 000 décès en 2020, les taux les plus importants étant en Amérique du Nord/centrale, mais aussi en l'Europe de l'Est [85]. La plupart des tumeurs ovariennes sont détectées après la ménopause (50% de détection après 60 ans). Malheureusement, seulement 15% des cancers ovariens sont diagnostiqués à un stade précoce [85] ce qui rend les chances de survie pour la patiente faibles.

Que ce soit d'un point de vue clinique, histologique ou encore moléculaire, le carcinome ovarien est une maladie hétérogène regroupant sous le même terme plusieurs maladies cancéreuses différentes [85, 86]. Pour répartir les sous-types, une classification a été créée en s'appuyant sur le tissu d'où le cancer provient : pour le stroma, ce sont les cellules qui libèrent les hormones et relient les différentes structures de l'ovaire ; le tissus épithélial regroupe les cellules recouvrant la paroi externe des ovaires ; finalement les cellules germinales, qui sont les cellules destinées à la formation des ovules. Le sous-type de cancer varie en fonction de l'âge de l'apparition [85, 87]. Parmi les différents sous-types, le plus commun est le cancer ovarien séreux de haut grade [88]. La première classification du FIGO date de 1971 pour les ovaires, suivie de celles de 1988 et 2014 [89, 90]. Une sous-division de stade (IVA et IVB) a été introduite en 2014 et 2018 [87]. Le FIGO se concentre principalement sur le classement du stade et son impact sur le pronostic de la patiente. Les classifications en fonction de l'origine du cancer, de l'histopathologie, du sous-type ou encore des mutations trouvées sont faites. Le WHO (OMS), lui, a sorti 5 éditions de classifications (1973, 2003, 2014 et 2020), regroupant finalement les cancers de l'ovaires en cancer séreux (bas grade et haut grade), mucineux, endométrioïdes, à cellules claires, sero-mucineux, Brenner et une catégorie "autre" (indifférencié, carcinosarcome, mixtes ou de type mésonéphrique). Il se concentre, ainsi, sur une classification histopathologique et moléculaire, avec un classement des

tumeurs avec des critères immunohistochimiques et moléculaires [91].

ll est alors possible de résumer les cancers de l'ovaire via une représentation schématique inspirée de [86] (figure 2.1).

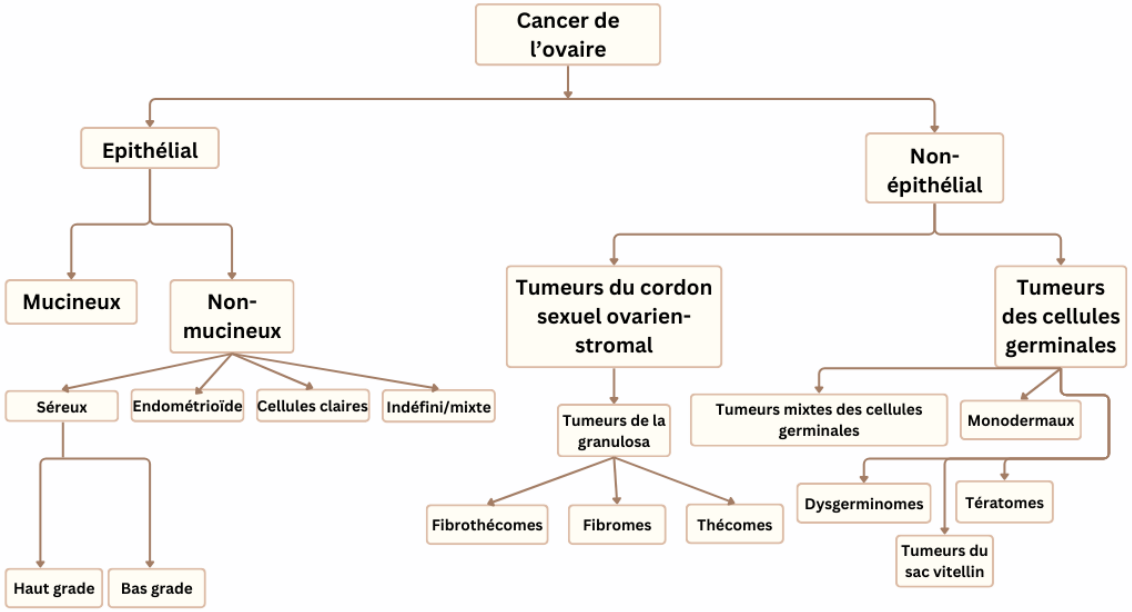


FIGURE 2.1 – Organigramme de la classification des cancers de l'ovaire. Les cancers sont répartis en groupe et sous-groupes et explorés dans les sous-parties suivantes.

1/3 des cancers ovariens épithéliaux proviennent de lésions précurseures dans l'ovaire. Ces lésions peuvent être le résultat de l'endométriose par exemple. Ces cancers sont principalement des adénocarcinomes endométrioïdes, des adénocarcinomes à cellules claires et des adénomes mucineux. Le reste des cancers épithéliaux sont des cancers ovariens séreux de haut grade (HGOSOC) [86, 92]. Dès les années 1970, Fathalla a proposé l'hypothèse de l'*ovulation incessante*, suggérant que les micro-ruptures répétées de la surface de l'épithélium de l'ovaire, lors de l'ovulation, favorisaient la transformation maligne [93]. Cette vision a longtemps structuré la classification des cancers ovariens épithéliaux, distinguant des sous-types histologiques majeurs supposément dérivés de métaplasies au sein de l'épithélium de surface [94]. Bien que des travaux plus récents aient remis en question cette supposée origine unique, notamment pour les tumeurs séreuses de haut grade, il demeure historiquement la première structure identifiée comme source potentielle des cancers ovariens épithéliaux.

2.1.1 Les sous-types épithéliaux.

Nous examinons dans cette partie les différents sous-types des cancers ovariens épithéliaux.

2.1.1.1 Les carcinomes ovariens séreux de haut grade (HGSOC).

Ils représentent 70% de tous les types de cancers de l'ovaire ; la lésion précurseure est généralement dans le tube séreux intra-épithélial, mais peut aussi se trouver dans la trompe de Fallope. Les mutations héréditaires qui lui sont associées sont BRCA1 et BRCA2. Les altérations moléculaires, elles, vont de TP53 (qui frôle les 100% de mutation), à HRD, en passant par une instabilité chromosomique et une altération du nombre de copies, on peut aussi retrouver des mutations de NF1, CDK12, la voie PI3K, la voie Ras, Rb, notch et des altérations de FOXm1 [91, 95, 96].

Auparavant, beaucoup de tumeurs ont été classifiées comme des carcinomes ovariens endométrioïdes de grade 3, répondant de façon inadéquate au traitement. Actuellement grâce à la classification moléculaire, il est possible de distinguer un profil moléculaire p53 muté via l'immunohistochimie. Ce profil est caractéristique des HGSOCs (96% des cas) [86, 92, 97, 98]. Cette expression aberrante de p53 peut être une sur-expression mais aussi une absence totale de la protéine, respectivement associéesà un gain de fonction de TP53 ou une perte de fonction de celui-ci. La surexpression est reliée à une mutation de type erroné au niveau du site de liaison de l'ADN, tandis que l'absence de p53 est reliée à une insertion ou une délétion dans le gène de TP53 [86]. L'altération de BRAC 1 et/ou de BRAC 2 est aussi très commune. Il est dorénavant conseillé aux praticiens de faire ces tests [98].

Il est très compliqué de retirer entièrement par chirurgie la tumeur, le site d'origine est en fait quasiment introuvable du fait de l'étendue de la tumeur au moment de la découverte de celle-ci. Le traitement principal s'effectue via une chimiothérapie, mais de nouvelles recherches se font sur les inhibiteurs de PARPs, ainsi que les inhibiteurs de checkpoints immunitaires [99-102]. Ceci sera expliqué dans la partie 2.2 (dépistages, rechutes et résistances aux traitements). De ce fait, les HGSOCs sont principalement responsables de la mort associée à ce type de cancer, du fait du diagnostic très tardif. La survie à 5 ans n'est que de 50% et celle à 10 ans entre 20% et 30% [91, 95, 96].

2.1.1.2 Les carcinomes ovariens séreux de bas grade (LGSOC).

Les LGSOCs sont une catégorie très différente des HGSOCs : les patientes sont généralement jeunes mais avec une résistance à la chimiothérapie (particulièrement à celle basée sur du platine) et une survie générale plus longue que les HGSOCs. La plupart des patientes sont prises en charge à un stade déjà élevé [88, 98]. Le site d'origine vient de l'endosalpingiose ou de la trompe de Fallope et ces carcinomes correspondent à moins de 5% de tous les cancers ovariens [95]. Les LGSOCs ont une bonne réponse aux thérapies hormonales, ainsi qu'aux thérapies avec facteurs anti-angiogéniques. Des recherches actuelles se basent aussi sur les inhibiteurs de MEK [92, 96]. Moléculairement, il n'y a pas de mutation de TP53, mais très souvent de BRAF, EGFR, HER2 (20 à 38% des patientes, par amplification), d'ALK qui sont considérées comme des mutations conductrices de ce cancer. KRAS, c-myc (65% des cas, par

amplification) ou ERBB2 peuvent aussi être mutés [88, 98, 103]. Les facteurs de risque pour les cancers séreux comprennent la nulliparité, une ménopause tardive, des menstruations précoces [88]. En effet, ces facteurs influencent le nombre de cycles menstruels que la femme aura au cours de sa vie, l'ovulation étant une rupture de l'épithélium de l'ovaire. Cette déchirure entraîne donc des erreurs de réplication de l'ADN, des mutations et du stress oxydatif. C'est le concept de l' « *incessant ovulation hypothesis* » [93, 104].

2.1.1.3 Les carcinomes ovariens de types endométrioïdes (ENOC).

Les ENOCs sont principalement de bas grade. Ce type de carcinome a un très bon pronostic et est originaire de lésions endométriosiques ; la croissance de ce type de cancer est lente. Ils constituent un groupe hétérogène au niveau des paramètres morphologiques mais aussi moléculaires [92, 96]. Ils correspondent à 10% de tous les carcinomes ovariens et le syndrome génétique qui l'accompagne est généralement le syndrome de Lynch. Les principales mutations somatiques retrouvées sont ARIDI1A, PIK3CA, PTEN, POLE, TP53, KRAS, PPP2R1A, et CTNNB1 [88, 95]. Mais aussi une empreinte MSI de 20% chez les patientes, qui est la plupart du temps reliée à une méthylation du promoteur MLH1. On peut aussi retrouver des déficiences au niveau des MMRs [92, 105]. Les ENOCs POLE mutées ont un très bon pronostic, les MSI un pronostic mitigé et les p53 anormales un mauvais pronostic, mais sont très peu rencontrées en clinique [98]. Ces patientes ont très souvent une faible réponse à la chimiothérapie basée sur le platine. Les recherches pour les traitements actuels comprennent les inhibiteurs de la voie mTOR mais aussi les inhibiteurs des checkpoints immunitaires [95].

2.1.1.4 Les carcinomes à cellules claires (OCCC).

En plus d'être la seconde cause de mort par cancer ovarien épithélial, l'OCCC représente 6-10% de toutes les carcinomes ovariens [92, 95]. Il est associé à un pronostic vital très faible mais aussi au syndrome de Lynch [92]. Sa lésion d'origine pourrait provenir de l'endométriose [95]. L'OCCC est diagnostiqué plus tôt dans l'évolution du cancer que l'HGSOC, pour un taux de 50% de femmes à un stade I, avec 77% de survie à 5 ans. Le Japon a un taux d'incidence de ce type de cancer élevé comparé à l'Amérique du Nord (27% versus 12%) [88]. Pour ce qui est des taux de réponse, les OCCCs ont le taux le plus faible pour les thérapies basées sur le platine. Lorsqu'elles ne sont pas prises à temps et qu'il y a présence de métastases, elles peuvent devenir rapidement résistantes à la chimiothérapie [96]. Quatre profils génétiques sont remarquables, comme pour les ENOCs : ARIDI1A, PTEN et PIK3CA mais aussi des MSIs. Ces mutations peuvent coexister, ce qui rend le pronostic encore moins favorable [106-108]. Une amplification de ERBB2 peut aussi être retrouvée, accompagnée des mutations de CTNNB1, TP53 et de PPP2R1A.

De très nombreuses modifications de la voie PI3K-AKT sont retrouvées, comme par exemple une activation par PI3KR1 et PTEN. Cela rend la voie

PI3K/AKT-MTOR idéale comme cible potentielle de traitement, mais les recherches se concentrent aussi sur les inhibiteurs de tyrosine kinase, et les inhibiteurs de checkpoint immunitaires [88].

2.1.1.5 Les carcinomes ovariens mucineux (MOC).

Une de leur principale caractéristique est aussi un jeune âge au diagnostic. Le plus souvent il y une implication d'un seul ovaire et non des deux [95, 103]. Le risque d'avoir un MOC est augmenté lors de la prise régulière de tabac [88]. Ces carcinomes représentent 3 à 4% de tous les carcinomes ovariens, ce qui fait de ceux-ci les moins fréquents. Sa lésion d'origine est très peu connue, la littérature suggérant fréquemment un tératome [92]. La survie à 5 ans dépasse 90%, ce qui en fait le moins mortel des cancers de l'ovaire [88]. Principalement détectés au stade I, ils ont une importante instabilité microsatellitaire (MSI dans 22% des cas), la mutation de KRAS est présente à 43% (ces mutations sont touchent principalement le codon 12, avec une prédominance des variantes G12D et G12V, qui constituent les hotspots reconnus dans les tumeurs) et 19% des MOCs ont une mutation de p53. HER2 est aussi amplifié [88, 103] et TP53 est souvent également muté, ces mutations sont hétérogènes, sans hotspot majeur identifié. [103]. CDKN2A est aussi muté et une perte du nombre de copies est observée, ces altérations sont également variées [95]. Pour ce qui est des traitements, des études précliniques ont démontré une synergie entre des traitements MEK et une inhibition de PI3K (chez les patientes avec une mutation KRAS), le taux de réponse allant jusqu'à 67% en étude pré-clinique et essais cliniques [103]. On note également un bon taux de réponse avec le trastuzumab avec 45% de taux de réponse en étude clinique [109, 110].

Le tableau 2.1 permet de résumer quelques caractéristiques des cancers ovariens épithéliaux [86, 88, 91-93, 95-104, 106-108].

2.1.2 Les sous-types non-épithéliaux

Les sous-types non-épithéliaux sont très souvent laissés de côté, du fait de leur rareté. Mais ils représentent nonobstant 15 à 20% des malignités ovariennes. Les traitements des tumeurs épithéliales et non épithéliales ont pendant très longtemps été séparés, mais de nouvelles méthodes sont actuellement envisagées, tirant parti des connaissances de l'un et de l'autre [111].

2.1.2.1 Les tumeurs des cellules germinales.

Ce sous-type regroupe les tératomes, les dysgerminomes, les tumeurs du sac vitellin et les tumeurs mixtes des cellules germinales.

Les tératomes sont des tumeurs qui sont formées avec des cellules pluripotentes ; du fait de leur origine se rapprochant du feuillet embryonnaire, elles sont souvent, dans le cas de l'ovaire, malignes avec possibilité de métastases. Le tératome consiste en un mélange de cellules différenciées donnant naissance à des tissus mûrs, mais à des endroits ou à des moments non-opportuns. Les

TABLE 2.1 – Tableau résumant les différentes sous-types de cancers ovariens épithéliaux et leurs particularités.

Marqueurs moléculaires	Sous-types de cancers ovariens épithéliaux	Commentaires
TP53	HGSOC, ENOC, MOC, OCCC.	Muté dans 96% des HGSOCs, pire pronostic chez les ENOCs.
BRAC1 BRAC2	HGSOC.	Bon pronostic.
BRAF	LGSOC.	Bonnes statistiques de survie quand traitement avec thérapie ciblée.
KRAS	LGSOC,ENOC, MOC.	Pronostic mauvais, récurrences fortes.
ERBB2	LGSOC, OCCC.	
Récepteurs hormonaux	LGSOC, ENOC.	Hormonothérapie possible.
MMRs	ENOC, OCCC.	Associé au syndrome de Lynch, grande expression de PD-L1.
POLE	ENOC,OCCC.	Excellent pronostic, grande expression de PD-L1.

exemples les plus fréquents sont la présence de cheveux ou de dents dans l'ovaire [112].

Les dysgerminomes de l'ovaire se produisent fréquemment de manière unilatérale. Ce sont des tumeurs rares des cellules germinales. Contrairement aux tératomes, ces tumeurs apparaissent particulièrement chez la jeune adulte et peuvent s'accompagner d'une virilisation de l'individu ainsi que d'une hyperthyroïdie [113].

Les tumeurs du sac vitellin sont les tumeurs les plus communes au sein des GCTs ; comme pour les dysgerminomes précédemment cités, il est plus fréquent de les voir apparaître de manière unilatérale et chez des femmes jeunes. Le taux d'incidence se situe entre 1 à 3% des cancers de l'ovaire. Leur biologie est peu connue du fait que ce sont des tumeurs rares ; des rechutes sont fréquentes même après chirurgie et chimiothérapie [114].

Les tumeurs mixtes des cellules germinales consistent en un mélange entre au moins deux types de cellules germinales malignes différentes. Ces tumeurs sont très agressives [111]. Pour tous ces cancers, au stade I, le traitement consiste en une chirurgie pour une conservation de l'ovaire et de l'utérus. Très fréquemment, si le stade est plus élevé, il y a possibilité de faire suivre une chimiothérapie [18, 88].

2.1.2.2 Les tumeurs du cordon sexuel ovarien-stromal (SCST)

Ils représentent 7% de tous les cancers ovariens et ont une tendance à la récurrence [18, 88]. On distingue deux autres sous-classes dans ce groupe : les tumeurs de la granulosa (chez la femme) et les tumeurs des cellules de Sertoli (chez l'homme). Les tumeurs de la granulosa (voir la représentation d'un follicule mature (de De Graaf), présent chez la femme, avec les différentes couches et épaisseurs, dans la figure 2.2) comprennent les tumeurs à cellules de la granulosa (souvent chez les adultes), les thécomes (tumeurs de la thèque, souvent bénins, et produisent des œstrogènes), les fibromes (tumeurs fibroblastiques, habituellement bénignes sans production hormonale) et les fibrothécomes (formes mixtes de fibrome et de thècome) [115-123]. Les informations concernant ces tumeurs sont résumées dans le tableau 2.2.

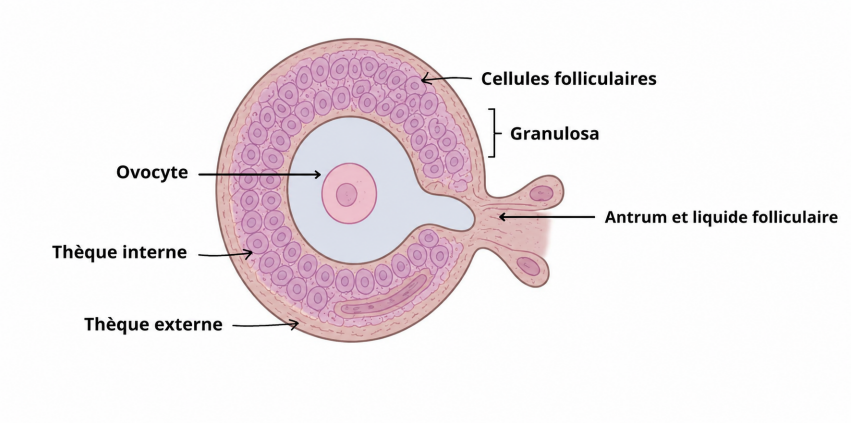


FIGURE 2.2 – Représentation schématique de la granulosa dans un follicule de De Graaf - image générée par ChatGPT sous sources de MedCell [124].

Finalement, le cancer des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig sont aussi appelés les androblastomes. Ils représentent moins de 0.5% des tumeurs ovariennes toutes catégories confondues. Les cellules de Sertoli permettent de former les structures tubulaires tandis que les cellules de Leydig sont sécrétrices d'androgènes. Ces tumeurs sont fréquemment associées à des mutations de DICER1 (aussi présentes dans le syndrome polykystiques des ovaires) et sont souvent présentes chez des femmes jeunes, en moyenne entre 20 et 30 ans. Sur ces femmes, environ 30 à 50% ont des symptômes comme l'hirsutisme, une voix grave, une clitoromégalie, une aménorrhée, qui sont caractéristiques de l'hyperandrogénie. Les traitements consistent en général en une chirurgie, une hystérectomie et une chimiothérapie adjuvante dans les stades avancés. Le pronostic est généralement bon et favorable [125-128].

2.1.2.3 Les sarcomes ovariens

Le sarcome ovarien est un peu plus particulier et rare. Il correspond à un mélange des tumeurs épithéliales ou non-épithéliales précédemment citées. Ils représentent uniquement 0.1% des cancers ovariens et 0.3% des sarcomes. La

TABLE 2.2 – Synthèse des différents sous-types de tumeurs du cordon sexuel ovarien-stromal et de leurs particularités [115-123].

Tumeur	Nature	dépendance hormonale	Risque de malignité	Âge typique	Remarques	Diagnostic et traitement
Fibrome ovarien	Fibreux, généralement bénin.	Non.	Très faible.	Environ 52 ans.	Peut-être associé au syndrome de Meigs et au syndrome de Gorlin.	Asymptomatique.
Thécome	Thèque, bénin.	Oui, avec oestrogène.	Très faible.	Environ 59 ans.	Parfois associé au cancer de l'endomètre, hyperoestrogénie.	Symptomatique (saignement, dérèglement hormonal).
Fibro-thécome	Mixte.	Variable selon la tumeur.	Très faible.	Âge moyen entre 42 et 53 ans, cas très juvéniles rares à 13 ans.	Parfois trisomie 12 retrouvée dans la tumeur.	Symptomatique mais non spécifique (troubles menstruels, douleurs pelviennes, ménorragies).
Tumeurs de la granulosa	Sécrétoire et néoplasique.	Oui, avec oestrogène.	Faible à modéré, récidives possibles.	Soit chez des femmes entre 30 et 50 ans, soit chez des femmes prépubères.	Mutation FOXL2.	Symptomatique (saignements, ménorragies, puberté précoce), récidives à long terme et suivi vie (25% de chance de récidives)

plupart ont un pronostic très mauvais, avec une survie moyenne à 2 ans de 60% [88].

Cette classe de cancer est ramifiée elle aussi : on distingue les sarcomes purs et les sarcomes mixtes (carcinosarcomes). Nous résumons dans le tableau 2.3 les types de sarcomes ovariens [129-133].

2.2 Dépistages, rechutes et résistances aux traitements

Actuellement les cancers de l'ovaire sont détectés très tardivement. Il n'existe en effet pas ou peu de programme public pour le dépistage et la détection précoce [87]. La plupart des cancers sont donc dépistés à un stade avancé et souvent métastasés. Les facteurs de risque du cancer ovarien sont : l'âge avancé (50% des cas diagnostiqués après 63 ans) et l'absence de grossesse (des études démontrent qu'une grossesse à terme réduit le risque de cancer de l'ovaire de 10%) [87]. Le fait de prendre des contraceptifs oraux pendant 5 ans ou plus est aussi associé à une réduction de 50% du risque de cancer ovarien, l'effet perdurant plusieurs années après l'arrêt de la contraception [87]. L'hormonothérapie prolongée, après la ménopause, augmente légèrement le risque de ce cancer [134]. Les femmes obèses ont aussi plus de risque de développer un cancer ovarien, produisant également un dérèglement hormonal

TABLE 2.3 – Tableau résumant les différentes sous-types de sarcomes ovariens et leurs particularités [129-133].

Type de sarcome	Origine	Details
Sarcome Stromal	Stroma ovarien	Rare, femme âge moyen, agressif
Léiomyosarcome ovarien	Muscle lisse de l'ovaire	Rare, cas isolés, peu connu
Angiosarcome ovarien	Endothélium vasculaire	Métastatique, très agressif
Rhabdomyosarcome ovarien	Cellules musculaire de l'ovaire	Chez les jeunes filles, très rare et tumeurs mixtes
Carcinosarcome	Composante à la fois épithéliale et mésenchymateuse	Forme la plus fréquente, composante carcinomateuse et sarcomateuse, 1-4% des cancers de l'ovaire, pronostic très sévère.

[134]. Le tabac augmente les sous-types mucineux, mais diminue le risque de carcinome à cellules claires. Enfin les traitements de radiothérapie pelvienne augmentent le risque de cancers ovariens [134, 135].

De surcroît, des facteurs génétiques peuvent aussi entrer en compte : la principale mutation connue dans le cancer de l'ovaire épithélial est la dysfonction des gènes BRCA1 et BRCA2, cette dysfonction conduisant à une déficience de la recombinaison homologue [86, 92]. De surcroît, des facteurs génétiques peuvent également intervenir : l'une des altérations majeures observées dans le cancer de l'ovaire épithélial concerne les gènes BRCA1 et BRCA2, dont la dysfonction entraîne une déficience de la recombinaison homologue. Dans ce contexte, les cellules perdent la capacité de réparer fidèlement les cassures double brin via cette voie haute fidélité et compensent ce déficit par des mécanismes alternatifs de réparation, notamment la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), plus rapide mais plus sujette aux erreurs. Le risque de cancer de l'ovaire est estimé de 35% à 70% pour BRCA1 et entre 10 et 30% pour BRCA2. Ces mutations ont été découvertes dans les années 90, facilitant ainsi le traitement des patientes [136, 137] (repérage des familles à risque, surveillance accrue, sensibilité au platine, début des thérapies ciblées). Les mutations sont connues pour être héréditaires et pour compter dans 25% des cas de cancers du sein et de l'ovaire [86, 92].

Pour ce qui est des thérapies, elles consistent en une chirurgie et une chimiothérapie. Les femmes qui font une rechute sont classées comme platine-sensible si la récurrence se passe après 6 mois post-traitement, et platine-résistante si la durée est inférieure à 6 mois [85]. Malgré les progrès majeurs réalisés en chirurgie, en chimiothérapie et l'introduction de thérapies de maintenance,

notamment dans les cancers de l'ovaire, les améliorations de la survie globale restent limitées et le pronostic demeure globalement défavorable, en particulier en raison du taux élevé de rechutes. Le taux de récurrence excède ainsi 85% après les premières lignes de traitement. De façon surprenante, ces rechutes peuvent être gérées avec succès grâce aux thérapies à base de platine [85]. Ainsi, les chances d'une rémission totale augmentent avec l'intervalle sans platine entre les doses. Malheureusement ces mêmes intervalles se raccourcissent jusqu'à ce que la sensibilité au platine soit perdue (sélection clonale), ce qui suggère qu'une population de cellules souches est à l'origine du développement et de la progression de ces tumeurs [85].

Pour de multiples raisons, les traitements anti-cancers échouent. De prime abord, le problème peut venir de l'injection de la drogue (généralement intra-systémique) et peut donc ne pas permettre une absorption, et une livraison optimale au tissu visé. Plus généralement, 3 mécanismes sont impliqués dans la résistance au traitement : le premier consiste à la faible prise en charge des drogues solubles dans l'eau ; le second consiste aux changements dans les cellules qui affectent la capacité des drogues de tuer la cellule (augmentation de la réparation de l'ADN par exemple) ; et enfin un afflux accru des médicaments hydrophobes qui peuvent facilement rentrer par diffusion à travers la membrane plasmique [138]. Actuellement, les technologies de séquençage à haut débit (NGS) et les approches bio-informatiques jouent un rôle central dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de biomarqueurs moléculaires, permettant une meilleure compréhension des mécanismes tumoraux et le développement de stratégies de médecine personnalisée [139]. La résistance au(x) traitement(s) fait naître une hétérogénéité entre patientes. La tumeur peut aussi être protégée par son environnement local : Deux types de résistance coexistent, une distinction peut être faite entre une résistance primaire ou secondaire. Dans le cas de la résistance primaire (intrinsèque), les cellules sont résistantes dès la première rencontre avec la drogue, la patiente n'a donc aucune réponse au traitement. Dans le second cas (résistance acquise), il y a sélection d'une population, avec tout d'abord une évolution positive du cas clinique, puis une progression de la maladie [140, 141].

Sur ce même sujet, en 2002, Weinstein a identifié un phénomène appelé l'addiction oncogénique, qui correspond au fait que les cellules cancéreuses deviennent dépendantes à une altération « *driver* ». De ce fait, les thérapies ciblées ont été mises au point. Malheureusement, comme précédemment énoncé, le cancer étant une maladie faite de nombreuses évolutions, il existe une hétérogénéité et une diversité génique énorme au sein d'une même tumeur. Ces deux processus de résistance peuvent paraître très éloignés, mais, en 2010, une équipe a démontré une nouvelle notion de « *drug-tolerant persister cells* », qui correspond à une petite sous-population de cellules qui vont survivre à l'exposition initiale de la thérapie ciblée en adoptant un stade quiescent. Malheureusement, après quelque temps, ces cellules vont pouvoir se re-développer à n'importe quel moment. La maladie résiduelle « re-sortirait »" alors, à cause de différents sous-mécanismes, comme la pharmacodynamique des drogues

ou l'arrêt du traitement [141]. Nous avons représenté sur la figure 2.3, les différents mécanismes de résistances aux drogues dans le cancer qui ont été abordés.

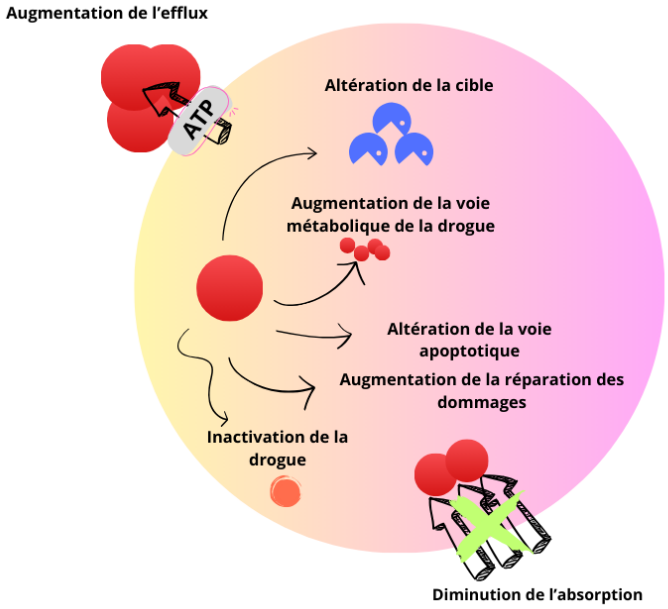


FIGURE 2.3 – Représentation schématique des mécanismes de résistance aux médicaments, inspirée de [139]. La résistance thérapeutique peut émerger à travers plusieurs adaptations cellulaires, notamment l'augmentation de l'efflux médicamenteux, la diminution de l'absorption du médicament, son inactivation ou son métabolisme accru. Des modifications de la cible thérapeutique, une altération des voies apoptotiques ainsi qu'une augmentation des capacités de réparation des dommages induits par le traitement contribuent également à réduire l'efficacité des agents anticancéreux et favorisent la survie des cellules tumorales.

Pour illustrer le changement d'environnement protecteur, nous allons aborder rapidement le rôle du métabolisme dans la résistance aux médicaments. La capacité des cellules tumorales à changer sous la concentration en oxygène est en effet un facteur essentiel pour le développement de la tumeur. Outre l'hypoxie, la pseudo-hypoxie est aussi utilisée fréquemment pour promouvoir le métabolisme glycolytique de la tumeur [142].Par exemple, la perte de p53 dans les lignées cancéreuses peut favoriser l'adaptation des cellules à des conditions de stress, notamment hypoxiques. L'hypoxie, fréquemment observée au centre des tumeurs en raison d'une vascularisation insuffisante, entraîne alors la stabilisation et l'activation de HIF-1, un facteur de transcription clé impliqué dans la réponse cellulaire à la privation d'oxygène. on activation va permettre de déterminer la reprogrammation des cellules cancéreuses à différents niveaux, comme par exemple le changement entre la respiration aérobique et la glycolyse (effet Warburg). Il est aussi responsable de la suractivation de la voie PI3K/AKT [143]. D'autres mécanismes environnementaux

sont aussi importants dans la résistance aux drogues. Plus particulièrement, les cellules souches sont généralement initiatrices des rechutes chimiorésistantes. Un traitement qui vise uniquement le « gros » de la tumeur sera moins efficace, car la tumeur va résister via les différents mécanismes des cellules souches (résistance à l'apoptose, surexpression des transporteurs ABC). Il sera donc plus efficace d'utiliser un traitement adapté aux cellules souches en première instance, puis de viser les autres cellules de la tumeur [143, 144].

Les miRs, déjà cités au début de cette thèse, sont aussi de plus en plus connus dans tous les types de cancers ; les cancers de l'ovaire n'y font donc pas exception. Le miR-181 est ainsi connu et surexprimé dans les cancers de l'ovaire résistants au paclitaxel, cette résistance étant due à la surrégulation de la N-cadhérine et à la sous-régulation de la E-cadhérine. De plus, dans les cancers de l'ovaire, la résistance au cisplatine est très généralement induite par une augmentation de la glycolyse, qui peut être causée par les miRNAs [145]. D'autres exemples sont citables, résumés dans le tableau 2.4, qui synthétise les différents effets des miRNAs sur les résistances aux drogues dans les cancers de l'ovaire.

Table 2.4: Les différents effets des miRNAs sur les résistances aux drogues dans les cancers de l'ovaire [145].

Nom du miR	Médicament	Voie	Type de resistance	Mode d'action	Mécanisme de résistance
miR-21	Platine	PTEN	Résistance à l'apoptose par dérégulation d'un suppresseur tumoral.	Inhibition de l'ARNm. Répression post-transcriptionnelle de PTEN, activation secondaire de PI3K/AKT.	Dérégulation de PTEN → résistance.
miR-93	Platine	PTEN/AKT	Résistance à l'apoptose médiée par la survie cellulaire.	Inhibition de l'ARNm. Répression post-transcriptionnelle de PTEN, activation de la voie AKT.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via PTEN/AKT.
miR-106a	Platine	PDCD4/ caspase-3, caspase-8	Résistance à l'apoptose (voies intrinsèque et extrinsèque).	Inhibition de l'ARNm. Répression de PDCD4, caspase-3 et caspase-8.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via PDCD4/caspase-3 et caspase-8.

Suite à la page suivante...

Table 2.4: Les différents effets des miRNAs sur les résistances aux drogues dans les cancers de l'ovaire [145]. (suite du tableau)

Nom du miR	Médicament	Voie	Type de resistance	Mode d'action	Mécanisme de résistance
miR-125b	Platine	BAK1	Résistance à l'apoptose mitochondriale.	Inhibition de l'ARNm. Inhibition post-transcriptionnelle de BAK1.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via BAK1.
miR-142-5p	Platine	MCL-1	Résistance à l'apoptose via protéines anti-apoptotiques.	Inhibition de l'ARNm. Régulation négative de MCL-1.	Sous-expression → inhibition de l'apoptose via MCL-1.
miR-149-5p	Platine	MST1, SAV1/YAP, TAZ	Résistance à l'apoptose via la voie Hippo.	Inhibition de l'ARNm. Répression de MST1/SAV1, activation de YAP/TAZ.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via MST1/SAV1/YAP/TAZ.
miR-204	Platine	IL-6R/ STAT3/miR-204/IL-6R	Résistance à l'apoptose dépendante de l'inflammation.	Inhibition de l'ARNm. Régulation de l'axe IL-6R/STAT3.	Sous-expression → inhibition de l'apoptose via IL-6R/STAT3.
miR-205	Platine	PTEN	Résistance à l'apoptose par dérégulation d'un suppresseur tumoral	Inhibition de l'ARNm. Répression post-transcriptionnelle de l'ARNm de PTEN.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via PTEN.
miR-214	Platine	PTEN/AKT	Résistance à l'apoptose médiée par la survie cellulaire (PI3K/AKT).	Inhibition de l'ARNm. Répression post-transcriptionnelle de PTEN et activation secondaire d'AKT.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via PTEN/AKT.
miR-216a	Platine	PTEN	Résistance à l'apoptose par dérégulation d'un suppresseur tumoral.	Inhibition de l'ARNm. Répression post-transcriptionnelle de PTEN.	Dérégulation de PTEN → résistance.
miR-223	Platine	PTEN/PI3K /AKT	Résistance à l'apoptose dépendante de la voie PI3K/AKT.	Inhibition de l'ARNm. Répression coordonnée de PTEN, activation de PI3K/AKT.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via PTEN/PI3K/AKT.

Suite à la page suivante...

Table 2.4: Les différents effets des miRNAs sur les résistances aux drogues dans les cancers de l'ovaire [145]. (suite du tableau)

Nom du miR	Médicament	Voie	Type de resistance	Mode d'action	Mécanisme de résistance
miR-411	Platine	ABCG2	Efflux médicamenteux. Résistance par efflux médicamenteux (transporteurs ABC).	Inhibition de l'ARNm. Régulation post-transcriptionnelle de ABCG2.	Sous-expression → efflux via ABCG2.
miR-1180	Platine	SFRP1/Wnt-5a/β-caténine	Glycolyse. Résistance métabolique associée à la reprogrammation glycolytique.	Inhibition de l'ARNm. Répression de SFRP1, activation de la voie Wnt/β-caténine.	Surexpression → glycolyse via SFRP1/Wnt-5a/β-caténine.
miR-27a	Taxane	HIPK2/ MDR1/ P-gp	HIPK2/MDR1/P-gp Résistance par efflux médicamenteux.	Régulation de réseaux ceRNA contrôlant l'expression de MDR1/P-gp.	Sous-expression → activation de MDR1 → résistance.
miR-29b	Taxane	BAG3/miR-29b/MCL-1	Résistance à l'apoptose mitochondriale.	Inhibition de l'ARNm. Répression post-transcriptionnelle de MCL-1 via l'axe BAG3/miR-29b.	Sous-expression → inhibition de l'apoptose via MCL-1.
miR-106a	Taxane	Caspase-7, BCL10	Inhibition de l'apoptose par voie intrinsèque.	Inhibition de l'ARNm. Répression post-transcriptionnelle de caspase-7 et BCL10.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via caspase-7/BCL10.
miR-630	Taxane	APAF-1	Résistance à l'apoptose mitochondriale.	Inhibition de l'ARNm. Répression post-transcriptionnelle de APAF-1.	Surexpression → inhibition de l'apoptose via APAF-1.
miR-1307	Taxane	CIC/ETV4	Résistance par efflux médicamenteux transcriptionnel.	Inhibition de l'ARNm. Activation indirecte de la transcription de MDR1 via l'axe CIC/ETV4.	Surexpression → transcription de MDR1 via CIC/ETV4.

Le même article [145] indique qu'il est également possible d'utiliser certains microARN (miRNA) pour contrer les mécanismes de résistance dans le cancer

de l'ovaire (tableau 2.5), notamment via l'utilisation de mimics ou d'inhibiteurs visant à restaurer ou moduler leur expression.

Finalement, une stratégie prometteuse pour limiter les rechutes tumorales consiste non pas à chercher à éliminer complètement la population de cellules résistantes, mais à en contrôler durablement l'expansion. Comme nous l'avons vu, cette population est soumise aux forces de sélection darwinienne : les traitements conventionnels exercent une forte pression sélective qui favorise la survie et la prolifération des clones résistants. À l'inverse, moduler cette pression de sélection pourrait permettre de maintenir un équilibre entre les populations sensibles et résistantes, limitant ainsi la domination de ces dernières. Par ailleurs, les cellules tumorales ne peuvent s'adapter qu'aux conditions de leur environnement immédiat et ne sont pas capables d'anticiper des modifications futures. Ce principe constitue le fondement des thérapies adaptatives, dans lesquelles le traitement est ajusté au cours du temps en fonction de l'évolution de la tumeur afin de contrôler la maladie plutôt que de rechercher systématiquement son éradication complète. Cette approche dynamique, directement adaptée au patient, pourrait ainsi prolonger l'efficacité des traitements et retarder l'apparition des rechutes[146].

Actuellement, la plus grande avancée est le traitement par inhibiteurs de PARP : Rucaparib, Niraparib et Olaparib. Ce dernier a été approuvé en décembre 2018 pour une thérapie de maintenance chez les femmes atteinte de mutation de BRCA (cellules somatiques ou germinales), qui sont sensibles au platine après traitement au platine (étude SOLO-1, SOLO-2 et Study 19) [147-149]. En effet, le système PARP est à l'origine de la réparation des cassures simple brin de l'ADN, mais dans certains cas de cancers de l'ovaires (mutés BRCA1/2 ou HRD), la réparation est déjà défectueuse. Ce qui entraîne, lors de la désactivation de PARP dans les cellules cancéreuses, une accumulation de trop de dommages à l'ADN et la mort de ces cellules. Les checkpoints immunitaires sont des molécules régulatrices qui contrôlent l'activation des lymphocytes T afin de maintenir l'homéostasie immunitaire. Dans les cancers de l'ovaire, les cellules tumorales exploitent ces mécanismes pour inhiber la réponse immunitaire. Les inhibiteurs de checkpoints immunitaires ont donc pour objectif de bloquer ces signaux inhibiteurs afin de réactiver l'immunité anti-tumorale. Ce mécanisme est principalement utilisé dans les HGSOCs. La classification moléculaire présentée auparavant est donc de bonne augure et permet de mieux cibler le traitement à donner aux patientes [150] en temps plus court et permettrait ainsi de prolonger la survie de celles-ci [149].

Les essais cliniques avec les checkpoints immunitaires actuels ont été résumés dans le tableau 2.6 [151-154].

TABLE 2.5 – Les différents utilisations des miRNAs pour combattre les résistances aux drogues dans les cancers de l'ovaire [145].

Nom du miR	Fonction	Cible	Résistance à la drogue
miR-30a-5p	Inhibition de la migration et de l'invasion.	SKP2,BCL9 et NOTCH1.	Cisplatine
miR-34a	Inhibition de la prolifération.	HDAC1.	Cisplatine
miR-34a-5p	Inhibition de la prolifération et de la phase G1 du cycle cellulaire.	PD-L1.	Cisplatine
miR-98-5p	Promotion de la résistance médicamenteuse.	mir-98-5P/ Dicer1/ miR-152.	Cisplatine
miR-136	Inhibition de la prolifération.	Notch3.	Paclitaxel
miR-142-5p	Inhibition de la résistance médicamenteuse.	XIAP, BIRC3, BCL2, BCL2L2 et MCL1.	Cisplatine
miR-206	Inhibition de la prolifération et du processus métastatique.	Voie de signalisation c-Met/ AKT/ mTOR.	Cisplatine
miR-338-3p	Inhibition de la prolifération, de la motilité et de l'TEM.	WNT2B.	Cisplatine
miR-383-5p	Suppresseur de tumeur.	TRIM27.	Paclitaxel
miR-503-5p	Inhibition de l'angiogénèse et croissance tumorale.	Voie de signalisation médiée par CD97 sur JAK2/STAT3.	Paclitaxel
miR-509-3p	Augmentation de la sensibilité médicamenteuse.	GOLPH3 et WLS.	Platine
miR-708	Inhibition du processus métastatique.	IGF2BP1/ Akt.	Cisplatine
miR-744-5p	Promotion de l'apoptose cellulaire.	NFIX et HNRNPC.	Carboplatine
miR-1246	Promotion de la croissance tumorale.	Axe Cav1/ p-gp/ macrophage de type M2.	Paclitaxel
miR-1307	Affecte la dynamique du cycle cellulaire.	CIC.	Paclitaxel

TABLE 2.6 – Tableau résumant les essais cliniques avec les checkpoints immunitaires actuels dans les cancers de l'ovaire [151-154].

Combinaison	Essai / NCT	Phase	Population / Contexte	Résultat / Objectifs
Nivolumab (anti-PD-1)	NCT02440425	II	Cancer de l'ovaire récidivant platine-résistant.	ORR 15 %, PFS médiane 3,5 mois, quelques réponses durables.
Avelumab (anti-PD-L1)	JAVELIN Ovarian 200 (NCT02580058)	III	Cancer de l'ovaire platine-résistant, Avelumab ± doxorubicine vs doxorubicine seule.	Pas de bénéfice significatif PFS/OS, mais sous-groupes PD-L1+ à explorer.
Atezolizumab (anti-PD-L1) + Bevacizumab (anti-VEGF) + chemo	IMagyn050 (NCT03038100)	III	HGSOC en 1ère ligne (platine-sensible).	Ajout Atezolizumab n'améliore pas PFS globalement, mais signaux dans PD-L1+.
Durvalumab (anti-PD-L1) + Olaparib (iPARP) ± Bevacizumab (anti-VEGF)	MEDIOLA (NCT02734004)	II	Cancer de l'ovaire platine-sensible, BRCA-muté.	ORR ∼71 % avec triple combo, PFS médiane ∼14 mois.
Pembrolizumab (anti-PD-1)	KEYNOTE-100 (NCT02674061)	II	Cancer de l'ovaire récidivant.	ORR 8–10 %, meilleures réponses si PD-L1 CPS ge10.
Niraparib (iPARP) + Pembrolizumab (anti-PD-1)	TOPACIO/ KEYNOTE-162 (NCT02657889)	I/II	Cancer de l'ovaire platine-résistant, HRD+ ou BRCA mutés enrichis.	ORR 18 %, CBR 65 %, bénéfice surtout HRD+.
Nivolumab (anti-PD1) + Ipilimumab (anti-CTLA-4)	NCT02498600	II	Cancer de l'ovaire sous récidive résistante.	ORR 31 % (combo) vs 12 % (Nivo seul), mais toxicités ↑.

2.3 La voie PI3K-PTEN-AKT-mTOR dans le cancer de l'ovaire

Dans l'ensemble, malgré l'importance centrale de la voie PI3K–PTEN–AKT–mTOR dans la tumorigenèse ovarienne et sa contribution démontrée à la résistance aux traitements conventionnels, les avancées thérapeutiques ciblant cette cascade demeurent limitées. Les essais cliniques réalisés à ce jour montrent des résultats hétérogènes, avec des réponses souvent modestes ou restreintes à des sous-groupes de patientes, en particulier celles présentant des altérations moléculaires spécifiques (comme les mutations *BRCA* ou des anomalies de PTEN/AKT). Les données du tableau 2.7 illustrent cette diversité d'approches : si certains inhibiteurs d'AKT ou de mTOR ont permis d'obtenir des réponses partielles ou une stabilisation de la maladie, les bénéfices restent généralement transitoires et rarement transformateurs en termes de survie globale.

Ces limites renforcent la nécessité de mieux caractériser la voie PI3K/AKT et d'identifier les mécanismes de résistance associés, afin de définir des combinaisons thérapeutiques rationnelles susceptibles d'amplifier l'efficacité clinique. Des stratégies intégrant des inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR avec la chimiothérapie, les anti-angiogéniques ou encore des inhibiteurs de PARP pourraient offrir des perspectives plus prometteuses, à condition d'être guidées par une

compréhension fine des altérations moléculaires propres à chaque tumeur. Ainsi, même si les résultats actuels demeurent limités, les données disponibles soulignent le potentiel thérapeutique de cette voie et la nécessité d'approfondir son exploration pour développer des options ciblées réellement efficaces chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire [151, 155-159].

Combinaison	Essai / NCT	Phase	Population / Contexte	Résultat / Objectifs
Afuresertib (Inhibiteur d'AKT)	NCT02091141	I/II	Cancer de l'ovaire récidivant ou résistant au platine.	ORR ∼32 %, PFS médiane 7,1 mois.
Uprosertib (GSK-2141795, inhibiteur d'AKT)	NCT01370276	I	Cancer de l'ovaire récurrent ou persistant.	CBR 27 % (RECIST), 30 % selon CA125.
MK-2206 (Inhibiteur d'AKT)	NCT01294306	II	Cancer de l'ovaire récurrent.	Maladie stable chez plusieurs patientes, PFS médiane 19 semaines.
Capivasertib (AZD5363, inhibiteur d'AKT inhibitor) + Olaparib (iPARP)	NCT02208375	I	Cancers ovariens incluant BRCA muté.	CBR 44,6 %, CR/PR ou SD ≥4 mois.
Everolimus (Inhibiteur de mTOR) + Bevacizumab (anti-VEGF)	NCT01509909 (RADBEV)	II	Cancers ovariens récurrents/peritoniens.	24 % patientes sans progression à 6 mois, CR 1, PR 6, SD 35.
Temsirolimus (Inhibiteur de mTOR) + chimiothérapie	NCT01007942	II	Carboplatine, docétaxel ou paclitaxel.	CR jusqu'à 31 %, PR jusqu'à 65 % selon cohortes.
BI-860585 (Inhibiteur de mTORC1/mTORC2)	NCT01981850	I	Cancers solides incluant ovaire.	En développement, sécurité et activité initiale évaluées.
CC-115 (Inhibiteur de mTOR/DNA-PK)	NCT01353625	I	Cancers solides incluant ovaire.	Maladie stable dans certains cas, sécurité évaluée.
Gedatolisib (PF-05212384, duo PI3K/mTOR)	Divers	Précoce	Cancers solides (non spécifiques à l'ovaire).	Développements précoces, monothérapie ou combos.
Autres PI3Ki (Apitolisib, Bimiralisib, Eganelisib)	Divers	II	Tumeurs solides.	En développement, certains essais sont arrêtés.

TABLE 2.7 – Tableau résumant les essais cliniques ciblant la voie PI3K/PTEN/AKT/mTOR dans les cancers de l'ovaire [151, 155-159].

Chapitre 3

Cancer de l'endomètre

Ce chapitre est inspiré grandement de la publication de la revue de littérature d'octobre 2025 [160].

3.1 Introduction.

Le cancer de l'endomètre (CE) est aujourd'hui la tumeur maligne gynécologique la plus fréquente dans les pays développés, avec une incidence en constante augmentation au cours des dernières décennies [161]. Cette tendance s'explique en partie par le vieillissement de la population, mais également par l'évolution des modes de vie et l'augmentation de la prévalence de facteurs de risques métaboliques tels que l'obésité, le diabète et l'hypertension [162]. À l'échelle mondiale, plus de 400 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, et environ 90 000 patientes en décèdent, ce qui confère au CE une importance croissante en santé publique [163].

La majorité des patientes sont diagnostiquées à un stade précoce, en raison de symptômes d'alerte généralement favorable, avec un taux de survie à 5 ans supérieur à 80% [164]. Cependant, 15 à 20% des patientes présentent des formes agressives, souvent de type non-endométrioïde (séreux, à cellules claires, carcino-sarcomes), associées à un risque élevé de récidive et une survie nettement inférieure [165]. Cette dualité entre formes « indolentes » et formes « agressives » illustre la complexité biologique du CE et la nécessité d'une stratification plus fine.

3.1.1 Facteurs de risque et enjeux de prévention.

Le CE est une maladie multi-factorielle, résultant d'interactions entre prédispositions génétiques, facteurs hormonaux et environnementaux. Parmi les facteurs génétiques, le syndrome de Lynch (HNPCC) occupe une place majeure : il est associé à un risque cumulé de CE de 40 à 60%, lié à des mutations germinales dans les gènes de réparation des mésappariements (MMR) [166]. D'autres syndromes plus rares, tels que le syndrome de Cowden (mutations de

PTEN) ou le PPAP (mutations de POLD1 et POLE), contribuent également au risque héréditaire [167].

Sur le plan hormonal, l'exposition prolongée aux œstrogènes non contrebalancés par la progestérone constitue un déterminant essentiel du risque de CE [168]. Ce mécanisme explique le sur-risque observé chez les femmes présentant une anovulation chronique (syndrome des ovaires polykystiques, SOPK), une ménarche précoce ou une ménopause tardive, ainsi que chez celles traitées par tamoxifène [169]. L'obésité, quant à elle, exerce un double effet délétère : augmentation de l'aromatisation périphérique des androgènes en œstrogènes et état inflammatoire chronique, qui favorise l'instabilité génomique et la prolifération cellulaire [170]. Enfin, l'influence de perturbateurs endocriniens (bisphénol A, phtalates) et de pathologies bénignes comme l'endométriose et les fibromes utérins fait l'objet d'investigations croissantes [40].

3.1.2 De la classification histologique à la classification moléculaire.

Historiquement, le CE était classé selon la dichotomie de Bokhman (1983) distinguant les tumeurs de type I (endométrioïdes, hormono-dépendantes, pronostic favorable) et de type II (non-endométrioïdes, non hormono-dépendantes, pronostic défavorable) [171]. Si cette classification a longtemps servi de cadre, elle s'est avérée insuffisante pour expliquer l'hétérogénéité clinique observée, certaines tumeurs de type I présentant des comportements agressifs et inversement.

La classification histologique de l'OMS, basée sur la morphologie (endométrioïde, séreux, à cellules claires, carcinosarcome), et la classification FIGO, basée sur l'extension tumorale, restent aujourd'hui utilisées en pratique clinique pour guider la prise en charge [172]. Toutefois, leur valeur pronostique est limitée par la subjectivité de l'évaluation et par le chevauchement phénotypique entre les sous-types.

Une avancée majeure est survenue avec les analyses moléculaires du *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) en 2013, qui ont permis d'identifier quatre sous-groupes distincts [173] :

- POLE ultramuté, caractérisé par des mutations dans la polymérase epsilon, un taux de mutation extrêmement élevé et un excellent pronostic ;
- MSI hypermuté, lié à des déficits du système MMR, avec un pronostic intermédiaire ;
- *Copy-number low* (p53 *wild-type*), correspondant majoritairement aux tumeurs endométrioïdes de bas grade ;
- *Copy-number high* (p53 muté), comprenant principalement les carcinomes séreux et associée au plus mauvais pronostic.

Cette classification a transformé l'approche du CE, en introduisant une stratification moléculaire à la fois pronostique et prédictive. Des initiatives comme ProMisE (*Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer*) cherchent désormais à simplifier et intégrer ces marqueurs dans la routine

clinique [174].

3.1.3 Enjeux thérapeutiques et translationnels.

Sur le plan thérapeutique, la chirurgie (hystérectomie totale avec salpingo-ovariectomie) et la radiothérapie adjuvante demeurent les standards des formes précoces [175]. En revanche, la prise en charge des stades avancés ou métastatiques reste un défi : la chimiothérapie conventionnelle (carboplatine-paclitaxel) offre une efficacité limitée et les options de seconde ligne sont rares [176].

Dans ce contexte, les immunothérapies (anti-PD-1/PD-L1) et les thérapies ciblées (inhibiteurs de PI3K, AKT, mTOR, FGFR ou HER2) suscitent un intérêt croissant [177, 178]. Néanmoins, les réponses thérapeutiques demeurent hétérogènes, reflétant l'hétérogénéité biologique du CE et soulignant la nécessité de bio-marqueurs prédictifs robustes.

Ainsi, le CE illustre parfaitement la nécessité d'une approche intégrée, reliant les apports de la biologie moléculaire aux réalités cliniques. L'enjeu actuel est de faire évoluer cette pathologie d'un paradigme histologique et clinique vers une entité véritablement moléculaire et personnalisée, où les choix thérapeutiques sont guidés par les caractéristiques génétiques et phénotypiques de chaque tumeur.

L'objectif de ce chapitre est de dresser un état des lieux exhaustif de la littérature sur le CE, en présentant ses aspects épidémiologiques, physiopathologiques, diagnostiques et thérapeutiques, avec un accent particulier sur la voie PI3K/AKT/mTOR, altérée dans une majorité de tumeurs. Cette analyse vise à souligner les progrès réalisés mais aussi les défis persistants, et servira de fondement aux travaux expérimentaux développés dans le cadre de cette thèse.

3.2 Contexte épidémiologique et clinique.

3.2.1 Incidence et mortalité dans le monde.

Le CE est la tumeur gynécologique la plus fréquente dans les pays industrialisés et occupe la sixième place parmi les cancers féminins à l'échelle mondiale. Selon les estimations de GLOBOCAN 2020, plus de 417 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués dans le monde et environ 97 000 décès lui étaient attribués [161]. L'incidence est particulièrement élevée en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest, où le CE représente jusqu'à 7% de l'ensemble des cancers féminins [162]. À l'inverse, les pays d'Asie et d'Afrique présentent une incidence plus faible, mais ces régions tendent à connaître une progression rapide liée à la transition démographique et à la « occidentalisation » des modes de vie [163].

Du point de vue de la mortalité, si le pronostic global reste plus favorable que celui d'autres cancers gynécologiques, tels que ceux de l'ovaire ou du col utérin, les taux de survie stagnent depuis plusieurs décennies. Le taux de survie

relative à 5 ans est estimé à environ 83% tous stades confondus, mais chute à moins de 20% pour les formes métastatiques [164]. Cette disparité souligne l'importance d'un diagnostic précoce, favorisé par la présence de symptômes d'alerte comme les métrorragies post-ménopausiques. Toutefois, elle met aussi en évidence les limites des stratégies thérapeutiques actuelles pour les formes avancées ou récidivantes.

3.2.2 Facteurs de risque.

Le développement du CE est influencé par une combinaison de facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux, que nous passons en revue ci-après.

3.2.2.1 Facteurs génétiques.

Le syndrome de Lynch constitue la principale prédisposition héréditaire au CE. Les femmes porteuses d'une mutation germinale dans un gène de réparation des mésappariements (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) présentent un risque cumulé de 40 à 60% au cours de leur vie, ce qui en fait la deuxième localisation tumorale la plus fréquente après le cancer colorectal [165].

D'autres syndromes plus rares, comme le syndrome de Cowden (mutations de PTEN) ou le *polymerase proofreading-associated polyposis* (PPAP, mutations germinales de POLE et POLD1), contribuent également à la susceptibilité génétique au CE [166].

3.2.2.2 Facteurs hormonaux.

Rôle des œstrogènes : Les œstrogènes constituent une famille de stéroïdes qui agissent principalement comme hormones sexuelles féminines. Ils sont produits majoritairement par les follicules ovariens en développement ou par le placenta, mais également en petites quantités par le foie, les glandes surrénales, les tissus mammaires et le tissu adipeux. On distingue trois principaux œstrogènes [179] :

— l'estradiol (E2), dérivé de la testostérone ;
— l'estrone (E1), issu de l'andro-stènedione ;
— l'estriol (E3), produit en plus grande quantité pendant la grossesse.

Leur action est médiée par deux récepteurs intracellulaires, codés par des gènes distincts : ERα et ERβ. Après liaison ligand-récepteur, deux types d'effets peuvent être déclenchés :

— des effets génomiques, impliquant la régulation de l'expression génique ;
— des effets non-génomiques, modulant directement des voies de signalisation protéiques.

Dans le contexte carcinologique, environ 80% des cancers de l'endomètre sont associés à un état d'hyperestrogénie, caractéristique des néoplasmes endométrioïdes. À l'inverse, les tumeurs œstrogéno-indépendantes (séreuses,

p53 mutées, peu différenciées) ne sont pas liées à une hyperplasie préalable et présentent un comportement plus agressif [179].

Rôle de la progestérone : La progestérone (P4) est synthétisée à partir du cholestérol sous le contrôle de la luteinizing hormone (LH). Dans les cellules de la granulosa entourant le follicule ovarien, la P4 peut être convertie en andro-stènedione, testostérone ou estradiol. Sa sécrétion est cyclique : faible en phase folliculaire, elle atteint un pic après l'ovulation grâce à la production du corps jaune.

La P4 exerce plusieurs effets physiologiques en induisant la transformation sécrétoire de l'endomètre. Elle favorise le maintien de la muqueuse utérine, la maturation des glandes endométriales, qui acquièrent leur aspect dentelé caractéristique, ainsi que le maintien des artères spiralées, préparant ainsi l'endomètre à une éventuelle implantation embryonnaire. En l'absence de fécondation, la régression du corps jaune entraîne une chute de la sécrétion de P4, provoquant la vasoconstriction des artères spiralées, la desquamation de la couche fonctionnelle de l'endomètre et, finalement, la menstruation [179].

Dans le cancer de l'endomètre, la progestérone est un facteur protecteur, contrairement aux œstrogènes. Son action anti-prolifération passe par [179] :

— la transcription du gène FOXO1 ;
— l'augmentation de l'expression de IGFBP-1, inhibant la signalisation IGF ;
— la modulation de la voie TGF-β : baisse de SMAD et d'E-cadhérine, hausse de la vimentine, induisant une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui impacte la viabilité des cellules tumorales.

L'expression des récepteurs à la progestérone (PR), induite par l'exposition préalable à l'E2 ou à la P4, constitue donc un marqueur pronostique favorable. Elle conditionne également la réponse aux traitements progestatifs. Restaurer l'expression des PRs dans les tumeurs pourrait représenter une stratégie pour re-sensibiliser certaines patientes à l'hormonothérapie [179, 180].

Déséquilibre hormonal et hyperplasie atypique : Le principal facteur de risque de CE est une exposition prolongée aux œstrogènes non opposés par la progestérone [181]. Plusieurs situations favorisent ce déséquilibre [180] :

— ménarche précoce et/ou ménopause tardive ;
— nulliparité et infertilité ;
— traitement hormonal substitutif à base d'œstrogènes seuls ;
— prise de tamoxifène, qui agit comme anti-œstrogène mammaire mais agoniste utérin.

Ce déséquilibre peut induire une hyperplasie endométriale, définie comme une prolifération excessive des glandes. On distingue plusieurs formes :

— simple ou complexe ;
— avec ou sans atypies.

Bien que la majorité des hyperplasies soient bénignes, la présence d'atypies augmente fortement le risque de progression vers un cancer de l'endomètre

[181-183]. Certaines pathologies gynécologiques bénignes, telles que les fibromes utérins ou l'endométriose, ont également été étudiées pour leur possible association avec le risque de cancer de l'endomètre. Toutefois, les données demeurent controversées et aucun lien de causalité n'a été clairement établi [170].

Perturbateurs endocriniens : Les perturbateurs endocriniens (PEs) sont des composés chimiques exogènes qui interfèrent avec le système hormonal. Plusieurs molécules sont suspectées de jouer un rôle dans le CE :

- le bisphénol A (BPA) et ses dérivés, qui agissent comme agonistes des récepteurs aux œstrogènes et induisent une activation proliférative anormale [184] ;
- les phtalates et plastifiants, associés à des effets pro-œstrogéniques et pro-inflammatoires dans des modèles expérimentaux ;
- les pesticides organo-chlorés et autres composés persistants, qui pourraient perturber l'équilibre hormonal endométrial.

Bien que les preuves épidémiologiques humaines soient encore limitées et parfois contradictoires, les PEs sont de plus en plus considérés comme un facteur de risque environnemental émergent pour le CE. Leur rôle exact nécessite des études prospectives de grande ampleur.

3.2.2.2.1 Facteurs métaboliques et modifiables : L'obésité est considérée comme le facteur de risque le plus important et le plus modifiable du CE. Chaque augmentation de 5 unités de l'indice de masse corporelle (IMC) est associée à une augmentation de 50% du risque de développer la maladie [40]. L'aromatisation périphérique des androgènes en œstrogènes dans le tissu adipeux, combinée à un état inflammatoire chronique et à une hyper-insulinémie, crée un environnement pro-tumoral [171].

Le diabète de type 2 et le syndrome métabolique sont également impliqués, renforçant le rôle de l'axe insuline/IGF-1 dans la carcinogenèse endométriale [172]. Enfin, les modes de vie sédentaires, l'alimentation hyper-calorique et la consommation d'alcool constituent des co-facteurs modifiables sur lesquels reposent les stratégies de prévention primaire.

3.3 Physiopathologie et classifications.

3.3.1 Bases physiopathologiques.

Le développement du CE repose sur une séquence d'événements allant de l'hyperplasie endométriale à la transformation maligne. Dans les formes de type endométrioïde, l'exposition chronique aux œstrogènes non contrebalancés par la progestérone entraîne une prolifération épithéliale excessive, pouvant évoluer vers une hyperplasie atypique (ou néoplasie intra-épithéliale endométriale, EIN), considérée comme une lésion pré-cancéreuse [185]. La progression vers

un carcinome invasif s'accompagne de l'accumulation de mutations somatiques et d'altérations épigénétiques qui perturbent l'homéostasie cellulaire.

À l'inverse, les formes séreuses et à cellules claires semblent suivre une voie carcinogénique distincte, indépendante des hormones, caractérisée par une instabilité chromosomique marquée et une forte fréquence de mutations de TP53 [186]. Cette dualité physio-pathologique a longtemps été conceptualisée par la classification de Bokhman (1983) distinguant :

Type I : endométrioïdes, hormono-dépendants, développés sur un endomètre hyperplasique, pronostic relativement favorable [171] ;

Type II : séreux et à cellules claires, non hormono-dépendants, survenant souvent sur un endomètre atrophique, à pronostic défavorable [171].

Bien que cette dichotomie ait marqué une étape importante, elle ne rend pas compte de l'hétérogénéité intra-groupe, ce qui a conduit à l'émergence des classifications moléculaires.

3.3.2 Classification FIGO (stades cliniques).

La classification FIGO (révision 2009) reste la référence pour évaluer l'extension tumorale et guider la stratégie thérapeutique [173]. Elle se compose de 4 stades :

Stade I : tumeur limitée au corps utérin, avec deux sous catégories :

IA : envahissement $< 50\%$ du myomètre.

IB : envahissement $\geq 50\%$ du myomètre

Stade II : extension au col utérin (stroma cervical).

Stade III : extension locale ou régionale (séreuse, annexes, vagin, ganglions pelviens/para-aortiques).

Stade IV : atteinte de la vessie, du rectum ou métastases à distance.

Cette classification reste prédictive du pronostic, mais elle ignore les spécificités biologiques et moléculaires des tumeurs [173].

3.3.3 Classification histologique (OMS).

Selon la classification histologique de l'OMS, le CE se divise en plusieurs sous-types [174] :

— Carcinome endométrioïde (70–80% des cas) ;
— Carcinome séreux (10–15%), agressif, associé à TP53 ;
— Carcinome à cellules claires ($< 5\%$) ;
— Carcinosarcome (MMMT), très agressif ;
— Sous-types plus rares : mucineux, squameux, mixtes.

L'évaluation du grade (1 à 3, basé sur la proportion de différenciation glandulaire) complète cette classification. Toutefois, la reproductibilité inter-observateur reste faible, et de nombreuses tumeurs présentent des phénotypes mixtes [174].

3.3.4 Classification moléculaire (TCGA et ProMisE).

La révolution moléculaire introduite par le TCGA (2013) a permis d'identifier quatre groupes distincts [176] :

— POLE ultramuté : pronostic excellent ;
— MSI hypermuté : instabilité microsatellite, pronostic intermédiaire ;
— *Copy-number low* (p53 WT) : endométrioïdes de bas grade, pronostic favorable ;
— *Copy-number high* (p53 muté) : séreux/endométrioïdes haut grade, pronostic défavorable.

Le modèle ProMisE transpose cette classification en pratique clinique grâce à l'immunohistochimie (MMR, p53) et au séquençage ciblé de POLE [178].

3.3.5 Altérations moléculaires associées au cancer de l'endomètre.

Le profil moléculaire du cancer de l'endomètre est particulièrement riche et complexe, marqué par l'accumulation de mutations somatiques, de pertes de gènes suppresseurs et de dérégulations épigénétiques. Ces altérations varient selon le sous-type histologique et moléculaire, influençant directement le pronostic et les réponses thérapeutiques.

3.3.5.1 PTEN.

Le gène PTEN, situé sur le chromosome 10q23, est l'un des suppresseurs de tumeur les plus fréquemment mutés dans le CE. Des altérations (mutations inactivatrices, délétions, perte d'expression) sont retrouvées dans 50 à 80% des carcinomes endométrioïdes [175, 176, 178].

PTEN code une phosphatase à double spécificité (lipides et protéines) qui régule négativement la voie PI3K/AKT/mTOR en déphosphorylant le phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) en phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2). Sa perte entraîne une activation constitutive de la signalisation PI3K, favorisant la prolifération, la survie cellulaire et la résistance aux signaux apoptotiques.

Sur le plan physio-pathologique, la perte de PTEN est considérée comme un événement précoce de la carcinogenèse endométriale. Elle est fréquemment observée dans les hyperplasies atypiques, renforçant son rôle dans la transition entre lésions bénignes et cancer invasif [175, 176, 178].

3.3.5.2 PIK3CA et PI3KR1.

Le gène PIK3CA, qui code pour la sous-unité catalytique p110α de la PI3K, est muté dans environ 40% des CE, souvent en association avec des mutations de PTEN [185-187]. Ces mutations sont majoritairement localisées dans les exons 9 et 20 (domaines hélicase et kinase), entraînant une activation constitutive de la voie PI3K.

De même, des mutations ou délétions de PIK3R1, codant pour la sous-unité régulatrice p85α, sont retrouvées dans environ 20% des CE [185-187]. Ces altérations renforcent la dérégulation de la signalisation PI3K/AKT, contribuant à l'agressivité tumorale.

3.3.5.3 AKT.

Le gène AKT (ou PKB, *protein kinase B*) possède trois isoformes : AKT1, AKT2 et AKT3. Des mutations activatrices ponctuelles d'AKT1 (notamment E17K) sont observées dans 2 à 3% des CE [186, 187]. Bien que relativement rares, elles entraînent une activation constitutive de la voie et ont été associées à des résistances thérapeutiques. Les isoformes d'AKT semblent jouer des rôles distincts :

— AKT1 est principalement impliqué dans la croissance et la survie cellulaire ;
— AKT2 dans le métabolisme et la migration ;
— AKT3 dans la régulation transcriptionnelle et la plasticité cellulaire.

L'étude spécifique des isoformes constitue un champ de recherche en plein essor, notamment dans le contexte de la résistance aux inhibiteurs ciblant la voie PI3K/AKT/mTOR [186, 187].

3.3.5.4 mTOR.

La protéine mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) est un régulateur central du métabolisme et de la croissance cellulaire. Si les mutations directes de MTOR sont rares dans le CE, son activation aberrante est fréquente, conséquence des altérations de PTEN, PIK3CA et AKT [186, 187].

L'activation de mTOR stimule la biosynthèse protéique, la croissance cellulaire et l'angiogenèse. Elle est corrélée à un pronostic défavorable et constitue une cible thérapeutique majeure, bien que les inhibiteurs de mTOR (rapalogues) aient montré une efficacité limitée en monothérapie en raison de mécanismes de rétro-activation [186, 187].

3.3.5.5 KRAS et voie MAPK.

Des mutations activatrices de KRAS (exons 2 et 3) sont retrouvées dans 15 à 25% des CE, principalement dans les tumeurs endométrioïdes [188]. Ces altérations activent la voie RAS/RAF/MEK/ERK, favorisant la prolifération et la survie.

L'importance clinique de KRAS dans le CE reste discutée : certaines études l'associent à un pronostic défavorable, tandis que d'autres suggèrent une interaction avec la voie PI3K/AKT, renforçant la complexité des réseaux de signalisation [189, 190].

3.3.5.6 ARID1A et remodelage de la chromatine.

Le gène ARID1A, membre du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine, est muté ou délété dans environ 30% des CEs [191]. Ces altérations perturbent l'architecture chromatinienne et modifient l'expression de gènes liés à la différenciation et à la réparation de l'ADN.

La perte d'ARID1A est fréquemment associée aux mutations de PTEN et PIK3CA, suggérant une coopération entre dérégulation épigénétique et activation de la voie PI3K [192, 193].

3.3.5.7 CTNNB1 et voie WNT/β-caténine.

Les mutations du gène CTNNB1, codant la β-caténine, sont retrouvées dans 20 à 25% des CEs endométrioïdes de bas grade [194]. Ces mutations, localisées dans l'exon 3, empêchent la dégradation de la β-caténine et conduisent à son accumulation nucléaire, où elle active des programmes transcriptionnels oncogéniques (MYC, CCND1).

Cliniquement, les mutations de CTNNB1 sont associées à un risque accru de récidive, même dans les tumeurs classées à faible risque selon les critères histo-cliniques. Elles constituent donc un biomarqueur potentiel de sous-stratification [195].

3.3.5.8 TP53.

Le gène TP53 est muté dans pratiquement tous les carcinomes séreux et dans une proportion significative d'endométrioïdes de haut grade. Ces mutations entraînent une perte de fonction de la protéine p53, « gardienne du génome », favorisant l'instabilité chromosomique et la résistance à l'apoptose [18].

Dans la classification TCGA, les tumeurs p53 mutées correspondent au groupe « *copy-number high* », caractérisé par un comportement clinique particulièrement agressif et un pronostic défavorable [196].

3.3.5.9 Autres altérations émergentes.

Des études récentes ont identifié d'autres gènes récurrents dans le CE :

— FGFR2 : mutations activatrices dans 10–15% des CEs, associées à une activation aberrante de la signalisation FGFR [190] ;
— POLE : mutations dans le domaine exonucléase, caractéristiques du sous-type « ultramuté », de très bon pronostic [18, 196] ;
— MMR genes (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) : altérations responsables du phénotype MSI, prédictives de réponse à l'immunothérapie [19, 170, 197].

3.3.5.10 Synthèse et implications cliniques.

Le CE se caractérise par une hétérogénéité moléculaire marquée, où coexistent des altérations touchant les voies de signalisation (PI3K/AKT/mTOR, MAPK, WNT, p53), les gènes de réparation de l'ADN (MMR, POLE) et le remodelage chromatinien (ARID1A).

Cette diversité explique les différences de pronostic et de réponse aux traitements entre patientes et justifie pleinement l'intégration des données moléculaires dans la pratique clinique. Elle souligne également la nécessité de stratégies thérapeutiques combinatoires capables de cibler simultanément plusieurs voies oncogéniques.

La combinaison des classifications histo-cliniques et moléculaires permet aujourd'hui une stratification pronostique beaucoup plus fine. Les implications sont majeures :

— Désescalade thérapeutique pour les patientes POLE ultramutées (excellent pronostic) ;
— Utilisation de l'immunothérapie pour les tumeurs MSI hypermutées (sensibles aux inhibiteurs de PD-1) ;
— Intensification thérapeutique pour les patientes du groupe p53 muté ;
— Identification de nouvelles cibles moléculaires (PI3K, AKT, mTOR, WNT, p53).

Ainsi, la compréhension physio-pathologique du CE évolue vers une approche intégrative qui combine données histologiques, cliniques et moléculaires, afin d'optimiser la prise en charge et de préparer l'ère de la médecine personnalisée [175, 176, 178, 185-189, 192, 193, 195, 196].

3.3.6 Interactions entre voies moléculaires dans le cancer de l'endomètre.

Le CE ne résulte pas d'une altération isolée mais d'un réseau complexe d'interactions entre différentes voies de signalisation. Ces interconnexions expliquent en partie la variabilité clinique et la difficulté à cibler efficacement la maladie avec des thérapies spécifiques.

3.3.6.1 PI3K/AKT/mTOR et MAPK : convergence de la signalisation prolifératives.

La voie PI3K/AKT/mTOR est activée dans plus de 80% des CE, mais elle interagit étroitement avec la voie RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) [198]. Les mutations de KRAS peuvent stimuler simultanément les deux cascades, renforçant la prolifération et la survie cellulaire. Cette redondance explique la résistance observée face aux inhibiteurs ciblant une seule voie : le blocage de PI3K peut être compensé par une activation parallèle de MAPK, et inversement [199].

3.3.6.2 PI3K et WNT/β-caténine : coopération tumorale.

Les mutations de PTEN/PIK3CA et de CTNNB1 coexistent fréquemment dans les CEs endométrioïdes. L'activation de la voie PI3K favorise la survie, tandis que la stabilisation de la β-caténine induit des programmes transcriptionnels oncogéniques. Des travaux ont montré que la β-caténine nucléaire pouvait directement potentialiser l'expression de gènes cibles d'AKT, renforçant ainsi la progression tumorale [200]. Cette synergie confère aux tumeurs un potentiel invasif et métastatique accru.

3.3.6.3 ARID1A et p53 : remodelage de la chromatine et instabilité génomique.

La perte d'ARID1A perturbe le complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine, augmentant la vulnérabilité cellulaire à d'autres mutations oncogéniques [172]. Dans les CEs séreux et certains endométrioïdes de haut grade, cette perte coexiste souvent avec des mutations de TP53, créant un environnement hautement instable sur le plan génomique. Cette combinaison favorise une plasticité tumorale importante et une résistance aux stress génotoxiques, ce qui complique les stratégies thérapeutiques [201].

3.3.6.4 MMR, POLE et immunogénicité.

Les altérations des gènes du système de réparation des mésappariements (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) et les mutations de POLE confèrent un phénotype hypermuté. Ces anomalies génèrent un fort taux de néoantigènes, stimulant la réponse immunitaire et expliquant la sensibilité accrue de ces tumeurs aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (anti-PD-1/PD-L1) [202]. L'immunogénicité constitue donc une dimension fonctionnelle clé reliant altérations moléculaires et réponse thérapeutique.

3.3.6.5 Réseaux d'interaction et résistance thérapeutique.

Ces interactions moléculaires expliquent pourquoi de nombreuses stratégies ciblées échouent lorsqu'elles visent une voie unique. La plasticité tumorale permet aux cellules cancéreuses de contourner l'inhibition pharmacologique en activant des voies alternatives. Par exemple :

— inhibition de PI3K $\rightarrow$ activation compensatoire de MAPK [203] ;
— inhibition de mTOR $\rightarrow$ rétro-activation d'AKT [203] ;
— inhibition de WNT $\rightarrow$ renforcement de PI3K [203].

Cette inter-dépendance justifie le développement de thérapies combinatoires et l'identification de bio-marqueurs de dépendance tumorale, afin de mieux cibler les vulnérabilités spécifiques de chaque sous-type moléculaire.

3.3.7 Altérations épigénétiques et microARNs dans le cancer de l'endomètre.

Outre les mutations somatiques et les altérations chromosomiques, le CE est marqué par de profondes modifications épigénétiques et transcriptionnelles. Ces changements, réversibles mais transmissibles lors de la division cellulaire, participent à la dérégulation des réseaux de signalisation oncogéniques et constituent des biomarqueurs et cibles thérapeutiques potentiels.

3.3.7.1 Méthylation de l'ADN.

La méthylation aberrante des promoteurs est un mécanisme fréquent d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Dans le CE, la méthylation du promoteur de MLH1 est la cause principale de l'instabilité micro-satellite (MSI) dans les formes sporadiques, aboutissant à un défaut de réparation des mésappariements [181].

D'autres gènes suppresseurs, comme PTEN, RASSF1A ou CDH1, peuvent également être inactivés par méthylation dans certains sous-types de CE [182]. Cette dérégulation contribue à la progression tumorale et à l'acquisition de phénotypes plus agressifs.

3.3.7.2 Modifications des histones.

Les histones, protéines essentielles de l'organisation chromatinienne, peuvent subir des modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, phosphorylation) qui influencent l'accessibilité de la chromatine et donc l'expression des gènes.

Dans le CE, une hypo-acétylation des histones H3 et H4 a été associée à une progression tumorale et à une résistance aux traitements [162]. L'inactivation de complexes de remodelage, tels que SWI/SNF (via ARID1A), renforce ces anomalies et participe à une dérégulation globale de l'expression génique [184].

Ces observations justifient l'exploration des inhibiteurs d'histone désacétylases (HDACi) et des inhibiteurs de méthyl-transférases comme nouvelles approches thérapeutiques.

3.3.7.3 Rôle des microARN (miARN).

OncomiRs et suppresseurs classiques :

- miR-21 : surexprimé ; cible PTEN et PDCD4 → activation de PI3K/AKT, prolifération, inhibition de l'apoptose [204, 205].
- Famille miR-200 (miR-200a/b/c, miR-141, miR-429) : régule l'EMT via ZEB1/ZEB2 ; leur perte favorise l'invasion [206].
- miR-34a : cible transcriptionnelle de p53, souvent sous-exprimé → perte des effets pro-apoptotiques [207].
- miR-182 : surexprimé, favorise invasion et migration [208].

— Famille let-7 : sous-exprimée, régule RAS ; sa perte favorise la prolifération [209].

Interaction avec la signalisation hormonale : Les miRNAs participent également à la régulation de la signalisation œstrogénique dans le CE.
Plusieurs miRNA — notamment miR-18a, miR-22, miR-206, miR-221 et miR-222 — se lient directement à la région 3'UTR de l'ARNm du récepteur aux œstrogènes alpha (ERα), diminuant sa stabilité et sa traduction [204, 210, 211].

— La dérégulation de ces miRNAs peut être induite par des traitements tels que le tamoxifène ou par l'exposition à des perturbateurs endocriniens, modifiant l'expression des gènes dépendants des œstrogènes.
— Ce mécanisme contribue potentiellement à la carcinogenèse endométriale, en perturbant l'équilibre entre stimulation proliférative œstrogénique et effets protecteurs de la progestérone.
— Certains profils de miARNs sont corrélés au pronostic et à la résistance thérapeutique, notamment vis-à-vis de la chimiothérapie et de l'hormonothérapie [211].

3.3.7.4 Long non-coding RNAs (lncRNAs) et autres ARN non codants.

Au-delà des miARNs, les longs ARN non codants (lncRNAs), comme HOTAIR et MALAT1, sont impliqués dans le CE. Ils participent à la régulation épigénétique, à l'organisation de la chromatine et à la modulation des voies oncogéniques. Leur surexpression est souvent associée à un pronostic défavorable et à une augmentation de l'invasion tumorale [204].

3.3.7.5 Implications cliniques et thérapeutiques.

Les altérations épigénétiques et les miARNs offrent un potentiel considérable comme :

— Bio-marqueurs diagnostiques : Des panels de miRNAs discriminent CE vs endomètre normal dans les tissus, et des signatures circulantes (plasma/sérum) sont prometteuses pour un dépistage non-invasif. Cependant, l'hétérogénéité des méthodologies et l'absence de validation large limitent leur usage clinique [184, 211] contrairement à par exemple la méthylation de MLH1 pour identifier les CE sporadiques MSI.
— Bio-marqueurs pronostiques : signatures de miARNs corrélées au risque de récidive. Une sur-expression de miR-21 et miR-182 est associée à un risque accru de récidive et à une survie réduite [204, 208]. À l'inverse, une forte expression de miR-34a ou let-7 est corrélée à un meilleur pronostic [209, 212]. Certaines signatures miRNA pourraient prédire la réponse aux progestatifs ou à la chimiothérapie, mais restent à confirmer [205].

— Cibles thérapeutiques : développement d'HDACi, d'inhibiteurs de DNMT, de thérapies à base d'ARN mimétiques (exemple du miR-34a) ou anti-miARN (exemple de l'anti-miR-21). Les résultats pré-cliniques sont encourageants mais l'application clinique reste limitée, notamment à cause de problèmes de délivrance et de toxicité [213].

L'intégration des données épigénétiques et des profils d'ARN non codants complète la vision génomique du CE et ouvre la voie à des approches thérapeutiques novatrices.

3.3.8 Conclusion de la section physiopathologie et classifications.

La compréhension du CE a considérablement évolué, passant d'une dichotomie simplifiée (types I et II) à une vision intégrative, dans laquelle se superposent les classifications histologiques, cliniques et moléculaires. L'accumulation de mutations affectant PTEN, PIK3CA, AKT, ARID1A, CTNNB1 ou TP53, combinée aux déficits de réparation de l'ADN (MMR, POLE), dessine un paysage tumoral hétérogène et dynamique.

Ces interactions complexes entre voies de signalisation conditionnent le pronostic, la réponse thérapeutique et les stratégies de médecine personnalisée. Le défi actuel est d'exploiter cette complexité pour transformer la prise en charge clinique, en intégrant systématiquement les signatures moléculaires dans la stratification et les décisions thérapeutiques.

3.4 Diagnostic du cancer de l'endomètre.

3.4.1 Présentation clinique.

Le CE se distingue par un symptôme d'appel fréquent et relativement spécifique : les saignements utérins anormaux, notamment les métrorragies post-ménopausiques. Environ 90% des patientes atteintes de CE consultent pour ce motif, ce qui explique que plus de 70% des cas soient diagnostiqués à un stade précoce (FIGO I) [205, 214].

Chez la femme non-ménopausée, le tableau est plus hétérogène, incluant des règles abondantes (ménorragies), des saignements inter-menstruels ou une aménorrhée prolongée. La présence de leucorrhées séreuses ou hémorragiques, de douleurs pelviennes ou de symptômes compressifs (vessie, rectum) sont des signes plus tardifs, souvent liés à une extension tumorale [206, 215].

Toutefois, certaines formes histologiques agressives, en particulier les carcinomes séreux, peuvent rester asymptomatiques jusqu'à un stade avancé, soulignant les limites du diagnostic précoce basé uniquement sur la clinique [212].

3.4.2 Méthodes de détection et d'évaluation.

3.4.2.1 Examen clinique et gynécologique.

L'examen pelvien est souvent normal dans les formes précoces, mais peut révéler une masse intra-utérine, une augmentation du volume utérin ou une extension cervicale dans les cas avancés. Le frottis cervico-utérin (Pap test), efficace pour le dépistage du cancer du col, n'a pas de valeur pour le CE, avec une sensibilité inférieure à 50% [208, 216].

3.4.2.2 Biopsie endométriale et hystéroscopie.

La biopsie endométriale constitue l'examen de référence. Elle peut être réalisée par aspiration en consultation (pipelle de Cornier) avec une sensibilité de 91–99% et une spécificité proche de 100% [18, 209]. Le curetage utérin, plus invasif, conserve une place lorsque l'aspiration est non contributive. L'hystéroscopie diagnostique permet une exploration visuelle de la cavité et un prélèvement dirigé. Sa sensibilité est estimée entre 94 et 97% et sa spécificité entre 88 et 96% [213, 217]. Elle est particulièrement utile pour les lésions focales ou en cas de discordance clinique-histologique.

3.4.2.3 Imagerie médicale.

L'imagerie est indispensable au bilan d'extension et à la planification thérapeutique. Les différentes techniques sont :

- Échographie transvaginale (ETV) : examen de première intention. Une épaisseur endométriale > 4–5 mm chez la femme ménopausée symptomatique doit alerter [218]. Sa sensibilité pour le CE varie entre 90 et 95%, mais sa spécificité reste limitée (50–70%) [219] ;
- IRM pelvienne : l'imagerie de choix pour évaluer la profondeur d'invasion myométriale et l'atteinte cervicale. La précision est $> 85\%$ pour l'infiltration myométriale et $> 90\%$ pour l'extension cervicale [205, 220] ;
- TDM thoraco-abdomino-pelvien : utile pour rechercher des métastases pulmonaires, hépatiques ou ganglionnaires ;
- TEP-Scan au FDG : sensible pour la détection des métastases et récidives, mais peu spécifique. Son rôle en évaluation initiale reste discuté [18, 221].

Un résumé des méthodes diagnostiques du cancer de l'endomètre ainsi que de leurs particularités, afin que les comparaisons soient plus simples à visualiser, est présenté dans le tableau 3.1.

3.4.2.4 Marqueurs biologiques et moléculaires.

Aucun bio-marqueur sérique validé n'existe pour le dépistage du CE. Le CA125 peut être élevé dans 30–50% des cas, surtout dans les formes séreuses et avancées, mais son utilité est limitée au suivi [222]. Des bio-marqueurs

TABLE 3.1 – Tableau comparatif des méthodes diagnostiques du cancer de l'endomètre.

Méthode	Sensibilité	Spécificité	Utilité en clinique ?
Examen clinique	Faible.	Faible.	Limitée. Au début de suivi.
Frottis cervico-utérin (Pap-Test)	< 50 %.	< 50 %.	Non recommandé pour le CE.
Biopsie endométriale (pipelle)	91% - 99%.	Environ 100 %.	Référence diagnostique.
Hystéroscopie diagnostique	94 % - 97 %.	88 % - 96 %.	Exploration visuelle + biopsie ciblée.
Échographie transvaginale	90 % - 95 %.	50 % - 70 %.	Examen de 1ère intention pour suivi symptômes.
IRM pelvienne	> 85 %.	> 90 %.	Bilan d'extension loco-régional.
TDM thoraco-abdomino-pelvien	Variable.	Variable.	Recherche de métastases.
TEP-FDG	Élevée.	Modérée.	Extensions/récidives avancées.
CA125 sérique	Faible.	Faible.	Suivi, stratification limitée.
Tests moléculaires (TP53, POLE, MSI/MSS)	Élevée (mais variations selon cibles).	Élevée.	Stratification pronostique, choix thérapeutique.
Biopsie liquide (ADN tumoral, miARN)	En cours d'évaluation.	En cours d'évaluation.	Détection précoce ? Suivi ?

moléculaires émergent. Ainsi, le statut MMR/MSI, déterminé par immunohistochimie ou PCR, permet d'identifier les patientes éligibles aux inhibiteurs de PD-1 [223]. Les mutations POLE et TP53 sont désormais intégrées à la stratification pronostique [167]. Des signatures transcriptomiques et miARNs sont également étudiées pour prédire la récidive et la réponse thérapeutique [224]. Finalement, des études récentes suggèrent un rôle du microbiote utérin comme bio-marqueur potentiel, mais les données restent préliminaires [96].

3.4.2.5 Dépistage et populations à risque.

Contrairement au cancer du col utérin, il n'existe aucun programme de dépistage organisé pour le CE. Les raisons principales en sont la prévalence relativement faible de la maladie, l'absence de test non-invasif, sensible et spécifique, et la symptomatologie souvent précoce.

En revanche, des stratégies ciblées s'appliquent aux patientes à haut risque :
— Syndrome de Lynch : biopsie endométriale annuelle à partir de 30–35 ans, ou dès 5 ans avant l'âge du diagnostic le plus précoce dans la famille. Certaines recommandations incluent l'hystéroscopie et l'IRM pelvienne régulière [225, 226] ;
— Syndrome de Cowden (PTEN) et mutations POLE/POLD1 : surveillance individualisée, avec discussion prophylactique d'hystérectomie.

3.4.3 Techniques innovantes et perspectives diagnostiques.

3.4.3.1 Biopsie liquide.

La biopsie liquide (ADN tumoral circulant, exosomes, ARN non-codants circulants) constitue une approche émergente pour la détection précoce, le suivi de la maladie résiduelle et la détection des récidives [227]. L'ADN tumoral circulant peut refléter le statut MSI ou TP53. Les exosomes et miARN circulants (miR-21, miR-200c) apparaissent comme des bio-marqueurs prometteurs [168].

3.4.3.2 Imagerie fonctionnelle et intelligence artificielle.

L'IRM de diffusion et le PET multiparamétrique (FDG, FES) sont en cours d'évaluation pour caractériser le métabolisme tumoral et prédire la réponse thérapeutique [228]. L'intégration de l'intelligence artificielle ouvre des perspectives : des algorithmes d'apprentissage profond appliqués à l'IRM ou à l'histo-pathologie numérique permettent d'améliorer la prédiction de l'agressivité tumorale et la reproductibilité des diagnostics [229].

3.4.3.3 Panels multi-omiques.

L'évolution vers une médecine de précision passe par l'intégration de données génomiques, transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques. Des panels multi-omiques sont testés pour identifier des signatures spécifiques permettant une stratification personnalisée [230].

Un résumé des différents bio-marqueurs et de leurs particularité a été produit dans le tableau 3.2, page 84 [229].

3.4.4 Limites et défis actuels.

Malgré ces progrès, plusieurs défis persistent :
— Manque de bio-marqueurs robustes et validés pour le dépistage précoce ;
— Difficulté à standardiser les protocoles d'évaluation histologique et moléculaire ;
— Inégalités d'accès à l'IRM et aux techniques avancées dans les pays à faibles ressources ;

TABLE 3.2 – Tableau résumant les bio-marqueurs émergents dans le cancer de l'endomètre.

Biomarqueurs	Rôle principal	Statut clinique
MMR/MSI (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2)	Identification des tumeurs MSI, prédiction réponse immunothérapie.	Déjà utilisé en immunothérapie clinique.
Mutations POLE	Excellent prognostic, possible désescalade thérapeutique.	Recommandé dans certaines classifications moléculaires.
Mutations TP53	Mauvais prognostic, groupe p53 muté (*copy-number high*).	Utilisé dans ProMisE/TCGA pour stratification.
Mutations CTNNB1	Pronostic intermédiaire, risque de récidive dans les CEs de bas grade.	Biomarqueur émergent, encore en validation.
Perte d'expression ARID1A	Altération du remodelage chromatinien, souvent associé au MMRs et aux altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR.	Exploratoire, avec données préliminaires.
CA125 sérique	Suivi et stratification limitée, peu spécifique.	Utilité limitée, suivi avancé.
microARN (miR-21, miR-200,...)	Prognostic et chimiorésistance, profils spécifiques associés à l'agressivité du CE.	Exploratoire, prometteur mais non-standardisé.
Long ARN non-codant (HOTAIR, MALAT1)	Marqueurs émergents, pronostic défavorable si surexpression.	En cours de recherche, pas encore appliqué en routine.
ADN tumoral circulant	Détection précoce, suivi dynamique, biomarqueurs pronostiques.	Expérimental, pas encore intégré en routine.
Exosomes et biomarqueurs liquides	Communication intercellulaire, potentiels biomarqueurs liquides.	Expérimental, pas intégré en clinique.

— Validation insuffisante des approches innovantes (biopsie liquide, IA) en pratique clinique courante.

Ces limites rappellent que le diagnostic du CE repose encore sur un triptyque classique : symptomatologie clinique, histo-pathologie et imagerie conventionnelle, enrichi progressivement par des outils moléculaires et technologiques.

3.5 Prise en charge thérapeutique du cancer de l'endomètre.

3.5.1 Principes généraux et objectifs thérapeutiques.

La prise en charge du CE vise à éradiquer la maladie locale, limiter le risque de récidive et préserver la fertilité (lorsque cela est souhaité). Les décisions reposent sur le stade FIGO, l'histologie, le grade, le statut ganglionnaire, ainsi que sur les altérations moléculaires identifiées (POLE, MMR, p53, CTNNB1). L'intégration de la classification moléculaire dans les stratégies thérapeutiques constitue un changement majeur des dernières années [231-233].

3.5.2 Traitement local : chirurgie.

3.5.2.1 Procédure chirurgicale standard.

L'hystérectomie totale avec salpingo-ovariectomie bilatérale (HT+BSO) demeure le traitement standard des stades précoces. La chirurgie mini-invasive est privilégiée, avec une efficacité oncologique équivalente et une morbidité réduite par rapport à la laparotomie [231, 232].

3.5.2.2 Évaluation ganglionnaire.

La stadification ganglionnaire repose aujourd'hui sur le *sentinel lymph node (SLN) mapping*, validé par plusieurs essais, dont le SENTI-ENDO et le FIRES trial, qui ont montré une sensibilité élevée et une valeur prédictive négative satisfaisante [234, 235]. Cette approche réduit la morbidité de la lymphadénectomie systématique et est désormais intégrée dans les recommandations internationales [232, 233].

3.5.2.3 Spécificités histologiques.

Dans les sous-types séreux, à cellules claires ou carcinosarcomes, un staging chirurgical complet est recommandé, incluant biopsies péritonéales et omentectomie, afin d'optimiser le pronostic et le choix des traitements adjuvants [232].

3.5.2.4 Conservation de la fertilité.

Chez les patientes jeunes avec un carcinome endométrioïde de bas grade limité à l'endomètre (stade IA, G1), une approche conservatrice peut être proposée : une résection hystéroscopique suivie d'un traitement progestatif oral ou par dispositif intra-utérin au lévonorgestrel. Les taux de réponse varient entre 70 et 80%, avec cependant un risque non négligeable de récidive [236]. Un suivi étroit par biopsies répétées est indispensable [237].

3.5.3 Traitement adjuvant : radiothérapie et curiethérapie.

La décision adjuvante repose sur les facteurs de risque. Pour les stades précoces à faible risque, aucune irradiation n'est nécessaire. Pour les groupes intermédiaires, la curiethérapie vaginale (VBT) réduit les récidives locales avec une faible toxicité [238]. L'irradiation pelvienne externe (EBRT) est réservée aux patientes à haut risque de récidive locale (LVSI massif, atteinte cervicale, marges positives). Dans les formes à haut risque (stades III, histologies agressives), une association radio-chimiothérapie peut être proposée (données PORTEC-3 et GOG-258) [239, 240].

3.5.4 Chimiothérapie.

3.5.4.1 Schéma standard.

La combinaison carboplatine + paclitaxel est le standard pour les formes avancées et métastatiques, comme validé par l'essai NRG/GOG0209 qui a démontré son efficacité et sa tolérance [241].

3.5.4.2 Association avec radiothérapie.

L'essai PORTEC-3 a démontré que l'association chimiothérapie–radiothérapie améliore la survie sans progression chez les patientes à haut risque, en particulier dans le sous-groupe p53 muté [239]. Toutefois, la toxicité cumulative reste importante, imposant une sélection rigoureuse.

3.5.5 Hormonothérapie.

L'hormonothérapie repose sur les progestatifs oraux (médroxy-progestérone, mégestrol) ou le système intra-utérin au lévonorgestrel. Elle est utilisée dans les contextes palliatifs, de préservation de la fertilité, ou chez les patientes non-opérables. Les méta-analyses rapportent des réponses globales de 55 à 75%, dépendantes de l'expression des récepteurs hormonaux [236, 237].

3.5.5.1 Contexte physiologique et rationnel thérapeutique.

Le CE, en particulier le sous-type endométrioïde, est majoritairement hormono-dépendant. Ce sous-type se développe fréquemment dans un contexte d'hyperestrogénie non-opposée, entraînant une prolifération endométriale accrue. La progestérone, en revanche, exerce un rôle protecteur en induisant la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'inhibition de la signalisation de croissance. Ces mécanismes expliquent l'utilisation thérapeutique des progestatifs pour freiner la progression tumorale et induire une régression des lésions pré-cancéreuses et cancéreuses à un stade précoce [232, 242].

3.5.5.2 Indications cliniques de l'hormonothérapie.

Deux indications principales sont reconnues :

— Conservation de la fertilité : chez des patientes jeunes atteintes d'un carcinome endométrioïde de bas grade (G1), limité à l'endomètre (stade IA sans invasion myométriale) ou d'une hyperplasie atypique/néoplasie intraépithéliale endométriale (EIN). Ces patientes peuvent bénéficier d'un traitement conservateur sous strict suivi [232].

— Alternative thérapeutique chez des patientes non-opérables (co-morbidités majeures, fragilité) ou refusant la chirurgie, à condition que la tumeur exprime les récepteurs hormonaux (ER/PR).

Les recommandations internationales (ESGO/ESTRO/ESP, NCCN) encadrent ces indications, insistant sur la sélection rigoureuse des patientes et la nécessité d'un suivi rapproché.

3.5.5.3 Agents hormonaux utilisés.

Progestatifs systémiques [243] :

— Medroxy-progestérone acétate (MPA) : doses usuelles de 200 à 600 mg/jour, souvent administrées à 400–600 mg/j.

— Megestrol acétate : 160–320 mg/jour. Ces traitements induisent la différenciation endométriale et l'inhibition de la prolifération cellulaire.

— Dispositif intra-utérin au lévonorgestrel (LNG-IUD, 52 mg) : libération locale de progestatif directement dans la cavité utérine, réduisant les effets secondaires systémiques. Utilisé seul ou en combinaison avec un progestatif oral, il est particulièrement adapté aux patientes obèses ou avec co-morbidités.

— Autres options exploratoires : agonistes de la GnRH, inhibiteurs de l'aromatase, ou association progestatif + metformine (en raison de ses effets anti-prolifératifs et d'amélioration de la sensibilité à l'insuline).

3.5.5.4 Résultats cliniques et fertilité.

Taux de réponse complète (CR) : les revues systématiques et méta-analyses rapportent des réponses complètes dans 55–80% des cas selon le traitement et la sélection des patientes [242, 243].

— Délai de réponse : généralement observé entre 3 et 12 mois de traitement.

— Risque de récidive : élevé, justifiant une surveillance étroite. Une hystérectomie définitive est recommandée après grossesse menée à terme ou en cas d'échec/rechutes.

— Fertilité : après réponse complète, des grossesses spontanées ou assistées sont possibles. Les taux de grossesse varient entre 20 et 40%, avec de meilleurs résultats en cas de recours à l'assistance médicale à la procréation (AMP).

3.5.5.5 Facteurs prédictifs de réponse.

D'après [232] et [233] :
— Expression positive des récepteurs hormonaux (ER/PR) : prédicteur majeur d'efficacité.
— Bas grade histologique (G1) et absence d'invasion myométriale.
— IMC plus faible : l'obésité est associée à une moindre réponse, mais le LNG-IUD contourne en partie cette limitation.
— Profils moléculaires : certains sous-types (par ex. POLE ultramuté) ont un excellent pronostic, mais les corrélations entre mutations (CTNNB1, ARID1A) et réponse hormonale restent exploratoires.

3.5.5.6 Suivi et évaluation.

D'après [232] et [233] :
— Biopsies endométriales (pipelle ou hystéroscopie) tous les 3 mois.
— Durée maximale d'essai conservateur : 6 à 12 mois.
— Critères d'échec : absence de régression complète au-delà de 12 mois, progression de la maladie ou récidive précoce.

3.5.5.7 Tolérance et effets indésirables.

— Les progestatifs oraux peuvent induire : prise de poids, rétention hydrique, troubles thrombo-emboliques rares, effets métaboliques.
— Le LNG-IUD présente un excellent profil de tolérance, avec très peu d'effets systémiques.

3.5.5.8 Perspectives et recherches en cours.

D'après [232] et [233] :
— Association progestatifs + metformine : résultats encourageants dans la réduction de la résistance hormonale et la modulation des voies métaboliques.
— Ciblage moléculaire : la restauration de l'expression des récepteurs à la progestérone pourrait améliorer les taux de réponse.
— Développement d'essais stratifiés par sous-types moléculaires pour affiner les indications de l'hormonothérapie conservatrice.

3.5.6 Immunothérapie.

3.5.6.1 Tumeurs MSI-H / dMMR.

Environ 25–30% des cancers de l'endomètre présentent une instabilité micro-satellite élevée (MSI-H) ou un déficit du système de réparation des mésappariements (dMMR), secondaire à une hyperméthylation de MLH1 ou à des mutations germinales/somatiques de MLH1, MSH2, MSH6, PMS2. Ces tumeurs sont caractérisées par une forte charge mutationnelle (TMB) et une

abondance de néo-antigènes tumoraux, favorisant l'infiltration lymphocytaire et la sensibilité aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire [244].

L'essai KEYNOTE-158 (phase II, pan-cancer) a inclus des patientes avec cancers MSI-H/dMMR réfractaires, dont un sous-groupe de cancers de l'endomètre. Le pembrolizumab a montré un taux de réponse objective (ORR) de 48%, avec 11% de réponses complètes et une durée médiane de réponse non atteinte à 24 mois de suivi [244]. Ces résultats ont conduit à l'approbation du pembrolizumab dans les CE MSI-H/dMMR réfractaires.

Parallèlement, l'essai GARNET a évalué le dostarlimab, un anti-PD-1, chez des patientes atteintes de CE avancés dMMR pré-traités. Les résultats intermédiaires ont montré un ORR de 43,5%, avec des réponses durables (>12 mois chez 93% des répondeurs), conduisant à l'approbation du dostarlimab en 2021 [245].

Ces données confirment que l'immunothérapie est aujourd'hui le standard de deuxième ligne pour les CE MSI-H/dMMR.

3.5.6.2 Tumeurs MSS / pMMR.

Les cancers MSS/pMMR représentent environ 70% des CE avancés et sont généralement résistants à l'immunothérapie seule, du fait d'une charge mutationnelle faible et d'un micro-environnement tumoral peu immunogénique [246].

Pour contourner cette résistance, l'association d'un anti-PD-1 (pembrolizumab) avec un inhibiteur de tyrosine kinase multi-cinétique (lenvatinib) a été explorée. Le rationnel repose sur l'effet immuno-modulateur du lenvatinib (inhibition VEGFR, FGFR, KIT, RET) qui favorise le recrutement des lymphocytes T.

L'essai KEYNOTE-775 (Study 309, phase III) a randomisé 827 patientes CE avancées/récidivantes MSS/pMMR entre pembrolizumab + lenvatinib et chimiothérapie standard (doxorubicine ou paclitaxel).

Résultats :

— Survie sans progression (PFS) : 7,2 mois vs 3,8 mois (HR = 0,56).
— Survie globale (OS) : 17,4 mois vs 12,0 mois (HR = 0,68).
— ORR : 30% vs 15%.

Ces résultats ont conduit à l'approbation de la combinaison en 2^e ligne chez les CE MSS/pMMR.

Cette association est devenue le standard de soin dans ce contexte, malgré une toxicité significative (hypertension, diarrhée, fatigue, hypothyroïdie)[246].

3.5.6.3 Immunothérapie en première ligne.

Plus récemment, l'immunothérapie a été évaluée en première ligne, en combinaison avec la chimiothérapie [245, 246].

L'essai RUBY (phase III, dostarlimab + carboplatine/paclitaxel) a montré un bénéfice majeur dans le sous-groupe dMMR :

— PFS à 24 mois : 61,4% vs 15,7% sous chimiothérapie seule.

— Bénéfice également observé en OS (non mature).

L'essai NRG-GY018 (phase III, pembrolizumab + chimiothérapie) a confirmé ces résultats, avec une amélioration significative de la PFS chez les patientes dMMR, et un bénéfice plus modeste, mais notable, chez MSS [245, 246].

Ces essais ouvrent la voie à une intégration de l'immunothérapie en 1^{re} ligne pour les CE avancés, en particulier dMMR.

Afin de faciliter la lecture des résultats, les données ont été synthétisées dans le tableau 3.3.

TABLE 3.3 – Tableau comparatif des essais cliniques chez les patientes atteintes de CE recevant une immunothérapie [247].

Cible	Noms des études	Justifications scientifiques
PD-1	RUBY (partie 1 et 2), NRG-GY018, KEYNOTE-158, GARNET, PODIUM-101.	PD-1 est une protéine localisée sur les lymphocytes T, dont le rôle est de réguler négativement le système immunitaire : lorsqu'une protéine PD-L1 se lie au récepteur PD-1, le lymphocyte T est désactivé. Certaines cellules tumorales expriment PD-L1. Elles se lient aux récepteurs PD-1 des lymphocytes T, empêchant leur activation et la destruction des cellules tumorales.
PD-L1	ATEND, DUO-E, MITO-END3	Les cellules cancéreuses ne sont alors plus reconnues par le système immunitaire et continuent de croître. L'immunothérapie empêche la liaison entre PD-1 et PD-L1, stimulant ainsi le système immunitaire pour agir contre ces cellules.

3.5.7 Thérapies ciblées.

3.5.7.1 HER2.

Dans les carcinomes endométriaux séreux, environ 30% surexpriment HER2/neu. L'essai randomisé NCT01367002 a comparé carboplatine-paclitaxel ± trastuzumab :

— PFS médiane : 17,9 mois vs 9,3 mois.

— OS médiane : 29,6 mois vs 24,4 mois.

Ces résultats ont établi le trastuzumab comme standard en association avec la chimiothérapie chez les patientes HER2-positives [248].

3.5.7.2 Voie PI3K/AKT/mTOR.

La voie PI3K/AKT/mTOR est altérée dans 40–50% des CE (mutations PTEN, PIK3CA, AKT1, amplifications mTOR). Plusieurs inhibiteurs (everolimus, temsirolimus, alpelisib) ont été testés en monothérapie, avec des taux de réponse modestes (10–15%). Les études récentes privilégient des combinaisons :

- everolimus + letrozole (progestatif/inhibiteur d'aromatase) → bénéfice dans certaines patientes ER+.
- associations avec inhibiteurs CDK4/6 ou immunothérapie en cours d'évaluation [198].

3.5.7.3 Autres cibles.

- FGFR2 : mutations activatrices (∼2% des CE endométrioïdes) ; essais avec inhibiteurs FGFR (erdafitinib, pemigatinib) en cours [190].
- PARP : pertinence encore limitée dans le CE, mais rationnel en cas d'altérations de réparation de l'ADN (BRCA-like).
- Autres pistes : inhibiteurs EZH2, ARID1A, Wnt, encore à un stade pré-clinique ou phase I.

Les données ont été séparées et résumées en 3 tableaux distincts, le premier tableau 3.4 sans profil moléculaire spécifique, le second pour les essais cliniques chez les patientes atteintes de CE avec récepteurs aux facteurs de croissance (tableau 3.5, page 93) et finalement le dernier pour les voies de signalisation (tableau 3.6, page 94).

3.5.8 Maladie récidivante ou métastatique.

La prise en charge repose sur une stratégie multimodale adaptée au site et au profil moléculaire [232, 241, 244, 245, 248] :

- Chirurgie ou radiothérapie pour récidives localisées.
- Chimiothérapie systémique (carboplatine-paclitaxel).
- Immunothérapie selon statut moléculaire : pembrolizumab/dostarlimab (dMMR), pembrolizumab + lenvatinib (MSS/pMMR).
- Essais cliniques pour thérapies innovantes (immuno-combinaisons, anti-PI3K, anti-FGFR, ADCs).

3.6 Modèles expérimentaux et perspectives de recherche dans le cancer de l'endomètre.

3.6.1 Importance des modèles pré-cliniques.

Le développement de nouveaux traitements dans le CE repose sur des modèles expérimentaux capables de reproduire fidèlement l'hétérogénéité histologique et moléculaire de la maladie. Ces modèles permettent de mieux comprendre la physiopathologie, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques

TABLE 3.4 – Tableau comparatif des essais cliniques chez les patientes atteintes de CE sans profil moléculaire spécifique [249-252].

Cible	Noms des études	Justifications scientifiques
Progestérone	GOG81, GOG119, GOG153.	La progestérone est l'hormone clé contrebalançant l'effet des estrogènes dans le CE.
Aromatase et mTOR	NCT01068249, NCT02370329/VICTORIA.	La voie PI3K est souvent dérégulée dans le CE. La manipulation hormonale entraîne parfois une réponse clinique, mais il existe une résistance via la voie PI3K. Le ciblage de mTOR + hormones peut surmonter cette résistance.
ER+, CDK4/6	NSGO-PALEO/ENGOT-EN3, NCT02657928, NCT03675893.	Les CE ER+ sont généralement altérés dans la voie PI3K et présentent une forte activité transcriptionnelle liée à ER et une surexpression de CDK4/6. Ce sont des régulateurs majeurs de la résistance hormonale.
DKK-1	NCT03355080.	DKK1 module la signalisation Wnt et les CE présentent une forte prévalence de mutations de β-caténine.
PORCN	NCT02521844	PORCN est requis pour la modification post-traductionnelle de Wnt.

et de tester l'efficacité et la toxicité des agents innovants avant leur évaluation clinique [232, 259].

3.6.2 Modèles cellulaires *in vitro*.

3.6.2.1 Lignées cellulaires classiques.

Les lignées cellulaires de CE, telles que Ishikawa, HEC-1-A/B, AN3CA et RL95-2, sont largement utilisées depuis plusieurs décennies. Elles présentent des altérations représentatives de certains sous-types (par exemple PTEN et PIK3CA mutés dans Ishikawa ; TP53 muté dans HEC-1-A) et constituent un outil accessible pour les études mécanistiques et pharmacologiques [260]. Toutefois, elles souffrent de limites majeures : faible représentativité de la diversité tumorale, dérives génétiques au fil des passages et absence de microenvironnement tumoral [261].

TABLE 3.5 – Tableau comparatif des essais cliniques chez les patientes atteintes de CE avec récepteurs aux facteurs de croissance [253-255].

Cible	Noms des études	Justifications scientifiques
VEGFR	GOG0209, EORTC, GOG229E, NCT00642826, AMG386, GOG229J.	VEGF est l'un des stimulateurs majeurs de l'angiogenèse dans le CE.
FGFR	KEYNOTE775, LEAP001, NCT00888173, NCT01225887, NCT01379534, NCT01111461, KEYNOTE146.	Des mutations de la voie FGFR ont été identifiées dans le CE.
HER2	NCT01367002, NCT01611554/TATTICE, DESTINY-PanTumor02, NCT04026336, NCT04235101, NCT05150691.	Une survie prolongée est observée chez les patientes présentant une surexpression de HER2+ dans les CE séreux.

3.6.2.2 Cultures primaires et sphéroïdes.

Les cultures cellulaires primaires dérivées directement de tumeurs de patientes offrent une meilleure représentativité. Associées à des techniques 3D (sphéroïdes, organoïdes), elles permettent de re-créer une architecture proche du tissu tumoral, avec interactions cellule-cellule et gradients d'oxygène/nutriments [262]. Ces modèles reproduisent mieux la sensibilité différentielle aux traitements (par exemple résistance à la chimiothérapie dans les CE séreux) et représentent un outil prometteur pour le criblage de nouvelles molécules [263].

3.6.3 Modèles animaux.

3.6.3.1 Xénogreffes et modèles dérivés de patient (PDX).

Les xénogreffes de lignées cellulaires humaines dans des souris immunodéficientes (nude, NOD/SCID) sont utilisées depuis longtemps. Plus récemment, les *patient-derived xenografts* (PDX), implantant directement des fragments tumoraux humains, permettent de conserver l'hétérogénéité et l'architecture de la tumeur initiale [264]. Ces modèles sont particulièrement utiles pour tester les inhibiteurs ciblés et les combinaisons thérapeutiques. Toutefois, l'ab-

TABLE 3.6 – Tableau comparatif des essais cliniques chez les patientes atteintes de CE ciblant les voies de signalisation [203, 216, 255-258].

Cible	Noms des études	Justifications scientifiques
mTOR	NCT00739830, AGO-GYN8, NCT02725268.	La voie PI3K/AKT/mTOR est la plus fréquemment altérée dans le CE.
PI3K	SAR245408, XL147.	Altérations fréquentes dans le CE.
PI3K/mTOR	MAGGIE.	Altérations simultanées PI3K/mTOR dans le CE.
KRAS	NCT01953934, code break 100.	Les mutations KRAS sont associées au CE de type I (lié aux estrogènes). Elles surviennent précocement dans la tumorigenèse et sont présentes dans 6–16 % des hyperplasies endométriales.
HRD (déficit de réparation de l'ADN)	UTOLA.	Ciblage de la réparation de l'ADN par inhibiteurs de PARP ; maintien thérapeutique en cas de CE avancés ou métastatiques.
ARID1A	ATARI, NCT05352440.	Des mutations d'ARID1A sont retrouvées dans les cancers gynécologiques, dont les CE. Les études montrent que les cellules mutantes ARID1A sont sensibles aux inhibiteurs d'ATR.
PTEN	ENDOLA.	PTEN est identifié comme un marqueur des hyperplasies endométriales précancéreuses : il stoppe la transition hyperplasie → cancer.

sence de système immunitaire fonctionnel limite leur usage pour l'étude des immunothérapies [265].

3.6.3.2 Modèles génétiquement modifiés (GEMM).

Les modèles murins génétiquement modifiés (GEMM) permettent d'introduire des mutations spécifiques (PTEN, PIK3CA, KRAS, TP53) afin de reproduire les différentes sous-catégories moléculaires du CE. Ces modèles offrent l'avantage d'un micro-environnement immunocompétent, indispensable pour l'évaluation des immunothérapies et des interactions tumeur-hôte [266]. Toutefois, leur développement est coûteux et chronophage.

3.6.4 Nouveaux modèles expérimentaux.

3.6.4.1 Organoïdes et cultures 3D.

Les organoïdes dérivés de patientes représentent l'un des modèles les plus prometteurs. Ils reproduisent la structure glandulaire de l'endomètre et conservent les altérations moléculaires de la tumeur d'origine [267]. Ils permettent des approches de médecine personnalisée, en testant *ex vivo* la sensibilité d'une tumeur donnée à divers traitements.

3.6.4.2 Co-cultures et modèles immunocompétents.

L'intégration de fibroblastes, cellules endothéliales et cellules immunitaires dans des systèmes de co-culture permet de mieux modéliser le micro-environnement tumoral. Ces modèles facilitent l'étude des interactions immuno-tumorales et des mécanismes de résistance aux immunothérapies [268].

3.6.4.3 Bio-puces et organes-sur-puce.

Les technologies de micro-fluidique (« organes-sur-puce ») permettent de recréer une vascularisation artificielle et des flux mécaniques, simulant les conditions physiologiques. Ces plateformes sont encore expérimentales mais pourraient révolutionner le criblage de médicaments dans le CE [269].

Les avantages de chacune de ces techniques ainsi que leurs défis ont été résumées dans le tableau 3.7, page 103.

3.6.5 Perspectives de recherche.

3.6.5.1 Stratégies thérapeutiques innovantes.

Les modèles pré-cliniques sont essentiels pour développer des thérapies ciblées contre [232, 266, 272] :

— la voie PI3K/AKT/mTOR (inhibiteurs combinés pour contourner les résistances) ;
— les altérations MMR/MSI (immunothérapie) ;
— les altérations épigénétiques (HDACi, DNMTi) ;
— l'angiogenèse (anti-VEGF, multitarget TKIs).

3.6.5.2 Médecine de précision.

Les organoïdes et PDX ouvrent la voie à une médecine personnalisée, permettant d'adapter le traitement à chaque patiente. L'intégration des données multi-omiques (génomique, transcriptomique, épigénomique, protéomique) constitue une étape essentielle vers une stratification plus fine du CE [267, 269].

3.6.5.3 Limites et défis.

Malgré leur apport, les modèles actuels souffrent encore de limites : manque de standardisation, coût élevé, faible disponibilité des tumeurs de patientes, et difficultés éthiques liées à l'utilisation animale. L'avenir repose sur une combinaison de modèles complémentaires, du plus simple (lignée cellulaire) au plus complexe (organoïde, modèle murin humanisé) [265, 268].

3.7 Perspectives cliniques et futures directions.

3.7.1 Intégration de la classification moléculaire dans la pratique.

L'un des progrès majeurs de la dernière décennie est l'intégration de la classification moléculaire TCGA/ProMisE (POLE ultramuté, MSI-H/dMMR, p53 muté, *copy-number low*) dans la stratification pronostique et thérapeutique. Cette approche dépasse la simple histologie et permet d'identifier des sous-groupes aux comportements biologiques très différents :

- POLE ultramuté : excellent pronostic, possibilité de désescalade thérapeutique [18, 196].
- MSI-H/dMMR : sensibilité marquée aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire [244].
- p53 muté : pronostic défavorable, nécessitant une intensification thérapeutique [196, 273].
- *Copy-number low* (NSMP) : profil intermédiaire, bénéfices modestes de la chimiothérapie [18, 196].

L'intégration de cette classification dans les recommandations ESGO/ESTRO/ESP et NCCN a ouvert la voie à une véritable médecine de précision en oncologie gynécologique [196, 232].

3.7.2 Vers une désescalade thérapeutique ciblée.

La désescalade thérapeutique est un objectif prioritaire afin de réduire la morbidité sans compromettre le pronostic. Les patientes avec mutations POLE pourraient bénéficier d'une réduction de l'adjuvant, voire d'une chirurgie seule, comme suggéré par les analyses du PORTEC-3 [273].

De même, les patientes à faible risque selon la classification moléculaire pourraient éviter des traitements inutiles.

Ces stratégies nécessitent une validation prospective, mais ouvrent la voie à une individualisation de l'intensité thérapeutique [232].

3.7.3 Nouvelles stratégies combinatoires.

La recherche clinique s'oriente vers des combinaisons innovantes pour surmonter les résistances :

— Immunothérapie + anti-angiogéniques (pembrolizumab + lenvatinib) déjà validée en $2e$ ligne [246].
— Immunothérapie + chimiothérapie en 1^{re} ligne (essais RUBY, NRG-GY018) avec résultats très prometteurs, surtout chez les patientes dMMR [244].
— Anti-HER2 + chimiothérapie (trastuzumab) pour les carcinomes séreux HER2+, intégré comme standard dans les recommandations [248].
— Associations avec inhibiteurs PI3K/AKT/mTOR, HDACi ou PARP, encore en cours d'évaluation [198].

Ces stratégies visent à augmenter les réponses durables tout en limitant les résistances.

3.7.4 Innovations diagnostiques et suivi personnalisé.

Le développement des biopsies liquides, reposant sur l'analyse de l'ADN tumoral circulant (ctDNA), des exosomes ou des microARN circulants, pourrait révolutionner le suivi des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre. Contrairement aux biopsies tissulaires, ces approches, peu invasives et répétables, permettent un suivi longitudinal de l'évolution tumorale. Elles offrent la possibilité de détecter précocement une maladie résiduelle minimale ou l'apparition d'une récidive avant même qu'elle ne soit visible par les examens d'imagerie, tout en renseignant sur l'émergence de nouveaux mécanismes de résistance aux traitements.

En parallèle, l'intégration de données multi-omiques (génomique, transcriptomique, épigénomique, voire protéomique) permet une caractérisation plus complète des tumeurs que les approches fondées sur un seul niveau d'analyse. La combinaison de ces informations pourrait conduire à une stratification pronostique plus fine, à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et à une meilleure sélection des traitements personnalisés [274].

Par ailleurs, les progrès de l'intelligence artificielle appliquée à l'imagerie médicale (IRM, TEP) et à l'histopathologie numérique ouvrent de nouvelles perspectives pour la prise en charge clinique. Les algorithmes d'apprentissage profond sont capables d'extraire des caractéristiques imperceptibles à l'œil humain, améliorant la reproductibilité des analyses, réduisant la variabilité inter-observateur et permettant de prédire le pronostic ou la réponse aux traitements. À terme, ces outils pourraient contribuer à une prise de décision thérapeutique plus personnalisée et à une optimisation du suivi des patientes [275].

3.7.5 Défis actuels et priorités de recherche.

Malgré ces avancées, plusieurs défis persistent :
— Accès inégal aux tests moléculaires et aux thérapies innovantes selon les pays.

— Besoin d'essais cliniques stratifiés prospectivement sur la base des sous-types moléculaires.
— Nécessité de valider les modèles pré-cliniques (organoïdes, PDX) pour guider la médecine personnalisée.
— Développement d'approches intégrées combinant clinique, biologie et modélisation computationnelle.

L'avenir de la prise en charge du CE reposera donc sur une approche multidimensionnelle, combinant classification moléculaire, innovations thérapeutiques et technologies émergentes, dans une logique de médecine de précision.

3.8 La voie PI3K/AKT et ses isoformes dans le cancer de l'endomètre.

La voie PI3K/AKT/mTOR est l'une des voies de signalisation intracellulaire les plus fréquemment altérées dans le CE. Elle intervient dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la survie, du métabolisme et de la résistance thérapeutique. Selon les analyses du TCGA (2013), des altérations de cette voie sont retrouvées dans plus de 80% des carcinomes endométrioïdes [276].

3.8.1 Activation de la voie.

L'activation de PI3K est initiée par la stimulation de récepteurs tyrosine kinases (RTK) ou de récepteurs hormonaux, conduisant à la conversion de PIP2 en PIP3. Ce dernier recrute AKT, qui est ensuite activée par PDK1 (phosphorylation en Thr308) et par mTORC2 (phosphorylation en Ser473). Une fois activée, AKT régule de multiples cibles impliquées dans le cycle cellulaire (p27, GSK3β), l'apoptose (BAD, caspase-9), et le métabolisme (mTOR, FOXO) [277]. Un résumé de la voie d'AKT ainsi que des précédents inhibiteurs cités est représenté de façon schématique dans la figure 3.1.

3.8.2 Isoformes d'AKT.

Trois isoformes d'AKT (ou PKB) existent chez l'humain, codées par des gènes distincts (AKT1, AKT2, AKT3), avec des fonctions spécifiques dans le CE :

— AKT1 : fortement impliqué dans la croissance et la survie cellulaire. La mutation récurrente AKT1 E17K a été identifiée dans un sous-groupe de CE, entraînant une activation constitutive de la kinase [277, 278]. AKT1 favorise la progression tumorale et la résistance à l'apoptose.
— AKT2 : joue un rôle majeur dans le métabolisme du glucose, l'invasion tumorale et l'EMT. Son amplification est associée à des formes plus agressives de CE et à un risque accru de métastases [279].
— AKT3 : exprimé principalement dans les tissus cérébraux, son rôle est moins bien caractérisé dans le CE. Toutefois, certaines études suggèrent

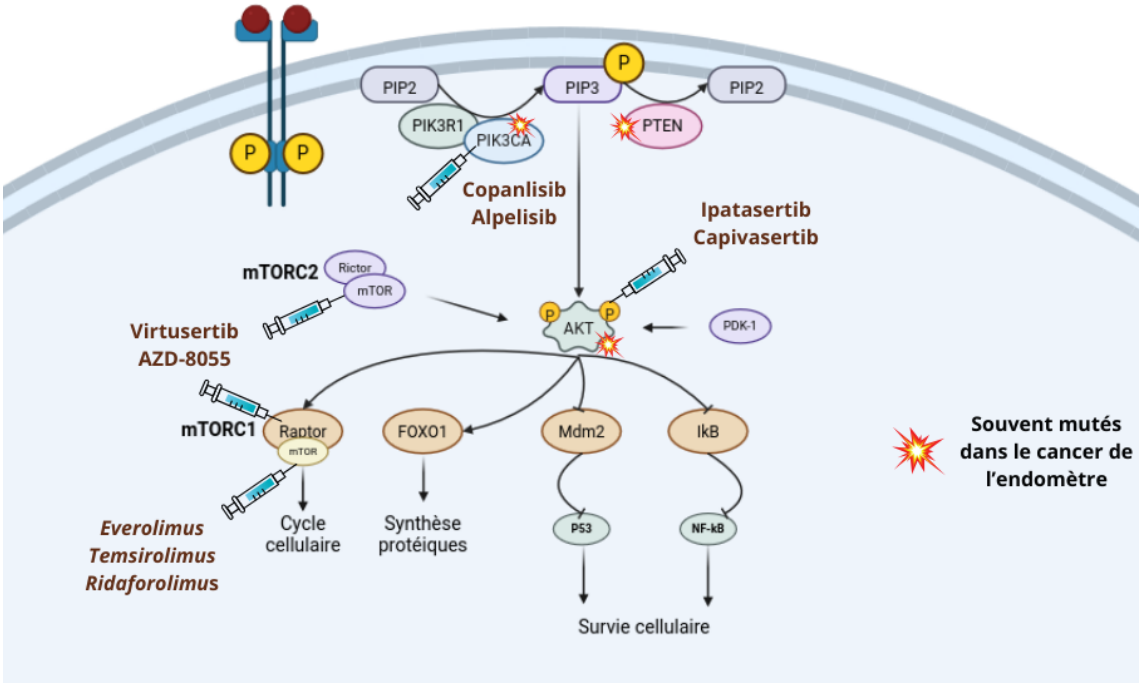


FIGURE 3.1 – Représentation schématique de la voie de la protéine d'AKT dans le cancer de l'endomètre.

qu'il pourrait contribuer à la résistance thérapeutique et à la régulation du stress oxydatif [280].

3.8.3 Interaction avec les altérations moléculaires du CE

Les anomalies génétiques caractéristiques du CE convergent fréquemment vers l'activation d'AKT :

— PTEN : la perte de PTEN (60–80% des CE endométrioïdes) entraîne une accumulation de PIP3, activant constitutivement AKT [71].
— PIK3CA : mutations activatrices (∼30% des CE) dans les exons 9 et 20, conduisant à une activation accrue d'AKT [18] [71].
— PIK3R1 : mutations de la sous-unité régulatrice de PI3K qui altèrent la régulation négative de la voie.

3.8.4 Conséquences biologiques et cliniques.

Une activation aberrante de la voie AKT entraîne [198] :

— une résistance hormonale, en modulant la signalisation des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone ;
— une résistance à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées (mTOR inhibiteurs) ;
— une stimulation de la croissance tumorale et de l'angiogenèse ;

— un impact pronostique défavorable, particulièrement dans les CE de haut grade.

3.8.5 Perspectives thérapeutiques.

Le ciblage spécifique d'AKT est en cours d'évaluation [203] :
— Inhibiteurs pan-AKT (capivasertib, ipatasertib) en monothérapie ou en association.
— Associations hormonothérapie + inhibiteurs AKT/mTOR (ex. everolimus + letrozole) qui semblent prometteuses dans les CE ER+.
— Approches combinées avec immunothérapie à l'étude.

3.9 Conclusion générale.

Le cancer de l'endomètre constitue aujourd'hui le cancer gynécologique le plus fréquent dans les pays industrialisés. Si la majorité des patientes sont diagnostiquées à un stade précoce et présentent un pronostic favorable, environ 15 à 20% développent des formes agressives associées à une survie nettement réduite [196, 276]. Ces formes sont caractérisées par des altérations moléculaires distinctes, notamment les mutations de TP53 et les profils séreux, qui expliquent leur comportement clinique plus défavorable [244].

Les progrès récents ont profondément modifié la compréhension et la prise en charge du CE. L'intégration de la classification moléculaire TCGA/ProMisE (POLE, MSI-H/dMMR, p53, NSMP) a permis d'affiner la stratification pronostique et d'orienter les décisions thérapeutiques, en complément des critères histologiques classiques [196, 273]. De même, l'arrivée des immunothérapies (pembrolizumab, dostarlimab) et des thérapies ciblées (trastuzumab pour les formes HER2+, combinaisons avec lenvatinib) a élargi l'arsenal thérapeutique et ouvert la voie à une médecine de précision [232, 246, 248].

Toutefois, d'importants défis persistent : absence de programme de dépistage organisé, difficultés diagnostiques des sous-types agressifs, manque de biomarqueurs robustes pour guider les stratégies de désescalade ou d'intensification thérapeutique, et accès inégal aux innovations selon les pays [198]. Par ailleurs, si les modèles expérimentaux actuels (organoïdes, PDX, GEMM) offrent des perspectives prometteuses, leur utilisation reste limitée par un manque de standardisation et par la difficulté à reproduire fidèlement l'hétérogénéité tumorale [274, 275].

Dans ce contexte, l'importance d'intensifier la recherche sur le cancer de l'endomètre est cruciale. Les priorités incluent : (i) améliorer la compréhension des mécanismes biologiques à l'origine de l'hétérogénéité tumorale, (ii) développer des biomarqueurs diagnostiques et prédictifs validés, (iii) affiner les approches de médecine personnalisée intégrant la génomique et l'immunologie, et (iv) faciliter l'accès des patientes aux essais cliniques et aux innovations thérapeutiques [196, 248, 273].

En définitive, le CE illustre parfaitement la transition en cours vers une oncologie intégrée, combinant classification moléculaire, immunothérapie et technologies émergentes. Le succès futur reposera sur un investissement continu en recherche translationnelle et clinique, afin de transformer les découvertes fondamentales en bénéfices tangibles pour les patientes.

Une représentation schématique simplifiée (figure 3.2, page 104) est présentée afin de résumer les principaux points de ce chapitre.

3.10 Transition vers la problématique de recherche.

Dans les cancers gynécologiques, la dysfonction concomitante de Par-4 et de CRM1 apparaît comme un point de convergence majeur des mécanismes favorisant la survie tumorale. L'exclusion nucléaire de Par-4, médiée notamment par l'hyperactivité de CRM1 et la suractivation de la voie PI3K/AKT, contribue à l'échappement apoptotique et au maintien du phénotype résistant observé malgré les traitements à base de platine ou d'anthracyclines. Ces observations suggèrent que la restauration de la localisation nucléaire de Par-4, combinée à l'inhibition de CRM1, pourrait rétablir la sensibilité des cellules tumorales en réactivant les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques, notamment celles impliquant TRAIL. De plus, l'utilisation combinée d'inhibiteurs d'AKT, tels qu'AZD5363, et d'inhibiteurs de CRM1, comme le *Selinexor*, pourrait potentialiser cette réponse et constituer une stratégie thérapeutique prometteuse pour surmonter la résistance au cisplatine et à la doxorubicine dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre.

Ainsi, l'hypothèse centrale de cette thèse est que la modulation coordonnée des voies Par-4/CRM1/AKT permet de restaurer les mécanismes apoptotiques et de sensibiliser les cellules tumorales résistantes aux traitements conventionnels.

Dans cette optique, les objectifs de ce travail étaient : (i) de caractériser l'implication de Par-4 et de CRM1 dans les mécanismes de résistance thérapeutique observés dans les cancers gynécologiques ; (ii) d'évaluer l'impact de l'inhibition pharmacologique de CRM1 et de la voie AKT sur la localisation subcellulaire de Par-4 et sur l'induction de l'apoptose ; et (iii) de déterminer le potentiel de nouvelles stratégies combinatoires visant à restaurer la sensibilité des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques conventionnels.

Bien que les travaux réalisés dans le cadre de cet objectif n'aient pas permis de générer un ensemble de résultats suffisamment complet pour faire l'objet d'une publication scientifique indépendante à ce stade, les données obtenues demeurent pertinentes et prometteuses. Elles apportent des informations préliminaires sur l'implication des voies Par-4/CRM1/AKT dans la résistance thérapeutique des cancers gynécologiques et ouvrent plusieurs pistes de recherche qui mériteraient d'être approfondies.

Dans un souci de valorisation et d'accessibilité des travaux réalisés au cours

de cette thèse, ces résultats sont présentés dans les chapitres **subséquents**. Leur inclusion permet non seulement de documenter l'ensemble de la démarche scientifique entreprise, mais également de mettre à la disposition de la communauté scientifique des données susceptibles de contribuer à de futurs projets de recherche et, éventuellement, à la production d'articles scientifiques ultérieurs.

TABLE 3.7 – Tableau de comparaison des modèles expérimentaux dans le cancer de l'endomètre [267, 270, 271].

Modèle	Avantages	Limites	Applications principales
Lignées cellulaires (2D)	Simplicité, faible coût, large disponibilité.	Peu représentatives de l'hétérogénéité tumorale, dérives génétiques.	Études mécanistiques, criblage simple de molécules.
Cultures primaires / sphéroïdes	Architecture 3D plus réaliste, meilleure représentativité que les lignées.	Difficultés techniques, durée limitée.	Étude de la résistance, sensibilité différentielle.
Organoïdes dérivés de patientes	Conservent l'hétérogénéité moléculaire et histologique, reproductibles.	Disponibilité limitée, manque de standardisation.	Médecine personnalisée, criblage thérapeutique.
Xénogreffes (*cell lines*)	Modèle animal bien établi, facile d'utilisation.	Absence de système immunitaire, homogénéité réduite.	Évaluation pharmacologique de base.
Patient-derived xenografts (PDX)	Représentativité clinique élevée, architecture tumorale conservée.	Absence d'immunité, coût élevé.	Étude de thérapies ciblées, prédiction clinique.
Modèles murins génétiquement modifiés (GEMM)	Microenvironnement immunocompétent, reproduction de mutations spécifiques.	Développement long, coût élevé.	Étude immuno-tumorale, évaluation immunothérapies.
Organoïdes / co-cultures immuno-compétentes	Intègrent cellules immunitaires et stroma, interactions complexes.	Encore en développement, complexité technique.	Étude résistance immunothérapie, interactions tumeur-hôte.
Organes-sur-puce (microfluidique)	Reproduisent vascularisation et flux mécaniques physiologiques.	Expérimental, faible accessibilité.	Plateformes avancées de criblage médicamenteux.

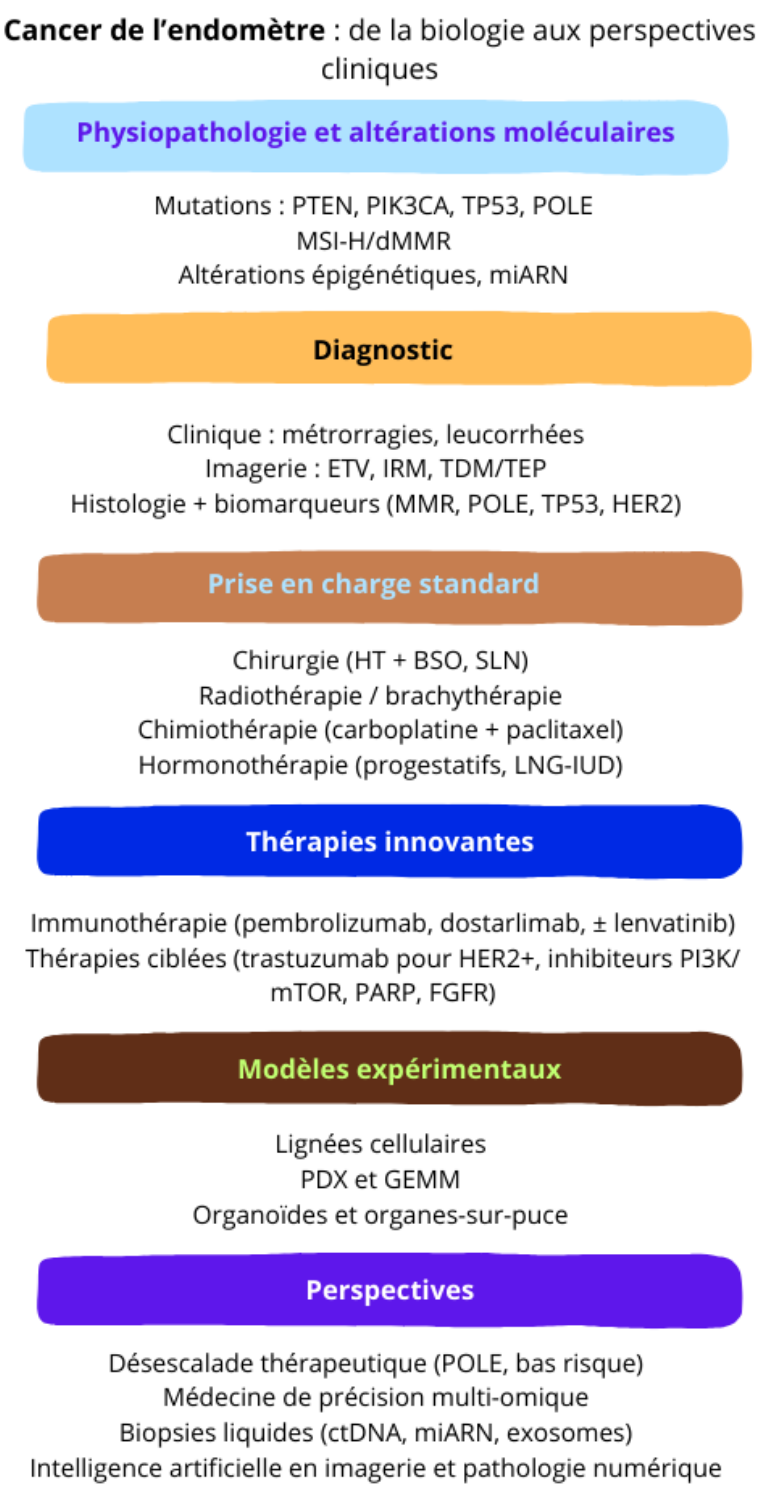


FIGURE 3.2 – Représentation schématique conclusive du cancer de l'endomètre : de la biologie aux perspectives cliniques.

Chapitre 4

Vidéo-microscopie

Cette section est inspirée de la publication d'avril 2025 [281]

4.1 Introduction.

La vidéo-microscopie est une technique consistant à enregistrer des images séquentielles d'échantillons biologiques vivants au cours du temps. Elle occupe aujourd'hui une place centrale dans la recherche en biologie cellulaire et en bio-médecine. Le terme associe le latin *video* (« je vois »), le grec *mikros* (« petit ») et *skopein* (« examiner »), soulignant dès l'origine l'ambition de visualiser les processus microscopiques dans leur dynamique propre. Contrairement à l'imagerie conventionnelle, qui repose sur des instantanés statiques en fin d'expérience, la vidéo-microscopie permet une observation continue, à intervalles réguliers, allant de la milliseconde à plusieurs jours ou semaines, fournissant ainsi une analyse temporelle complète des réponses cellulaires et tissulaires [282, 283].

L'histoire de la vidéo-microscopie s'inscrit dans le développement plus large de la microscopie optique et électronique. Depuis les premières observations de Hooke (Micrographia, 1665) et de Leeuwenhoek au XVIIe siècle, jusqu'aux perfectionnements apportés par Abbe et Köhler à la fin du XIXe siècle, l'évolution de la microscopie a constamment été orientée par la recherche d'une meilleure résolution et d'une plus grande fidélité optique [284-292]. L'introduction du microscope électronique par Ruska dans les années 1930 a marqué un tournant majeur en permettant d'atteindre une échelle nanométrique [291]. Toutefois, c'est véritablement l'essor de l'imagerie vidéo au XXe siècle, notamment grâce au développement de la télévision en circuit fermé (CCTV), puis des caméras numériques, qui a rendu possible l'intégration d'une dimension temporelle aux observations microscopiques [293-297].

Au cours des deux dernières décennies, la vidéo-microscopie s'est imposée comme un outil de choix dans l'étude des cellules vivantes. Son intérêt réside dans la possibilité de maintenir les conditions physiologiques (température, pH, oxygénation) tout en enregistrant en continu l'évolution de l'échantillon, notamment grâce à l'intégration de chambres environnementales et d'incubateurs

spécifiques [298, 299]. Cette approche non-invasive a trouvé des applications variées, telles que le suivi de la morphogenèse embryonnaire [282, 283], l'étude des dynamiques cytosquelettiques [300-303], l'exploration du métabolisme microbien [304-306], l'observation du comportement tumoral en conditions *in vitro* et *in vivo* [307, 308], ou encore le suivi de la plasticité neuronale [309-312].

La vidéo-microscopie illustre également un changement de paradigme en biologie contemporaine : le passage de l'analyse « en masse » (*bulk analysis*) à l'analyse unicellulaire. En effet, les approches traditionnelles tendent à lisser les hétérogénéités, alors que les analyses dynamiques à l'échelle individuelle révèlent la variabilité des comportements cellulaires, qu'il s'agisse de migration, de prolifération ou de réponse à un traitement [283, 307]. Cette capacité à capturer l'hétérogénéité cellulaire confère à la vidéo-microscopie une pertinence particulière dans le contexte actuel de la médecine personnalisée, où l'objectif est d'adapter les thérapies aux caractéristiques propres de chaque patient.e.s [313].

Malgré ses atouts, la technique présente un certain nombre de limites. La qualité des images demeure conditionnée par les performances des systèmes optiques et des capteurs, tandis que l'analyse manuelle de longues séquences est extrêmement chronophage et sujette à des biais [314]. De plus, les problèmes de photo-toxicité et de photo-blanchiment liés aux fluorochromes, ainsi que les artefacts optiques induits par les systèmes d'illumination, constituent des obstacles méthodologiques importants [315-317]. Pour pallier ces contraintes, des solutions sont actuellement explorées, parmi lesquelles l'intégration de l'intelligence artificielle et de l'apprentissage profond pour automatiser la segmentation et le suivi cellulaire [318-321], ou encore le développement de techniques optiques innovantes comme la microscopie à feuillet de lumière (*light-sheet microscopy*) [322].

L'objectif de ce chapitre est de fournir une analyse approfondie de la vidéo-microscopie, en retraçant son développement historique, en présentant ses principes fondamentaux et ses modalités techniques, puis en détaillant ses principales applications en biologie et en médecine. Enfin, une discussion des limites actuelles et des perspectives futures permettra de situer cette technique dans le paysage plus large des outils d'imagerie moderne. Ce chapitre servira ainsi de fondement conceptuel et méthodologique pour aborder les travaux expérimentaux qui vont suivre.

4.2 Contexte historique et fondements théoriques.

4.2.1 Les origines de la microscopie.

L'histoire de la microscopie remonte à l'Antiquité, lorsque Sénèque décrivit dès le Ier siècle l'utilisation d'une sphère de verre remplie d'eau comme lentille de grossissement [284]. Au XIIIe siècle, Salvino d'Armate conçut les premières

lunettes correctrices, popularisant l'usage de lentilles à visée optique [323]. Un siècle plus tard, Zacharias et Hans Janssen mirent au point le premier microscope composé (vers 1595), rapidement perfectionné par Galilée en 1609 [286]. Le terme « *microscope* » fut introduit en 1625 par Giovanni Faber [287]. Robert Hooke fut l'un des premiers à exploiter systématiquement cet instrument : dans son Micrographia (1665), il observa des structures végétales et introduisit le terme « *cellule* » pour décrire les compartiments du liège [286]. Dans le même temps, Antoni van Leeuwenhoek développa plus de 500 microscopes à lentille unique, atteignant une résolution de $1,4\ \mu m$ et un grossissement de $300\times$, qui lui permirent d'observer pour la première fois bactéries et protozoaires, qu'il qualifia d'« *animalcules* » [284, 288, 289].

Au XIXe siècle, la recherche d'une amélioration de la résolution et de la correction des aberrations optiques conduisit à des avancées déterminantes. En 1830, Joseph Jackson Lister démontra que l'assemblage de lentilles achromatiques disposées à des distances précises permettait de réduire les aberrations sphériques [284]. Puis, en 1873, Ernst Abbe formula sa célèbre théorie de la diffraction, établissant que la résolution d'un microscope est limitée par la longueur d'onde de la lumière [286]. Enfin, August Köhler proposa en 1893 une technique d'illumination homogène qui améliora considérablement la qualité des images [290]. Ces fondations préparèrent l'avènement du XXe siècle, marqué par la révolution de la microscopie électronique. Ernst Ruska et Max Knoll construisirent en 1931 le premier microscope électronique à transmission (TEM), qui atteignit rapidement une résolution bien supérieure à celle des microscopes optiques [291]. Parallèlement, Frits Zernike introduisit en 1935 la microscopie à contraste de phase, ouvrant la voie à l'observation non-invasive d'échantillons transparents tels que les cellules vivantes [292].

4.2.2 Les jalons de la vidéo-microscopie.

L'intégration de la dimension temporelle en microscopie émergea dès 1929, lorsque l'on enregistre pour la première fois le développement d'embryons de lapin en utilisant la technique du *time-lapse* [282]. Toutefois, c'est surtout l'apparition de la télévision en circuit fermé (CCTV) en 1927 qui marqua un tournant : appliqué à la microscopie, ce dispositif permit non seulement de diffuser les images en temps réel, mais également d'améliorer le contraste et d'archiver les observations [293, 294].

Dans les années 1940, l'introduction des tubes intensificateurs d'image issus de la recherche militaire facilita l'amplification des signaux lumineux faibles, un obstacle majeur pour l'observation en microscopie [295]. Vers 1970, Caspersson et ses collaborateurs utilisèrent pour la première fois une caméra de télévision couplée à un microscope à fluorescence afin d'analyser les chromosomes, ouvrant la voie à l'application de la vidéo-microscopie en cytogénétique [296]. Les décennies suivantes virent se généraliser l'usage des caméras électroniques dans les laboratoires. L'essor des dispositifs CCD (*charge-coupled device*) dans les années 1980–1990 constitua une avancée majeure, en

raison de leur sensibilité élevée et de leur faible bruit électronique [324]. En parallèle, l'avènement de l'imagerie numérique et du traitement informatique des images permit d'automatiser certaines étapes d'analyse, notamment le suivi cellulaire et la segmentation [325-327].

4.2.3 L'évolution des technologies d'imagerie cellulaire.

Parallèlement aux progrès des capteurs et des caméras, la biologie cellulaire a bénéficié d'innovations majeures en matière de contrastes optiques et de marquages fluorescents. Dès la fin du XIXe siècle, Paul Ehrlich utilisa la fluorescéine pour colorer des bactéries, améliorant considérablement leur visualisation [290]. L'essor de la vidéo-microscopie a été rendu possible par le développement des protéines fluorescentes, en particulier la GFP (*green fluorescent protein*) initialement isolée chez *Aequorea victoria*, ainsi que de ses nombreux dérivés. Ces outils ont permis le marquage dynamique de protéines et de cellules vivantes, ouvrant la voie à l'imagerie en temps réel des processus biologiques, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Leur utilisation, couplée aux avancées en microscopie time-lapse et en systèmes d'acquisition automatisés, a profondément transformé l'étude des dynamiques cellulaires[328]. Ces approches se sont progressivement imposées comme des standards en histologie, virologie et microbiologie.

Dans la seconde moitié du XXe siècle, la microscopie intravitale introduite par Ellinger et Hirt permit l'observation de tissus vivants à l'aide de colorants fluorescents et d'illuminations ultra-violettes [329]. Par la suite, les lasers infrarouges pulsés ont rendu possible l'imagerie non linéaire, ouvrant la voie à la microscopie bi-photonique, à la génération d'harmoniques et au Raman cohérent [330-334]. Ces techniques ont accru la profondeur de pénétration dans les tissus et réduit les dommages liés au photo-blanchiment. Enfin, les dernières décennies ont été marquées par l'essor de la super-résolution, qui permet de franchir la limite de diffraction définie par Abbe. Des méthodes telles que STED (*stimulated emission depletion*), PALM (*photoactivated localization microscopy*) ou STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) offrent aujourd'hui une résolution de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres [335, 336]. Bien que coûteuses et techniquement exigeantes, elles constituent un complément puissant à la vidéo-microscopie, permettant d'intégrer la dimension spatio-temporelle à une échelle sub-cellulaire.

4.3 Techniques et principes de la vidéo-microscopie.

4.3.1 Principes fondamentaux de l'optique en microscopie.

Tout système de microscopie repose sur trois composantes principales : un objectif, un oculaire et une source d'illumination. Les objectifs, constitués de lentilles convexes, ont pour rôle de condenser la lumière et de produire

une image agrandie de l'échantillon. La qualité de l'image obtenue dépend de la distance focale et de l'ouverture numérique (*numerical aperture*, NA) de l'objectif, paramètres déterminant le pouvoir de résolution [337].

Pour limiter les aberrations chromatiques et sphériques inhérentes aux systèmes optiques simples, différents types d'objectifs ont été conçus. Les objectifs achromatiques les plus courants corrigent les aberrations axiales dans deux longueurs d'onde (rouge et bleu). Les objectifs apochromatiques offrent une correction plus poussée sur plusieurs couleurs (bleu profond, vert, rouge), tandis que les objectifs en fluorite constituent une alternative intermédiaire, assurant une meilleure luminosité et un contraste amélioré [338-340].

L'illumination constitue un autre facteur essentiel. Parmi les méthodes les plus utilisées, l'illumination de Köhler occupe une place prépondérante. Elle repose sur la formation de rayons lumineux parallèles traversant l'échantillon, ce qui permet de contrôler la taille, l'intensité et l'angle du faisceau lumineux, garantissant ainsi une illumination homogène [337]. Le choix du mode d'illumination doit tenir compte de la transparence, de l'épaisseur et de la sensibilité de l'échantillon (par exemple, chaleur ou UV).

4.3.2 Composants spécifiques de la vidéo-microscopie.

La vidéo-microscopie combine un microscope classique avec une caméra vidéo et un système de traitement de l'image. L'image produite par le microscope est d'abord transmise à la caméra, transformée en signal électronique, puis restituée en temps réel sur un moniteur [294].

4.3.2.1 Types de caméras.

Les caméras CCD (*charge-coupled device*) sont les plus utilisées en vidéo-microscopie, en raison de leur sensibilité élevée et de leur faible bruit électronique. Ces propriétés permettent d'obtenir des images de haute résolution, même en condition de faible luminosité [324]. Les caméras CMOS (*complementary metal-oxide semiconductor*) représentent une alternative moins coûteuse, mais elles génèrent un bruit de fond plus élevé et une qualité d'image généralement inférieure [341].

Les caméras monochromes, dépourvues de filtres de couleur, présentent une sensibilité accrue et une meilleure résolution que les caméras couleur, particulièrement utiles dans les conditions de faible illumination [342]. Dans le cas des caméras couleur, les données sont interpolées par une matrice de filtres (Bayer), introduisant un risque d'erreurs chromatiques.

4.3.2.2 Traitement numérique.

Le traitement informatique des images constitue une étape critique, équivalente au développement en chambre noire pour la photographie argentique. Il permet d'atténuer le bruit, de corriger les fonds inhomogènes et d'améliorer le contraste. Parmi les techniques courantes figurent la soustraction de fond,

la correction de champ plat, l'intégration d'images ou encore les transformées de Fourier [343].

4.3.3 Modes d'imagerie et d'illumination.

Différents modes d'imagerie existent, chacun présentant des avantages spécifiques en fonction du type d'échantillon et des objectifs expérimentaux :

- Champ clair (*brightfield*) : méthode la plus simple, souvent associée à des colorations histologiques. Elle est adaptée à l'étude de la morphologie ou de la croissance microbienne, mais limitée par un faible contraste sur des échantillons transparents [344] [345, 346] ;
- Champ sombre (*darkfield*) : utilise un condenseur spécial qui éclaire l'échantillon par la périphérie, créant un contraste marqué avec un fond noir. Cette méthode est utile pour visualiser des structures fines, comme les flagelles bactériens [347, 348] ;
- Contraste de phase : introduit par Zernike, il repose sur le déphasage des ondes lumineuses traversant l'échantillon, permettant d'observer des cellules vivantes non colorées avec un contraste élevé [349] ;
- Contraste interférentiel différentiel (DIC) : technique proche du contraste de phase, offrant une impression tridimensionnelle des structures cellulaires [350] ;
- Fluorescence : repose sur l'utilisation de fluorochromes excités par une source lumineuse spécifique (lampe à arc, laser). L'échantillon émet une lumière de plus grande longueur d'onde, isolée par des filtres optiques, ce qui permet de marquer sélectivement les protéines, les organites ou les acides nucléiques [351].

4.3.4 Préparation des échantillons vivants.

La réussite d'une expérience de vidéo-microscopie dépend en grande partie des conditions de culture et de maintien des échantillons. Pour cela, des chambres environnementales sont utilisées, permettant de contrôler la température, l'humidité, le pH et l'atmosphère gazeuse (O_2, CO_2) [298, 299]. Deux principaux types de chambres existent :

- Ouvertes : elles autorisent des manipulations directes (ajout de médicaments, changements de milieu), mais sont plus sensibles aux variations environnementales.
- Fermées : elles offrent une meilleure stabilité et sont adaptées aux expériences longues, comme l'embryogenèse *in vitro* [352, 353].

Un des défis majeurs concerne le marquage fluorescent des cellules vivantes. Si les sondes fluorescentes (comme par exemple SiR-DNA) permettent de visualiser l'ADN ou le cytosquelette, elles peuvent aussi induire des phénomènes de photo-toxicité et de photo-blanchiment, notamment par production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [315, 354, 355]. Ces effets peuvent ralentir le

cycle cellulaire, altérer la viabilité et fausser les observations. Des compromis doivent donc être trouvés entre intensité lumineuse et temps d'exposition.

4.3.5 Acquisition et analyse des images.

L'acquisition repose principalement sur deux paramètres :

— Le temps d'exposition, qui détermine la quantité de photons atteignant le capteur et influence la luminosité et le risque de saturation ;

— La fréquence d'acquisition (*frame rate*), qui doit être ajustée selon la vitesse des phénomènes étudiés (par exemple quelques millisecondes pour des dynamiques rapides, quelques minutes pour des suivis d'embryogenèse) [356] [357].

4.3.5.1 Logiciels et algorithmes.

L'analyse des séquences représente un défi majeur en vidéo-microscopie. Les étapes clés incluent :

— la segmentation : détection automatique des cellules individuelles sur les images, souvent basée sur l'intensité des pixels et des algorithmes de seuillage [358] ;

— le suivi cellulaire (*tracking*) : reconstruction des trajectoires de cellules au cours du temps, essentielle pour l'étude de la migration, de la division et des interactions cellulaires [359].

Des logiciels tels que ImageJ/Fiji (plugin TrackMate) ou CellProfiler sont largement utilisés [359], mais leur performance reste limitée face à la complexité de certains échantillons (ex. lignées cancéreuses hétérogènes). L'émergence d'approches fondées sur l'apprentissage profond (deep learning) a permis des avancées significatives, comme l'algorithme DeLTA, capable de segmenter et d'annoter automatiquement de larges ensembles d'images [321, 360].

4.4 Applications de la vidéo-microscopie en biologie et médecine.

4.4.1 Biologie cellulaire.

La vidéo-microscopie a profondément transformé la compréhension des processus dynamiques intracellulaires. L'un des apports majeurs réside dans l'étude de la division cellulaire. Grâce à l'imagerie en temps réel, il est possible de suivre avec précision les étapes successives de la mitose et de la cytocinèse, d'identifier les anomalies du fuseau mitotique et d'évaluer l'impact de traitements pharmacologiques sur la progression du cycle cellulaire [300, 361, 362].

Au-delà du cycle cellulaire, la technique a permis d'explorer la dynamique du cytosquelette. La microscopie de fluorescence par speckle (FSM), combinée au suivi vidéo, a révélé la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules

et des filaments d'actine en temps réel [301, 302, 363]. Ces approches ont mis en évidence le rôle des moteurs moléculaires dans le transport intracellulaire, notamment la kinésine et la dynéine, essentielles au trafic vésiculaire et au positionnement des organites [364].

Enfin, la vidéo-microscopie peut contribuer à l'étude de la signalisation intracellulaire par le suivi spatio-temporel de protéines fluorescentes fusionnées à la GFP ou à ses dérivés. Cette approche a permis d'élucider les mécanismes de translocation nucléaire, de recrutement membranaire et d'interactions protéine-protéine dans des cellules vivantes [365-367].

4.4.2 Biologie du développement.

La vidéo-microscopie est un outil incontournable pour l'étude de l'embryogenèse. Dès 1929, elle fut utilisée pour enregistrer le développement d'embryons de lapin [282]. Aujourd'hui, le suivi morphocinétique des embryons en fécondation *in vitro* (FIV) est largement répandu : il permet de déterminer avec précision le moment des clivages, la symétrie des divisions et la vitesse de compaction, paramètres prédictifs de la viabilité embryonnaire [298, 299, 368].

Chez les organismes modèles, tels que *Caenorhabditis elegans* ou le poisson zèbre, l'imagerie en temps réel a permis de reconstruire les lignages cellulaires complets, offrant une vision intégrée des programmes de différenciation et de la morphogenèse tissulaire [369-371]. De même, en biologie végétale, la vidéo-microscopie a servi à suivre la formation du tube pollinique et la dynamique des divisions méristématiques [372].

4.4.3 Neurosciences.

Dans le domaine des neurosciences, la vidéo-microscopie a ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude des réseaux neuronaux. *In vitro*, elle permet le suivi de la croissance axonale, de la synaptogenèse et de la plasticité synaptique au niveau individuel [309]. L'utilisation de sondes calciques fluorescentes a permis de visualiser en temps réel l'activité neuronale et la propagation des potentiels d'action au sein de réseaux complexes [310].

In vivo, des techniques comme la microscopie bi-photonique couplée à la vidéo-microscopie ont permis de suivre la dynamique dendritique et la plasticité structurelle dans le cortex de souris vivantes [311]. Ces approches se révèlent particulièrement utiles pour étudier les processus de dégénérescence (maladie d'Alzheimer, Parkinson) ou de régénération neuronale après lésion [312].

4.4.4 Microbiologie.

La vidéo-microscopie a également profondément marqué la microbiologie en permettant l'observation en temps réel de populations bactériennes ou virales. Cette approche a révélé l'hétérogénéité phénotypique des bactéries isogéniques,

mise en évidence par des différences de croissance, de division et de réponse aux antibiotiques [305, 373].

Elle a aussi été utilisée pour l'étude des bio-films, structures complexes où les bactéries coopèrent et échangent des signaux chimiques. Le suivi vidéo a permis de visualiser la formation de micro-colonies, la sécrétion de matrice extracellulaire et les interactions de type prédateur-proie entre bactéries et protozoaires [306].

Enfin, la vidéo-microscopie s'est imposée dans la virologie. Le suivi dynamique des infections virales a montré la propagation de particules au sein de cellules hôtes et la formation de plaques virales, offrant une meilleure compréhension des cinétiques d'infection et des mécanismes de défense cellulaire [316].

4.4.5 Cancérologie et médecine personnalisée.

En cancérologie, la vidéo-microscopie offre une fenêtre unique sur la plasticité tumorale. Elle permet le suivi en temps réel de la migration et de l'invasion de cellules cancéreuses dans des matrices 3D, mettant en évidence les mécanismes d'EMT et de métastases [307, 308].

Les modèles organoïdes tumoraux combinés à la vidéo-microscopie ont permis d'évaluer la réponse hétérogène aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées, ouvrant la voie à la médecine personnalisée [313]. Cette approche permet non seulement de prédire l'efficacité thérapeutique, mais aussi d'identifier précocement des résistances adaptatives.

De plus, des outils algorithmiques dédiés, tels que *CancerCellTracker*, utilisent l'imagerie en temps réel pour estimer la sensibilité de lignées cancéreuses à différents traitements, offrant un potentiel de transposition en clinique [307].

4.5 Limites et défis actuels.

4.5.1 Contraintes techniques.

Malgré ses nombreuses avancées, la vidéo-microscopie reste soumise à un ensemble de contraintes technologiques. L'une des principales limitations est liée à la photo-toxicité, c'est-à-dire aux dommages cellulaires induits par l'exposition prolongée à la lumière. L'illumination intense, nécessaire pour exciter les fluorochromes, peut générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui altèrent l'ADN, perturbent le cycle cellulaire et déclenchent l'apoptose [315]. De plus, le photo-blanchiment des fluorophores limite la durée d'observation, car l'intensité du signal diminue au fil du temps, compromettant la qualité des suivis à long terme [354].

Un autre défi concerne la profondeur d'imagerie. La microscopie conventionnelle est limitée par la diffusion et l'absorption de la lumière dans les tissus, ce qui rend difficile l'observation en profondeur au-delà de $100-200\ \mu m$. Bien que des techniques comme la microscopie bi-photonique ou la microscopie à feuillet

de lumière (*light-sheet*) aient permis d'améliorer ce paramètre, elles nécessitent des équipements coûteux et des conditions expérimentales complexes [316, 317].

Enfin, les systèmes de vidéo-microscopie requièrent des infrastructures sophistiquées (chambres environnementales, stabilisation mécanique, contrôle de l'humidité et du CO_2), ce qui limite leur accessibilité. La mise en place de ces dispositifs représente un investissement considérable, tant sur le plan matériel que logistique.

4.5.2 Contraintes analytiques.

Un second ensemble de limites réside dans la gestion et l'analyse des données. Les expériences de vidéo-microscopie génèrent souvent des volumes considérables d'images (plusieurs téra-octets pour une seule longue expérience), ce qui pose des problèmes de stockage, de traitement et de partage des données [314].

L'analyse manuelle des séquences est non seulement chronophage, mais également sujette à des biais d'interprétation. Par exemple, le suivi manuel de cellules individuelles dans un champ dense peut conduire à des erreurs de traçage et fausser les conclusions biologiques [359]. La segmentation automatique, bien qu'elle ait progressé grâce à l'intelligence artificielle, reste difficile dans les cas d'échantillons hétérogènes, de faible contraste ou présentant des artefacts optiques [318]. La standardisation des méthodes constitue un autre défi. Chaque laboratoire tend à développer ses propres protocoles d'acquisition et d'analyse, rendant difficile la comparaison inter-études et limitant la reproductibilité des résultats [319].

4.5.3 Tentatives de résolution.

Pour répondre à toutes ces limitations, plusieurs approches sont actuellement explorées.

4.5.3.1 Innovations optiques.

La microscopie à feuillet de lumière (*light-sheet microscopy*) a émergé comme une solution aux problèmes de photo-toxicité et de photo-blanchiment comme cité auparavant. En illuminant uniquement un plan focal mince, elle réduit drastiquement la dose lumineuse reçue par l'échantillon, tout en permettant une imagerie rapide de grands volumes [306, 316]. De plus, l'utilisation de lasers infrarouges dans la microscopie biphotonique et multiphotonique, permet de pénétrer plus profondément dans les tissus vivants tout en minimisant les dommages [374].

4.5.3.2 Développements logiciels

L'intégration de l'intelligence artificielle et de l'apprentissge profond (*deep learning*) dans l'analyse d'images ouvrent des perspectives prometteuses. Des algorithmes tels que DeLTA permettent désormais la segmentation et le suivi automatique de cellules, avec une précision comparable, voire supérieure, à l'expertise humaine [321]. Ces outils facilitent également l'extraction de paramètres complexes, comme la morpho-dynamique ou la corrélation spatio-temporelle de signaux moléculaires.

4.5.3.3 Automatisation et standardisation.

Enfin, l'automatisation des systèmes d'acquisition et l'adoption de standards de métadonnées visent à améliorer la reproductibilité et l'accessibilité des données [318-320]. Des plateformes intégrées combinant vidéo-microscopie, robotique et analyse computationnelle sont en cours de développement, permettant un enregistrement systématique et reproductible des expériences.

C'est dans ce contexte qu'émerge *Toto-Cell*, un projet visant à dépasser certaines des limitations actuelles de la vidéo-microscopie en proposant une approche innovante d'aide à l'analyse cellulaire dynamique. En s'appuyant sur les acquis présentés dans ce chapitre et en intégrant les avancées technologiques les plus récentes, *Toto-Cell* ambitionne d'offrir un système plus performant, plus accessible et mieux adapté aux besoins de la recherche biomédicale contemporaine.

La présentation et la mise en perspective de ce dispositif feront l'objet des chapitres 6 et 7. Le logiciel présenté lors du chapitre 6 a été utilisé afin de produire des résultats dans le chapitre 9.

Chapitre 5

Matériels et méthodes

Cette section a pour but de présenter les éléments (réactifs, matériel et méthodes) cités dans les chapitres suivants et qui ne sont pas présentés dans les articles ajoutés à la thèse.

5.1 Réactifs.

De nombreux réactifs ont été utilisés durant les travaux décrits dans ce manuscrit, les principaux d'entre-eux étant listés ci-après :

- Les drogues : le cisplatine (NSC 119875) et la doxorubicine (*Adriamycine*) HCl (S1208), commandés chez *Selleckchem*, l'AZD5363 (A11759) 10 mg et le *Selinexor* (KPT-330) (A12582) 10 mg commandés chez *Adooq*, le *Gibco™ Human TRAIL* (TNFSF10) Recombinant Protein commandé chez *Thermofisher*. Pour la vidéo-microscopie, le kit Sir-DNA (SPY650) de chez *Spirochrome*.
- Les anticorps pour le western blot et les IHCS ont été achetés chez *Cell Signal* : PTEN (138G6) Rabbit mAb - 9559M, p53 Antibody - 9282, Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb - 4060L, Akt Antibody - 9272S, Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb - 9234S, PAR-4 Antibody, 2328S, Progesterone Receptor A/B (D8Q2J) XP® Rabbit mAb #8757, XIAP (D2Z8W) Rabbit mAb #14334, Estrogen Receptor α (D6R2W) Rabbit mAb #13258, MLH1 (ES05) Mouse mAb, 47954, PMS2 (M0R4G) Mouse mAb, 78576S, MSH2 (D24B5) XP® Rabbit mAb, 2017, MSH6 (3E1) Mouse mAb, 12988, ARID1A/BAF250A (D2A8U) Rabbit mAb, 12354S, Cleaved Caspase-8 (Asp387) (D5B2) Rabbit Monoclonal Antibody #8592, Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit Monoclonal Antibody #9664, BID Antibody #2002, Bad Antibody #9292, PARP Antibody #9542.
- Un traitement *Plasmocure* a aussi été acheté (Plasmocure™ - Mycoplasma Elimination Reagent - ant-pc) chez *InvivoGen* pour nos cultures cellulaires.

5.2 Techniques utilisées et mises au point.

5.2.1 Western Blot.

Le Western blot a été réalisé afin de détecter et quantifier spécifiquement les protéines d'intérêt dans les extraits cellulaires. Les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon RIPA, complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases. Les lysats ont été incubés par alternance 5 minutes au congélateur, puis 1 minute en décongélation, puis clarifiés par centrifugation à 14000 $\times$ g pendant 20 minutes à 4 °C. La concentration protéique des surnageants a été déterminée par le test DC protein kit de *Thermofisher*.

Un volume équivalent de protéines (20–40 μg) a été mélangé avec un tampon Laemmli 4$\times$ contenant du β-mercaptoéthanol, puis chauffé à 95 °C pendant 5 minutes. Les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (8–12 % selon le poids moléculaire attendu) avant transfert sur membrane PVDF activée au méthanol.

Une vérification par rouge de Ponceau a été effectuée, puis les membranes ont été bloquées dans du lait non-écrémé 5 % mélangé à du PBS-tween (pour les protéines phosphorylées) pendant 1 heure à température ambiante, puis incubées avec l'anticorps primaire (dilution selon les recommandations du fabricant) toute la nuit à 4 °C. Après trois lavages dans du PBS-Tween 0,1 %, les membranes ont été exposées à un anticorps secondaire conjugué à une HRP pendant 1 heure. Les membranes ont ensuite été nettoyées trois fois, au PBS-Tween 0,1 % et la détection des protéines s'est faite en utilisant le kit *SuperSignal West Femto* de Thermo Fisher Scientific sur l'appareil Epi Chemi II avec une caméra CCD.

Les anticorps utilisés ont été, tout d'abord pour la partie caractérisation des lignées, ER, PR, P53, ARID1A, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, avec une dilution de 1 dans 4999 de lait. Les cellules dans ce cas n'ont pas été traitées. Puis, pour la partie caractérisation des voies de signalisation, nous avons utilisé p-AKT, AKT, Par-4, P53, caspase clivée 3, caspase clivée 8, p-P70S6K, Bad, PTEN, Bid, XIAP, PARP. Toujours avec la même dilution, mais cette fois-ci les cellules ont reçu des traitements avant d'être récoltées et le western effectué. Les traitements ont une durée de 24h avant la récolte des cellules.

Le contrôle de charge a été utilisé, ici la β-actine.

5.2.2 Vidéo-microscopie confocale en conditions de culture.

Cette partie résume brièvement la technique de vidéo-microscopie, qui est décrite plus en détails dans la section de l'article de *Toto-Cell*, chapitre 6.

Vingt-quatre heures avant les traitements, les cellules ont été ensemencées dans une plaque à 8 puits (*ThermoFisher*, 12-565-338) à une densité de 15 000 cellules/cm^2. Vingt-quatre heures après le traitement, le milieu a été retiré, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS, puis 500 μL de milieu contenant 0,5 μM de SiR-DNA ont été ajoutés pour le marquage nucléaire des cellules

vivantes.

La plaque a été placée dans une chambre d'incubation contrôlée (INUB-GSI2F1, Tokai Hit) montée sur un microscope confocal Leica TCS SP8. Les conditions standards de culture (37°C, 5 % $C0_2$, humidité saturée) ont été maintenues pendant toute la durée de l'acquisition.

L'imagerie a été réalisée à un grossissement de 20× (objectif HC PL APO CS2 20×/0.75 DRY), sur deux canaux : le premier un canal en contraste de phase pour la morphologie cellulaire, le second un canal en fluorescence far-red ($\frac{\lambda_{abs}}{\lambda_{em}} = \frac{664}{684} nm$) pour la détection du SiR-DNA. Pour chaque puits, trois positions distinctes ont été acquises toutes les 10 mn pendant 72 h. Les images ont été enregistrées au format 1024×1024, vitesse 200, zoom 1. Les séries temporelles ont été compilées en films comprenant 432 images par canal. Les fichiers *.tif* ont été générés via *Leica Application Suite* (Version 4.0.0.11706). Le suivi cellulaire a ensuite été effectué manuellement image par image avec *Fiji*. Les événements phénotypiques suivants ont été quantifiés : nombre de cellules, mitose normale, mitose non dichotomique (division en plus de deux cellules), fusion cellulaire (coalescence post-mitotique), mort mitotique et mort non-mitotique. La classification des morts cellulaires dépend de la survenue ou non d'une division préalable.

5.2.3 Test de *tracking-back.*

Après avoir mis en place la vidéo-microscopie, un axe de mon projet a été de savoir s'il était possible d'implémenter la technique de *tracking-back* au laboratoire, en y associant de nouvelles fonctionnalités de notre logiciel Toto-cell (présenté au chapitre 4).

5.2.3.1 Description.

La technique de traçage rétrospectif des cellules (ou *tracking back*) constitue une approche d'analyse avancée utilisée pour relier des phénotypes cellulaires ou marqueurs cellulaires, observés après imagerie *time-lapse*, à l'ensemble des événements dynamiques survenus en amont durant l'acquisition.

Contrairement au suivi temporel prospectif (qui reconstruit les trajectoires et la filiation cellule par cellule à mesure que les images sont acquises) le *tracking back* adopte une stratégie rétrograde : il part d'un événement phénotypique final d'intérêt et remonte ensuite l'historique vidéo pour reconstituer l'ensemble des étapes ayant conduit à ce destin cellulaire ; il vise ainsi à déterminer si les événements précédents ont pu avoir un lien avec le marqueur présent à la fin du temps alloué.

5.2.3.2 En pratique.

Nous avons effectué les tests préliminaires : à la fin de la vidéo-microscopie de 72h, les 18 positions au sein de la plaque ont été enregistrées sur le logiciel *Leica TCS SP8*. Puis les cellules ont été fixées dans les plaques avec de la

paraformaldéhyde. Une immunofluorescence a ensuite été effectuée, suivant les mêmes étapes qu'une immunofluorescence normale (perméabilisation (au Triton X-100), blocage, anticorps primaire, anticorps secondaire lié au fluorophore), une coloration au DAPI du noyau a aussi été faite afin de bien déterminer les cibles et leurs localisations.

Les images ont été générées sur le même confocal que précédemment, permettant ainsi de lier l'étude de cellules individuelles à leurs marqueurs avec l'enregistrement des emplacements des positions précédentes.

5.2.3.3 En bref...

Le *tracking back* permet également d'identifier l'ancêtre direct de la cellule (sa « cellule mère ») et de reconstruire ainsi son arbre lignée. Dans le cas où la cellule résulte d'une division, le *tracking back* permet de comparer le devenir des cellules sœurs, ce qui met en évidence des divergences phénotypiques intra-familiales révélatrices d'une hétérogénéité fonctionnelle.

L'intérêt majeur du *tracking back* réside dans sa capacité à établir une relation causale entre un destin cellulaire final et les événements dynamiques antérieurs. Cette approche permettra de révéler :

— comment une cellule devient résistante ou sensible à un traitement ;
— quelles trajectoires individuelles se distinguent au sein d'une population homogène en apparence.

Cette méthode est particulièrement pertinente dans les études sur l'hétérogénéité intra-clonale, la variabilité de réponse aux thérapies anticancéreuses, et la dynamique des anomalies génomiques induites par stress mitotique. En effet, le *tracking back* permettra au laboratoire d'identifier des sous-populations discrètes, invisibles dans les analyses et expériences populationnelles classiques, mais essentielles pour comprendre les mécanismes de résistance ou de persistance cellulaire.

Sur les photographies des figures 5.1 et 5.2, il est possible de voir les cellules avant/après fixation, puis leurs signaux en DAPI.

La figure 5.3 représente quant à elle le processus mis en place et les possibles remontées implémentables à *Toto-Cell*.

5.2.4 Test de mycoplasmes.

La détection de mycoplasmes a été effectuée de manière routinière (une fois par semaine) afin d'assurer la qualité des cultures cellulaires. Les tests ont été réalisés à l'aide d'un kit de détection commercial, conformément aux recommandations du fournisseur. Les échantillons d'ADN ont été extraits à partir du surnageant cellulaire (100–200 µL), puis soumis à un test de bandelettes. Toutes les expériences présentées dans cette étude ont été réalisées exclusivement à partir de cultures testées négatives pour les mycoplasmes. En cas de résultat positif, les cultures contaminées étaient immédiatement éliminées et exclues de toute analyse ultérieure.

5.2.5 Immunohistochimie sur cellules.

Le but de cette expérience a été de confirmer la présence ou l'absence des protéines dans les cellules cancéreuses ainsi que leurs localisations. Les supports utilisés ont été des plaques 12 puits afin de permettre l'insertion d'une lamelle en verre, sur laquelle les cellules ont poussé (après *coating* à la gélatine). Les cellules ont été ensemencées à hauteur de 20 000 par puits et ont été laissées 24h (le temps qu'elles adhèrent et poussent) avant de commencer la manipulation. A la suite de cette période, les cellules ont été fixées à la paraformaldéhyde (la fixation permettait une préservation de leur morphologie cellulaire et de leurs épitopes), puis elles ont été perméabilisées. Ces étapes se sont faites en retirant les lamelles en verre des puits.

L'étape de blocage s'est faite à partir d'une solution de sérum de chèvre, puis les cellules sur lamelles ont été incubées dans une chambre humide et noire avec les anticorps primaires pendant une nuit. Des lavages ont suivi, ainsi qu'une incubation avec l'anticorps secondaire ; une contre coloration à l'hématoxyline a ensuite été réalisée, puis les photographies ont été prises à l'objectif 20x avec la caméra C-B5 et le logiciel *Proview*.

Les contrôles positifs ont été les cellules de la lignée HELA qui étaient connues pour avoir l'entièreté des marqueurs. Les contrôles isotypiques IgG souris et lapins ont aussi été mis en place.

5.2.6 Test de Clonogénicité.

Le test de clonogénicité, ou *colony formation assay* ou encore *clonogenic assay*, constitue l'une des approches de référence pour évaluer la capacité de survie et de prolifération à long terme des cellules cancéreuses après exposition à un stress. Contrairement aux analyses basées sur des mesures instantanées de viabilité, le *clonogenic assay* interroge la compétence d'une cellule unique à

reformer un clone, offrant ainsi un indicateur robuste de sa *cellular fitness* et de la persistance tumorale potentielle.

Les manipulations se sont faites dans des plaques 6 puits, la première étape consistant à évaluer la capacité de nos cellules à remplir 85 % du puits sur 12 jours. Elles ont donc été mises en plaque à différentes densités. Les quantités retenues ont été 8000 pour les Ishikawa, 20 000 pour les HEC-1-A et 50 000 pour les KLE. Pour les lignées ovariennes, les Caov-3 ont été mises en plaque à 47 000, les Ovsaho à 52 000, les Cov362 à 110 000 et les Ovcar à 80 000.

Les cellules ont été mises en plaque, et le lendemain les traitements ont été faits. Les photos ont été prises 10 jours plus tard et le logiciel d'ImageJ *colony area* a été utilisé pour leur analyse.

Ce test permet de représenter la reconstitution de la masse cancéreuse suite au stress émis par l'ajout de drogues dans un contexte 2D. Le schéma de la figure 5.4a illustre la procédure de test de clonogénicité, tandis que les étapes de détourage du module *colony area* d'imageJ sont illustrées sur la figure 5.4b.

5.2.7 Test 3D post-traitement.

Pour terminer notre analyse, des tests de croissance sphéroïdales en 3D ont été effectués avec les différentes lignées. Les analyses post-traitement des modèles 3D ont été réalisées afin d'évaluer la viabilité cellulaire, la morphologie tissulaire ainsi que l'organisation spatiale des structures obtenues.

Il est ainsi important de différencier une aggrégation de cellules comparativement à la formation d'un sphéroïde [375] (voir figure 5.5). De plus la dynamique à l'intérieur des sphéroïdes n'est pas toujours la même.

En effet, plusieurs zones sont remarquables, illustrées sur la figure 5.6 : la zone du noyau nécrotique, la zone de quiescence et viable et la zone proliférative. Ces différentes zones sont remarquables sur les photographies de sphéroïdes [375].

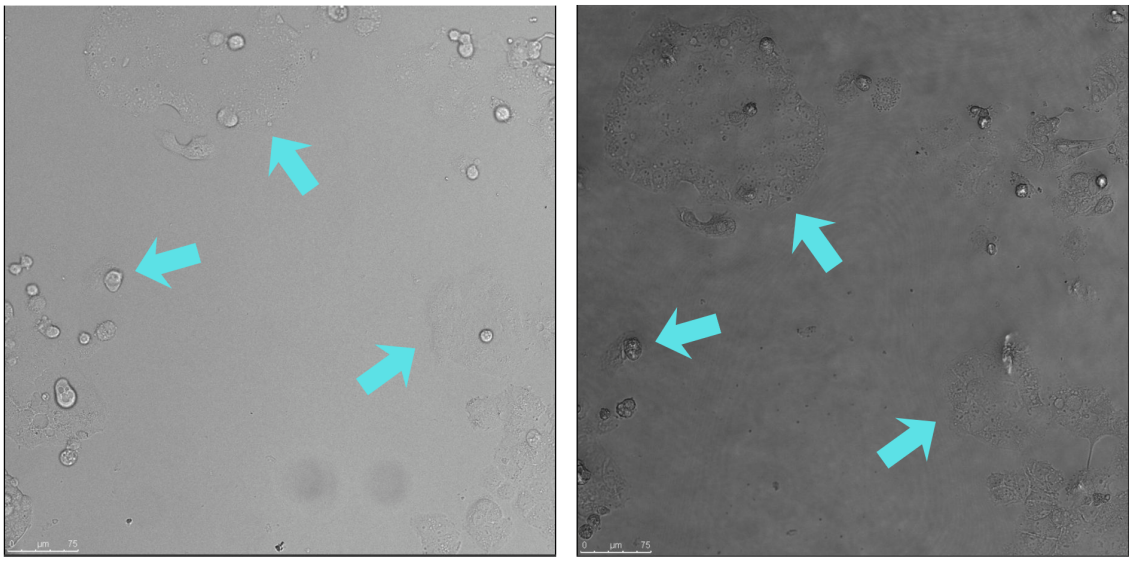
Enfin durant le temps durant lequel le sphéroïde grandit, plusieurs phases sont remarquables avec la formation de plusieurs couches à l'intérieur de ce dernier (figure 5.7). Durant les premiers 4 jours les cellules sont quasiment toutes en prolifération et cyclent normalement, entre 4 et 8 jours le cycle de certaines cellules s'arrête, afin d'offrir dans une 3ème phase la formation d'un noyau nécrotique [376].

Nous avons ainsi choisi le temps maximal de 8 jours, afin de limiter la formation de ce noyau nécrotique et de pouvoir voir les impacts de nos thérapies sur la forme et les différentes couches de nos sphéroïdes.

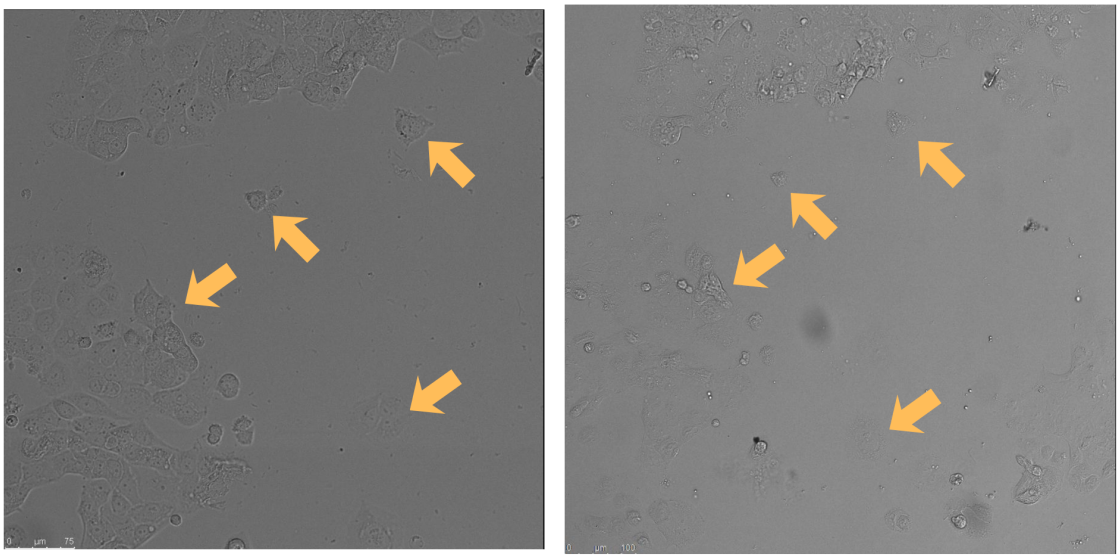
Nous avons ainsi dans un premier temps mis en place les cultures de sphéroïdes, en effectuant différents tests concernant le nombre de cellules. Nous avons ainsi optimisé le nombre de cellules pour les cultures 3D à 20 000 cellules par puits pour les Ishikawa, 40 000 cellules pour les HEC-1-A et 60 000 pour les KLE. Nous avons optimisé la densité de cellules pour les cultures ovariennes de la même façon. La seule particularité a été pour les Ovcar-4 qui n'ont pas réussi malgré les différents essais à former des sphéroïdes,

probablement du fait qu'elles proviennent d'ascites. Pour les Cov-362, les cellules ont été mise en plaque à hauteur de 100 000 cellules par puits, pour les Caov-3 et les Ovsaho à 60 000 cellules.

L'expérience se déroulait comme suit : la mise en plaque s'est faite pour toutes les cellules à hauteur de 200 000 cellules par plaque de 6 puits ; 24h plus tard le traitement était effectué ; 24h après les cellules étaient décollées et mises en plaque 96 puits à fond rond. La plaque était ensuite centrifugée à 400 g pendant 10 minutes et les plaques sont ensuite restées 8 jours à 37°c, sans sortie et sans changement de milieu, dans les incubateurs avant que les photos soient prises sur un microscope Olympus IV.



(a)



(b)

FIGURE 5.1 – Deux exemples de photographie des cellules Ovcar-4, à gauche avant fixation, à droite après fixation avec la paraformaldéhyde. Les flèches permettent d'identifier les cellules et structures communes entre les deux photographies, un léger décalage de quelques micromètres peut se faire remarquer sur les deux photos. Cependant sur l'image **(b)** il est possible de voir que même avec un angle plus grand de camèra les cellules restent identifiables, permettant ainsi leurs suivis.

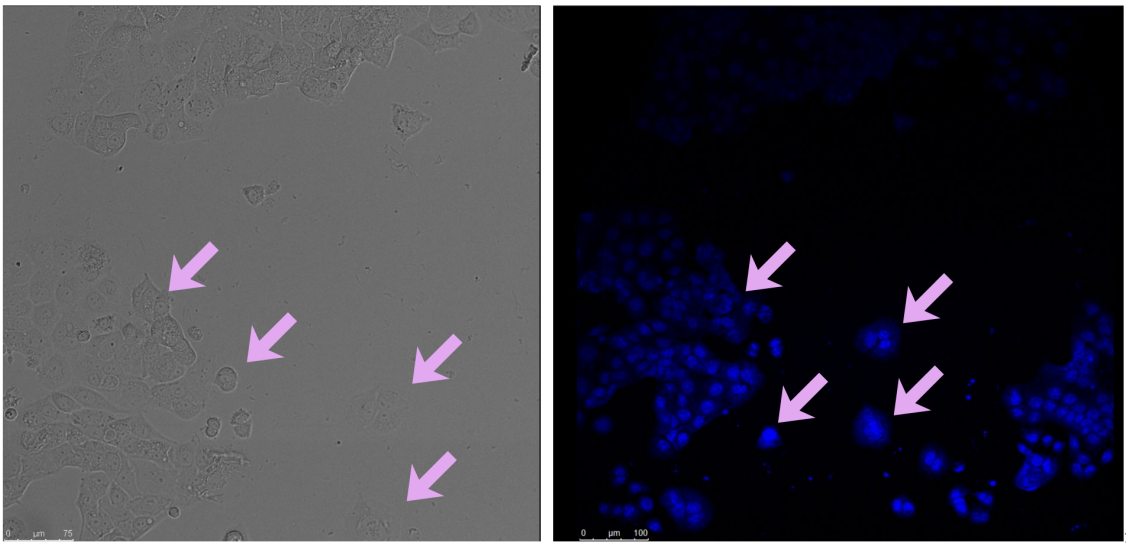


FIGURE 5.2 – Photographie des cellules Ovcar-4, à gauche après fixation à la paraformaldéhyde, à droite après révélation d'immunofluorescence. Les flèches indiquent les structures et cellules identifiables entre les deux prises photos.

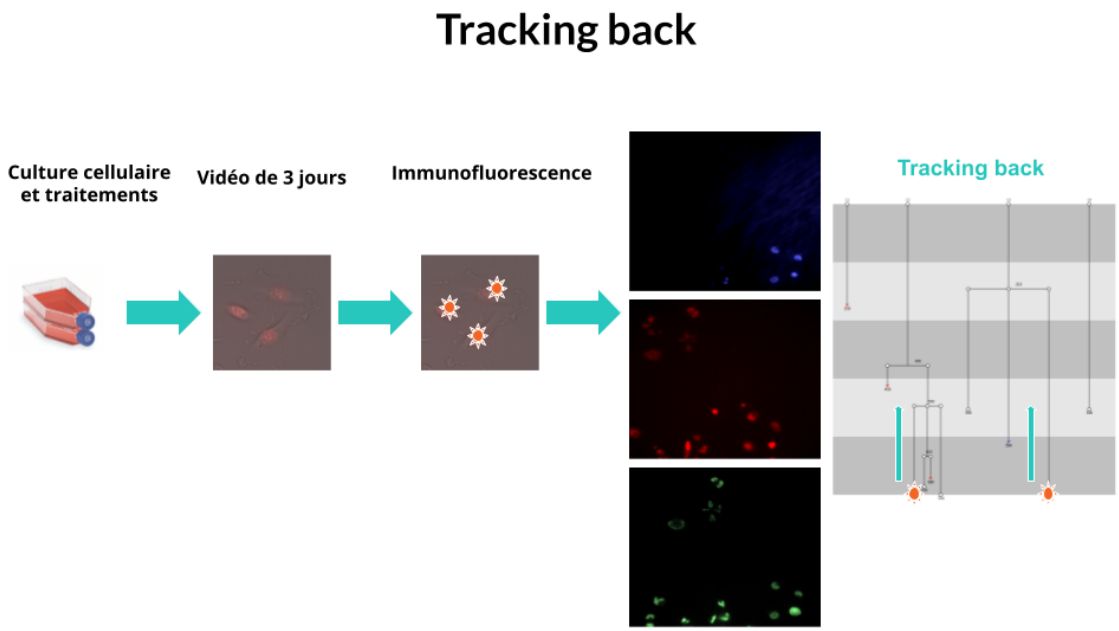
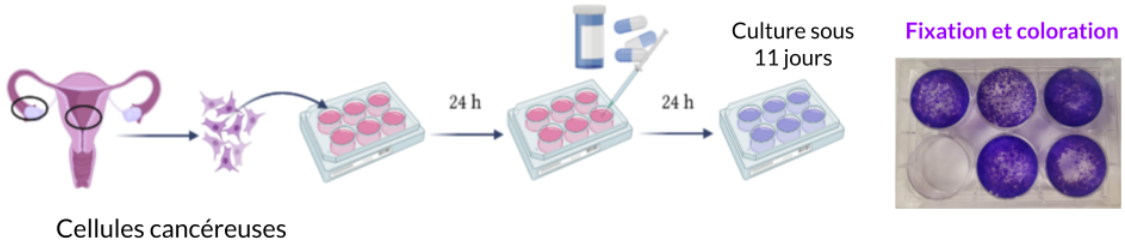
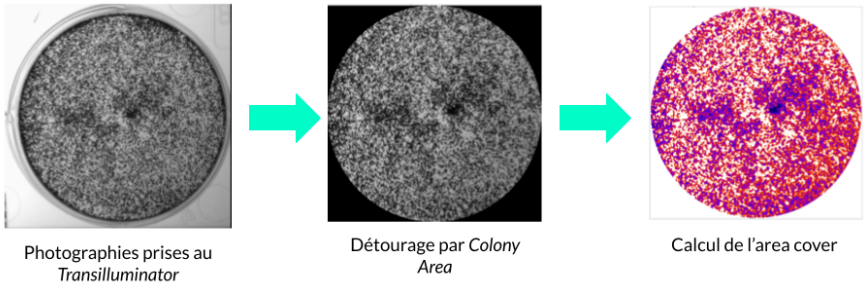


FIGURE 5.3 – Représentation schématique des différentes étapes de la technique de *tracking back*. Après l'acquisition des images en vidéo-microscopie, les cellules sont suivies individuellement au cours du temps à l'aide du logiciel *Toto-Cell*, permettant la génération d'un arbre de lignage (cladogramme) retraçant l'historique de chaque cellule et de ses descendantes. À la fin de l'expérience, les cellules sont fixées puis soumises à une analyse par immunofluorescence afin d'identifier les cellules présentant le signal d'intérêt. Un système d'annotations graphiques a été développé dans *Toto-Cell* afin de marquer ces cellules positives directement sur le cladogramme (indiquées ici par les marqueurs rouges). Cette approche permet ensuite de remonter rétrospectivement l'historique complet des cellules marquées et d'associer leur comportement dynamique observé en vidéo-microscopie à leur phénotype moléculaire déterminé après fixation.



(a) Procédure de test de clonogénicité.



(b) Étapes du détourage d'images.

FIGURE 5.4 – Illustration de la procédure de test de clonogénécité et étapes de détourages des images par le module *colony area* d'imageJ.
Test de clonogénicité : Les cellules sont ensemencées à faible densité et cultivées pendant 12 jours afin de permettre la formation de colonies dérivées d'une cellule unique. Les colonies sont ensuite fixées et colorées au crystal violet pour visualisation et quantification.
Analyse « colony area » : Quantification de la surface totale occupée par les colonies après binarisation des images et analyse par logiciel (ex. ImageJ), permettant d'évaluer l'effet sur la capacité proliférative cellulaire.

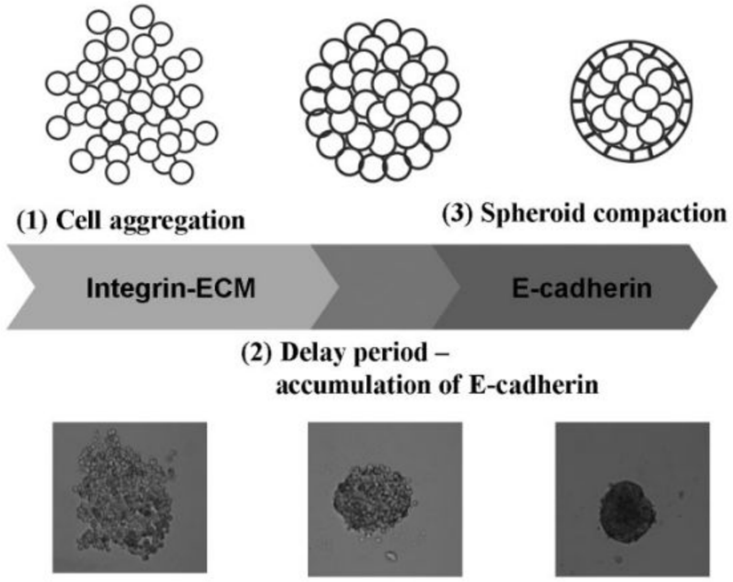


Figure 1. A model of the spheroid formation process. Spheroid formation can be divided into three stages: (1) formation of loose cell aggregates *via* integrin-ECM binding; (2) a delay period for cadherin expression and accumulation; (3) formation of compact spheroids through homophilic cadherin-cadherin interactions.

FIGURE 5.5 – Représentation des différentes étapes d'aggrégation d'un sphéroïde - extraite de [375]. Schéma des différentes étapes de formation d'un sphéroïde. L'agrégation initiale des cellules est médiée par les interactions intégrines–matrice extracellulaire (ECM), conduisant à la formation d'agrégats cellulaires lâches. Cette phase est suivie d'une période d'accumulation et d'expression de l'E-cadhérine, favorisant les interactions homophiliques cellule-cellule et la compaction progressive du sphéroïde en une structure dense et organisée. Des images représentatives illustrent chaque étape du processus.

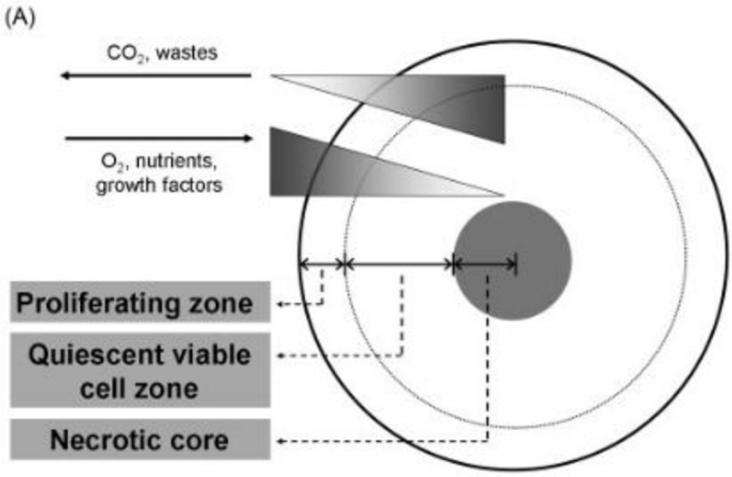


FIGURE 5.6 – Représentation des différentes stades d'un sphéroïde, démontrant les différentes couches présentes - extraite de [375]. Représentation de l'organisation spatiale d'un sphéroïde mature. Les gradients de diffusion de l'oxygène, des nutriments et des facteurs de croissance depuis le milieu extracellulaire vers le centre du sphéroïde, ainsi que l'élimination des déchets métaboliques et du CO_2, conduisent à la formation de trois régions distinctes : une couche périphérique prolifératives, une zone intermédiaire de cellules viables quiescentes et un cœur nécrotique central.

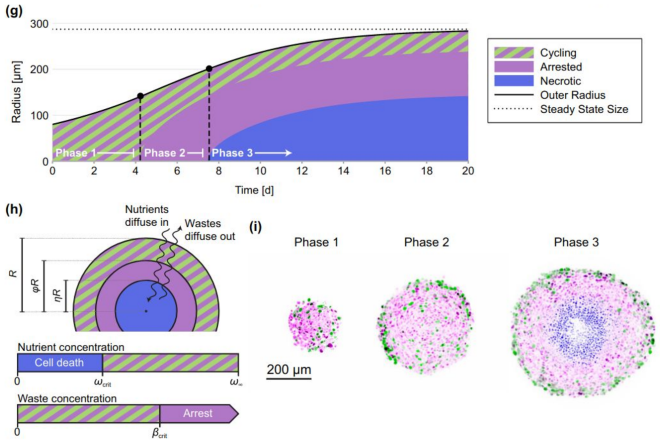


FIGURE 5.7 – Représentation des différentes étapes d'une croissance de sphéroïde, démontrant les différentes étapes du cycle cellulaire que suivent les cellules - extraites de [376]. Évolution temporelle de la croissance d'un sphéroïde et de sa composition cellulaire. Au cours de la phase initiale, la majorité des cellules sont prolifératives. Avec l'augmentation du rayon du sphéroïde, les limitations de diffusion entraînent l'apparition d'une population de cellules en arrêt de cycle (phase quiescente), puis d'un cœur nécrotique. Le schéma illustre les différentes phases de croissance, la distribution spatiale des populations cellulaires et l'établissement progressif d'un état d'équilibre caractérisé par la coexistence de cellules prolifératives, quiescentes et nécrotiques.

Chapitre 6

Article 1

« *Toto-Cell : un nouveau logiciel pour analyser les événements cellulaires lors de la vidéo-microscopie* », publié dans la revue PLOS ONE, 21 juin 2024 [377].

Toto-Cell : A new software to analyze cellular events during video-microscopy, **Auteurs :** Léa-Isabelle Renaud (1), Christophe Renaud (2), Samuel Delepoulle (2), Eric Asselin (1).

(1) : Laboratoire de Gynéco-Oncologie Moléculaire, Université du Québec Trois-Rivières, Trois Rivières, Québec, Canada

(2) : Laboratoire d'Informatique, Signal et Image (LISIC), Université du Littoral Côte d'Opale, Calais, France

— **Léa-Isabelle Renaud** : Curation des données, analyse formelle, méthodologie, validation, rédaction – version originale, rédaction – révision et édition.
— **Christophe Renaud** : Curation de données, logiciels, rédaction – révision et édition.
— **Samuel Delepoulle** : Logiciels, validation, rédaction – révision et édition.
— **Eric Asselin** : Conceptualisation, analyse formelle, obtention de financement, méthodologie, administration du projet, ressources, supervision, validation, rédaction – révision et édition.

6.1 Résumé (traduction de l'abstract).

La vidéo-microscopie est une technologie largement utilisée pour suivre, au niveau d'une seule cellule, le comportement cellulaire. Plusieurs études récentes cherchent à suivre ces comportements à l'aide de l'intelligence artificielle ; malheureusement, certains événements en temps réel doivent encore être suivis manuellement. C'est pourquoi nous avons développé un logiciel qui aide l'expérimentateur à analyser les données collectées. *Toto-cell* est très simple à utiliser et peut être adapté à différents types d'analyses ou de traitements.

Il permet d'accéder à une nouvelle gamme étendue de paramètres qui étaient pratiquement impossibles à calculer à la main. Nous avons donc développé ce nouveau logiciel en utilisant la lignée cellulaire endométriale HEC-1-A pour suivre différents paramètres cellulaires tels que : le nombre de mitoses normales/anormales, le ratio quotidien de mort cellulaire, de mitoses, de fusions cellulaires ou enfin la durée entre deux cycles de mitose. Nous avons traité nos cellules avec du cisplatine, de la doxorubicine ou de l'AZD5363 (un inhibiteur d'AKT) afin d'obtenir différents événements cellulaires. Il en ressort une grande hétérogénéité des paramètres analysés entre les cellules d'un même traitement, comme le démontrent clairement les résultats fournis par Toto-Cell. En conclusion, notre logiciel est un outil important qui facilite l'analyse de la vidéo-microscopie de manière quantitative et qualitative. Il permet une plus grande précision par rapport aux calculs manuels.

6.2 Contexte et justification.

La vidéo-microscopie permet d'observer le comportement cellulaire en temps réel, offrant ainsi une fenêtre dynamique sur les processus biologiques. Cependant, l'analyse manuelle de ces données reste laborieuse, sujette à des biais et limitée par la subjectivité de l'observateur. Des outils automatisés sont nécessaires pour quantifier précisément des événements cellulaires complexes tels que la mitose, la mort cellulaire, la fusion cellulaire et les cycles mitotiques.

6.3 Développement de *Toto-Cell*.

Le logiciel *Toto-Cell* a été conçu pour combler ces lacunes. Il permet d'analyser des fichiers contenant des événements cellulaires annotés manuellement, en générant des cladogrammes et des statistiques détaillées. Il peut être utilisé directement sur la machine de l'utilisateur ou via une interface web, accessible à l'adresse suivante : `https://diran.univ-littoral.fr/web-cell/cell.html`.

6.4 Méthodologie expérimentale.

Modèle cellulaire.

Nous avons utilisé la lignée cellulaire humaine HEC-1-A, dérivée d'un adénocarcinome endométrial, pour les expériences. Les cellules ont été cultivées dans un milieu McCoy supplémenté et traitées avec trois agents : le Cisplatine (10 μM), la Doxorubicine (3 μM) et l'AZD5363 (inhibiteur d'AKT, 20 μM). Un témoin a été inclus en utilisant les mêmes volumes de diluants respectifs.

Vidéo-microscopie.

Les cellules ont été ensemencées 24 heures avant le début de l'expérience. Après traitement, un colorant fluorescent (SiR-DNA) a été ajouté pour marquer les noyaux cellulaires vivants. Des images ont été capturées toutes les 10 minutes pendant 72 heures, produisant ainsi une vidéo-microscopie de haute résolution temporelle.

Analyse des vidéos.

Chaque vidéo a été analysée par un opérateur humain, en suivant les cellules initialement présentes au début de celle-ci. Une saisie des événements cellulaires survenant pour chaque cellule a été effectuée et notée dans un fichier texte, dans le formalisme propre au logiciel d'analyse *Toto-Cell*.

6.5 Fonctionnalités de Toto-Cell.

Toto-Cell offre plusieurs fonctionnalités clés :

— Analyse statistique automatisée : calcule des paramètres tels que le nombre de mitoses normales/anormales, le taux de mort cellulaire, la fréquence des fusions cellulaires, et la durée entre deux cycles de mitose ;
— Visualisation des événements : génère des représentations graphiques (cladogrammes) de l'évolution des lignées cellulaires au fil du temps ;
— Adaptabilité : peut être personnalisé pour suivre d'autres paramètres ou utilisé avec différents types de cellules ou de traitements.

6.6 Résultat obtenus.

Les analyses fournies par Toto-Cell ont montré une hétérogénéité marquée entre les cellules traitées, illustrant la variabilité des réponses cellulaires aux traitements anticancéreux.

6.7 Applications et perspectives.

Bien que l'étude se soit concentrée sur les cellules cancéreuses endométriales, *Toto-Cell* est conçu pour être polyvalent. Il peut être utilisé pour analyser d'autres modèles cellulaires, tels que *C.elegans*, ou pour étudier des phénomènes comme la fusion musculaire ou la reproduction cellulaire normale. Le logiciel peut également être intégré à d'autres outils d'analyse vidéo-microscopique open-source, comme
textitTrackMate, pour une analyse plus approfondie.

6.8 Accès au logiciel.

Toto-Cell est disponible en accès libre et gratuit, et peut être téléchargé sur le dépôt logiciel gitlab : `https://gitlab.com/crrenaud/cellv1.5`.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Toto-Cell: A new software to analyze cellular events during video-microscopy

Léa-Isabelle Renaud[1☯], **Christophe Renaud**[2☯], **Samuel Delepoulle**[2☯], **Eric Asselin**[1☯*]

1 Laboratoire de Gynéco-Oncologie Moléculaire, Université du Québec Trois-Rivières, Trois Rivières, Québec, Canada, **2** Laboratoire d'Informatique, Signal et Image (LISIC), Unfigiversité du Littoral Côte d'Opale, Calais, France

☯ All these authors are contributed equally to this work.
* eric.asselin@uqtr.ca

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Renaud L-I, Renaud C, Delepoulle S, Asselin E (2024) Toto-Cell: A new software to analyze cellular events during video-microscopy. PLoS ONE 19(6): e0302042. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042

Editor: Alexander F. Palazzo, University of Toronto, CANADA

Received: February 6, 2024

Accepted: March 27, 2024

Published: June 21, 2024

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042

Copyright: © 2024 Renaud et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available at https://gitlab.com/crrenaud/cellv1.5.

Funding: This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (2019-06151 to EA). The funders

Abstract

Video-microscopy is a technology widely used to follow, in a single cell manner, cell behavior. A number of new studies are searching a way to track these behaviors by artificial intelligence; unfortunately some real-time events still have to be track manually. For that reason, we developed a software that helps the experimenter to analyze collected data. Toto-cell is very simple to use and it can be adapted at different type of analyses or treatments. It allows a wide new range of parameters that were nearly impossible to calculate only by hand. We thus developed this new software using HEC-1-A endometrial cell line to track different cellular parameters such as: the number of normal/abnormal mitosis, the ratio per day of death, mitosis, cell fusions or finally the length between two mitosis cycles. We treated our cells with cisplatin, doxorubicin or AZD5363 (an Akt inhibitor) to obtain different cellular events. What emerged is a huge heterogeneity for these analyzed parameters between the cells in a single treatment which is clearly demonstrated by the results provided by Toto-Cell. In conclusion, our software is an important tool to facilitate the analysis of video-microscopy, in a quantifying and qualifying manner. It enables a higher accuracy when compared to manual calculations.

Introduction

Video-microscopy may appear to be a new technology but in fact it has been used since 1976 with the C.Elegans model [1]. The principle of this imaging technique is to follow the different behaviors of animated living things by taking pictures at a given latency and by making videos with these pictures. In 1976, scientists took their own images manually and had to stayed close to the microscope during the entire experiment. In fact, since then, improvements in terms of automation have been developed: our microscope's cameras are now able to take pictures in real-time. Nowadays the next more important problem is always the analysis of the videos and pictures. A lot of new projects are meant to improve the analysis of these videos [2], but due to the diversity in cell morphology and types, differences between imaging protocols (use of a confocal, an Incucyte, or a home-made installation for examples), it is really difficult to obtain

had no role in study design, data collection and anal-ysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

a reliable automation of image analysis. Creation of a way to detect different events in time-lapse videos is currently in progress, but most of these projects are for normal mitosis model [3], which means a fully symmetric division into two cells. Somehow the other events such as mitosis in more than two or fusion appear difficult to be taken into account for the moment. This means that further manual analysis is required in videos containing this type of complex behavior, which frequently occurs in cancer cells.

In biology, a new area of single cell analysis has changed our knowledge of cancer therapy. Single cell sequencing in genomics or proteomics leads to a precise way of analyzing the molecular pathways inside tumor cells [4, 5]. Thus, video-microscopy can be used as a single cell technique in cancer biology; conversely to the current methods that are only taking a snapshot only at the end of the experiment [6], video-microscopy can show the different cells behaviors consistently during the entire experiment. In testing new cell drugs, it is useful to know if the treatment works or not and moreover to elucidate what kind of events are arising. In fact, previous methods such as clonogenic assay and scratch assay can be linked to video-microscopy to clarify if a treatment is working for example by killing the cells, or by stopping mitosis for an amount of time. According to this, heterogeneity in cancer is the most common point of therapy failure [7], each individual cell being able to react in its own way to a treatment. Without single cell analysis, it is impossible to link the individual behavior of one cell to its fate at the end of the experiment. With this same idea in mind, we observed in our videos some events called fusions. This event is not a well-known and described phenomena, and is characterized by the fusion of two or more cells into one. It is unclear for now, how fusions on cancer initiation and progression are implicated but what we know is that the cell fusion frequency is increasing with the tumor size [8]. As expected the fusion of cells increases the tumor heterogeneity where genomic instability and chromosomal variations play a critical role in driving the evolution of tumors [9]. For all these reasons, video-microscopy are required to be annotated manually to better understand how a treatment works at the single cell level.

The main aim of this article is to present the Toto-Cell software developed by our team. This tool was created to facilitate the graphical presentation of the manual annotation of a video-microscopy and to optimize its analysis phase. We performed video-microscopy experiments with different types of drugs and showed parameters that can be useful to analyze the cell's behavior after a treatment. This article shows the different parameters that Toto-Cell can extract from the data, how it calculates them and its application on endometrial cancer cells.

Materials and methods

Cell culture and treatments

Human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1-A (from ATCC) were cultured respectively in Mc Coy medium supplemented with 5% of BGS, with 0.1% gentamycin. Cells were grown in an incubator at 37˚C and 5% CO_2. Cells were cultured for no longer than 10 weeks.

Cells were treated with anti-cancerous treatments at different concentrations: Cisplatin (Selleckchem, NSC 119875) 10μM, Doxorubicin (Selleckchem, S1208) 3μM, and AZD5363 (Adooq, A11759) 20μM. Control was defined by adding the same volumes of diluant (respectively saline for Cisplatin, DMSO for Doxorubicin and AZD5363).

Video-microscopy

The experimental scheme is described in Fig 1. Namely, 24 h before treatment, the cells were plated in a 8-wells rack (Thermofisher—12-565-338) 15 000/cm^2. 24 h after treatment, media was removed, cells were washed carefully with PBS, and 500μL of media was added with a dilution of 0.5μM of SiR- DNA (SPY650-Spirochrome) to counterstain the nucleus of alive cells.

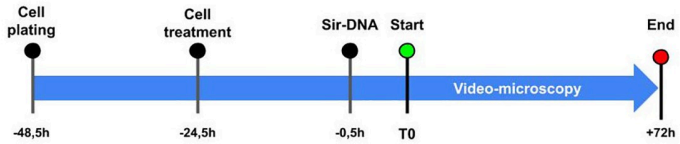


Fig 1. Temporality of video-microscopy. Cells were plated 48,5 hours before the start of the video-microscopy; 24 hours after the plating, cells were treated with controls, chemotherapy or targeted treatment, the Sir-DNA was added 30min before the start of the experiment. After that, one picture in two channels (brightfield and far red) were taken each 10min during 72 hours. At the end of the 3rd day, the pictures were compiled into a movie.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g001

Then, the rack was inserted into an incubation chamber (INUB-GSI2F1, Tokai Hit) and then imaging was performed with a Leica TCS SP8 confocal microscope. After setting up standard cell culture conditions (i.e., 37˚C/5% CO_2 and water), pictures of 10 to 20 cells were taken at 20X (Leica microsystems) magnification at 3 separate locations in each well every 10 min over 3 days on 2 different channels: a phase contrast brightfield channel to obtain the whole cell morphology and a far-red fluorescence channel (λabs/Em 664/684nm) to detect SirDNA-labelled nuclei. The 2 channels allowed the suitable tracking of cellular observables. Pictures were taken at 1024x1024 format, speed 200, zoom factor 1 and at magnification 20x/0.75 DRY (HC PL APO CS2). Complete movies were obtained from the compilation of the 432 images from both channels. Movies were transformed into .tif files using the Leica Application Suite (Leica, Advanced Fluorescence, version 4.0.0.11706). Each cell was then manually tracked frame by frame over the 432 frames using Fiji visualization tool [10]. The type and timing of appearance of phenotypic observable (cell count, normal mitosis, non-dichotomic mitosis, cell fusion, mitotic death, non-mitotic death) were manually monitored (Fig 2). Abnormal mitosis was characterized by either a division in more than 2 cells (non-dichotomic mitosis) or normal mitosis followed by the coalescence of the daughter cells (cell fusion). Cell death was characterized as a function of the presence or not of a previous cell division (mitotic death and non-mitotic death were identified in a similar manner).

Analysis of cell monitoring data

The results of the manual tracking are then provided to our Toto-cell software. This application has been developed to graphically represent the evolution of the cells studied in a video-microscopy experiment, as well as providing a range of statistics concerning this evolution. It was developed in the C++ language and can be used via a Web interface for ease of use (see Fig 3).

The application takes as input a file in which the person who manually analyzed the video has noted the evolution of each of the cells studied in the experiment. After analyzing the input file, it produces a graphical representation, in the form of cladograms of the evolution of all the

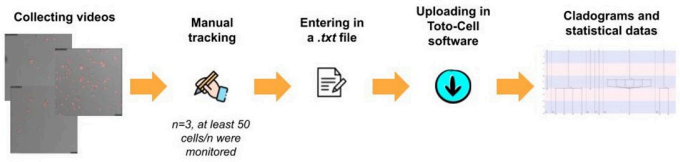


Fig 2. Toto-Cell bio-statistical processing of video-microscopy. Each video was collected and tracked manually. At least 50 cells were followed for one repetition, for a mean of 150 cells per condition. All the data were entered into a .txt file thas was then uploaded into Toto-Cell. It gave us cladograms and a .csv file with our statistical datas.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g002

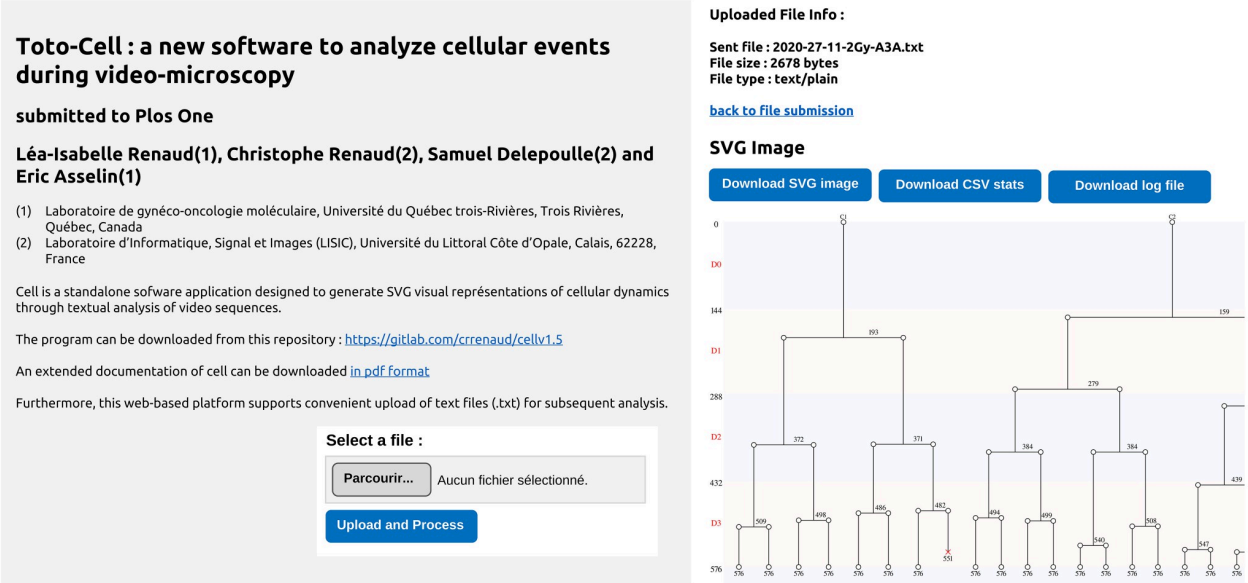


Fig 3. The web interface of Toto-Cell. The web interface offers to load an event file available on the experimenter's computer (a). Once the file has been selected and uploaded, Toto-Cell performs the analysis remotely, displaying the results on a second page (b). The user can then retrieve the image representing the cladogram and the statistics file, and return to the submission page if necessary. The submission page can be accessed at https://diran.univ-littoral.fr/web-cell/cell.html.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g003

```
# cell 1
0 begin C1
250 death C1

# cell 2
0 begin C2
112 div C2 3 C2.1  C2.2  C2.3

287 out C2.2
380 fusion C2.1 C2.3 in C2.4
410 death C2.4

# cell 3
0 begin C3
432 end C3
```

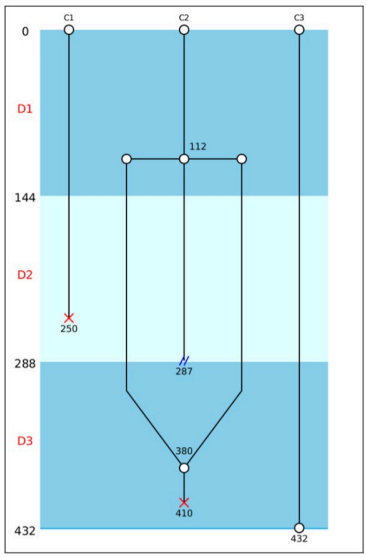


Fig 4. Example of an event file. 3 cells were analyzed and the events relating to them were reported in the text file whose content is shown on the left: the cells are all present at the start of the video (time 0) and are named C1, C2 and C3 at the time they were created (`0 begin C1` for example). Cell C1 dies at time 250, while cell C2 undergoes abnormal mitosis into 3 cells at time 112. These 3 cells are named (C2.1, C2.2, C2.3), with the second cell leaving the camera field at time 287. The daughter cells C2.1 and C2.3 then fuse at time 380 before the new cell obtained (named C2.4) dies at time 410. Finally, cell C3 is not affected by any event and we mark the end of the analysis at time 432 (end of the video). The right part of the figure present the corresponding cladogram.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g004

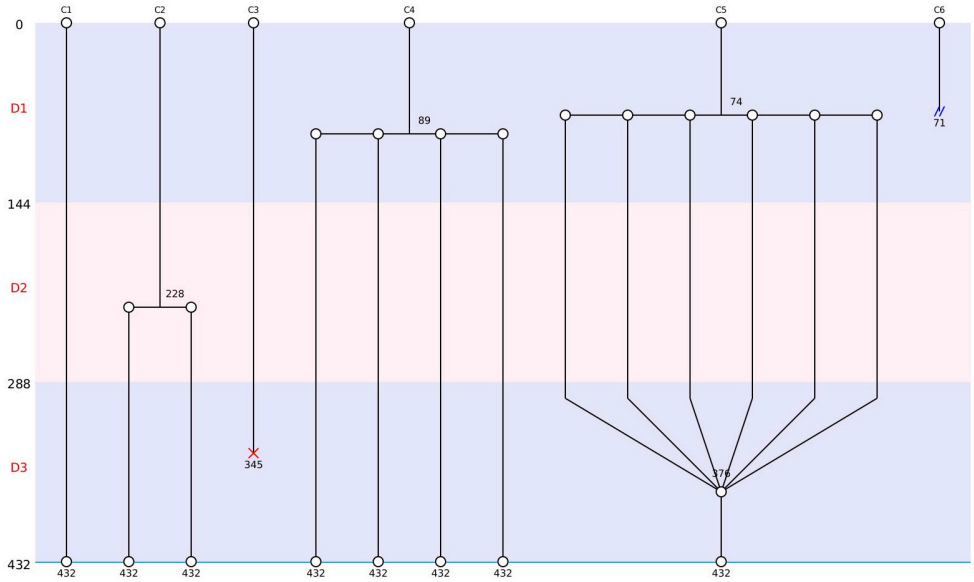


Fig 5. Representation of the different events by Toto-Cell in cladrogramm. This cladrogramm shows the different events that Toto-Cell can produce. At the left side, the days and their definition by frames, in the top the name of the cells. The C1's cell has no event during the 3 days; the C2's cell has a division in the frame 228; the C3's cell dies in the 345th frame; the C4's cell is dividing in 4 in the frame 89; the C5's cell is dividing in 6 daughter cells in frame 74 and fusion all together in 376; finally the C6's cell is getting out the field at frame 71.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g005

cells studied, as well as a file of statistics on this evolution. The graphical representation is generated in the form of an image in SVG graphics format. This format is recognized by most image-editing software and offers the possibility to zoom in on different parts of the image without any loss of quality. This is a real advantage when the number of cells in the video sequence grows. The statistics file is generated in CSV format, which is recognized by most spreadsheet programs, which makes them easier to use.

The video sequence analysis file must be created by the person analyzing the video in a text file, following very simple and intuitive instructions relating to each of the events that can be encountered in a video: presence of a cell, death or exit of a cell, division into several cells or fusion from several cells present. In order to identify each cell processed, the experimenter must assign them a name, which must be unique for each video. Each instruction should be indicated in the same way, by first indicating the number of the image in which it occurs, followed by a keyword corresponding to the event identified and followed by the name of one or more cells affected by this event. An example of such a file, associated with the image obtained, is provided in Fig 4 and the documentation available on the Toto-Cell web page details all the functions available in the software.

Note that a version of Toto-Cell is available for installation directly on the user's machine, which can be useful if there is no network connection, for example. A version of the software exists for Windows, MacOs and Linux on the gitlab software repository (https://gitlab.com/crrenaud/cellv1.5), where the application sources and documentation can also be found.

Figures and charts

Figures were made with GraphPad Prism v9.5 and charts with Xmind v23.11. All the cladograms were generated by Toto-Cell.

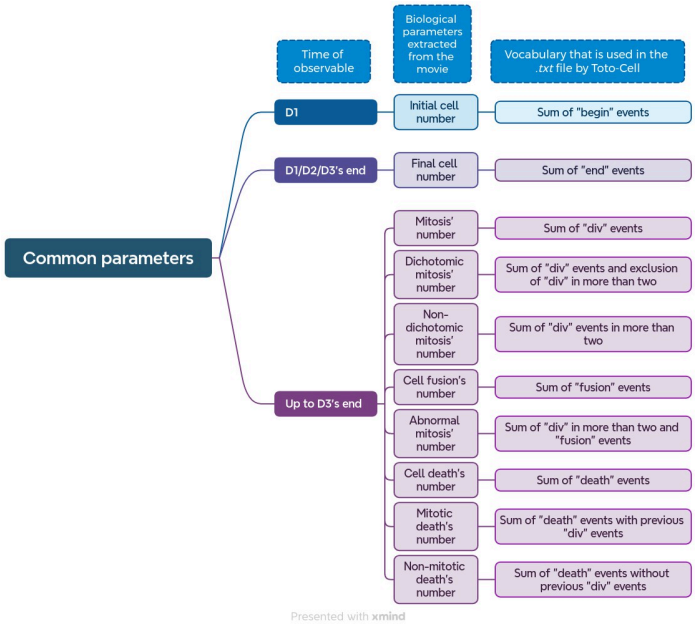


Fig 6. Common parameters extracted from video-microscopy data by Toto-Cell. This chart is showing in three different columns the time of observable, the biological parameters that are extracted from the videos and the vocabulary used in the.txt file that Toto-Cell translates into statistics. Briefly, initial cell number is an indicator of how many cells have the event "begin", it permits to show how many cell the experimenter has followed. The final cell number is the accounting of all the cells that finished at the end of the video, it is translated by an "end" event in the .txt file. Mitosis number is the sum of all the "div" event either abnormal or normal divisions. Dichotomic and non-dichotomic mitosis' number are respectively the exclusion of one and the other. That is to say, dichotomic mitosis count do not take into account divisions in more than two, and non-dichotomic mitosis count do not take into account normal mitosis. Next, the fusion number is a number calculation of fusions in the video. For abnormal mitosis number it is the account of each mitosis that was abnormal or followed by a fusion. And finally, a characterization of the death, with the total number of cell death (sum of "death" events) and if it was preceded of a mitosis.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g006

Results

Different events can occur in video-microscopy and are treated by Toto-Cell: division (normal and abnormal), fusion, death and an exit of the field. We used here Hec-1-a endometrial cancer cells treated in monotherapy, filmed with confocal imaging technology, to test our software. For our experiment, 3 days are 432 frames. To help the experimenter with the analyses of these events we defined parameters on Toto-Cell.

What produces Toto-Cell?

Phylogenic trees or cladogramms. As explained before, the first cladograms were designed in the 70's with C.Elegans. The nomenclature is still the same since this period. As you can see in Fig 5, according to the methodology a separation and new branches correspond to a division and a red cross means death. In our representation, a double parallel blue bar stands for an exit out the field. A fusion is characterized by the union of a number of cells. If a cell has spent all the time of the video-microscopy without any event, it would be represented by a straight line from the top to the bottom of the cladogram. At the top of the cladogram, the user can find the cells' names. Here we used a number for defining the cells. At the left of the cladogram you can find the days and the number of frames that composed a day. For each

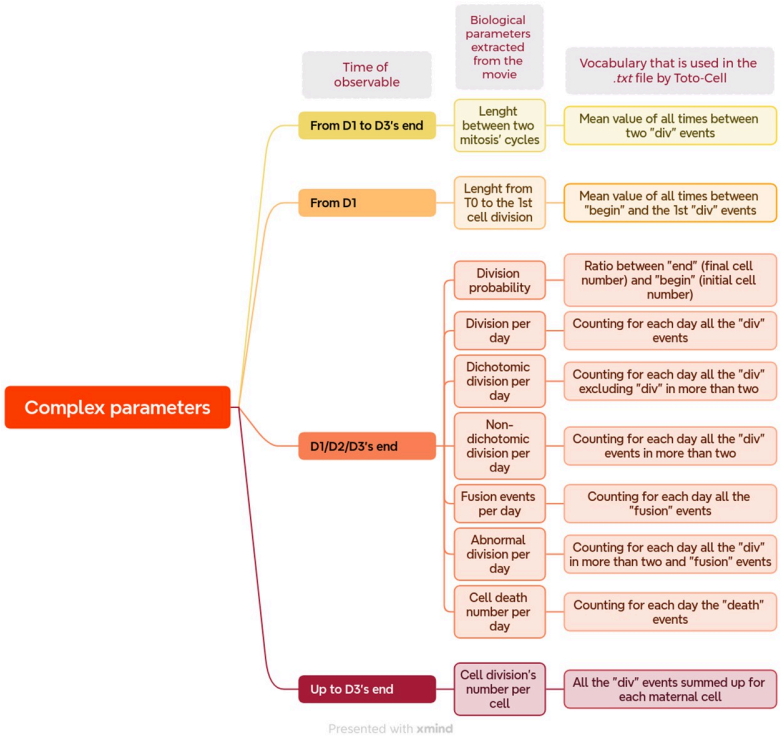


Fig 7. Complex parameters extracted from video-microscopy data by Toto-Cell. This chart is showing in three different columns the time of observable, the biological parameters that are extracted from the videos and the vocabulary used in the .txt file that Toto-Cell translates into statistics. These parameters are using mostly the previous one in Fig 6 to do calculations and have statistics. Firstly, the length between two mitosis' cycle is calculated by the mean of the time between two "div" events for all the cells that were followed. The length between T0 (start of the video microscopy, "begin" event in the .txt file) and the first event "div", mean value of all the followed cells that were followed. The division probability is a ratio between the number of cells that have an "end" and a "begin" events, it excludes all the cells that died, or went out of the field. To pursue, the others parameters are the different events but in ratio per day. And lastly, we have the cell's division number per cell, which summarizes all the "div" events for one maternal cell.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g007

event, the experimenter can see the event and the event frame number, which is always below the event.

Quantifying and qualifying data. Toto-Cell parameters are divided into two classes: the first ones are common parameters shown in Fig 6 and the others are the complex ones in Fig 7. These parameters are directly calculated from the data that are on the .txt file. We have quantifying parameters to basically help to understand in a numeric manner the treatment's effect. In Fig 6, initial cell number is a parameter that allows the experimenter to check the right amount of cells wanted. It calculates only the number of cells that have the event "begin" in the .txt file. The final cell number considers all the cells that finish at the end of the experimentation, not taking into account if it is a mother cell or a daughter cell, or the other events that can occur during the time of the video-microscopy.

Qualifying parameters are helping the characterization of different events, such as mitosis or death. The mitosis number summarizes all the divisions no matter the quality of the mitosis. More precisely we develop 3 tools to help qualify mitosis. First, we have the cell fusion's number that is the sum of the "fusion" events; these fusions can be between daughter cells after a division or unexpectedly with another cell with no previous lineage with the first one.

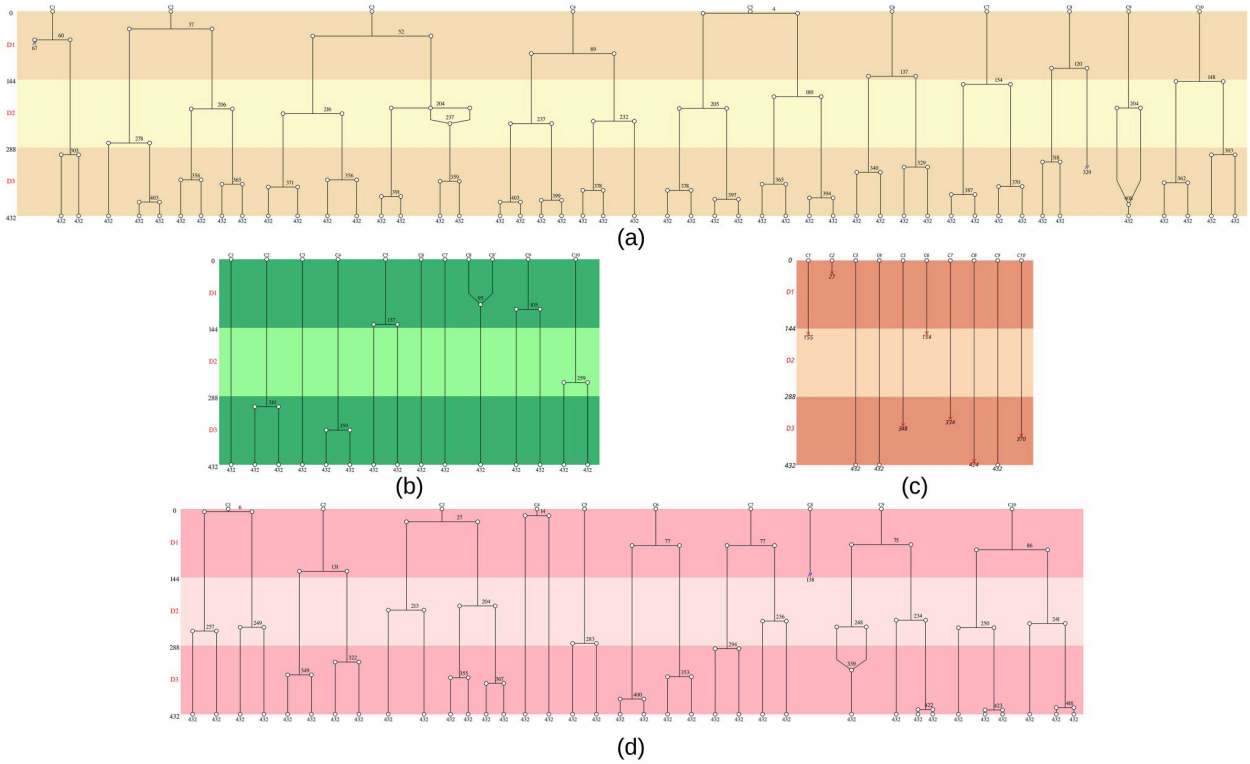


Fig 8. Cladograms representing treated (24h) HEC-1-A cells' behaviors. (a) Control cells, **(b)** Cisplatin treated cells (10μM), **(c)** Doxorubicin (3μM) treated cells, **(d)** AZD5363 treated cells (20μM)—three independent experiments.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g008

Secondly, we develop a counter of non-dichotomic mitosis' number, which means that Toto-Cell is counting all the "div" events that are in more than two as non-dichotomic. Finally, we have an abnormal mitosis counter, this one being defined as the mitosis in more than two and the fusion that can occur after a mitosis. Deeply, Toto-Cell is taking into account as "abnormal mitosis" only a mitosis followed by one of these two events; for example if a cell is doing a division in 4 and after that a fusion, Toto-Cell counts only one event. For death, we develop a tally, and precise after that the type between non-mitotic and mitotic death also known as a death following mitosis. We decided to study the length between two mitosis cycles: how long does it take to a cell to re-prepare itself to a new mitosis. It is a good indicator because a longer/shorter time for preparing cell's division can be explained by damages into the nucleus and chromosomes. This parameter is taking into account all the cells from the start to the end of the video. We also measure the time between the start of the video and the first division; this allows us to see if the treatment has delayed time of the first division.

To go further, we have defined "complex parameters" (see Fig 7) which require Toto-Cell to perform a number of calculations.

Conversely to the previous one that can potentially be calculated by hand without wasting too much time, these one would be too tedious and error-prone on such a large sample. Among them, we decided to study the length between two mitosis cycles: how long does it take to a cell to re-prepare itself to a new mitosis. This parameter is taking into account all the cells from the start to the end of the video. In the same line of quantification, we decided to take all the previous common parameters and to do a ratio per day, it allows us to see how and if the treatment has an effect, either delayed, over the long term, or, for example, directly but over

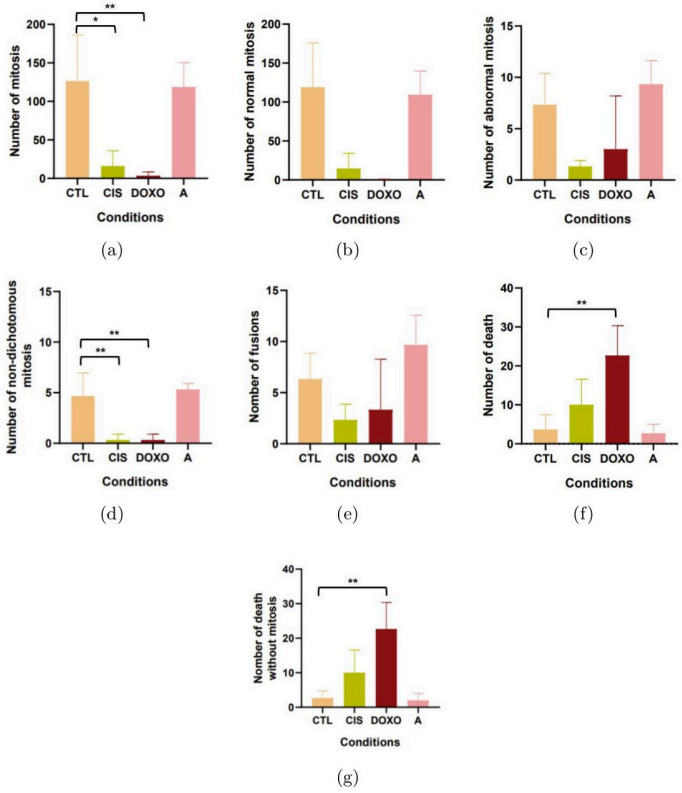


Fig 9. Application of simple parameters on control and treated (24h) HEC-1-A cells. CTL: control condition, CIS: cisplatin condition (10μM), DOXO: Doxorubicin condition (3μM), A: AZD5363 condition (20μM). **(a)** Number of mitosis on 3 days, **(b)** number of abnormal mitosis on 3 days, **(c)** number of abnormal mitosis on 3 days, **(d)** number of non-dichotomous mitosis, **(e)** number of fusions on 3 days, **(f)** number of death on 3 days, **(g)** number of death without mitosis. Anova one way followed by Dunett's test, results are mean ± S.D of three independent experiments. $^{*}=P < 0.05$; and $^{**}=P < 0.01$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g009

the short term. We also have a ratio between final cell number and initial cell number that enables to see the division probability on the total days of the experiments. Finally, depending on the heterogeneity of the cells responding to a treatment, we are developing a counter of events per cell, with which the experimenter can see whether a cell stands out from the others and study it in greater depth.

An example of how Toto-Cell works

We decided to test our software on data from video-microscopy. We used our Hec-1-a cells treated with cisplatin, doxorubicin or AZD5363 (an Akt inhibitor). The first two are chemotherapies that are used commonly in clinics for endometrial cancer, and the last one is a targeted therapy used in clinical trials [11]. We followed 150 cells for each condition.

Cladograms. First we looked at the cladograms produced by Toto-Cell (Fig 8).

For space reasons, here we put an extracted representative cladogram of 10 cells but the entire cladograms (for one repetition, 50 cells) can be found on the following additional webpage, with associated data (cell evolution and statistics): https://www-lisic.univ-littoral.fr/~renaud/VideoMicroscopy/PlosOne/.

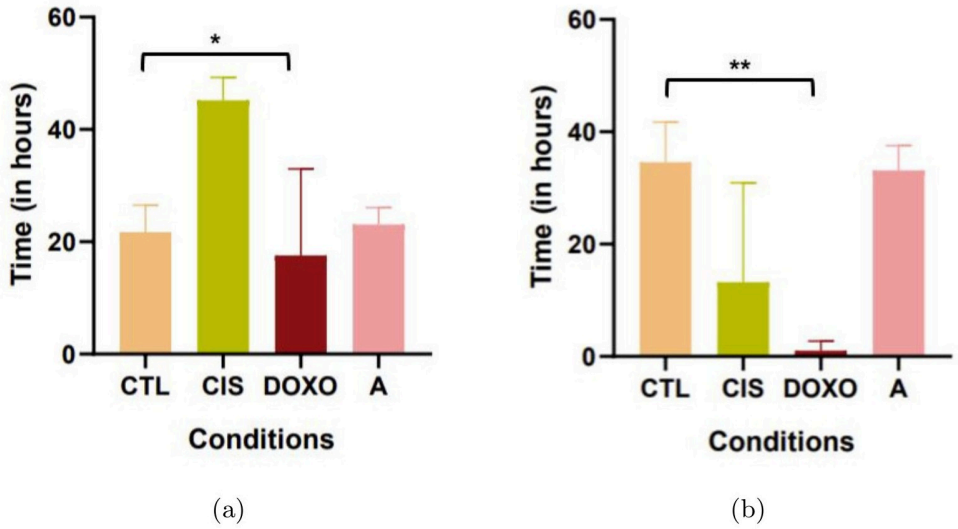


Fig 10. Representation of length of mitosis on control and treated (24h) HEC-1-A cells. CTL: control condition, CIS: cisplatin condition (10μM), DOXO: Doxorubicin condition (3μM), A: AZD5363 condition (20μM). **(a)** Mean of time between two mitosis (on 150 cells by condition) and **(b)** between D0 (start of the video-microscopy) and the first division (on 150 cells by condition). Anova one way and Dunett's test, results are mean ± S.D of three independent experiments. $^{*}=P < 0.05$; and $^{**}=P < 0.01$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g010

In control cells (Fig 8a), the behavior's pattern was really repetitive, one division occured each day. It was totally different for the cells treated with chemotherapies. With cisplatin treatment (Fig 8b) the cell divisions appeared to be delayed or have disappeared. For doxorubicin treatment (Fig 8c), we mainly saw death across the three days. And finally, with our targeted therapy (Fig 8d), the differences between control cells and treated cells were really slight. It appeared that the mitosis is delayed and the behavior of each single cell was heterogeneous.

Application of different simple parameters. Here, we wanted to show the different application of parameters of Toto-Cell. Firstly, with the cladograms in mind, we wanted to look at the number of mitosis (Fig 9).

As expected we observed differences with cisplatin and doxorubicin conditions but not with AZD5363 condition. In term of quality of mitosis, we looked at the number of normal and abnormal mitosis. What we observed was that there was no significant differences. But one parameter that was really interesting was that we could see in doxorubicin condition that the few mitosis are abnormal. For the qualifying of the abnormal mitosis, we showed here for our cisplatin condition, that there was less non-dichotomous mitosis than in control condition, it may seem surprising but in fact there is less mitosis in total so it is normal that there is less non-dichotomous mitosis too. For the number of fusion, we observed no differences between our conditions, which means that there is no treatment that reduces the phenomena. Lastly for death, obviously we observed a difference between doxorubicin condition and control, we had more deaths and these deaths were without mitosis as presented in Fig 9.

Application of different complex parameters. We decided to look after a panel of complex parameters extracted from our data. In Fig 10 we showed the differences of time between the start of the video-microscopy and the first division. As expected we observed a difference for doxorubicin condition. In the same line, we investigated the differences of time between two mitosis, and again the only relevant condition was doxorubicin.

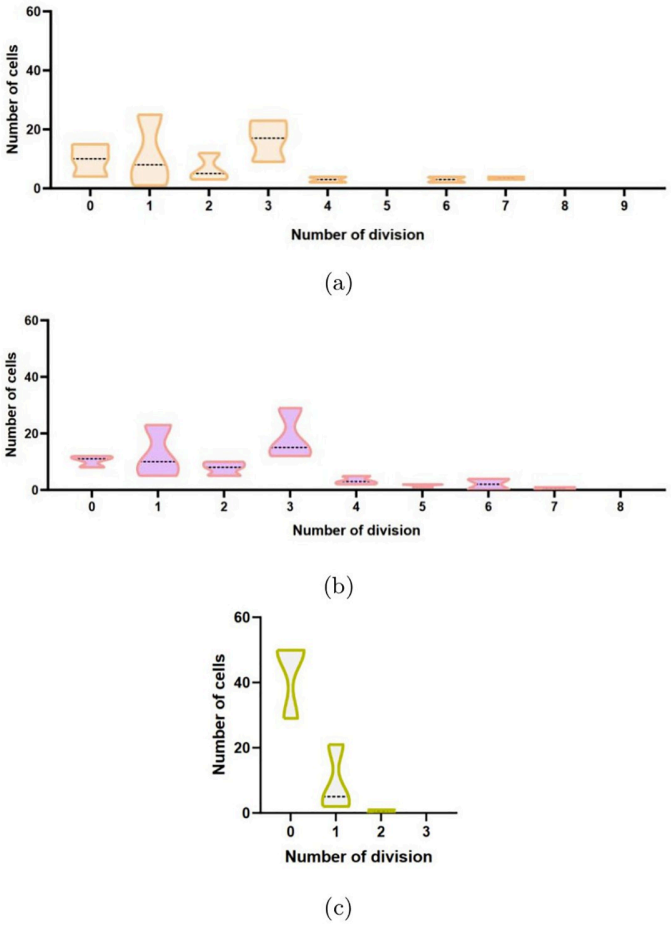


Fig 11. Violin distribution of the number of mitosis (single cell following) from D1 to D3 of control and treated (24h) HEC-1-A cells. Distribution's pattern of division's number for conditions, X-axis represents the number of division a cell did, Y-axis the number of cells that did the number of division(s). **(a)** Control condition, **(b)** AZD5363 condition (20μM), **(c)** Cisplatin condition (10μM) mean is represented by dot line, three independent experiments.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g011

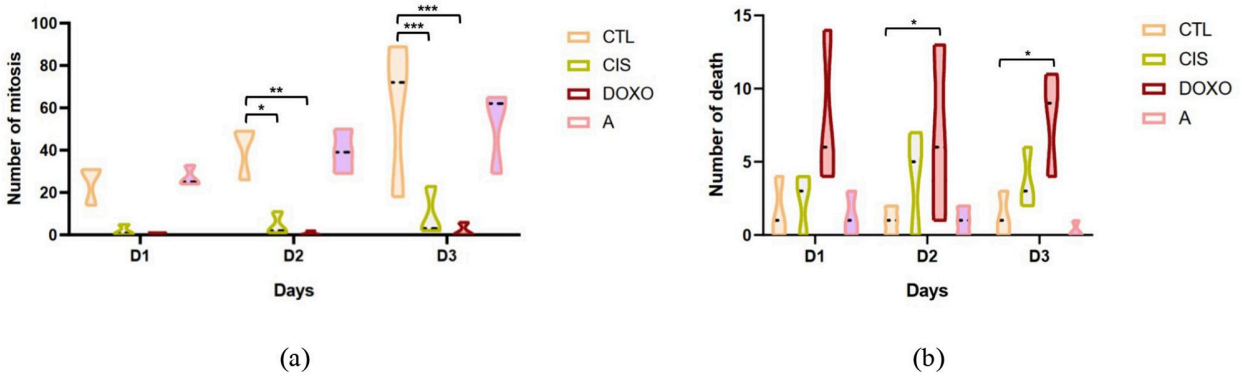
Following this study, we represented the different patterns of division in a single cell manner Fig 11: we represented here in violin diagrams, the number of cells that were doing a defined number of division(s). The AZD5363 and control condition have the same patterns, conversely to the cisplatin condition that did not go any further than two divisions

Table 1. Representation of division's number per cell, HEC-1-A cells treated (24h) with doxorubicin (3μM).

Repetitions	Number of division per cell							
	0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
n1	54	1	0	0	0	0	0	0
n2	54	0	0	0	0	0	0	0
n3	51	2	0	0	0	0	0	1

Each cell has made a precise number of division, here we represent for every repetition (n1, n2 and n3) the number of divisions each individual cell has experienced. This table showed that for doxorubicin's condition, there is so few division and it was impossible to represent in violin distribution.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.t001



(a) (b)

Fig 12. Time-dependent study of mitosis and death events of control and treated (24h) HEC-1-A cells. CTL: control condition, CIS: cisplatin condition (10μM), DOXO: Doxorubicin condition (3μM), A: AZD5363 condition (20μM). **(a)** Study of the number of mitosis between days, **(b)** Study of the number of death between days. Anova two ways, mean is represented by dot line, three independent experiments, $^{*}=P < 0.05$; $^{**}=P < 0.01$ and $^{***}=P < 0.001$.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g012

into 3 days. For doxorubicin (see Table 1) there was so few divisions that it was not possible to represent them in that type of graph.

Ultimately, we wanted to study if there is any difference for division or death between days. We showed here that there is less division in day two and three for our chemotherapy conditions compared to the control. And more deaths for the doxorubicin condition on day 2 and 3 (Fig 12).

Discussion

We showed here a new tool to help the manual analysis of video-microscopy. Toto-Cell software is very simple to use and can help to explain different results. Here we showed different parameters that can be interesting in cancer biology. We treated our cells with different drugs that are currently on the market. What we observed is that our HEC-1-A cells react differently between different conditions: cisplatin had few divisions but no death, doxorubicin either death or abnormal mitosis, and the effect of AZD5363 seems to lose its efficiency over time. It is really important to obtain these analysis because they can explain the results that we can have in other tests (such as clonogenic assays) and how a treatment is working or failing in a cell population. Taking the example of cisplatin, the fact that there is no mitosis during the first three days can explain the resistant phenotype of the HEC-1-A cell line, the cells are probably dividing again after the 3rd day. For doxorubicin, the fact that the mitosis are mostly abnormal can lead to the emergence of a new resistant tumor type.

The next important point is that in all of our graphs we observed heterogeneity. With at least 150 cells per condition, the most important point standing out was that the cells all have a different behavior even in the same well and in the same field. It is for this reason that single cell analysis is really important. That is why we developed a counter of events per cell and moreover we had a tracking back helper in Toto-Cell. The user, in the .txt file can point out with an icon a cell that had a different behavior and see on its cladogram how many cells had this same behavior 13.

For our experiments all the parameters were not relevant, for example the time between the start of our video and the first division, because we are treating our cell 24.5 hours before the video-microscopy. But in cases where the experimenter wants to see the direct effect of the drug or the therapy on the cells, by letting the drug into the media or in case of

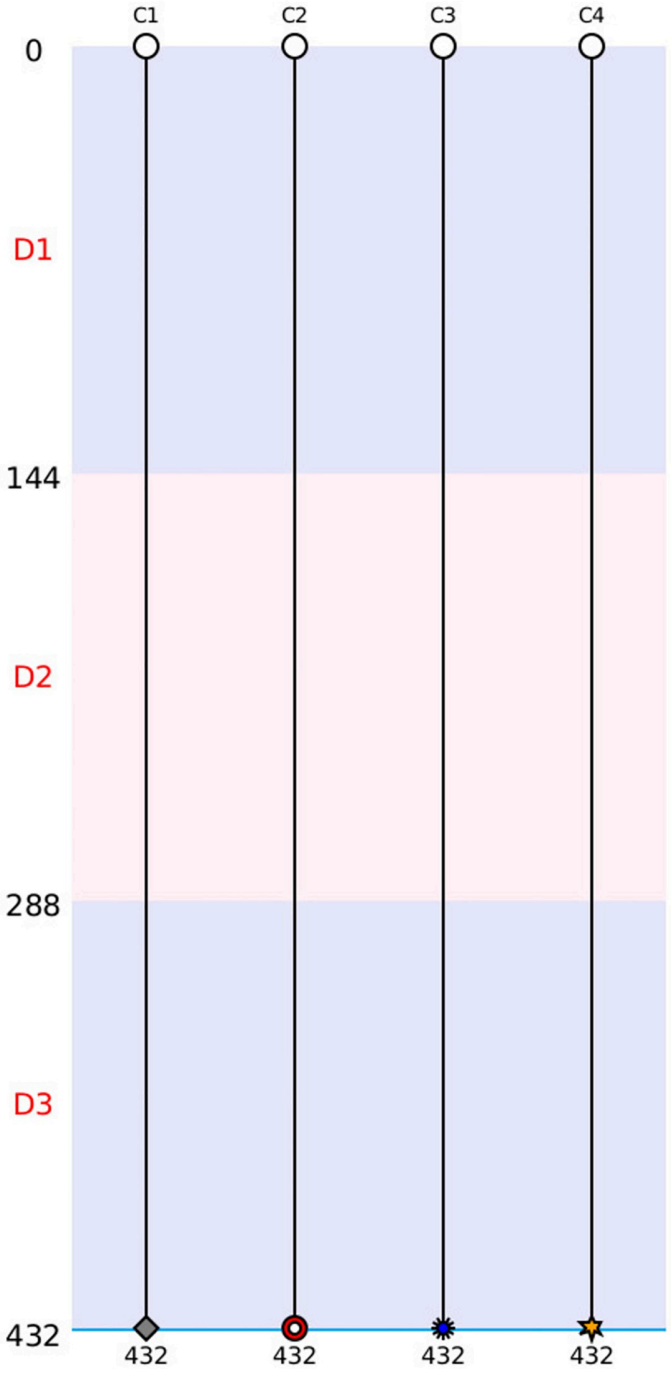


Fig 13. Representation of tracking back cells. The experimenter can choose between different forms and colors to point out a particular cell.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.g013

irradiating the cells, it is a very important pointing device. We know that all our parameters can be used in other treatment settings such as radiotherapy where mitotic death is such a great subject [12].

We are also very interested in using Toto-Cell in analyses other than cancer cells, as the software can be adapted very easily with as many parameters as the user wishes. For example, it would be interesting to use it with a model of C.Elegans, study of muscle cells that fuse over time, or with normal reproducing cells. It should be noted that this software can be made compatible with the output of existing analysis software, or even integrated with it if it is open-source (e.g. Trackmate [13]). This has not yet been done due to the current inability of such software to detect and/or follow the complex behavior of cancer cells (abnormal mitoses, fusions), which requires us to continue our analysis visually.

Conclusion

Toto-Cell can be used regardless of: the type of cell, the imaging technology used, how many pictures the experimenter has, time between the frames or the number of cells tracked. It facilitates the manual analysis of video-microscopy and has several advantages:

- It is easy to use, and it doesn't require to have any IT skills, particularly through the web interface that has been developed;
- It helps speed up manual analysis of video-microscopy;
- It is possible to calculate new parameters that were difficult manually;
- It produces automatically cladograms with as much cells as the experimenter wishes;
- It is very simple to upgrade Toto-Cell with different and designed parameters.

As presented in the material and methods sub-section, Toto-Cell is only working with a .txt file. The experimenter has to follow a precise syntax. We provide a handbook of this syntax with example both on the sofware repository and on the web interface.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pascal Adam and Amélie Lemire for their help in proofreading and editing this article. A particular thank to Mélodie B. Plourde for her help in confocal microscopy.

Author Contributions

Conceptualization: Eric Asselin.

Data curation: Léa-Isabelle Renaud, Christophe Renaud.

Formal analysis: Léa-Isabelle Renaud, Eric Asselin.

Funding acquisition: Eric Asselin.

Methodology: Léa-Isabelle Renaud, Eric Asselin.

Project administration: Eric Asselin.

Resources: Eric Asselin.

Software: Christophe Renaud, Samuel Delepoulle.

Supervision: Eric Asselin.

Validation: Léa-Isabelle Renaud, Samuel Delepoulle, Eric Asselin.

Writing – original draft: Léa-Isabelle Renaud.

Writing – review & editing: Léa-Isabelle Renaud, Christophe Renaud, Samuel Delepoulle, Eric Asselin.

References

1. Sulston J.E., Horvitz H.R., Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans, Developmental Biology, Volume 56, Issue 1, 1977, Pages 110–156, ISSN 0012-1606, https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0
2. http://celltrackingchallenge.net/, consulted on 2024/02/03.
3. Gilad T, Reyes J, Chen JY, Lahav G, Riklin Raviv T. Fully unsupervised symmetry-based mitosis detection in time-lapse cell microscopy. Bioinformatics. 2019 Aug 1; 35(15):2644–2653. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1034 PMID: 30590471
4. Kashima Y, Sakamoto Y, Kaneko K, Seki M, Suzuki Y, Suzuki A. Single-cell sequencing techniques from individual to multiomics analyses. Exp Mol Med. 2020 Sep; 52(9):1419–1427. https://doi.org/10.1038/s12276-020-00499-2 PMID: 32929221
5. Lei Y, Tang R, Xu J, Wang W, Zhang B, Liu J, et al. Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives. J Hematol Oncol. 2021 Jun 9; 14(1):91. https://doi.org/10.1186/s13045-021-01105-2 PMID: 34108022
6. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. Curr Pharm Biotechnol. 2016; 17 (14):1213–1221. https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513 PMID: 27604355
7. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin Oncol. 2018 Feb; 15(2):81–94. Epub 2017 Nov 8. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166 PMID: 29115304
8. Weiler J, Dittmar T. Cell Fusion in Human Cancer: The Dark Matter Hypothesis. Cells. 2019 Feb 7; 8 (2):132. https://doi.org/10.3390/cells8020132 PMID: 30736482
9. Yi E, Gujar AD, Guthrie M, Kim H, Zhao D, Johnson KC, et al. Live-Cell Imaging Shows Uneven Segregation of Extrachromosomal DNA Elements and Transcriptionally Active Extrachromosomal DNA Hubs in Cancer. Cancer Discov. 2022 Feb; 12(2):468–483. Epub 2021 Nov 24. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1376 PMID: 34819316
10. https://fiji.sc/.
11. Fabi F, Adam P, Parent S, Tardif L, Cadrin M, Asselin E. Pharmacologic inhibition of Akt in combination with chemotherapeutic agents effectively induces apoptosis in ovarian and endometrial cancer cell lines. Mol Oncol. 2021 Aug; 15(8):2106–2119. Epub 2021 Jan 4. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12888 PMID: 33338300
12. Sia J, Szmyd R, Hau E, Gee HE. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. Front Cell Dev Biol. 2020 Feb 13; 8:41. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00041 PMID: 32117972
13. Ershov D., Phan M.-S., Pylvänäinen J. W., Rigaud S. U., Le Blanc L., Charles-Orszag A., et al. (2022). TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. Nature Methods, 19(7), 829–832. https://doi.org/10.1038/s41592-022-01507-1 PMID: 35654950

Chapitre 7

Article 2

« *Aligner l'œil humain et l'algorithme : une étude multi-utilisateurs et multi-logiciels en vidéo-microscopie* », *en préparation, soumission prévue en janvier 2026.*

Aligning the human eye and the algorithm : a multi-user, multi-software study in video microscopy, **Auteurs :** Léa-Isabelle Renaud (1), Kelliane Béland (1), Christophe Renaud (2), Coralie Compare (3), Raphaëlle Proulx (1), Elisabeth Saint-Laurent (4), Emna Bouaine (1) et (2), Monique Cadrin (1) et Eric Asselin (1).

(1) Laboratoire de Gynéco-Oncologie Moléculaire, Université du Québec Trois-Rivières, Trois Rivières, Québec, Canada
(2) Laboratoire d'Informatique, Signal et Image (LISIC), Université du Littoral Côte d'Opale, Calais, France
(3) Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM U1068, CNRS UMR7258, Institut Paoli-Calmettes, Aix Marseille Université, Marseille, France
(4) Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, CANADA

— **Léa-Isabelle Renaud** : Curation des données, analyse formelle, méthodologie, validation, rédaction – version originale, rédaction – révision et édition.
— **Kelliane Béland** : Curation des données, méthodologie, logiciel, validation, rédaction – version originale, rédaction – révision et édition.
— **Christophe Renaud** : Curation de données, logiciel, rédaction – révision et édition.
— **Coralie Compare**, **Raphaëlle Proulx**, **Elisabeth Saint-Laurent**, **Emna Bouaine** : Curation des données
— **Eric Asselin** : Conceptualisation, analyse formelle, obtention de financement, méthodologie, administration du projet, ressources, supervision, validation, rédaction – révision et édition.
— **Monique Cadrin** : Révision et édition du manuscrit.

7.1 Résumé (traduction de l'abstract).

La détection et le suivi automatisés des cellules sont largement utilisés pour analyser les données d'imagerie de cellules vivantes, mais leurs performances restent fortement dépendantes de la qualité des images et des conditions expérimentales. Parallèlement, le suivi manuel des cellules reste une méthode de référence courante, bien que sa fiabilité soit influencée par l'expertise et la formation de l'utilisateur. Dans cette étude, nous avons combiné des analyses automatisées et basées sur l'utilisateur pour évaluer la reconstruction des lignées cellulaires cancéreuses à partir de données de microscopie 2D en temps réel de cellules vivantes.

Des vidéos en accéléré de cellules cancéreuses HEC-1-A et Cov-362, caractérisées par une intensité de fluorescence variable, un bruit de fond, un regroupement de cellules et des divisions fréquentes, ont été analysées à l'aide de trois outils d'analyse d'images biologiques largement utilisés (Imaris, CellProfiler et TrackMate). En parallèle, les mêmes ensembles de données ont été analysés manuellement par des étudiants de premier cycle et des étudiants diplômés, formés ou non à l'analyse par microscopie vidéo. Les résultats manuels ont été traités à l'aide du logiciel Toto-Cell afin de générer des arbres généalogiques et des descripteurs quantitatifs, qui ont ensuite été analysés à l'aide de scripts R personnalisés.

Nos résultats montrent qu'aucun des outils automatisés n'a permis une reconstruction fiable et entièrement automatisée des lignées cellulaires complètes. En outre, une variabilité inter-utilisateurs importante a été observée dans les analyses manuelles, les utilisateurs non formés nécessitant plus de temps et produisant des résultats plus divergents. Ensemble, ces résultats soulignent à la fois les limites des méthodes de suivi automatisées conventionnelles et le rôle essentiel de la formation des utilisateurs.

7.2 Méthodologie expérimentale.

7.2.1 Analyses manuelles et organisation des groupes d'utilisateurs

Les analyses manuelles ont été réalisées par différents groupes d'utilisateurs, répartis selon leur niveau académique (étudiants de premier cycle et étudiants des cycles supérieurs) et leur degré de formation à la vidéo-microscopie (formés ou non formés). Les protocoles ont été validés par des certificats éthiques (*CER-23-305-07.11* et *CER-24-307-08-01.06*).

Pour les étudiants des cycles supérieurs, quatre participants ont été inclus, chacun assigné à l'analyse d'une combinaison spécifique de lignée cellulaire (Cov-362 ou HEC-1-A) et de condition d'encadrement (supervisée ou non supervisée). Chaque étudiant diplômé a analysé 18 vidéos.

Pour les étudiants de premier cycle, un effectif plus important a été retenu

(10 étudiants par condition), chaque participant analysant 5 vidéos. Cette organisation expérimentale a permis d'évaluer l'impact du niveau d'expertise, de la formation et du nombre de vidéos analysées sur la qualité et la variabilité des résultats.

Les données issues de ces analyses manuelles (temps d'analyse, lignées cellulaires reconstruites, événements biologiques identifiés) ont été centralisées dans le logiciel *Toto-Cell*, permettant la génération d'arbres de lignées (cladogrammes) et de statistiques comparatives.

Les résultats produits par Toto-Cell ont été exportés sous forme de fichiers *.CSV*, puis traités à l'aide de scripts développés en langage R (version ≥ 4.0), exécutés dans l'environnement *RStudio Desktop*. Deux scripts principaux ont été utilisés : *functions_comparison.R*, regroupant les fonctions de traitement et de comparaison, et *Get_errors.R*, permettant l'exécution automatisée des analyses.

Chaque fichier *.CSV* a été structuré en trois composantes principales (Cells, Stats et Daily) via la fonction *Process_csv*. Les analyses comparatives ont ensuite été menées selon plusieurs approches : comparaisons pair-à-pair entre utilisateurs ayant analysé les mêmes vidéos, comparaisons entre un utilisateur de référence et un groupe d'utilisateurs, ainsi que comparaisons entre conditions expérimentales (traitement versus contrôle) après moyennage des réplicats biologiques. Ces analyses visaient à quantifier les écarts entre utilisateurs et méthodes, ainsi qu'à mesurer la variabilité induite par l'expérience et la formation.

7.2.2 Évaluation des logiciels d'analyse automatisée

En parallèle des analyses manuelles, trois logiciels d'analyse d'images biologiques ont été évalués : *Imaris* (version 9.2.1), *TrackMate* (plugin Fiji) et *CellProfiler* (version 4.2.8). Pour chacun d'eux, des pipelines spécifiques ont été construits, testés et optimisés afin de refléter au mieux leurs capacités dans un contexte de suivi cellulaire en imagerie 2D complexe.

Pour *Imaris*, plusieurs modules de détection (*Cell Detection* avec ses différentes options, et *Spots Detection*) et de suivi (*autoregressive motion*, *Brownian motion*, *lineage* et *connected components*) ont été testés séparément. La détection des cellules reposait principalement sur une approche par spots, avec ajustement manuel des tailles attendues et des filtres d'intensité, de qualité et de distance aux bords. Le suivi a ensuite été évalué en comparant les trajectoires générées aux événements observés manuellement dans les vidéos.

TrackMate a été évalué par plusieurs utilisateurs indépendants, chacun testant différents détecteurs (*DoG*, *LoG*, *Hessian*, *Threshold*, *Mask, Label Image*) et algorithmes de suivi (*LAP*, *Kalman*, *nearest-neighbor*, *overlap*, *advanced Kalman*). Les paramètres de détection et de suivi ont été systématiquement ajustés afin d'optimiser la reconnaissance des cellules, des divisions et des fusions, et les résultats ont été évalués à l'aide des outils de visualisation interne (*TrackScheme*).

CellProfiler a été utilisé via une pipeline modulaire comprenant la détection des objets primaires (*IdentifyPrimaryObjects*), la conversion des images RGB en niveaux de gris (*ColorToGrey*), le suivi temporel via l'algorithme *LAP* (*TrackObjects*) et l'exportation des résultats en fichiers *.CSV*. Les paramètres ont été maintenus proches des valeurs par défaut afin d'assurer la cohérence des comparaisons, en raison de l'absence de visualisation en temps réel des effets des réglages.

7.2.3 Critères d'évaluation communs

Pour l'ensemble des méthodes, automatisées et manuelles, plusieurs critères ont été évalués de manière systématique : la qualité de la détection cellulaire, la capacité à identifier les cellules de faible intensité et les cellules en amas, la sensibilité au bruit, la continuité du suivi au cours du temps, la détection des divisions et des fusions, l'apparition d'artefacts (cellules fantômes, duplications), le temps d'analyse requis, la stabilité des logiciels et la nécessité d'interventions manuelles.

L'ensemble des vidéos analysées, des images annotées et des résultats intermédiaires a été archivé de manière structurée, et les difficultés rencontrées (limitations logicielles, documentation obsolète, instabilités) ont été systématiquement consignées.

Aligning the human eye and the algorithm: a multi-user, multi-software study in video microscopy

Léa-Isabelle Renaud[1], Kelliane Béland[1], Christophe Renaud[2], Coralie Compare[3], Raphaëlle Proulx[1], Elisabeth St-Laurent[4], Emna Bouaine[2], Monique Cadrin[1], Eric Asselin[1*]

***1**: Université du Québec à Trois-Rivières, département de biologie médicale, laboratoire de gynéco-oncologie moléculaire, Trois-Rivières, CANADA*

***2**: Laboratoire d'Informatique, Signal et Image (LISIC), Université du Littoral Côte d'Opale, Calais, France*

***3**: Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM U1068, CNRS UMR7258, Institut Paoli-Calmettes, Aix Marseille Université, Marseille, France*

***4**: Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, CANADA*

**Corresponding author*

Abstract

Automated cell detection and tracking are widely used to analyze live-cell imaging data, yet their performance remains constrained by image quality, biological complexity, and experimental conditions. Manual cell tracking also remains a common reference approach, but it is user-dependent and can introduce substantial annotation variability. This study combined user-based and software-based analyses to evaluate cancer cell lineage reconstruction from 2D live-cell time-lapse microscopy under realistic imaging conditions.

Time-lapse videos of HEC-1-A and Cov-362 cancer cells, exhibiting variable fluorescence intensity, background noise, cell clustering, and frequent divisions, were manually analyzed by undergraduate and graduate users with or without supervision and evaluated against an experienced reference user. Percentage differences were interpreted descriptively as annotation discrepancies relative to this reference rather than as absolute error rates. The same datasets were also tested with Imaris, TrackMate, and CellProfiler, and a preliminary YOLO-based detection approach was explored as a future direction.

Manual analyses revealed user-dependent divergence that varied with cell-line complexity, event type, training level, and supervision status. Automated tools generated

partial detection and tracking outputs but did not robustly reconstruct complete lineages without substantial parameter tuning and manual correction. Together, these results indicate that reliable quantitative video-microscopy analysis remains limited by both human annotation variability and current automated tracking methods, supporting the development of more robust, standardized, AI-based tools for live-cell analysis.

Introduction

Video microscopy acquires repeated images over defined periods, with temporal resolutions ranging from milliseconds to weeks [1]. Since early applications to rabbit embryos in 1929 and C. elegans in 1977, it has become a key approach for observing living systems without disrupting their natural behavior [1–3]. In cell biology and oncology, it enables single-cell monitoring of migration, proliferation, cell death, cell-cycle dynamics, and organelle behavior [3–8]. Because treatment failure is often driven by tumor heterogeneity, video microscopy provides a valuable strategy for studying therapy responses at the single-cell level [9,10].

Historically, users acquired images and manually tracked cells, but this approach is time-consuming, repetitive, and error-prone [1,11–14]. Long time-lapse recordings require hours of manual inspection followed by additional data processing, limiting the number of videos that can be analyzed and increasing the risk of user-dependent discrepancies. Inter- and intra-observer variability has been documented in related image-based techniques, including flow cytometry [15–17] and immunohistochemistry [18,19], where image quality, staining variability, and rare events can affect interpretation. Although comparable observer-variability studies remain limited in video microscopy, similar sources of variability are likely to affect manual lineage reconstruction.

Automated image-analysis tools have been developed to reduce manual workload and improve reproducibility [1,12]. Several tools exist for flow cytometry, immunohistochemistry, and specialized microscopy tasks [22–28]. In video microscopy, commonly used platforms include CellProfiler [29,30], TrackMate [31,32], Imaris [33,34], and Toto-Cell [9]. However, automated analysis remains strongly dependent on the segmentation and tracking steps used to identify objects, link them over time, and detect biological events.

Object segmentation can rely on thresholding, edge detection, watershed approaches, or combinations of these methods [12,35]. Each strategy has limitations: thresholding requires strong contrast, edge detection depends on clear boundaries, and watershed segmentation often struggles with overlapping or adjacent cells. After segmentation, tracking algorithms such as nearest-neighbor or feature-matching approaches attempt to connect objects between frames and identify events such as division, fusion, disappearance, or death [12]. These methods become less reliable when cells overlap, cluster, vary in intensity, or display irregular morphology.

The present study evaluates these limitations by combining two complementary analyses. First, we examined manual video-microscopy analyses performed by users with different academic backgrounds and supervision status, focusing on analysis

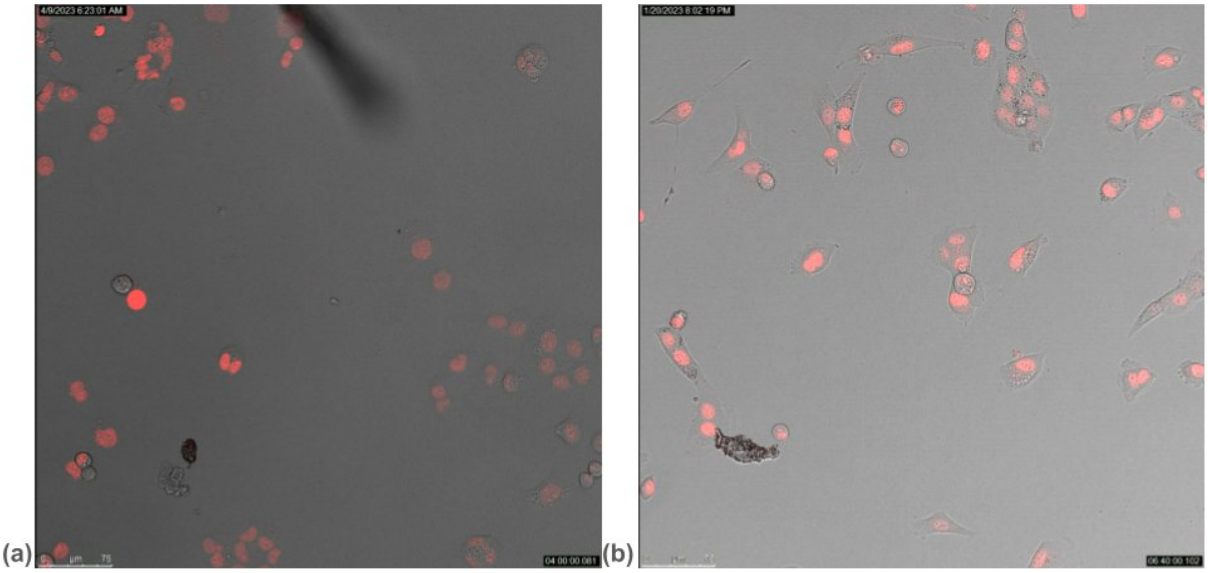
duration and reference-based annotation discrepancies. Second, we assessed the practical performance of Imaris, TrackMate, and CellProfiler on the same complex cancer cell datasets. By linking human variability with software limitations, this study aims to show that reliable quantitative video-microscopy analysis remains constrained under real-world imaging conditions and that these constraints justify the development of more robust AI-based approaches, including the preliminary YOLO-based strategy presented here.

Material and Methods

Video microscopy

Video microscopy was performed over 72 h, hereafter divided into days 1, 2, and 3, using videos of Cov-362 ovarian cancer cells and HEC-1-A endometrial cancer cells. Cov-362 cells were generally easier to analyze because they were mostly isolated and rarely clustered, although up to 26 cells could require tracking in a single video. HEC-1-A videos were more challenging because of lower image quality, large aggregates, frequent overlap, crossing trajectories, and cells moving above or below one another.

Figure 1: Representative video-microscopy images of (a) HEC-1-A and (b) Cov-362 cells.



Methodology with the experimenters

Ethics certificate numbers: CER-23-305-07.11 dated January 4, 2024, and CER-24-307-08-01.06 dated January 24, 2024.

Participants were stratified by academic level and supervision status into bachelor-level and graduate-level groups (Table 1). Four graduate participants were assigned by cell line and condition: for each cell line, one participant worked under supervision of the professional experimenter and one worked independently. Each graduate participant analyzed 18 videos. The bachelor-level design was similar, with 10 students per cell line and supervision condition; because of their lower experience, each analyzed five videos. For all participants,

analysis time and output files were recorded and processed with Toto-Cell. To ensure comparability, participants analyzed the same predefined cell subsets, in the same order, within sequentially assigned videos. U0, an experienced user in video-microscopy acquisition and quantitative analysis, served as the reference. Both supervised and non-supervised groups received initial training on ImageJ, video-microscopy principles, and phylogenetic-tree construction; supervised users could ask questions during analysis.

Interactions with U0 were excluded from recorded analysis time.

	Cov-362 supervised	Cov-362 non-supervised	HEC-1-A supervised	HEC-1-A non-supervised
Number of bachelor subjects	10	10	10	10
Number of graduated subjects	1	1	1	1
Number of visualized videos (bachelor level)	5	5	5	5
Number of visualized video (graduated level)	18	18	18	18

Table 1: Experimental design by cell line, supervision condition, participant number, and number of analyzed videos.

A qualitative and descriptive design was used to assess learning and user-dependent variability in video-microscopy analysis. Graduate and undergraduate participants, supervised or non-supervised, were compared with U0 while performing standardized lineage reconstruction tasks. Completion times were recorded across sessions, and Toto-Cell generated cladograms and quantitative lineage descriptors for reference-based comparison. The technical features of Toto-Cell and the video-microscopy workflow are described in [9].

User profiles were compared descriptively. Because U0 was an experienced reference user rather than an absolute ground truth, all percentages were interpreted as differences relative to U0 rather than true error rates or accuracy estimates. The analysis therefore focused on inter-user divergence, agreement with the reference annotation, task execution patterns, and learning trajectories. Wording throughout the manuscript was adjusted accordingly to avoid inferring true annotation accuracy from reference-based differences.

User Comparison Analyses

Toto-Cell outputs were exported as CSV files and re-exported through Microsoft Excel for compatibility with R (version >=4.0) and RStudio Desktop (Posit).

Two R scripts were used: functions_comparison.R for processing and comparison functions, and Get_errors.R to execute the analyses.

Each CSV file was processed with Process_csv, which separates the data into Cells, Stats, and Daily components. Discrepancies between users were quantified by pairwise comparison and by comparison of each user or group against the reference. Scripts and manuals are available at https://gitlab.com/crrenaud/cellv1.5.

Statistical interpretation of user comparisons

The user-comparison analyses were treated as descriptive and exploratory. Values calculated from Toto-Cell and Compcell represent reference-based percentage differences or annotation discrepancies relative to U0 or to an experienced reference file; they do not measure true annotation accuracy. Mixed-effects models were not applied to these annotation outcomes because the design did not include an independently validated ground truth and because the available manuscript-level outputs were summarized as percentages rather than observation-level user-video-event data suitable for estimating random effects. For the same reason, confidence intervals and effect sizes were not calculated for annotation discrepancies; doing so would imply a level of uncertainty estimation and inferential support that the available data structure does not justify. In addition, for graduate users, supervision is confounded with individual user identity, with one supervised and one non-supervised user per cell line, preventing generalizable inference about supervision effects in that subgroup.

Treatment Comparison Analyses

Averaging Biological Replicates

Independent replicates (N) from the same condition were averaged with Average_condition, generating mean CSV files for Cells, Stats, Daily, and a combined all summary.

Treatment vs. Control Comparison

Treatment means were compared with the control condition using Compare_treatment_with_control, producing difference files for Cells, Stats, and Daily outputs.

Core Functions Used

Core functions were Process_csv; Compare_cells, Compare_stats, and Compare_daily; Compare_two_users and Compare_group_with_control; Average_condition; and Compare_treatment_with_control.

The dedicated Compcell software

Existing cladogram similarity metrics [36,37] provide global distances but do not localize discrepancies or quantify event-specific annotation differences. They also do not integrate cell fusions, which are frequent in cancer-cell lineage data.

Compcell was developed from Toto-Cell features to automatically compare a participant file with a reference file from an experienced user. For each starting cell, it compares cladogram structure and timing, counts discrepancies, and stops analysis downstream of the first structural discrepancy to avoid biased interpretation of later events. The only operational assumption is that cells appear in the same order in the input files. Compared with the R scripts, Compcell provides a more localized event-based comparison and graphical visualization of difficult annotation points.

Compcell was written in C++ using Toto-Cell components and will be released in the same repository. The detected discrepancy types and generated statistics are summarized below.

Analysis of endings

Compcell classifies endings as normal, cell death, or field exit. Field exits are considered definitive because re-entering cells cannot be reliably matched. The software summarizes ending annotations and user discrepancies (Figure 2).

Analysis of mitosis

Mitoses are represented as cladogram branches: two daughter branches for normal mitosis and more than two for abnormal mitosis. Compcell first compares the number of subdivisions. If they differ, the event is recorded as a discrepancy and downstream comparison stops; if they match, the corresponding subtrees are compared recursively.

Because users may order daughter cells differently, Compcell pairs each reference branch with the most similar compared branch using subtree structure and event timing, then repeats the analysis from each child branch. It reports the number of mitoses analyzed and detected discrepancies (Figure 3).

Analysis of fusions

For fusions, Compcell first compares the number of merging cells. If the numbers differ, the subgraph comparison stops and the discrepancy is recorded; otherwise, a local fusion analysis is performed.

Fusion analysis is complicated by multiple incoming arcs converging on the same node. Compcell therefore performs a conservative top-down analysis: if a fusion node is reached in both cladograms without prior discrepancies, the incoming paths are treated as comparable.

Fusion nodes are then evaluated in two steps: compatibility of the fusion nodes, and verification that all incoming subgraphs have been processed before analyzing the downstream branch. A counter tracks tested incoming arcs; different counter values indicate incompatible fusion paths, whereas completion of all incoming arcs allows downstream comparison. Compcell reports analyzed fusion events and differences between cladograms.

Analysis of temporal differences

Toto-Cell annotations include both event type and event timing, recorded as the frame in which the user judged the event to occur. Timing precision may vary with image quality and user interpretation.

Compcell evaluates valid event timing with an adjustable tolerance, set here to +/-3 frames. Events are classified as identical timestamps, different timestamps within tolerance, or timestamps outside tolerance.

Visualization of comparisons

Compcell also produces SVG graphical outputs to visualize structural and temporal discrepancies.

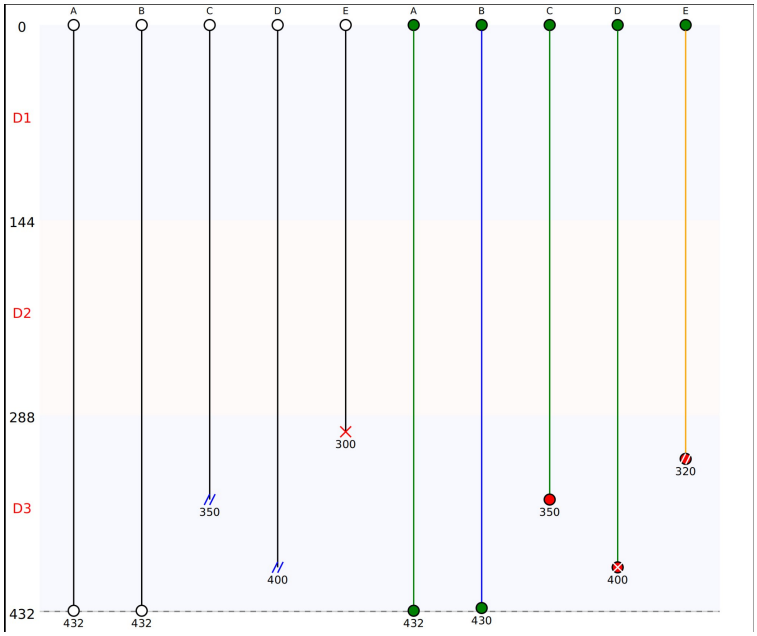


Figure 2: Termination comparison between the reference annotation (left, black) and user annotation (right) for cells A-E. Endings are normal (circle), field exit (blue bar), or death (red cross); colors indicate agreement (green), timing differences within tolerance (blue), discordant ending type (red), or timing differences beyond tolerance (orange).

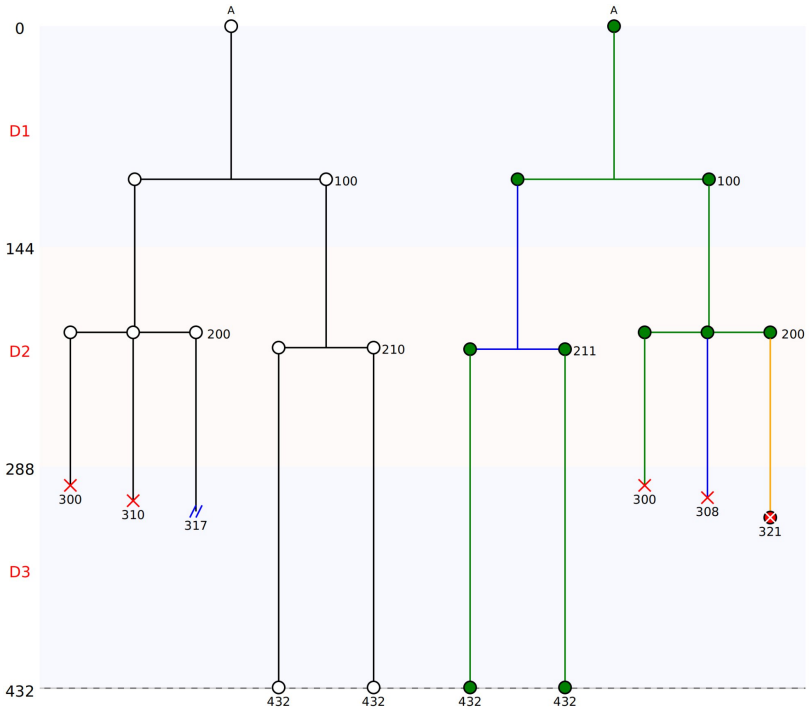
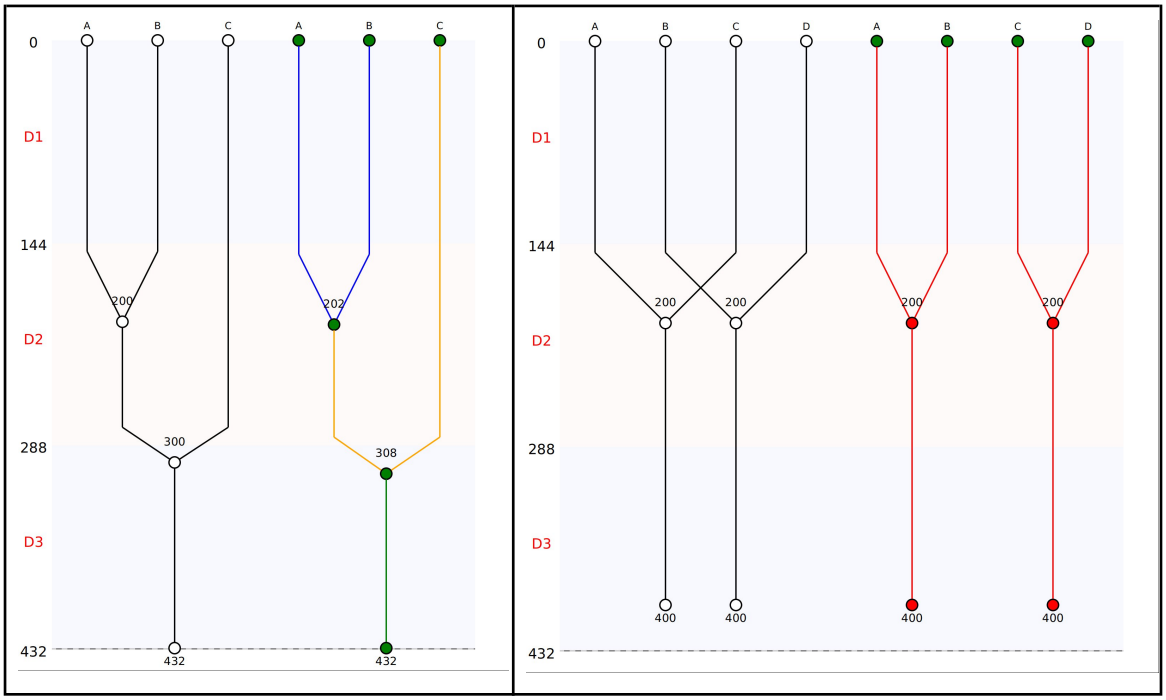


Figure 3: Mitosis comparison between the reference annotation (left, black) and user annotation (right). Colors indicate agreement (green), timing differences within tolerance (blue), and timing or event-annotation discrepancies (orange/red); Compcell resolves daughter-branch pairing when user ordering differs.



(a)	(b)

Figure 4: Fusion comparison between the reference annotation and user annotation. In (a), structures match but timing differs within (blue) or beyond (orange) tolerance; in (b), different cells are involved in the fusion and are highlighted in red.

Overall, Compcell standardizes event-based cladogram comparison by combining ending, mitosis, fusion, and temporal analyses in a conservative recursive pipeline. Subtree pairing and configurable tolerance localize and quantify discrepancies while limiting downstream overinterpretation. Quantitative statistics and SVG visualizations support reproducible performance evaluation in time-lapse cell-tracking studies.

Experimental use of software tools

The three software tools (Imaris, TrackMate, and CellProfiler) were evaluated by three independent users testing different configurations for complex cancer-cell features, including multinucleated, large, and clustered cells.

Imaris performance analysis

Software

Imaris 9.2.1 (Bitplane [38]) was used to test Cell options, Nucleus, Nucleus + vesicles, Spots Detection, Tracking (autoregressive and Brownian motion), Lineage, and Connected Components. The software supports 2D, 3D, and 4D tracking and quantifies position, displacement, morphology, velocity, colocalization, and cell-cycle metrics [12,39], with both manual and automated tracking options.

Detection procedure

Detection was mainly performed with Spots. Tested diameters ranged from approximately 7,500 to 9,500 um depending on the video. Maximum intensity (usually channel 1), distance to edge, and spot quality filters were manually adjusted and verified frame by frame.

Tracking procedure

Tracking was performed after cell detection, mainly using *Spots*. The following tracking algorithms were evaluated: *autoregressive motion*, *Brownian motion*, and *lineage*.

Parameter optimization

Detection filters and tracking parameters were adjusted manually for each dataset to optimize detection quality and trajectory reconstruction.

Validation

Divisions, mergers, and disappearances were validated manually by comparing the trajectories generated by Imaris with the original videos.

Evaluation criteria

Evaluation criteria included detection quality, number of detected cells, cluster and low-intensity-cell detection, noise sensitivity, tracking continuity, division and merger detection, and ghost or duplicated cells.

Analysis time

Computation time for detection and tracking, time spent on manual corrections, and software stability (including crashes) were recorded.

Manual editing

The ability to correct spots, and frame-by-frame correction and its relevance in terms of time were evaluated.

Organization and documentation

Analyzed videos and annotated images were archived in shared folders, with one recording showing spots and one showing trajectories only. Interface issues, outdated documentation, and unavailable features were noted.

TrackMate performance analysis

Software

TrackMate 8.1, a free ImageJ/Fiji plugin, was used for 2D tracking [41]. It supports morphological and displacement-feature extraction and offers flexible, user-customizable workflows, particularly for users with coding experience.

Detection procedure

Evaluated detectors were DoG, LoG, Hessian, Label Image, Mask, and Threshold. Estimated cell size (approximately 25 px), thresholds, and intensity/contrast filters were varied systematically.

Tracking procedure

The following tracking algorithms were tested: Simple LAP tracker, LAP Tracker, Kalman Tracker, Advanced Kalman Tracker, Overlap Tracker, and Nearest-Neighbor Tracker.

Parameter optimization

Threshold, spot size, linking distance, gap closing, splitting distance, merging distance, and intensity filters were optimized. For DoG, the best setting used a threshold of approximately 0.5 with contrast (<0.5) and intensity (>139.42) filters.

Validation

Tracking results were inspected using the TrackScheme window, and manual corrections were performed when necessary to verify lineage reconstruction and event detection.

Evaluation criteria

For each detector/tracker combination, we evaluated cell detection, ghost-cell reduction, mitosis and fusion detection, discrimination of live cells/dead cells/debris, robustness to multinucleation and high density, and required manual-editing time.

Data export and documentation

Results were stored within *Fiji*/*TrackMate* outputs and documented for comparison across detector–tracker combinations.

CellProfiler performance analysis

Software

CellProfiler 4.2.8 (September 2024) is an open-source platform for quantitative biological image analysis [42]. Its modular pipeline supports segmentation, feature extraction, batch processing, and downstream statistical export, including compatibility with CellProfiler Analyst [43].

Detection procedure

Cell detection used IdentifyPrimaryObjects and was evaluated from object contours, object counts, and visual agreement with source images.

Tracking procedure

Tracking was performed using the *TrackObjects* module with the LAP (Linear Assignment Problem) method to link objects across successive frames.

Pipeline configuration

The pipeline was IdentifyPrimaryObjects, ColorToGrey, TrackObjects (LAP), and ExportToSpreadsheet. ColorToGrey was required because the images were RGB whereas tracking used grayscale inputs.

Parameter optimization

Parameter tuning was limited by the absence of real-time segmentation preview. Intensity and segmentation thresholds were therefore estimated, LAP parameters were kept close to defaults, and the same configuration was retained across tests.

Validation

Detection and tracking were evaluated by inspecting segmentation outputs and tracking results across frames.

Data export and documentation

Results were exported as CSV files using the *ExportToSpreadsheet* module.

Results

The results are organized around a single methodological question: how reliable quantitative video-microscopy analysis is constrained by both human annotation variability and the current limits of automated tracking tools under realistic imaging conditions. User analyses were therefore interpreted as reference-based divergence from an experienced annotator, whereas software analyses were treated as practical performance assessments rather than formal inferential comparisons.

The datasets included isolated cells, clusters, divisions, cell death, debris, variable fluorescence, background noise, reduced resolution, and shading artifacts, reflecting realistic live-cell imaging conditions.

User Analysis Workflow

Manual tracking was evaluated using participants with different experience levels and training status. All procedures followed the approved ethical protocols.

Toto-Cell CSV outputs were analyzed with R scripts after structuring each file into Cells, Stats, and Daily components. Inter-user variability was quantified through pairwise comparisons of identical videos and reference-based comparisons against U0, using mean percentage differences and annotation discrepancies to assess user-dependent variability and compare manual with software-based lineage reconstruction. These outcomes were not interpreted as true accuracy.

Comparisons of time between users

Graduated students

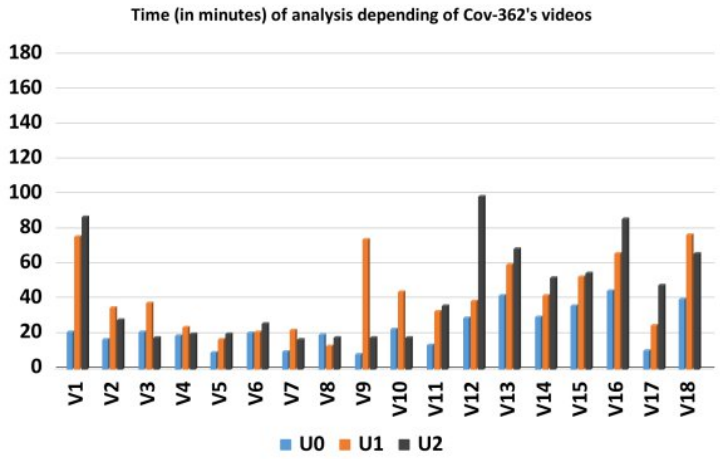
This analysis compared the time required by U0, a supervised graduate student (U1), and a non-supervised graduate student (U2) on Cov-362 and HEC-1-A videos to

describe how supervision status, user experience, and dataset complexity were associated with analysis duration.

Four graduate students, with no previous video-microscopy experience, analyzed 18 videos each. Maximum analysis times reached about 100 min for Cov-362 and nearly 160 min for HEC-1-A.

For Cov-362, U1 and U2 showed variable analysis times despite initial training, whereas U0 remained consistently faster, indicating the importance of prior experience even in simpler datasets. For HEC-1-A, U1 approached U0's analysis times while U2 required substantially longer. These descriptive patterns are consistent with a potential role of supervision in complex videos, but the graduate sample size prevents generalization of a supervision effect.

(a)



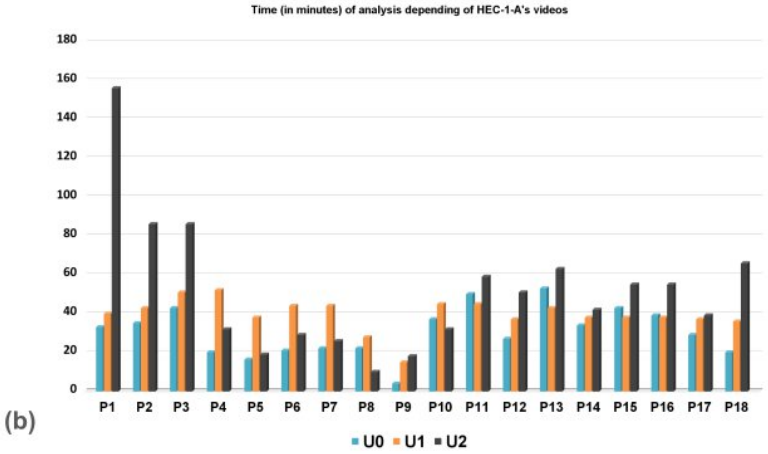


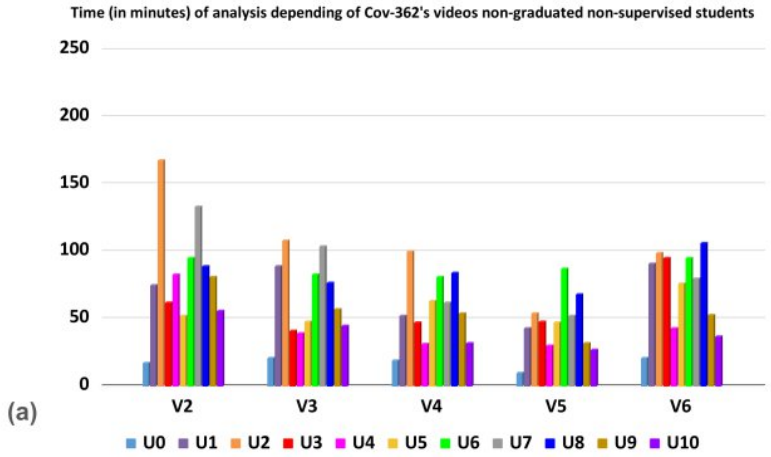
Figure 5: Graduate-student analysis time for (a) Cov-362 and (b) HEC-1-A videos.

Undergraduate students

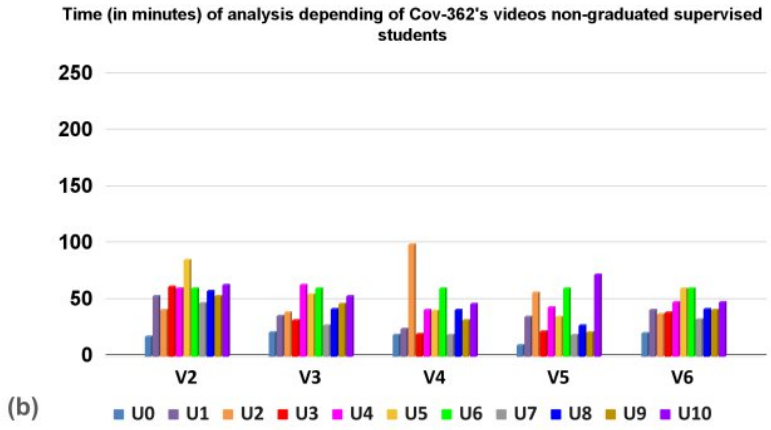
This analysis compared supervised and non-supervised undergraduate students analyzing identical Cov-362 and HEC-1-A videos, with U0 and graduate students used as reference points for experience and analysis duration.

Forty undergraduate students were recruited: 10 per cell line and supervision condition. None had prior video-microscopy experience, and only a few had laboratory experience. They received the same training as graduate students but analyzed five videos each: V2-V6 for Cov-362 and P3, P4, P6, P7, and P18 for HEC-1-A, selected to increase in difficulty.

For Cov-362, non-supervised undergraduates were highly heterogeneous: some required 50-70 min, whereas others consistently required about 100 min, compared with about 20 min for U0. Supervised students generally required about 50 min, with few exceptions. Supervision was therefore associated with shorter analysis times in this cohort, although no consistent learning curve was observed across videos.



(a)



(b)

Figure 6: Cov-362 analysis time for 10 undergraduate students: (a) non-supervised and (b) supervised.

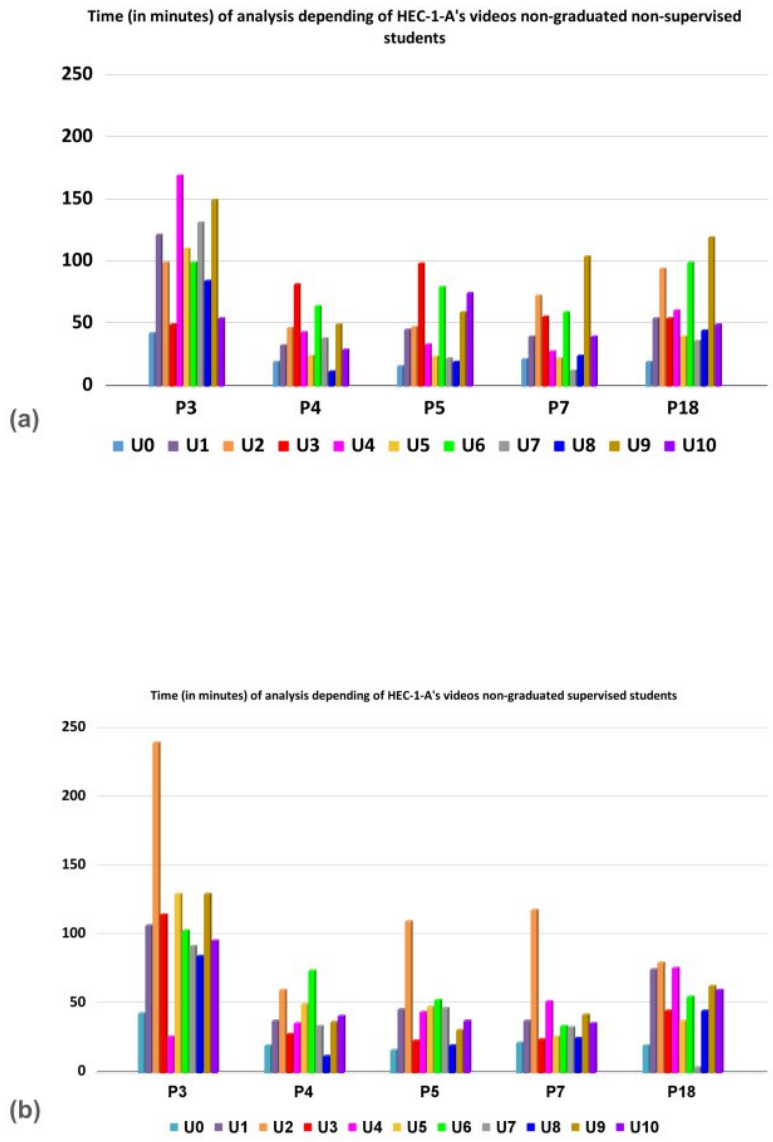


Figure 7: HEC-1-A analysis time for 10 undergraduate students: (a) non-supervised and (b) supervised.

For HEC-1-A, non-supervised undergraduates showed strong heterogeneity. Video P3 required 100-160 min in the longest cases; for P4, P5, P7, and P18, several users (U1, U2, U4, U5, U7, and U8) showed decreasing times. Their average was about 37 min per video versus about 20 min for U0. In the supervised group, P3 was also the longest, but later times were more homogeneous except for U2; supervision was associated with shorter analysis times and a clearer familiarization pattern.

Analysis time varied with cell-line complexity, training level, and supervision status. For Cov-362, supervised users generally showed shorter durations but limited learning across videos. For HEC-1-A, prior experience and guidance appeared to support greater efficiency. These patterns indicate that analysis duration was shaped by both biological complexity and user-related factors in this cohort.

Inter-User Variability in Reference-Based Percentage Differences

Only daily results and selected grouped Stats metrics are presented in the main text; the full dataset is provided in supplementary materials and online.

Cov-362 cell line

For Cov-362, percentage differences relative to U0 remained substantial despite favorable imaging conditions. U1 showed the lowest differences, generally below 10% for most events, whereas U2 reached higher values for abnormal and mitotic-related categories. These patterns indicate lower divergence from the reference annotation in the supervised graduate user, without establishing U0 as an absolute ground truth.

	U1	**U2**
Total number of mitoses	15,2 %	57,7 %
Number of normal mitoses	9,8 %	36,6 %
Number of abnormal mitoses	9,1 %	74,07 %
Number of non-dichotomous mitoses	6,3 %	66,7 %
Number of refusions after mitosis	7,4 %	64,8 %
Total number of deaths	5,7 %	45,5 %

Table 2: Absolute percentage differences for key Cov-362 cellular events relative to U0.

Daily Cov-362 comparisons showed the highest discrepancies on Day 1, especially for rare or complex events such as abnormal mitoses, non-dichotomous mitoses, and

fusions. By Day 3, several differences decreased, consistent with possible familiarization, but complex or low-frequency events remained variable. U1 was more stable across days, whereas U2 and undergraduate groups, particularly non-supervised students, showed stronger day-to-day variability without clear convergence toward U0.

Differences D1	**U1**	**U2**
Number of deaths per day	101,8 %	75,3 %
Number of mitoses per day	13,66 %	45,91 %
Number of abnormal mitoses per day	11,64 %	74,51 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	3,3 %	11,76 %
Number of fusions per day	4,2 %	45,04 %
Average number of errors per day	4,1 %	46,3 %

Table 3: Daily percentage differences relative to U0 on Day 1 for Cov-362.

Differences D2	**U1**	**U2**
Number of deaths per day	38,9 %	81,25 %
Number of mitoses per day	11,06 %	65 %
Number of abnormal mitoses per day	5,56 %	54,17 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	1,01 %	25 %
Number of fusions per day	5,03 %	47,17 %
Average number of errors per day	3,05 %	48,45 %

Table 4: Daily percentage differences relative to U0 on Day 2 for Cov-362.

Some Cov-362 discrepancies decreased with repeated exposure, consistent with possible familiarization, but inter-user variability persisted. Complex events remained particularly sensitive to manual interpretation, supporting the need for standardized and computationally assisted approaches to improve consistency across users and time.

Differences D3	**U1**	**U2**

Number of deaths per day	22,96 %	56,25 %
Number of mitoses per day	10,61 %	66,79 %
Number of abnormal mitoses per day	3,7 %	12,5 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	1,85 %	0 %
Number of fusions per day	2,22 %	30 %
Average number of errors per day	2,46 %	35,58 %

Table 5: Daily percentage differences relative to U0 on Day 3 for Cov-362.

CompCell provided a structural view of Cov-362 discrepancies (Table 6). Mitosis and death patterns were broadly comparable between graduate users and showed limited lineage-depth propagation. In undergraduates, discrepancies were more frequent, especially in non-supervised users, where fusion-related differences and propagation were most pronounced. Supervised undergraduates showed lower fusion-related divergence and less propagation, whereas death annotations remained inconsistent. Because the reference file was not an absolute ground truth, these values are interpreted as discrepancies rather than true error rates.

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant mitosis (larger divisions) (%)	Discrepant mitosis (lower divisions) (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)	Discrepant fusion (larger ancestors) (%)	Discrepant fusion (lower ancestors) (%)
Graduate – non-supervised (U1)	6.41	0	0.33	13.54	11.46	0	0
Graduate – supervised (U2)	7.51	0	0.91	13.00	0	0	0
Undergraduate – supervised	19.24	4.00	15.00	0	48.00	11.00	19.29
Undergraduate – non-supervised	13.01	2.00	1.75	13.00	13.00	2.00	0

Table 6: Cov-362 annotation discrepancy rates (%) for mitosis, death, fusion, and lineage-depth propagation across user groups.

Overall, Cov-362 results suggest that guidance may reduce divergence for some complex cell-cell interaction annotations, particularly fusions, while death-related annotations remained difficult to standardize.

Comparative Video-by-Video Analysis of Annotation Differences

Video-by-video Cov-362 analysis was performed for V3, V4, V5, and V6 (Table 7); V2 was excluded because cell counts varied too strongly across users. Across V3-V6, mitosis-related discrepancies were generally lower in graduate users, whereas undergraduate profiles showed greater divergence, particularly for fusions and death annotations. Detailed percentages are provided in the table; the main pattern is that even visually favorable videos did not remove user dependence, and supervision was not uniformly beneficial across event types.

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)
Graduate – non-supervised (U1)	7.69	0	0
Graduate – supervised (U2)	7.69	0	0
Undergraduate – supervised	10.00	14.00	6.00
Undergraduate – non-supervised	19.24	0	48.00

(a) Video V3

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)
Graduate – non-supervised (U1)	0	0	100
Graduate – supervised (U2)	18.18	0	0
Undergraduate – supervised	18.00	10.00	10.00
Undergraduate – non-supervised	34.00	0	10.00

(b) Video V4

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)
Graduate – non-supervised (U1)	12.50	0	0
Graduate – supervised (U2)	33.33	0	0
Undergraduate – supervised	10.57	14.00	14.00
Undergraduate – non-supervised	19.51	0	14.00

(c) Video V5

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)
Graduate – non-supervised (U1)	5.26	100	0
Graduate – supervised (U2)	11.11	0	0
Undergraduate – supervised	13.68	13.00	21.00
Undergraduate – non-supervised	7.98	0	10.00

(d) Video V6

Table 7: Video-specific Cov-362 annotation discrepancy rates (%) for V3, V4, V5, and V6 across user groups.

Conclusion of Cov-362 cell line

For Cov-362, favorable image quality and repeated exposure reduced some reference-based differences but did not eliminate user variability. The strongest divergence persisted for fusion and death events, indicating that complex or ambiguous annotations remain sensitive to interpretation. These findings support standardized protocols and

automated support, while remaining descriptive because the reference annotation was not an absolute ground truth.

HEC-1-A cell line

For HEC-1-A, graduate users showed strong reference-based divergence, especially for complex mitotic parameters. U1 showed large differences for abnormal mitoses, non-dichotomous mitoses, and post-mitotic refusions, whereas U2 remained consistently closer to U0. These contrasts highlight strong inter-individual effects in a complex cell line rather than a generalizable supervision effect.

	U1	**U2**
Total number of mitoses	31.94 %	10.31 %
Number of normal mitoses	40.24 %	5.04 %
Number of abnormal mitoses	62.43 %	9.71 %
Number of non-dichotomous mitoses	35.93 %	3.72 %
Number of refusions after mitosis	69.67 %	11.16 %
Total number of deaths	21.34%	2.23 %

Table 8: Absolute percentage differences for key HEC-1-A cellular events relative to U0.

Daily HEC-1-A comparisons showed high Day 1 divergence, especially for fusions, deaths, and abnormal mitoses. U2 remained close to U0, while U1 and undergraduate groups were more variable; supervised undergraduates tended to show fewer extreme deviations for some parameters.

Differences D1	**U1**	**U2**
Number of deaths per day	82,2 %	63,33 %
Number of mitoses per day	33,93 %	1,65 %
Number of abnormal mitoses per day	50 %	5,03 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	44,4 %	2,59 %

Number of fusions per day	92,59 %	4,79 %
Average number of errors per day	60,64 %	2,42 %

Table 9: Daily percentage differences relative to U0 on Day 1 for HEC-1-A.

On Day 2, several differences decreased, suggesting possible familiarization. However, U1 remained highly divergent for fusion and mitotic-related categories, and supervision effects among undergraduates were event-specific rather than uniform.

Differences D2	**U1**	**U2**
Number of deaths per day	53,33 %	15,98 %
Number of mitoses per day	21,63 %	5,72 %
Number of abnormal mitoses per day	74,54 %	6,59 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	57,78 %	3,37 %
Number of fusions per day	101,334 %	5,2 %
Average number of errors per day	61,722 %	2,62 %

Table 10: Daily percentage differences relative to U0 on Day 2 for HEC-1-A.

By Day 3, differences further decreased in some undergraduate profiles, whereas U1 remained divergent for fusions and deaths and U2 stayed consistently close to U0. These patterns suggest possible learning for some users, but not a systematic supervision effect across all events.

Differences D3	**U1**	**U2**
Number of deaths per day	66,402 %	4,44 %
Number of mitoses per day	36,244 %	4 %
Number of abnormal mitoses per day	43,44 %	2,99 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	18,52 %	0,31 %
Number of fusions per day	72,13 %	5,76 %
Average number of errors per day	47,35 %	1,72 %

Table 11: Daily percentage differences relative to U0 on Day 3 for HEC-1-A.

CompCell analysis of HEC-1-A confirmed that supervision was not uniformly associated with lower discrepancy rates (Table 12). In both graduate and undergraduate comparisons, supervised users sometimes showed greater divergence for mitosis or fusion annotations, whereas death-related differences were more comparable. This pattern suggests that dense HEC-1-A clusters and ambiguous cell interactions may promote user-specific interpretation strategies, including possible over-annotation of uncertain divisions or fusions.

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant mitosis (larger divisions) (%)	Discrepant mitosis (lower divisions) (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)	Discrepant fusion (larger ancestors) (%)	Discrepant fusion (lower ancestors) (%)
Graduate – non-supervised (U1)	6.44	0.55	0.21	8.33	15.38	2.56	0.00
Graduate – supervised (U2)	21.95	9.00	0.83	21.00	41.00	0.00	0.00
Undergraduate – supervised	40.22	27.00	0.81	11.00	40.00	0.00	0.00
Undergraduate – non-supervised	14.03	5.00	0.15	13.00	16.00	0.00	0.00

Table 12: HEC-1-A annotation discrepancy rates (%) for mitosis, death, fusion, and lineage-depth propagation across user groups.

Comparative Video-by-Video Analysis of Annotation Differences

Video-specific HEC-1-A analysis was performed for P3, P5, P7, and P18 (Table 13); P4 was excluded because divergent cell counts prevented reliable comparison. Across videos, the detailed percentages showed a strongly event-dependent profile: mitosis was particularly problematic in P7, fusion in P3/P5, and P18 was more stable for graduate users despite poorer visibility. Supervised undergraduate users did not consistently show

lower divergence than non-supervised users, indicating that guidance alone did not resolve ambiguous event interpretation in this cell line.

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)
Graduate – non-supervised (U1)	1.82	0	33.33
Graduate – supervised (U2)	4.88	0	100
Undergraduate – supervised	7.16	17	17
Undergraduate – non-supervised	3.08	14	33.33

(a) Video P3

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)
Graduate – non-supervised (U1)	0	0	100
Graduate – supervised (U2)	0	0	100
Undergraduate – supervised	22	17	67
Undergraduate – non-supervised	20	11	20

(b) Video P5

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)
Graduate – non-supervised (U1)	66.67	0	0

Graduate – supervised (U2)	40	0	0
Undergraduate – supervised	62.96	12	0
Undergraduate – non-supervised	26.88	7	5

(c) Video P7

User group	Discrepant mitosis (%)	Discrepant death (%)	Discrepant fusion (%)
Graduate – non-supervised (U1)	0	0	0
Graduate – supervised (U2)	2.70	0	0
Undergraduate – supervised	8.73	10	15
Undergraduate – non-supervised	26.88	7	5

(d) Video P18

Table 13: Video-specific HEC-1-A annotation discrepancy rates (%) for P3, P5, P7, and P18 across user groups.

Conclusion of HEC-1-A cell line

Together, HEC-1-A analyses show that differences relative to U0 depended on event type, image quality, and individual user behavior. Some undergraduate profiles showed reduced divergence over time, suggesting familiarization, but supervision alone was not a uniform predictor.

These results should therefore be interpreted as cohort-specific patterns of reference agreement rather than proof of annotation accuracy. For complex HEC-1-A videos, individual experience and interpretation strategies remained critical.

Software analysis

The same cell populations and imaging sequences were processed by human users and automated software pipelines to provide a practical comparison of analytical feasibility. This software assessment was not designed as an inferential benchmark; it was intended to identify workflow limitations that affect real-world lineage reconstruction and to motivate development of more robust AI-assisted approaches.

Analysis of TrackMate

TrackMate was tested for cell detection, tracking, and lineage reconstruction, including divisions and fusions, using multiple detectors, trackers, and parameter settings.

Spot detection was highly threshold-dependent. Low thresholds increased false positives and ghost cells, whereas higher thresholds reduced false positives but missed real cells. Contrast and intensity filters improved specificity but reduced sensitivity. Some videos could be optimized by adjusting threshold, spot size, and filters, but settings were not transferable and required recalibration for each dataset.

Comparison of available detectors:

- DoG detector: The DoG detector worked for small spots but was less consistent for larger cells. Trajectories were interrupted and mother-daughter links required manual correction in TrackScheme.
- LoG detector: The LoG detector gave the most balanced performance. With threshold tuning and median-intensity/contrast filters, it detected many cells and supported more stable tracking, so it was retained for subsequent analyses.
- Hessian detector: The Hessian detector generated many false positives. Increasing the threshold reduced artifacts but also lowered sensitivity, and processing was slower than with other detectors.
- Label image and mask detectors: The label image detector required extensive post-processing because of excessive objects; the mask detector was not directly usable because input images were not binary.
- Threshold detector: The threshold detector identified many cells but tracked them inconsistently and detected small fragments requiring additional filtering. Overall, LoG gave the best detection/tracking compromise.

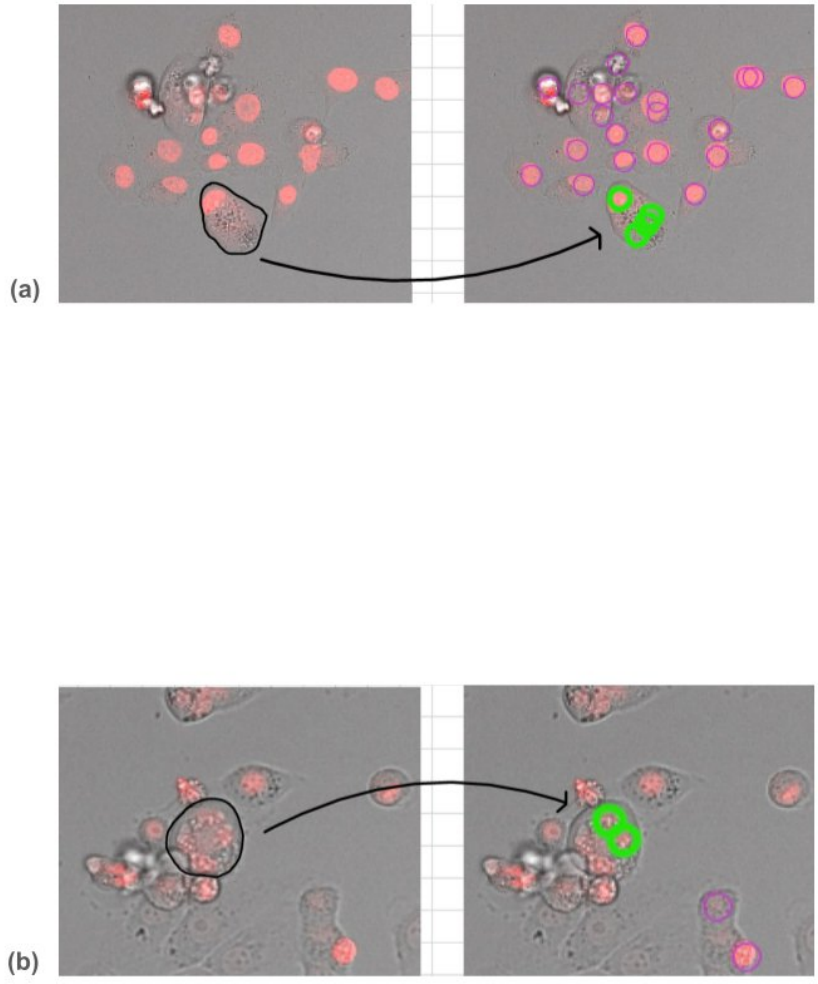


Figure 5: TrackMate detector limitations. (a) Multinucleated cells and (b) large nuclei can lead to over-detection and inflated lineage cell counts.

Performance of tracking algorithms

Several tracking algorithms were tested:

- Simple LAP tracker: This tracker lacks splitting and merging functions, so it cannot represent divisions or fusions and is unsuitable for full lineage reconstruction here.

- LAP tracker: The LAP tracker supported divisions and fusions and gave the most complete framework, but required careful tuning. It also linked debris, dead cells, and artifacts, and some mother-daughter links required manual verification.
- Kalman and Nearest-Neighbor trackers: These trackers provide continuous tracking but do not implement splitting or merging, limiting lineage reconstruction for division and fusion events.
- Advanced Kalman tracker: This tracker can detect divisions and fusions, but its constant-velocity model did not fit irregular cancer-cell movement as well as the LAP tracker.

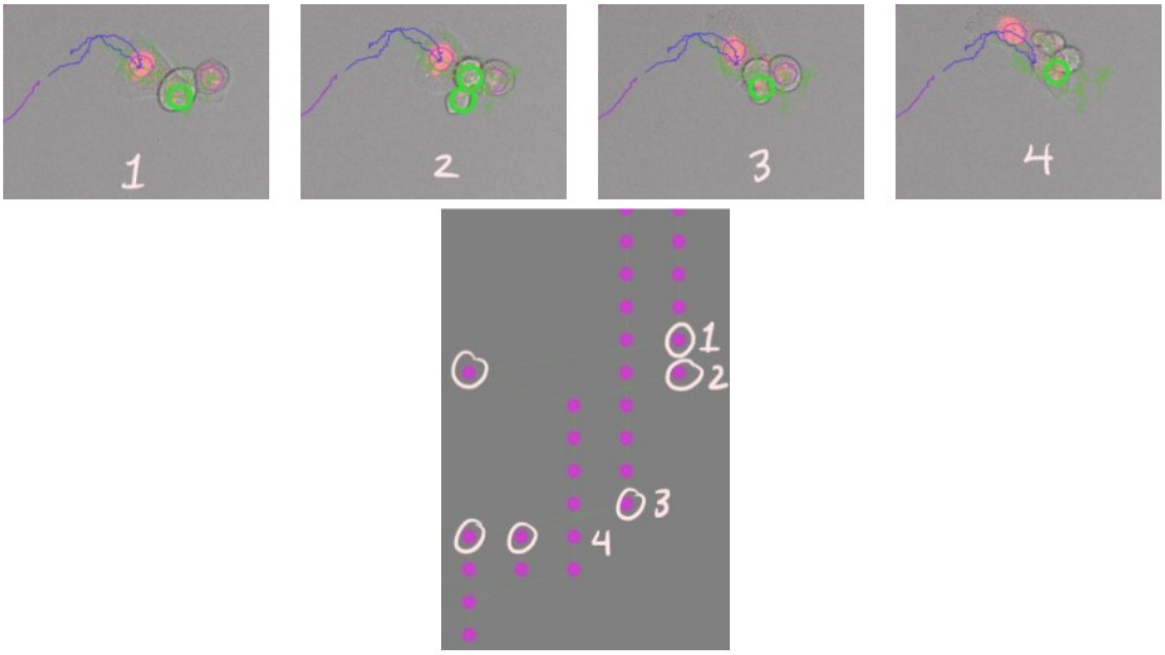


Figure 6: LAP Tracker example showing sequential cell divisions and the corresponding tracking-tree numbering.

Despite its limitations, the LAP tracker was selected as the most appropriate option.

Optimization of parameters by cell type

Cov-362 cells: The most consistent TrackMate configuration used the LoG detector (threshold approximately 0.15), maximum intensity filter (>233.8), contrast filter (> -0.1), and LAP tracker with maximum linking, splitting, and merging distances of approximately 40 px. This enabled some divisions and fusions to appear in the tracking scheme, but death events were not explicitly detected, dead cells were often retained as immobile objects, multinucleated cells were split, and dense cells remained difficult to separate. Reconstructed

lineages were incomplete and required about 40 min of manual correction per video, comparable to full manual annotation.

HEC-1-A cells

HEC-1-A cells: The most stable TrackMate configuration used LoG detection (threshold approximately 0.15) without spot filters, combined with LAP tracking (maximum linking/splitting/merging distance approximately 40 px; maximum frame gap = 2). Most divisions and fusions could be visualized, but death detection, cluster separation, and multinucleated-cell segmentation remained problematic. Manual correction still required about 20 min per video.

Overall Assessment of *TrackMate* Performance

Across datasets, TrackMate performance was limited by variable cell diameter, irregular morphology, image quality, contrast, fluorescence intensity, and cell density. Settings were video-specific, and manual correction became increasingly complex at high density. Although TrackMate generated partial lineage reconstructions under optimized conditions, death and multinucleation were not reliably represented, and accurate biological validation still required substantial expert intervention.

Analysis of Imaris

Imaris (Oxford Instruments) was evaluated on 2D live-cell videos, although it is primarily designed for 3D image analysis.

Cell Detection using the *Cell* module:

- Detection based on nucleus signal: Nucleus detection worked only in frames with strong, homogeneous fluorescence. Uneven signal caused missed nuclei or merged neighboring nuclei; area filters reduced some artifacts but removed weak true cells. Performance was therefore strongly contrast-dependent.
- Detection based on cell membrane: This option required approximately 4 min per video and detected many background structures and low-intensity regions, increasing computational load and limiting useful filtering.
- Detection based on cell cytoplasm: Cytoplasm detection was acceptable only in frames with stable background. Noise and background variation produced large false objects, and threshold increases reduced sensitivity. Each workflow step required about 5 min per video.
- Summary of Cell Detection performance: All Cell Detection configurations were sensitive to blur, shadows, and intensity heterogeneity. Filtering reduced artifacts but also removed true cells, limiting downstream tracking reliability.

Cell divisions and fusions were not consistently resolved using Cell Detection workflows.

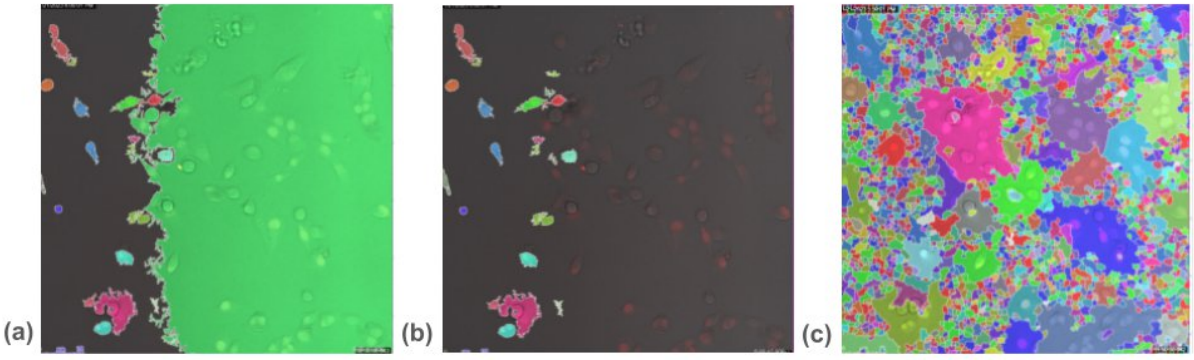


Figure 7: Imaris Cell Detection options: (a) Nucleus, (b) Nucleus area filtering with loss of cells, and (c) Cell membrane detection with excessive regions.

Cell detection using the “Spots” module:

- ## Optimization of spot detection parameters

Spot detection was tested as an alternative to full-contour segmentation. Spot diameters were adjusted for each video (approximately 7,500-9,500 um), and spots generally localized near nuclei. Maximum intensity, distance-to-border, and spot-quality filters improved specificity compared with Cell Detection.

- ## Limitations of spot-based detection

Spot detection was more stable than contour-based segmentation but still required iterative tuning. A single parameter set could not cover all frames: low signal caused missed cells, while dead cells and debris were sometimes retained as spots. Frame-by-frame correction was possible but too time-consuming for long sequences.

Tracking performance

Autoregressive **and** ***Brownian*** **motion models**

Autoregressive and Brownian tracking did not consistently reconstruct divisions or fusions. Daughter cells were usually treated as new objects, and stationary cells were poorly handled, showing the limitation of motion-based assumptions for these datasets.

Lineage tracking

Lineage Tracking gave the best Imaris reconstruction after tuning maximum linking distance (approximately 1.2 x 10^4 um), frame gap (4-5 frames), and gap filling. It detected many divisions, including low-fluorescence cases, but often lost daughter cells, missed fusions, or produced extra branches requiring manual inspection.

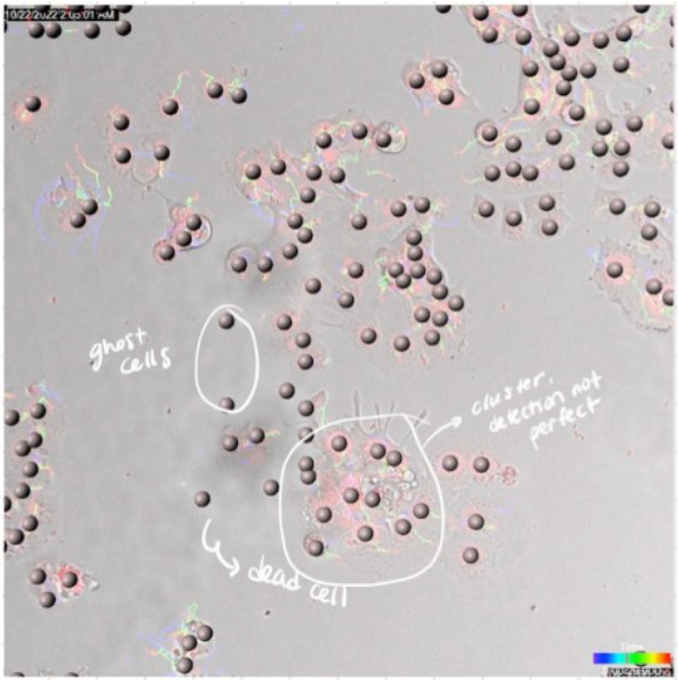


Figure 8: Imaris Lineage Tracking example affected by ghost and dead-cell detections.

Connected Components Tracking

Connected Components identified some divisions and fusions but depended on overlap between frames; rapid movement interrupted tracks, and the lack of adjustable parameters limited optimization.

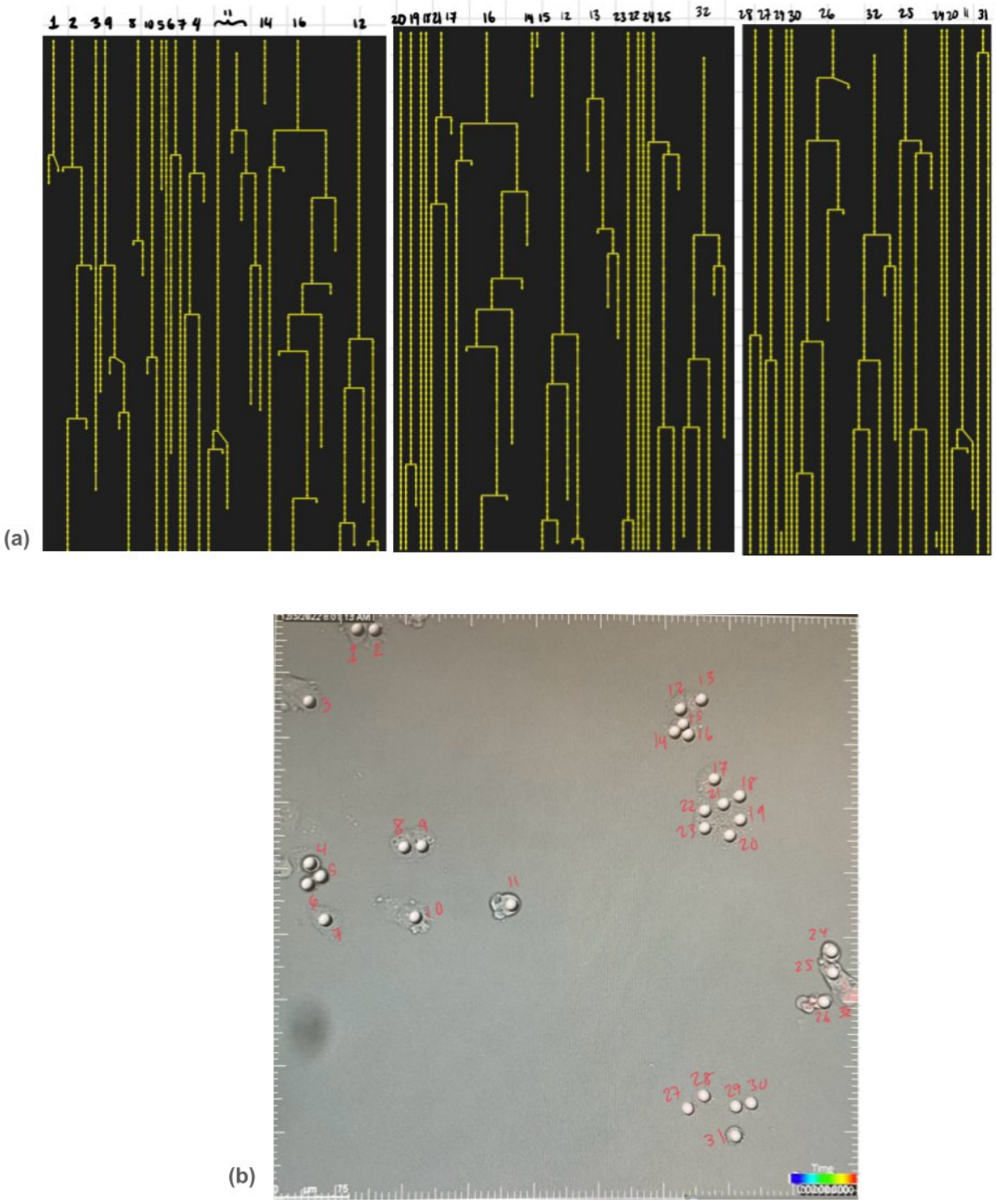


Figure 9: Imaris tracking example with cell identification (a) and tracks (b). Some tracks are duplicated; fusions are not shown and daughter-cell continuity is often lost. Manual work required 45-60 min depending on the user.

Quantitative output and visualization

Imaris could export tracking statistics, but only part of the reconstructed tracks could be displayed at once, limiting global inspection in dense datasets. A reproducible workflow for

comprehensive lineage metrics was also difficult to establish because available documentation did not fully match the software version used.

Overall Assessment of *Imaris* Performance

Under optimized conditions, Imaris detected and tracked subsets of cells and some divisions using Spots plus Lineage Tracking. However, daughter-cell continuity, fusion detection, robustness to image quality, and practical efficiency were insufficient for comprehensive lineage reconstruction without extensive tuning and manual refinement.

Analysis of CellProfiler

To better understand CellProfiler, three graduate students tested the software following the guidelines provided on the official website (https://cellprofiler.org/manuals).

Pipeline and general considerations

The CellProfiler workflow tested cell detection and tracking over time with IdentifyPrimaryObjects, ColorToGrey, TrackObjects (LAP), and ExportToSpreadsheet. Because parameter changes require full pipeline execution and no real-time preview is available, optimization was iterative and slow.

Segmentation performance

IdentifyPrimaryObjects did not consistently match visually identifiable cells. Segmentation covered approximately 72% of the image surface (Figure 10), far more than the visible cell area, while only a few cells were correctly isolated. The tested object diameter, threshold, maximum suppression, and deblobbing settings were therefore insufficient under these imaging conditions.

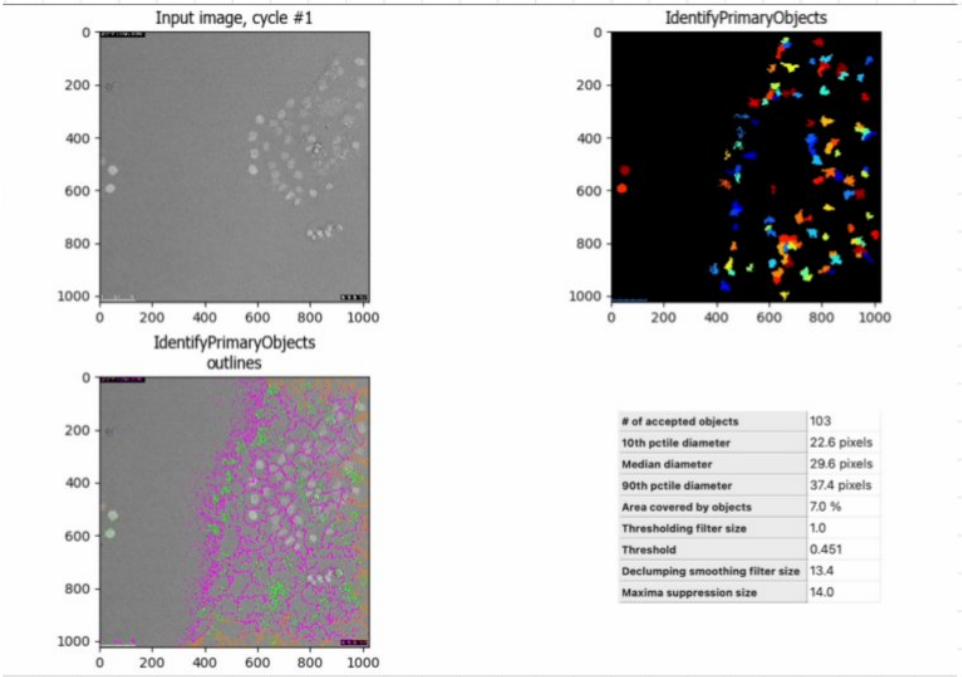


Figure 10: CellProfiler IdentifyPrimaryObjects output for cell detection.

Quantitative outputs confirmed over-segmentation: 103 objects were detected despite far fewer visible cells, and object diameters varied more than expected from the observed morphology.

Tracking performance

Tracking outputs were difficult to interpret. Exported CSV files did not explicitly report divisions, fusions, or structured lineages, and external reconstruction attempts failed. Many detected objects appeared stationary, likely reflecting segmentation errors or failed identity propagation. No divisions or fusions were automatically detected, trajectories did not match visual inspection, and many segmented objects corresponded to background or artifacts. Under the tested pipeline, CellProfiler did not provide reliable lineage reconstruction without substantial refinement.

Discussion

The central message of this study is that reliable quantitative video-microscopy analysis is constrained by two complementary sources of uncertainty: reference-based variability among human annotators and the limited robustness of current automated tracking tools in heterogeneous live-cell datasets. The human and software analyses are therefore not separate narratives, but two parts of the same methodological problem: extracting reproducible lineage information from complex cancer-cell videos remains difficult under routine experimental conditions.

Impact of software limitations on video-microscopy outcomes

Software performance depended strongly on imaging conditions and dataset characteristics. Some tools detected and tracked subsets of cells after optimization, but none consistently reconstructed complete, biologically reliable lineage trees.

These limitations reflect the broader challenge of applying automated tracking to heterogeneous real-world live-cell datasets. Variability in signal, morphology, and cell interactions required video-specific tuning and limited parameter transferability. Current tools remain useful, but complex cancer-cell datasets require expert optimization, improved robustness, and standardized evaluation metrics.

Human-related variability

Student results were highly heterogeneous, demonstrating strong user-dependent variability. In this cohort, undergraduates had the greatest difficulty, likely because of limited laboratory experience, and even supervised analyses remained slower or more divergent than experienced reference annotations in several contexts. Graduate users generally showed smaller differences and faster progression, but the small number of graduate participants prevents generalization. These findings emphasize the need for task comprehension, standardized training, and validation before assigning complex video-microscopy analysis to inexperienced trainees.

Explanations involving fatigue, confidence, help-seeking behavior, and publication pressure remain hypothetical because they were not directly measured. However, the observed heterogeneity is compatible with mechanisms described in the literature, including cognitive fatigue [44], discomfort with asking questions [45,46], and performance-oriented academic norms that may reduce willingness to report uncertainty [47,48]. These factors are therefore discussed only as plausible contributors to user-dependent variability, not as demonstrated causes.

Limitations and interpretation boundaries

Several limitations define the interpretation of these findings. First, comparisons against U0 quantify agreement with an experienced reference user rather than accuracy against an independent ground truth. Second, the graduate cohort was too small to isolate supervision effects from individual user effects. Third, the software comparison was a real-world feasibility assessment rather than a controlled statistical benchmark. Finally, the YOLO-based results represent preliminary object detection only; additional validation

is required before drawing conclusions about temporal tracking, mitosis or fusion detection, and complete lineage reconstruction.

The Cell Tracking Challenge

The Cell Tracking Challenge, launched in 2013, provides standardized benchmarks for cell segmentation and tracking. It enables objective comparison of segmentation quality, tracking agreement, biological-event handling, and reproducibility across datasets, laboratories, and software tools.

Its datasets cover diverse biological systems, including stem cells, bacteria, and cancer cells, and multiple imaging modalities such as brightfield, phase contrast, fluorescence, and confocal microscopy. Like our datasets, they include variable signal intensity, complex morphologies, overlaps, and crossing trajectories. Consistent with our results, segmentation remains a major bottleneck, parameter tuning is often extensive, generalizability is limited, and divisions or fusions remain difficult for many algorithms.

A major strength is the experimentally grounded reference standard: multiple experts perform frame-by-frame manual annotations, and ambiguous cases are treated realistically. This provides a rigorous framework for testing tracking algorithms under practical conditions.

Using this benchmark perspective anchors our methodology in standardized evaluation and reinforces reproducibility.

Opening: What we learn and how to prepare the next steps

Quantitative video-microscopy analysis remains challenging in cell biology and oncology because time-lapse datasets capture rich cellular dynamics but generate data volumes that exceed practical manual analysis. Artificial intelligence is therefore promising if model development is methodologically rigorous and statistically validated.

Before developing a dedicated AI framework, we compared existing approaches representing semantic segmentation (Ilastik and Trainable Weka ImageJ plugins) and instance segmentation (TrackMate CellPose detector). We assessed robustness to image heterogeneity, generalization, and suitability for real biological constraints. These tools required substantial image-by-image adjustment and reached limits with high cell density, debris, and contrast variability.

Preliminary work with YOLO object detection [50], trained on approximately 200 annotated images, suggested more stable visual detection and better adaptation to morphological variability under heterogeneous conditions than the conventional approaches tested here. This result should be interpreted as an initial detection-level observation; further validation is required to establish robustness and extend the model to temporal tracking.

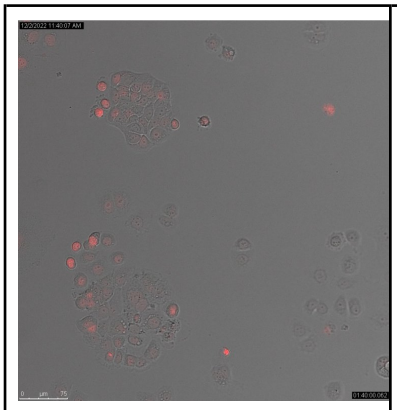
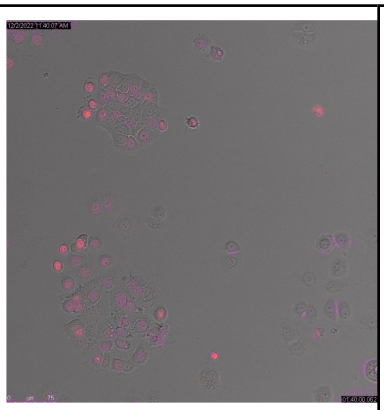
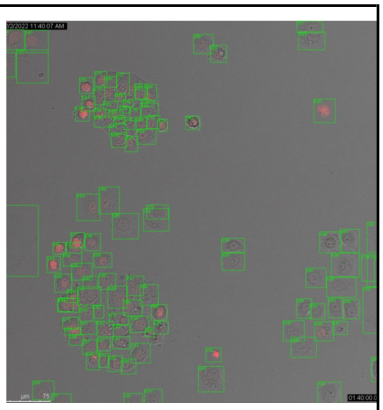
		
Original image captured by video microscopy on HEC-1-A cells.	Result from *Trackmate*. The small purple circles indicate detected objects of interest. Not all cells are detected, and some elements are false positives.	Results of our experimental model using Yolo v8, with a confidence threshold of 0.5. The green squares indicate detected objects of interest. All cells have been identified.

Figure 11: TrackMate and preliminary YOLO-based detection outputs on the same image.

Algorithmic choice directly affects quantitative outputs and downstream interpretation. Differences between approaches can alter cell counts, spatial distributions, and trajectory reliability, emphasizing the need for rigorous validation before AI deployment in video microscopy.

Taken together, these observations support a proof-of-concept rationale for developing deep-learning object-detection approaches as part of future automated video-microscopy workflows. Such tools should be designed as statistically validated and biologically interpretable systems, not as black-box replacements for experimental expertise.

Conclusion

This study combined reference-based user analysis and practical software evaluation to examine quantitative video microscopy under realistic experimental conditions. The results show that manual lineage reconstruction is affected by user-dependent divergence from an experienced reference annotation, particularly when image quality is

heterogeneous and cellular behavior is complex. In parallel, the evaluated software tools remained limited by parameter dependence, imperfect segmentation, incomplete lineage reconstruction, and variable robustness across videos. These two observations converge toward a single conclusion: reproducible extraction of biologically meaningful lineage information from live cancer-cell imaging requires standardized annotation procedures, cautious interpretation of reference-based comparisons, and the development of more robust AI-assisted approaches. The preliminary YOLO-based detection results support this direction, but full validation for temporal tracking and lineage reconstruction remains necessary before such models can replace or substantially reduce expert supervision.

Acknowledgements

We thank all students who contributed to this work: David Zuchoski, Carl Marchand, Matys Briere, Laurence Arsenault, Khadidiatou Sene, Hiba Archid, Amelie Lemire, William Boucher, Priscilla Yiemi Bel's, Magueye Camara, Pascal Adam, Eraste Ouedraogo, Aurelia Condomat, Safietou Kone, David Ross, Justine Deshaies, Nongnon Ibrahim Ivan Berte, Adrien Hevey, Anne-Sophie Marion, Pascale Delisle, Marie Lebourg, Beatrice Gagnon, Aissam Souidi, Marya Hayame Djaballah, Alex Nangguan Ayina, Zoe Asselin, and Alexandra Dube.

Grant Support

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (EA: RGPIN2025-05564 and MC: RGPIN2016-05735).

References

[1] Renaud LI, Béland K, Asselin E. Video microscopy: an old story with a bright biological future. Biomed Eng Online. 2025 Apr 16;24(1):44. doi: 10.1186/s12938-025-01375-8. PMID: 40241123; PMCID: PMC12004724.

[2] Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: Towards a general characterisation of embryogenesis. Anim Reprod Sci. 2016 Nov;174:2-10. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.09.015. Epub 2016 Sep 29. PMID: 27720247.

[3] Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. Curr Pharm Biotechnol. 2016;17(14):1213-1221. doi: 10.2174/1389201017666160808160513. PMID: 27604355.

[4] Bonnomet A, Terryn C, Cutrona J, Jonquet A, Birembaut P, Zahm JM. Analysis of cell dispersion and migration by video-microscopy. Methods Enzymol. 2012;505:233-54. doi: 10.1016/B978-0-12-388448-0.00021-8. PMID: 22289457.

[5] Zhu C, Lau E, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E, Jiang W. Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 18;103(16):6196-201. doi: 10.1073/pnas.0506926103. Epub 2006 Apr 7. PMID: 16603632; PMCID: PMC1458854.

[6] Lima JT, Pereira AJ, Ferreira JG. The LINC complex ensures accurate centrosome positioning during prophase. Life Sci Alliance. 2024 Jan 16;7(4):e202302404. doi: 10.26508/lsa.202302404. PMID: 38228373; PMCID: PMC10791920.

[7] Hutchison V, Lynch A, Gutierrez-Gamez AM, Chen J. Inducible tricolor reporter mouse for parallel imaging of lysosomes, mitochondria, and microtubules. J Cell Biol. 2024 Jan 1;223(1):e202305086. doi: 10.1083/jcb.202305086. Epub 2023 Nov 2. PMID: 37917008; PMCID: PMC10621751.

[8] Jiang Q, Sudalagunta P, Silva MC, Canevarolo RR, Zhao X, Ahmed KT, Alugubelli RR, DeAvila G, Tungesvik A, Perez L, Gatenby RA, Gillies RJ, Baz R, Meads MB, Shain KH, Silva AS, Zhang W. CancerCellTracker: a brightfield time-lapse microscopy framework for cancer drug sensitivity estimation. Bioinformatics. 2022 Aug 10;38(16):4002-4010. doi: 10.1093/bioinformatics/btac417. PMID: 35751591; PMCID: PMC9991899.

[9] Renaud LI, Renaud C, Delepoulle S, Asselin E. Toto-Cell: A new software to analyze cellular events during video-microscopy. PLoS One. 2024 Jun 21;19(6):e0302042. doi: 10.1371/journal.pone.0302042. PMID: 38905217; PMCID: PMC11192387.

[10] Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin Oncol. 2018 Feb;15(2):81-94. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29115304.

[11] Walter RJ, Berns MW. Computer-enhanced video microscopy: digitally processed microscope images can be produced in real time. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Nov;78(11):6927-31. doi: 10.1073/pnas.78.11.6927. PMID: 6947267; PMCID: PMC349165.

[12] Hand AJ, Sun T, Barber DC, Hose DR, MacNeil S. Automated tracking of migrating cells in phase-contrast video microscopy sequences using image registration. J Microsc. 2009 Apr;234(1):62-79. doi: 10.1111/j.1365-2818.2009.03144.x. PMID: 19335457.

[13] Carvalho V, Gonçalves IM, Souza A, Souza MS, Bento D, Ribeiro JE, Lima R, Pinho D. Manual and Automatic Image Analysis Segmentation Methods for Blood Flow Studies in Microchannels. Micromachines (Basel). 2021 Mar 18;12(3):317. doi: 10.3390/mi12030317. PMID: 33803615; PMCID: PMC8002955.

[14] Di Ruberto C, Loddo A, Putzu L. Detection of red and white blood cells from microscopic blood images using a region proposal approach. Comput Biol Med. 2020 Jan;116:103530. doi: 10.1016/j.compbiomed.2019.103530. Epub 2019 Nov 7. PMID: 31778895.

[15] Tibbe AG, Miller MC, Terstappen LW. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. Cytometry A. 2007 Mar;71(3):154-62. doi: 10.1002/cyto.a.20369. PMID: 17200956.

[16] Scholtens TM, Schreuder F, Ligthart ST, Swennenhuis JF, Greve J, Terstappen LW. Automated identification of circulating tumor cells by image cytometry. Cytometry A. 2012 Feb;81(2):138-48. doi: 10.1002/cyto.a.22002. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22170812.

[17] Say EA, Melamud A, Esserman DA, Povsic TJ, Chavala SH. Comparative analysis of circulating endothelial progenitor cells in age-related macular degeneration patients using automated rare cell analysis (ARCA) and fluorescence activated cell sorting (FACS). PLoS One. 2013;8(1):e55079. doi: 10.1371/journal.pone.0055079. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23359346; PMCID: PMC3554681.

[18] Rigon A, Infantino M, Merone M, Iannello G, Tincani A, Cavazzana I, Carabellese N, Radice A, Manfredi M, Soda P, Afeltra A. The inter-observer reading variability in anti-nuclear antibodies indirect (ANA) immunofluorescence test: A multicenter evaluation and a review of the literature. Autoimmun Rev. 2017 Dec;16(12):1224-1229. doi: 10.1016/j.autrev.2017.10.006. Epub 2017 Oct 14. PMID: 29037905.

[19] Sarmadi S, Izadi-Mood N, Sanii S, Motevalli D. Inter-observer variability in the histologic criteria of diagnosis of hydatidiform moles. Malays J Pathol. 2019 Apr;41(1):15-24. PMID: 31025633.

[20] de Hond YJM, van Haaren PMA, Verrijssen AE, Tijssen RHN, Hurkmans CW. Inter-observer variability in library plan selection on iterative CBCT and synthetic CT images of cervical cancer patients. J Appl Clin Med Phys. 2023 Nov;24(11):e14170. doi: 10.1002/acm2.14170. Epub 2023 Oct 3. PMID: 37788333; PMCID: PMC10647946.

[21] Daniel J. Kaser, Leslie V. Farland, Stacey A. Missmer, Catherine Racowsky, Prospective study of automated versus manual annotation of early time-lapse markers in the human preimplantation

embryo, Human Reproduction, Volume 32, Issue 8, August 2017, Pages 1604–1611, https://doi.org/10.1093/humrep/dex229.

[22] Sun J, Choy D, Sompairac N, Jamshidi S, Mishto M, Kordasti S. ImmCellTyper facilitates systematic mass cytometry data analysis for deep immune profiling. Elife. 2024 Sep 6;13:RP95494. doi: 10.7554/eLife.95494. PMID: 39240985; PMCID: PMC11379455.

[23] Meehan S, Walther G, Moore W, Orlova D, Meehan C, Parks D, Ghosn E, Philips M, Mitsunaga E, Waters J, Kantor A, Okamura R, Owumi S, Yang Y, Herzenberg LA, Herzenberg LA. AutoGate: automating analysis of flow cytometry data. Immunol Res. 2014 May;58(2-3):218-23. doi: 10.1007/s12026-014-8519-y. PMID: 24825775; PMCID: PMC4464812.

[24] Raffoux X, Falque M. CAYSS: Package for Automatic Cytometry Analysis of Yeast Spore Segregation. Yeast. 2024 Nov;41(11-12):681-690. doi: 10.1002/yea.3988. Epub 2025 Jan 22. PMID: 39844477; PMCID: PMC11826985.

[25] Helin HO, Tuominen VJ, Ylinen O, Helin HJ, Isola J. Free digital image analysis software helps to resolve equivocal scores in HER2 immunohistochemistry. Virchows Arch. 2016 Feb;468(2):191-8. doi: 10.1007/s00428-015-1868-7. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26493985.

[26] Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. PLoS One. 2014 May 6;9(5):e96801. doi: 10.1371/journal.pone.0096801. PMID: 24802416; PMCID: PMC4011881.

[27] Wen Y, Murach KA, Vechetti IJ Jr, Fry CS, Vickery C, Peterson CA, McCarthy JJ, Campbell KS. MyoVision: software for automated high-content analysis of skeletal muscle immunohistochemistry. J Appl Physiol (1985). 2018 Jan 1;124(1):40-51. doi: 10.1152/japplphysiol.00762.2017. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28982947; PMCID: PMC6048460.

[28] Savage JT, Ramirez JJ, Risher WC, Wang Y, Irala D, Eroglu C. SynBot is an open-source image analysis software for automated quantification of synapses. Cell Rep Methods. 2024 Sep 16;4(9):100861. doi: 10.1016/j.crmeth.2024.100861. Epub 2024 Sep 9. PMID: 39255792; PMCID: PMC11440803.

[29] Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM. CellProfiler: image analysis software for identifying

and quantifying cell phenotypes. Genome Biol. 2006;7(10):R100. doi: 10.1186/gb-2006-7-10-r100. Epub 2006 Oct 31. PMID: 17076895; PMCID: PMC1794559.

[30] McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kamentsky L, Cimini BA, Karhohs KW, Doan M, Ding L, Rafelski SM, Thirstrup D, Wiegraebe W, Singh S, Becker T, Caicedo JC, Carpenter AE. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. PLoS Biol. 2018 Jul 3;16(7):e2005970. doi: 10.1371/journal.pbio.2005970. PMID: 29969450; PMCID: PMC6029841.

[31] Tinevez JY, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, Bednarek SY, Shorte SL, Eliceiri KW. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. Methods. 2017 Feb 15;115:80-90. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.09.016. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27713081.

[32] Ahmadi A, Courtney M, Ren C, Ingalls B. A benchmarked comparison of software packages for time-lapse image processing of monolayer bacterial population dynamics. Microbiol Spectr. 2024 Aug 6;12(8):e0003224. doi: 10.1128/spectrum.00032-24. Epub 2024 Jul 9. PMID: 38980028; PMCID: PMC11302142.

[33] Nguyen C, Thompson-Peer KL. Comparing Automated Morphology Quantification Software on Dendrites of Uninjured and Injured Drosophila Neurons. Neuroinformatics. 2021 Oct;19(4):703-717. doi: 10.1007/s12021-021-09532-9. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34342808; PMCID: PMC8566419.

[34] Walczak-Sztulpa J, Wawrocka A, Kuszel Ł, Pietras P, Leśniczak-Staszak M, Andrusiewicz M, Krawczyński MR, Latos-Bieleńska A, Pawlak M, Grenda R, Materna-Kiryluk A, Oud MM, Szaflarski W. Ciliary phenotyping in renal epithelial cells in a cranioectodermal dysplasia patient with WDR35 variants. Front Mol Biosci. 2023 Dec 12;10:1285790. doi: 10.3389/fmolb.2023.1285790. PMID: 38161384; PMCID: PMC10756907.

[35] Liu P, Li J, Chang J, Hu P, Sun Y, Jiang Y, Zhang F, Shao H. Software Tools for 2D Cell Segmentation. Cells. 2024 Feb 17;13(4):352. doi: 10.3390/cells13040352. PMID: 38391965; PMCID: PMC10886800.

[36] Wills P, Meyer FG (2020) Metrics for graph comparison: A practitioner's guide. PLoS ONE 15(2): e0228728. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228728

[37] Pavlopoulos GA, Soldatos TG, Barbosa-Silva A, Schneider R. A reference guide for tree analysis and visualization. BioData Min. 2010;3(1):1. Published 2010 Feb 22. doi:10.1186/1756-0381-3-1

[38] http://www.bitplane.com/

[39] https://imaris.oxinst.com/ https://imaris.oxinst.com/

[41] https://imagej.net/plugins/trackmate/

[42] Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P., & Sabatini, D. M. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology*, *7*(10), R100. https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100.

[43] http://www.cellprofiler.org

[44] Behrens, M., Gube, M., Chaabene, H., Prieske, O., Zenon, A., Broscheid, K. C., Schega, L., Husmann, F., & Weippert, M. (2023). Fatigue and Human Performance: An Updated Framework. Sports medicine (Auckland, N.Z.), 53(1), 7–31. https://doi.org/10.1007/s40279-022-01748-2

[45] Sibia, Naaz & Zavaleta Bernuy, Angela & Williams, Joseph & Liut, Michael & Petersen, Andrew. (2023). Student Usage of Q&A Forums: Signs of Discomfort?. 10.48550/arXiv.2305.18717.

[46] Chang JC, Wu YT, Ye JN. A Study of Graduate Students' Achievement Motivation, Active Learning, and Active Confidence Based on Relevant Research. Front Psychol. 2022 Jun 10;13:915770. doi: 10.3389/fpsyg.2022.915770. PMID: 35756232; PMCID: PMC9226552.

[47] Blomberg, A. (2025). Doctoral studies as a precarious identity process: deviance and the rational ideal of the doctoral process. Studies in Higher Education, 50(11), 2346–2360. https://doi.org/10.1080/03075079.2024.2420205

[48] Thornton A, Lee P. Publication bias in meta-analysis: its causes and consequences. J Clin Epidemiol. 2000 Feb;53(2):207-16. doi: 10.1016/s0895-4356(99)00161-4. PMID: 10729693.

[49] Carter, E. C., & McCullough, M. E. (2014). Publication bias and the limited strength model of self-control: has the evidence for ego depletion been overestimated?. Frontiers in psychology, 5, 823. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00823

[50] https://yolov8.org/ https://yolov8.org/

Supplementary analyses are provided as descriptive reference-based comparisons. They should be interpreted as divergence from U0 rather than as absolute measures of annotation accuracy.

Annexe

	Supervised students	**Non-supervised students**
Total number of mitoses	20,5 %	19,5 %
Number of normal mitoses	20,5 %	17,6 %
Number of abnormal mitoses	111,8 %	114,3 %
Number of non-dichotomous mitoses	80,3 %	95,18 %
Number of refusions after mitosis	92,6 %	75,7 %
Total number of deaths	67,2 %	62,1 %

Supplementary table 1: Cov-362 absolute percentage differences for key cellular events relative to U0.

Differences D1	**Supervised students**	**Non-supervised students**
Number of deaths per day	68,34 %	62,644 %
Number of mitoses per day	29,516 %	40,696 %
Number of abnormal mitoses per day	76,84 %	102,4 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	59,998 %	77,734 %
Number of fusions per day	107,42 %	96,02 %
Average number of errors per day	68,424 %	69,52 %

Supplementary table 2: Cov-362 daily percentage differences relative to U0 on Day 1.

Differences D2	**Supervised students**	**Non-supervised students**
Number of deaths per day	45,714 %	48,092 %
Number of mitoses per day	48,798 %	45,732 %
Number of abnormal mitoses per day	58,65 %	40 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	20,872 %	39,334 %
Number of fusions per day	81,496 %	57,486 %
Average number of errors per day	51,106 %	44,632 %

Supplementary table 3: Cov-362 daily percentage differences relative to U0 on Day 2.

Differences D3	**Supervised students**	**Non-supervised students**
Number of deaths per day	27,686 %	35,79 %
Number of mitoses per day	49,112 %	38,944 %
Number of abnormal mitoses per day	54,576 %	44,666 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	54,576 %	47,334 %
Number of fusions per day	26,666 %	32,278 %
Average number of errors per day	42,522 %	35,735 %

Supplementary table 4: Cov-362 daily percentage differences relative to U0 on Day 3.

Descriptive analysis of supervised and non-supervised students' results (Cov-362)

Supervised and non-supervised students differed across most Cov-362 cellular-event metrics.

For total mitoses, supervised and non-supervised deviations were similar (20.5% vs 19.5%). Normal mitoses were closer to U0 in supervised students (20.5%) than non-supervised students (17.6%), whereas abnormal mitoses were strongly overestimated in both groups

(111.8% supervised; 114.3% non-supervised). Non-dichotomous mitoses were also higher without supervision (95.18% vs 80.3%). Post-mitotic fusions and total deaths showed larger deviations in supervised students (92.6% vs 75.7%; 67.2% vs 62.1%). Overall, non-supervised users showed greater difficulty with abnormal and non-dichotomous mitoses, while some event categories remained high in both groups.

Daily Quantification – Day 1 (D1)

On Day 1, deviations were high in both groups. Deaths per day were slightly higher in supervised students (68.34% vs 62.644%), whereas abnormal mitoses were higher in non-supervised students (102.4% vs 76.84%).

Non-dichotomous mitoses showed the largest D1 contrast (77.734% non-supervised vs 59.998% supervised), and average daily differences were slightly higher without supervision (69.52% vs 68.424%), suggesting reduced extreme overestimation with supervision.

Daily Quantification – Day 2 (D2)

On Day 2, supervised students showed more moderate deviations for non-dichotomous mitoses (20.872% vs 39.334%), while mitoses per day were similar (48.798% vs 45.732%). Fusions and average daily differences were higher in supervised students (81.496% vs 57.486%; 51.106% vs 44.632%).

Daily Quantification – Day 3 (D3)

On Day 3, deviations decreased overall. Supervised students had lower deaths per day (27.686% vs 35.79%) and slightly lower mitosis-related discrepancies, except for non-dichotomous mitoses (54.576% vs 47.334%). Average daily differences remained lower in non-supervised students (35.735%) than supervised students (41.642%).

	Supervised students	**Non-supervised students**
Total number of mitoses	18.99	23.744 %
Number of normal mitoses	10.766	10.196 %
Number of abnormal mitoses	18.34 %	17.89 %

Number of non-dichotomous mitoses	14.954 %	12.436 %
Number of refusions after mitosis	14.928 %	15.826 %
Total number of deaths	9.528 %	9.598 %

Supplementary table 5: HEC-1-A absolute percentage differences for key cellular events relative to U0.

Differences D1	**Supervised students**	**Non-supervised students**
Number of deaths per day	95,194 %	104,4 %
Number of mitoses per day	14,974 %	18,826 %
Number of abnormal mitoses per day	9,386 %	11,334 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	6 %	6,534 %
Number of fusions per day	6,45 %	6,648 %
Average number of errors per day	4,558 %	5,134 %

Supplementary table 6: HEC-1-A daily percentage differences relative to U0 on Day 1.

Differences D2	**Supervised students**	**Non-supervised students**
Number of deaths per day	40,478 %	40,666 %
Number of mitoses per day	5,954 %	12,312 %
Number of abnormal mitoses per day	7,736 %	10,89 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	4,504 %	3,396 %
Number of fusions per day	3,672 %	3,714 %
Average number of errors per day	3,218 %	3,758 %

Supplementary table 7: HEC-1-A daily percentage differences relative to U0 on Day 2.

Differences D3	**Supervised students**	**Non-supervised students**
Number of deaths per day	19,998 %	13,134 %
Number of mitoses per day	11,564 %	15,074 %
Number of abnormal mitoses per day	12,486 %	13,056 %
Number of non-dichotomous mitoses per day	5,874 %	6,556 %
Number of fusions per day	7,744 %	9,728 %
Average number of errors per day	4,76 %	5,246 %

Supplementary table 8: HEC-1-A daily percentage differences relative to U0 on Day 3.

Descriptive analysis of supervised and non-supervised students' results (HEC-1-A)

For HEC-1-A, patterns associated with supervision were event-specific. Non-supervised students showed higher total mitosis deviation (23.744% vs 18.99%), while normal mitosis deviations were similar (10.196% non-supervised; 10.766% supervised). Abnormal and non-dichotomous mitoses were slightly higher in supervised students (18.34% vs 17.89%; 14.954% vs 12.436%). Refusion after mitosis was comparable (14.928% supervised; 15.826% non-supervised), and total deaths were nearly identical (9.528% vs 9.598%).

Thus, supervision did not systematically reduce HEC-1-A deviations, although it lowered global mitosis discrepancies.

Daily Quantification – Day 1 (D1)

On Day 1, deviations were highest overall. Non-supervised students had larger deviations for deaths (104.4% vs 95.194%), mitoses (18.826% vs 14.974%), and abnormal mitoses (11.334% vs 9.386%). Non-dichotomous mitoses, fusions, and average daily differences were similar but slightly higher without supervision.

Daily Quantification – Day 2 (D2)

On Day 2, deviations decreased and supervision was associated with lower mitosis-related differences: mitoses per day (5.954% supervised vs 12.312% non-supervised) and abnormal mitoses (7.736% vs 10.89%). Non-dichotomous mitoses were slightly

higher in supervised students (4.504% vs 3.396%), while fusions and deaths were comparable.

Daily Quantification – Day 3 (D3)

On Day 3, differences were moderate. Supervised students had higher death deviations (19.998% vs 13.134%), whereas non-supervised students showed higher mitoses (15.074% vs 11.564%), abnormal mitoses (13.056% vs 12.486%), non-dichotomous mitoses (6.556% vs 5.874%), fusions (9.728% vs 7.744%), and average daily differences.

Chapitre 8

Résultats : cancer de l'ovaire

8.1 Introduction.

Nos lignées cellulaires sont composées de 4 lignées ovariennes. Elles ont été choisies selon l'article de Silvia Domcke et al. [261] qui indique selon les profils génomiques, les lignées cellulaires ressemblant le plus aux HGSOCs (90% des carcinomes séreux de l'ovaire sont de type *High-Grade Serous Ovarian Cancer*, comme nous avons pu le voir dans la partie précédente). Ainsi, nos lignées sont des types suivants :

- OVCAR-4 : probablement HGSOC, originaires d'ascites. Mutation de **TP53** ; profil génomique très proche des HGSOC avec nombreuses altérations du nombre de copies (copy number alterations). Classée parmi les meilleurs modèles de HGSOC [261]. ;
- Ovsaho : d'origine métastatique abdominale d'un adénocarcinome séreux papillaire, mais cellules différenciées. Mutation de **TP53** et altération de **BRCA2** (déletion homozygote/perte de fonction), associée à une déficience de la recombinaison homologue (HRD). [261] ;
- Cov-362 : probablement HGSOC, cellules différenciées d'origine métastatique effusion pleurale. Mutation de **TP53** et mutation tronquante de **BRCA1** conduisant à une perte de fonction ; modèle HRD fréquemment utilisé pour l'étude des inhibiteurs de PARP [261] ;
- Caov-3 : probablement HGSOC, en provenance d'un adenocarcinoma ovarien. Mutation non-sens de **TP53** et amplification de **PIK3CA** ; forte instabilité chromosomique caractéristique des HGSOC [261].

Nous avons cependant vérifié le profil de ces lignées avant de commencer nos essais, étant donné la grande variabilité des profils de lignées cellulaires imortalisées [378].

Nous avons par la suite testé les résistances de ces lignées face à des doses différentes de thérapies (ces dernières ont été au préalable utilisées par le doctorant me précédent sur le projet, François Fabi) : le cisplatine

(chimiothérapie au platine, 10 μM), la doxorubicine (chimiothérapie connue sous le nom d'*Adryamicine*, 3 μM), l'AZD5363 (thérapie ciblée, connue sous le nom commercial de *Capivasertib*, 20 μM), le TRAIL (thérapie ciblée, *TNF-Receptor Associated Inducing Ligand*, 0.1 $\mu g/mL$) ainsi que le KPT330 (thérapie ciblée connue sous le nom commercial de *Selinexor*, thérapie ciblée, 2 μM).

Les expériences suivantes ont été adressées : Test de cicatrice (*scratch assay*), test de clonogénicité (*clonogenic assay*), test de pousse 3D post-traitement. Par souci de temps et de pertinence, les résultats de ces expériences ont servi comme comparaison pour les mêmes tests effectués sur des lignées endométriales (voir chapitre 9 sur les résultats du cancer de l'endomètre, page 217).

8.2 Résultats.

Dans un premier temps, le test de cicatrice a permis d'évaluer la capacité de migration et de prolifération de nos cellules. Sur les figures 8.2, 8.6 et 8.4, apparaissent les photographies de la fermeture des tests de cicatrices à 24h, 48h et 120h de traitements. Les monothérapies de cisplatine, doxorubicine, d'AZD5363, de KPT330 et de TRAIL ont été injectées à T0 ; 24h plus tard le scratch a été effectué et le milieu changé, afin de permettre une incubation sans drogue. Les photographies ont été prises au moment du scratch, puis 24h, 48h et 120h après. Les photographies ont ensuite été analysées sous ImageJ avec le plugin *Wound healing assay* et des graphiques ont été construits, représentés par les figures 8.1, 8.5 et 8.3.

Pour les OVCAR-4, aucune différence notable n'a été remarquée quel que soit le traitement, prouvant la résistance de cette lignée en monothérapie au traitement sur ce test (figure 8.1 et figure 8.2).

Pour la lignée des Caov-3, les chimiothérapies ont fait décoller l'entièreté des cellules cancéreuses. Pour les thérapies ciblées, les résultats sont plus disparates, démontrant une hétérogénéité de la réaction. Il est possible d'observer un ralentissement de la fermeture du scratch pour les temps 24h, 48h et 120h pour les conditions traitées à l'AZD5363 et KPT330. Pour le traitement au TRAIL, les cellules ont complètement décollées au bout de 120h. Le TRAIL serait donc efficace à long terme dans ce genre de test (figure 8.3 et figure 8.4).

Finalement les Cov-362 semblent avoir de la difficulté à refermer la cicatrice avec un traitement au cisplatine et à la doxorubicine. Par contre, l'effet des thérapies ciblées est inexistant (figures 8.5 et 8.6).

Les données de la lignée cancéreuse Ovsaho ne seront pas présentées du fait de leur faible taux de proliférations : cette lignée n'a pas réussi à refermer la cicatrice quelle que soit sa taille de base, du fait de leur lent temps de division.

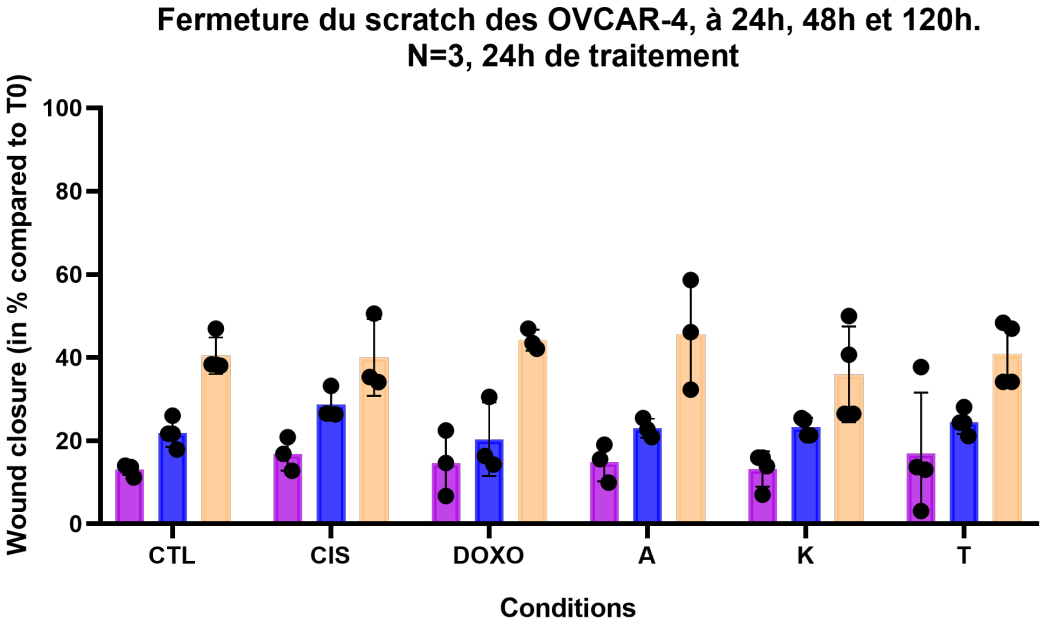


FIGURE 8.1 – Fermeture du test de cicatrice des OVCAR-4 sous 5 jours, calcul effectué (T0-Tx)/T0 CTL = Contrôle, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A = AZD5363, K = KPT330, T = Trail. En mauve les résultats à 24h après le scratch, en bleu 48h après le scratch et en orange 120h après le scratch.

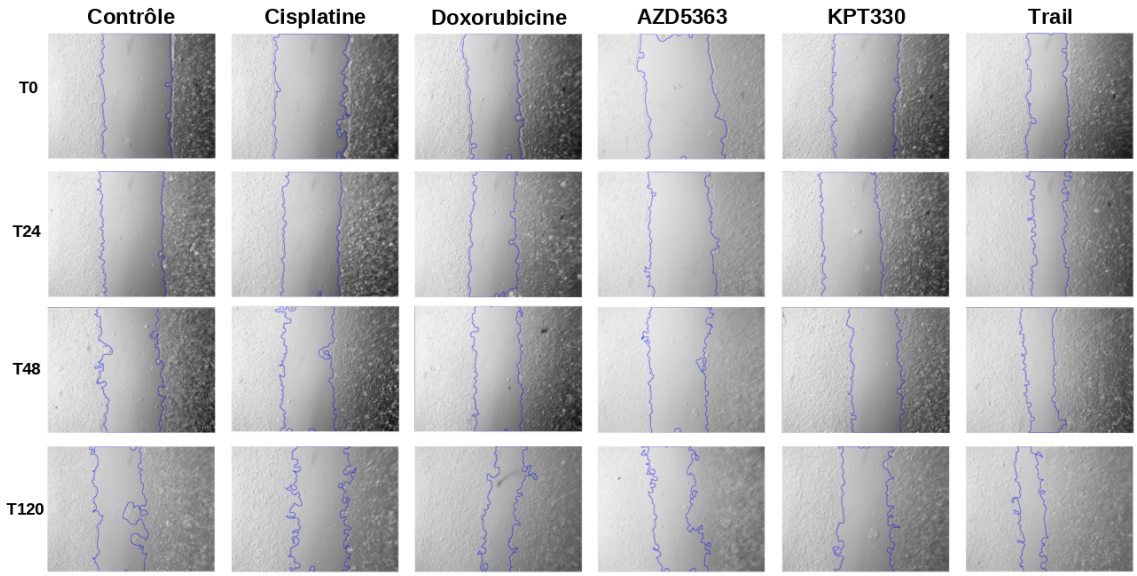


FIGURE 8.2 – Fermeture du test de cicatrice des OVCAR-4 à 24h, 48h et 120h, n=3 après 24h de traitements en monothérapies.

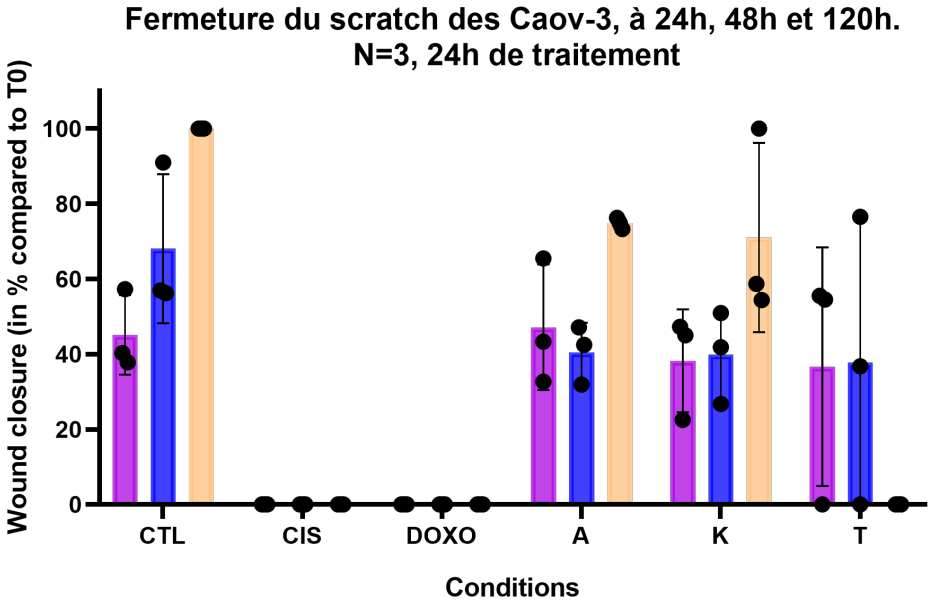


FIGURE 8.3 – Fermeture du test de cicatrice des Caov-3 sous 5 jours, calcul effectué (T0-Tx)/T0 CTL = Contrôle, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A = AZD5363, K = KPT330, T = Trail. En mauve les résultats à 24h après le scratch, en bleu 48h après le scratch et en orange 120h après le scratch.

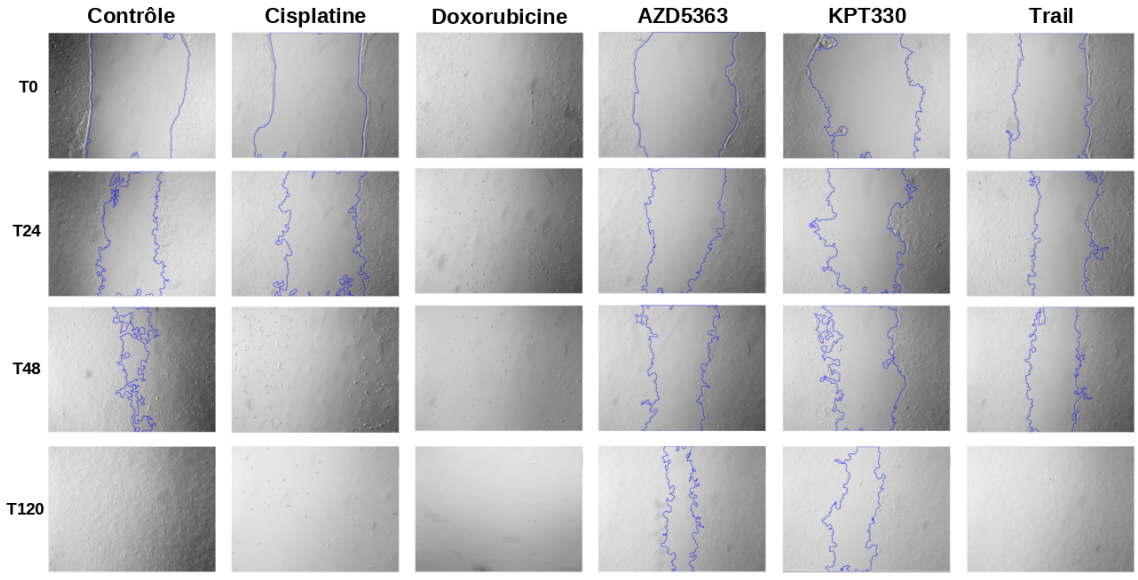


FIGURE 8.4 – Fermeture du test de cicatrice des Caov-3 à 24h, 48h et 120h, n=3 après 24h de traitements en monothérapies.

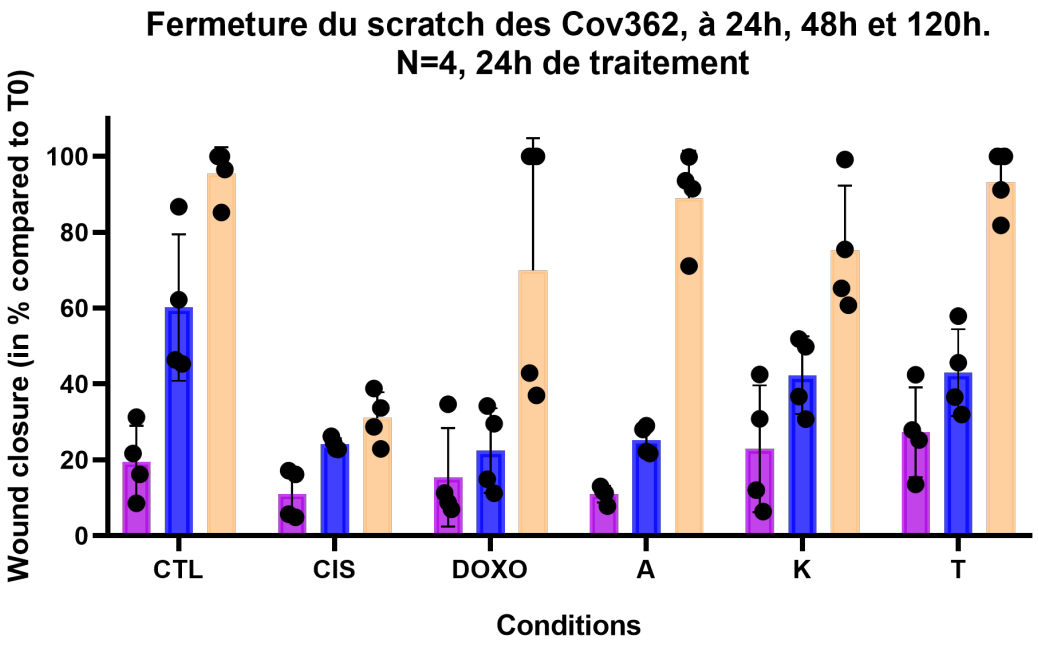


FIGURE 8.5 – Fermeture du test de cicatrice des Cov362 sous 5 jours, calcul effectué (T0-Tx)/T0 CTL = Contrôle, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A = AZD5363, K = KPT330, T = Trail.En mauve les résultats à 24h après le scratch, en bleu 48h après le scratch et en orange 120h après le scratch.

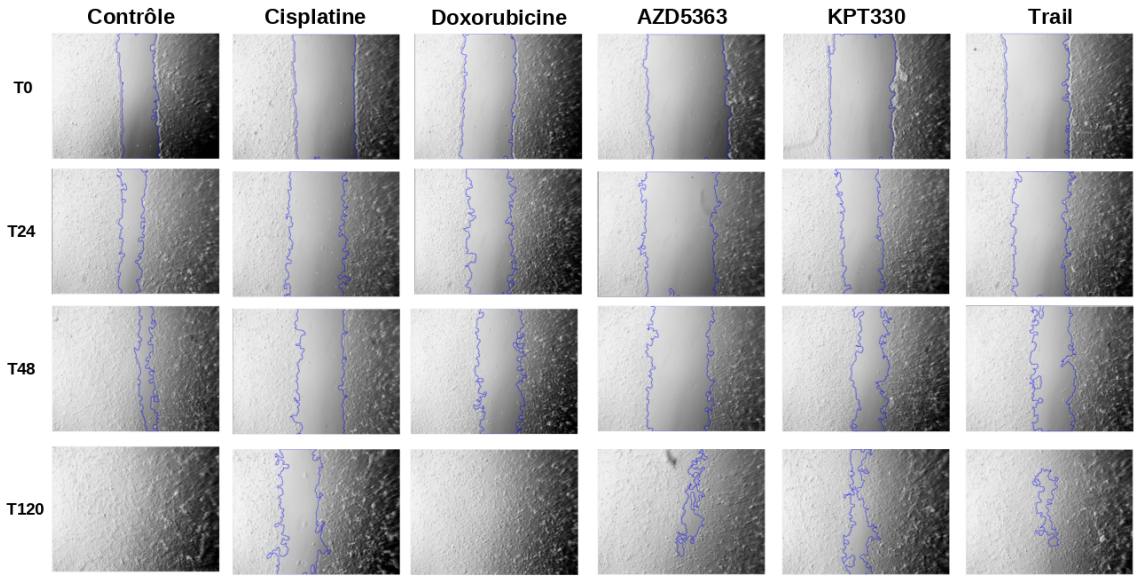
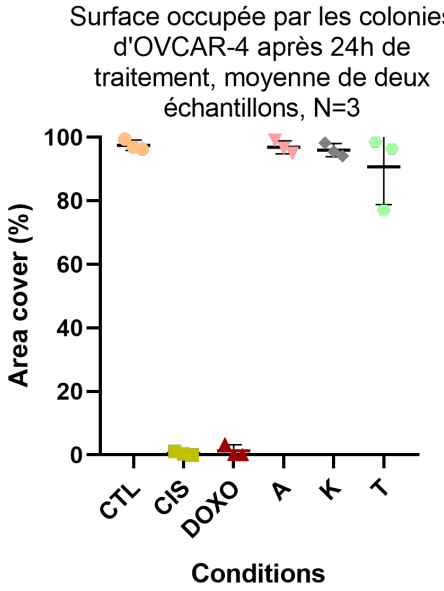


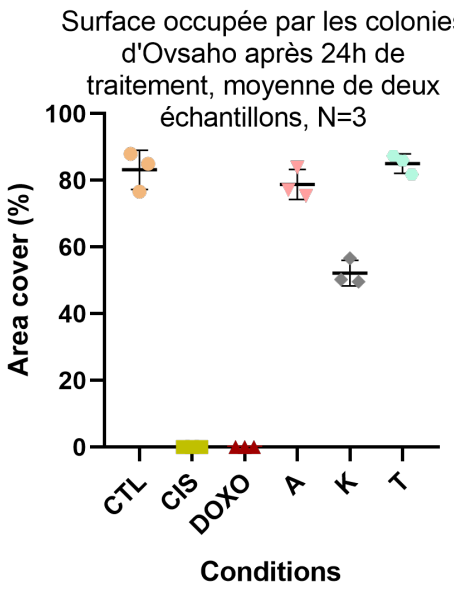
FIGURE 8.6 – Fermeture du test de cicatrice des Cov-362 à 24h, 48h et 120h, n=3 après 24h de traitements en monothérapies.

Afin de confirmer nos résultats, des tests de clonogénicités ont été effectués. Les cellules ont été mises en plaque à T0 ; 24h plus tard ces dernières ont été traitées en monothérapie, puis le milieu contenant les drogues a été retiré et remplacé par du milieu frais. Les cellules ont été laissées 10 jours en croissance, en retirant le milieu vicié et en ajoutant du nouveau milieu tous les deux jours. Les plaques ont été fixées puis colorées au crystal violet et scannées. Le logiciel ImageJ et le plugin *Colony Area* ont été utilisés afin de produire des données. Ces dernières ont été utilisées pour les graphiques apparaissant sur les figures 8.7a, 8.7b, 8.8a, et 8.8b .

Pour la lignée cellulaire OVCAR-4 (figure 8.7a), la sensibilité au cisplatine et à la doxorubicine semblait présente avec aucune pousse après 10 jours. Les cellules semblaient ne pas réagir au traitement avec les thérapie ciblées. Un léger écart entre les valeurs de TRAIL pourrait suggérer une tendance à l'hétérogénéité de réponse.



(a) Ovcar4

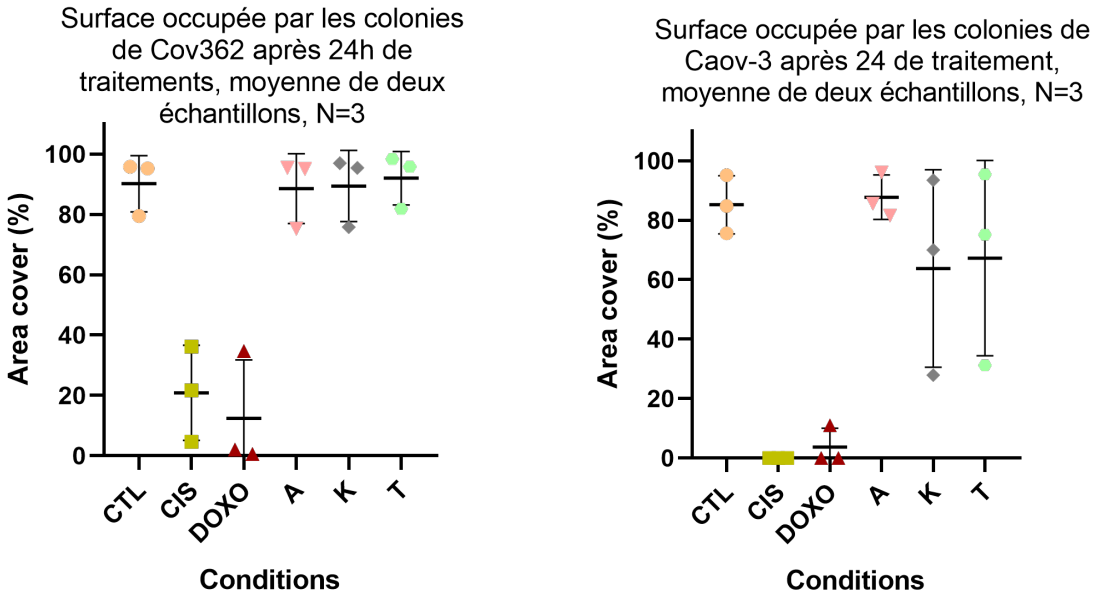


(b) Ovsaho

FIGURE 8.7 – Surface occupée par les colonies d'Ovcar-4 (a) et d'Ovsaho (b) après 11 jours de pousse (N=3) - CTL = Contrôle, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A = AZD5363, K = KPT330, T = Trail.

Dans le cas de la lignée cellulaire Ovsaho, les cellules ont comme pour les précédentes peu supporté le traitement aux chimiothérapies. Une tendance cependant se démarque, avec une réaction au traitement KPT330, diminuant ainsi de 30% leur pousse en comparaison du contrôle (figure 8.7b).

Les cellules Cov-362 (figure 8.8a) ont, elles, démontré un modèle plus complexe. Déjà dans la condition contrôle, leur croissance semblait hétérogène. Plus les passages avançaient et plus les cellules semblaient pousser rapidement. Il en va de même avec leur réaction vis à vis de la drogue ajoutée : ainsi l'*area cover* pour le cisplatine est passée de 5% à 35%, pour la doxorubicine



(a) Cov362

(b) Caov-3

FIGURE 8.8 – Surface occupée par les colonies de Cov362 (a) et de Caov-3 (b) après 11 jours de pousse (N=3) - CTL = Contrôle, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A = AZD5363, K = KPT330, T = Trail.

de 2% à 38%, l'AZD5363 et le KPT330 passant de 75% à 90% et finalement le TRAIL passant de 82% à 95%, ces chiffres suggérant ainsi une résistance au traitement.

Finalement, les Caov-3 étaient des cellules particulièrement difficiles à cultiver en plaque pour les test de clonogénicités. En effet, à cause des vibrations et du fait que les cellules décollaient rapidement, il était compliqué de les garder plus de 10 jours en faisant des changements de milieux réguliers. Les résultats sont moins disparatres que pour les Cov362 (figure 8.8b) : les Caov-3 sont sensibles au cisplatine ainsi qu'à la doxorubicine, mais peu sensibles à l'AZD5363, avec des résultats comparables à la conditions contrôle (moyenne de 85% contrôle versus 87% avec l'AZD5363). Ce qui a été surprenant est par contre leur réaction hétérogène vis-à-vis du KPT330 et du TRAIL (*area cover* d'environ 30% versus de 90%). Ceci a permis de suggérer qu'un traitement au KPT330 ou au TRAIL pourrait être envisageable.

Finalement, les derniers tests effectués pour cette partie ovarienne ont été la création de sphéroïdes post-traitement. Le but de cette expérience a été de voir si les cellules cancéreuses étaient capable de reformer des sphéroïdes (et parallèlement des tumeurs chez la patiente). La méthode consistait à faire pousser les cellules pendant 24h en plaque 6 puits, puis de traiter avec les monothérapies pendant 24h. A la fin de ces 24h, les cellules ont été changées de milieux, rincées puis passées dans des puits à fond ronds stimulant la pousse et la formation de sphéroïdes 3D. L'analyse a été faite après 3 expériences en triplicata et les photographies présentées sont des représentations fiables des

expériences et répétitions.

Pour la lignée cellulaire OVCAR-4, les cellules provenant de métastases n'ont jamais pu former de sphéroïdes, malgré les différents essais, à différentes densités de cellules.

Les cellules cancéreuses Ovsaho ont démontré des sphéroïdes moins denses et moins compactes, notamment avec le traitement à la doxorubicine, mais aussi au cisplatine. Pour ce qui est des thérapies ciblées, peu d'effets ont été observés pour ces derniers traitements (figure 8.9).

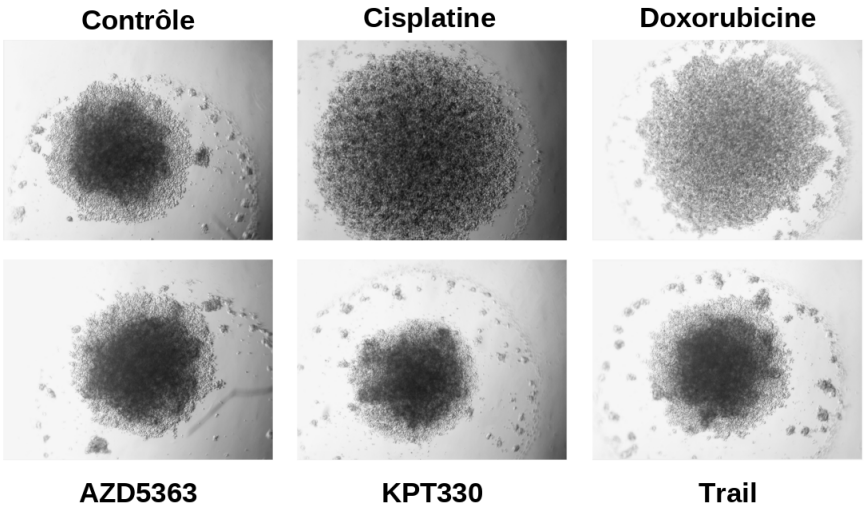


FIGURE 8.9 – Photographies représentatives de sphéroïdes 3D de la lignées Ovsaho : les cellules ont d'abord été cultivées en 2D et ont reçu un traitement de 24h en monothérapie, avant de pousser en 3D. Les photos ont été prises 8 jours après la mise en plaque 3D (N=3).

La lignée Cov-362 (figure 8.10), a démontré encore une fois, un séquences de motifs très hétérogène. Les cellules ont eu beaucoup de mal à former des tumeurs post-chimiothérapies. Les résultats étaient par contre comparables entre le contrôle et le traitement à l'AZD5363 et au TRAIL. Le traitement avec la thérapie ciblées KPT330 a lui par contre permis la formation de mini-sphéroïdes denses.

Pour terminer, les Caov-3 ont démontré des tendances surprenantes dans leur comportement en 3D (figure 8.11). Ainsi les sphéroïdes arrivaient toujours à se former quel que soit le traitement injecté. Une attention particulière devra être portée pour le traitement au TRAIL, car les sphéroïdes étaient plus denses et avec une taille notablement plus grande.

Pour conclure, des vidéo-microscopies des différentes lignées ont été prises (n=3) afin de pouvoir augmenter la base de données du projet à l'interface entre IA et biologie. Cet aspect a été abordé lors du chapitre 4. Nous présentons ci-après des photographies extraites des films d'OVCAR-4 (figure 8.13), d'Ovsaho (figure 8.14), de Cov362 (figure 8.15) et de Caov-3 (figure 8.16).

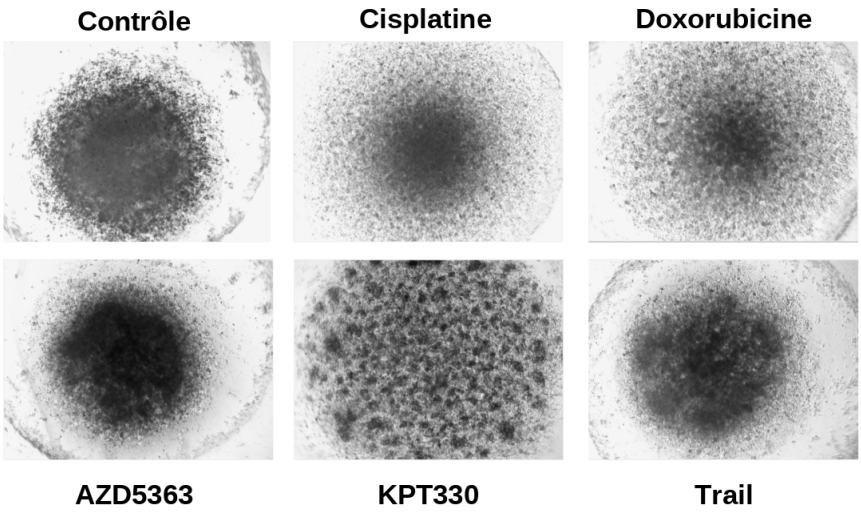


FIGURE 8.10 – Photographies représentatives de sphéroïdes 3D de la lignée Cov362 : les cellules ont d'abord été cultivées en 2D et ont reçu un traitement de 24h en monothérapie, avant de pousser en 3D. Les photos ont été prises 8 jours après la mise en plaque 3D (N=3).

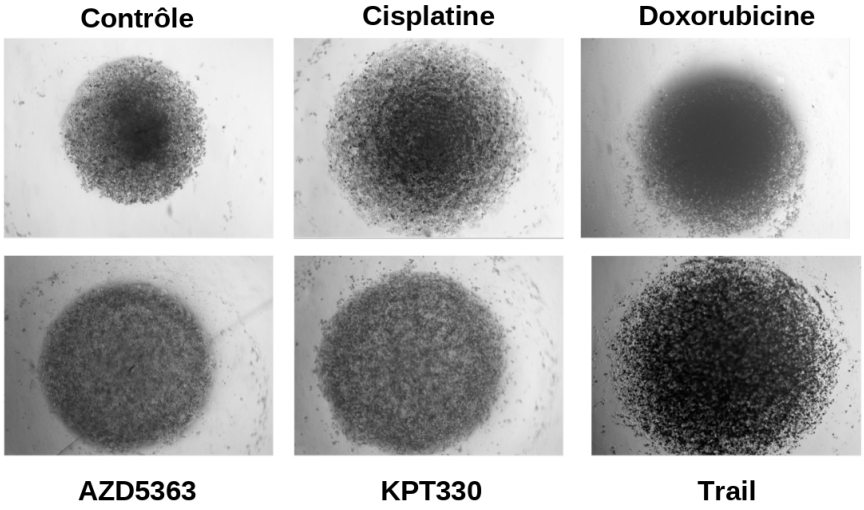


FIGURE 8.11 – Photographies représentatives de sphéroïdes 3D de la lignées Caov-3 : les cellules ont d'abord été cultivées en 2D et ont reçu un traitement de 24h en monothérapie, avant de pousser en 3D. Les photos ont été prises 8 jours après la mise en plaque 3D (N=3).

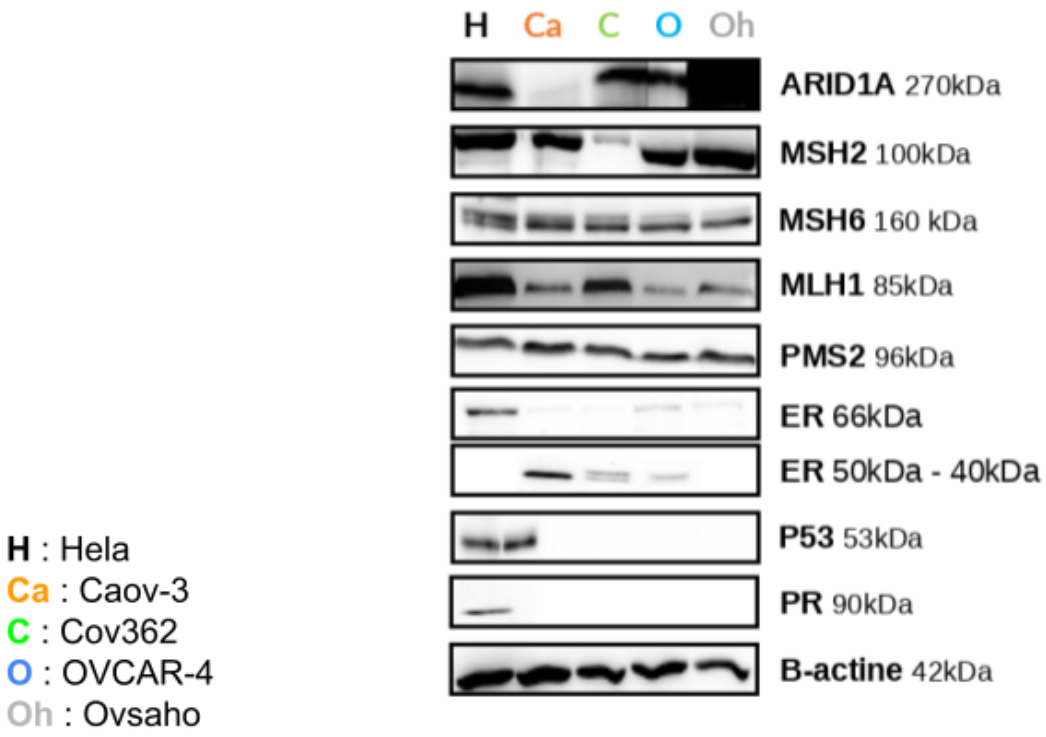


FIGURE 8.12 – Expression des biomarqueurs dans les lignées ovariennes à l'aide d'anticorps anti-lapin et anti-souris. Dilutions pour le SDS-PAGE/Western-Blot à 1/4999. Les contrôles positifs pour ces marqueurs sont la lignée HELA (cancer de l'utérus). N=3

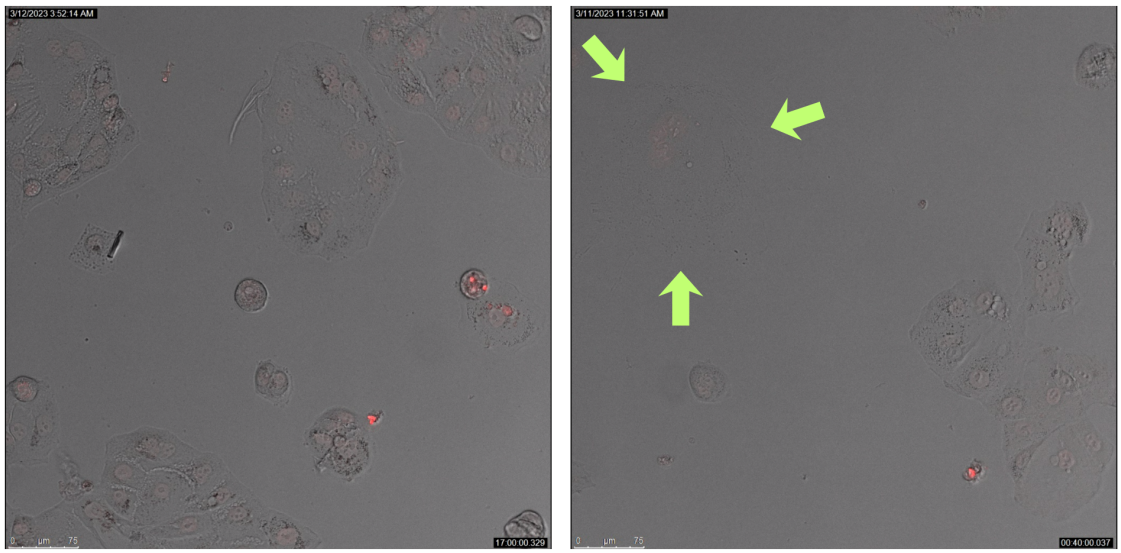


FIGURE 8.13 – Photographies représentatives d'une vidéo-microscopie d'OVCAR-4 sans traitement, les flèches indiquent les cellules très peu visibles, représentant ainsi la complexité d'analyse, liée à l'hétérogénéité de la qualité des images de video-microscopique.

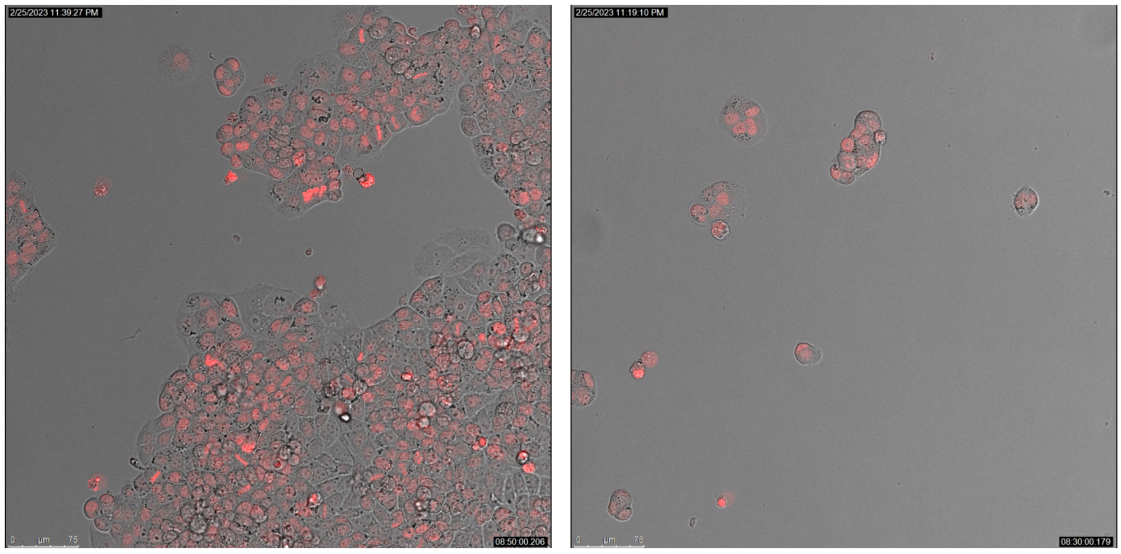


FIGURE 8.14 – Photographies représentatives d'une vidéo-microscopie d'Ovsaho sans traitement, deux champs séparés au sein d'un même puits.

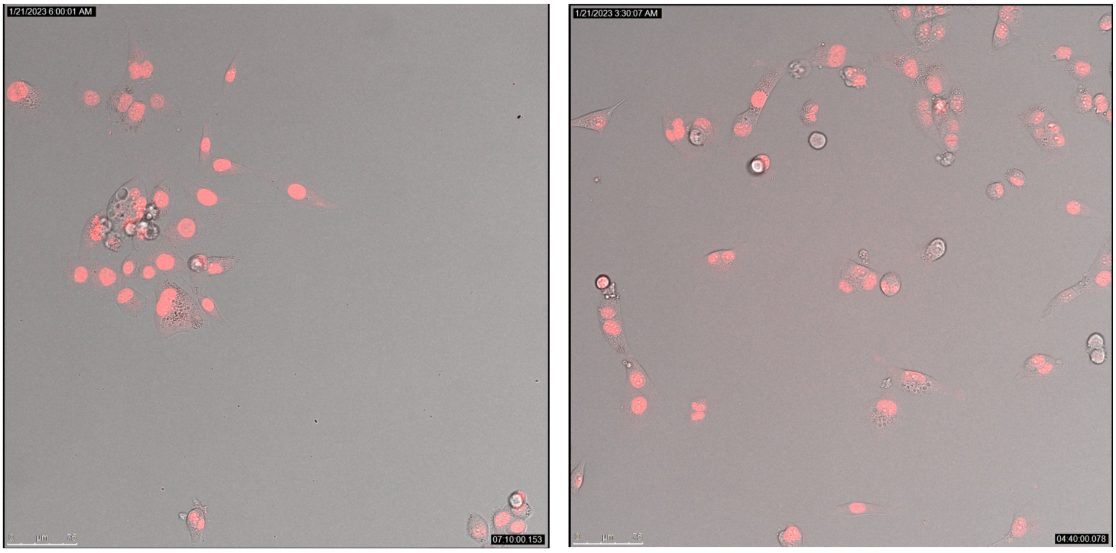


FIGURE 8.15 – Photographies représentatives d'une vidéo-microscopie de Cov362 sans traitement, deux champs séparés au sein d'un même puits.

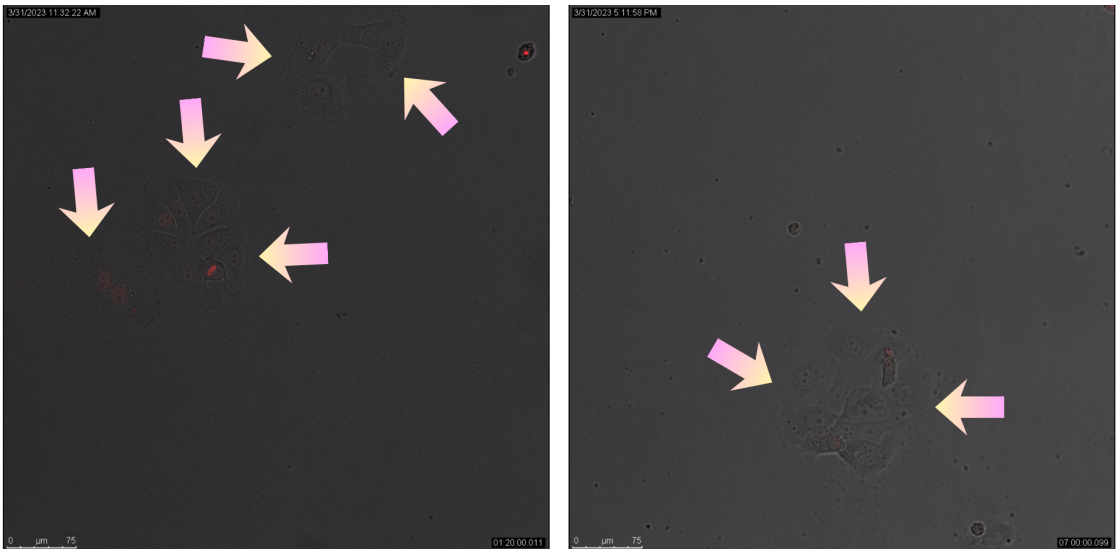


FIGURE 8.16 – Photographies représentatives d'une vidéo-microscopie de Caov-3 sans traitement, les flèches indiquent les cellules très peu visibles, représentant ainsi la complexité de l'imagerie, liée à l'hétérogénéité des types de cellules.

Chapitre 9

Résultats : cancer de l'endomètre

9.1 Introduction.

La première étape de mon projet a consisté à caractériser les lignées cellulaires endométriales (KLE, HEC-1-A, Ishikawa), pour les rapprocher au plus près de la classification moléculaire actuellement utilisée par les praticiens pour le choix des traitements. Ces lignées endométriales ont été choisies en fonction de leur fréquence d'utilisation dans la littérature déjà existante.

Pour nos lignées endométriales, nous avions au départ les données suivantes :

- HEC-1-A : proviennent d'un adénocarcinome endométrial peu différencié de grade faible. D'après les mutations connues actuelles, son statut serait *MSI-hight* ;
- KLE : proviennent d'un carcinome peu différencié d'origine métastatique péritonéale de stade III (haut grade) ;
- Ishikawa : dérivent d'un carcinome bien différencié de grade I (bas) ; d'après les mutations connues, elles seraient en faveur d'un statut MSI.

Les techniques d'IHC et de Western Blot ont été utilisées sur ces lignées afin d'identifier les principaux marqueurs de la classification et leurs expressions.

Notre second objectif a été l'étude de l'impact de thérapies combinées sur les cancers de l'endomètre et de l'ovaire *in vitro*. Dans un premier temps, différents traitements ont été envisagés pour mon projet. Ceux-ci consistent en un regroupement de thérapies déjà utilisées en clinique avec une thérapie ciblant la voie AKT, ou l'apoptose. Le but final est de réduire les doses des traitements avec de forts effets secondaires comme la chimiothérapie, afin de maximiser le taux de survie et l'espérance de vie des patientes. L'objectif principal de ce travail aurait été de réussir à déterminer si une thérapie combinée se dégage plus que les autres, pour une certaine classe moléculaire de type de cancer. La combinaison de ces thérapies sera d'abord évaluée par un test MTT de viabilité cellulaire, afin d'identifier, pour chaque lignée cellulaire, les concentrations les plus efficaces de chaque traitement et de leur

association, sur la base des valeurs d'IC_{50}. Par la suite, les mêmes étapes que pour le premier objectif seront appliquées post-traitements. Il sera ajouté à ces techniques une caractérisation moléculaire des principales cibles de la voie PI3K-AKT : l'expression et l'activation des protéines cibles seront évaluées par Western Blot après un temps donné de 24h traitement sur des cultures en 2D.

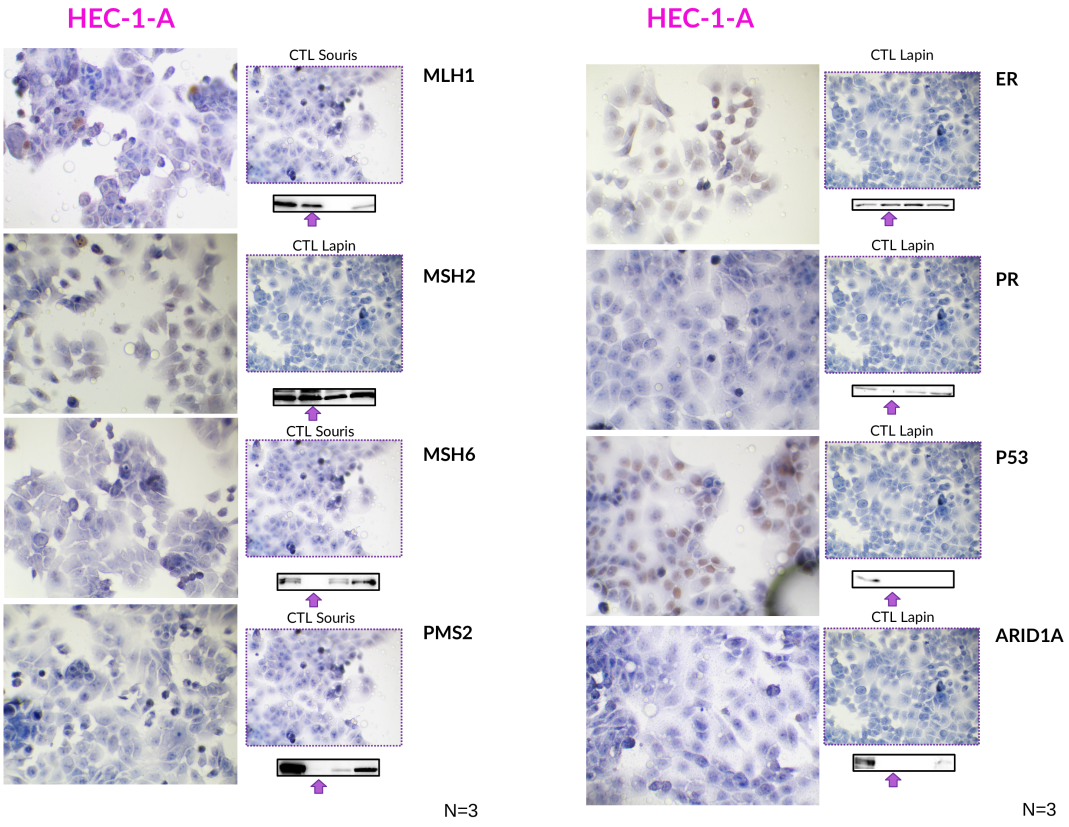
Pour tester les réactions des lignées face à aux thérapies, le cisplatine (chimiothérapie au platine, 10 μM), la doxorubicine (chimiothérapie connue sous le nom d'*adryamicine*, 3 μM), l'AZD5363 (thérapie ciblée, connue sous le nom commercial de *capivasertib*, 20 μM), le TRAIL (thérapie ciblée, *TNF-Receptor Associated Inducing Ligand*, 0.1 $\mu g/mL$) ainsi que le KPT330 (thérapie ciblée connue sous le nom de *selinexor*, thérapie ciblée, 2 μM) ont été utilisés. Ces drogues et doses ont déjà été utilisées par le passé dans le laboratoire, à part pour le KPT330, qui était précédemment remplacé par la Leptomycine B (n'ayant pas passé les modèles murins du fait d'une toxicité rénale) ; cette étape s'est ainsi faite par des tests de clonogénicités. Malheureusement cette technique a beaucoup de limitantes, puisqu'elle permet de voir uniquement la croissance finale des colonies après un temps donné et ne permet pas de voir les possibles événements qui mèneraient à des résistances ou encore à une sur-prolifération de celles-ci. Une approche complémentaire a été appliquée à mon projet, la vidéo-microscopie, qui permet avec deux champs différents (un *bright field* (BF) et un autre en *far red*) de visualiser le comportement des cellules sur un temps donné. Il est ainsi possible d'observer le comportement individuel des cellules, tel que la division, la fusion, les mitoses anormales, et la mort cellulaire. Cette technique nous permettra donc d'avoir une meilleure compréhension de ce qu'il s'est réellement passé après nos traitements et de mieux caractériser le comportement de chacune de nos lignées. D'autres tests subsidiaires complémentaires aux tests précédents ont été utilisés. En effet, la culture 2D n'est pas optimale pour représenter un modèle humain, les interactions entre cellules sur différents niveaux n'étant pas représentées. Or, certaines cultures sont sensibles aux traitements en 2D, mais résistantes en 3D et réciproquement. Une culture 3D post-traitement a donc été mise en place pour chaque lignée, afin d'être capable de voir ces interactions entre cellules.

9.2 Résultats.

La caractérisation des différentes lignées que nous avons considéré a été faite par IHC et Western Blot. Les techniques de PCR et de séquençage n'ont pas été utilisées par manque de ressources.

De prime abord, dans les figure 9.1a et 9.1b, il est possible de voir que les cellules cancéreuses HEC-1-A ont une expression protéique mutée pour PMS2 et MSH6. Dans la littérature, leur statut POLE a été identifé comme muté et incomplet [379] ; ces cellules font donc partie du groupe 1 du CE avec mutations de PMS2 et MSH6, ce qui permettra, par la suite de voir des

différences de réactions vis-à-vis des traitements effectués.



(a) (b)

FIGURE 9.1 – Expression des bio-marqueurs dans les cellules HEC-1-A à l'aide d'anticorps anti-lapin et anti-souris. Dilutions pour les IHCs : (a) MLH1 = 2/23, MSH2 = 1/24, MSH6 = 1/499, PMS2 = 1/49 - (b) ER = 1/24, PR = 1/24, P53 = 1/199, ARID1A = 1/499. Triplicat de plaques à 12 puits ensemencées avec 250 000 cellules/puits, images prises avec un microscope OPTIKA (40x) et une caméra OPTIKA série C-B5 (05x). Dilutions pour le SDS-PAGE/Western-Blot à dilution 1/4999. Les contrôles positifs pour ces marqueurs sont la lignée HELA (cancer de l'utérus). Les résultats de Western blot sont montrés à côté de chaque cible-IHC, les anticorps sont décrits dans la section *Matériel et méthodes* et ont été dilués à 1/4999.

Dans les figures 9.2a et 9.2b, il est identifié que les cellules KLE sont p53 mutées, l'expression de cette protéine semble altérée en comparaison au contrôle. Aucun autre marqueur ne semblait disfonctionnel pour cette lignée, mettant donc en lumière que les cellules cancéreuses KLE font partie du groupe 3. Ainsi, les KLE se rapprochent fortement des HGSOCs. Leurs résultats seront comparés aux résultats du chapitre 8 par la suite.

Finalement, les figures 9.3a et 9.3b permettent de voir que la lignée Ishikawa est aussi classée dans le groupe 1, du fait de leur mutation sur POLE [380]. D'après ce même article, des mutations de PTEN sont aussi présentes et, de nos résultats, nous avons pu identifier que la protéine MLH1 n'était pas

présente.

Dans un second temps, la sensibilité des différentes lignées cellulaires aux traitements administrés en monothérapie (cisplatine, doxorubicine et thérapies ciblées) a été caractérisée à l'aide de plusieurs approches fonctionnelles, incluant un test de cicatrisation (« wound healing »), un test de clonogénicité, une analyse de la croissance en culture 3D après traitement ainsi que de la vidéo-microscopie. Les voies de signalisation modulées par ces traitements ont ensuite été étudiées par Western blot, en analysant l'expression et/ou l'activation de protéines impliquées dans l'apoptose et la survie cellulaire (caspases-3 et -8, AKT, p-AKT, PAR-4, PARP, XIAP, p53, BID, p-P70, PTEN et BAD).

Comme pour les lignées ovariennes, les test de cicatrices ont permis d'évaluer la capacité de migration et de prolifération de nos cellules. Sur les figures 9.4, 9.14 et 9.18, apparaissent les photographies de la fermeture des tests de cicatrices à 24h, 48h et 120h de traitements. Les monothérapies de cisplatine, doxorubicine, d'AZD5363, de KPT330 et de TRAIL ont été injectées à T0 ; 24h plus tard la cicatrice a été effectuée et le milieu changé, afin de permettre une incubation sans drogue. Les photographies ont été prises au moment du « *scratch* », puis 24h, 48h et 120h après. Les photographies ont ensuite été analysées sous *ImageJ* avec le plugin *Wound healing assay* et des graphiques ont été construits, représentés par les figures 9.5, 9.13 et 9.19.

9.2.1 Lignée HEC-1-A.

Pour débuter, la lignée cellulaire HEC-1-A a été très intéressante à étudier : en effet, sur les tests de cicatrice, il a été possible de remarquer une absence de différence notable pour la condition *cisplatine* contrairement à nos autres lignées endométriales (figures 9.14, 9.13 et 9.18, 9.19) ou nos lignées ovariennes (chapitre 8). Cette tendance s'est maintenue lors de nos tests de clonogénicités. Les cellules ont été mises en plaque à T0 en très faible quantité, le but étant qu'après 12 jours au total, 80% de la plaque soit recouverte par les colonies. 24h après la mise en plaque, les cellules ont été traitées en monothérapie, puis le milieu contenant les drogues a été retiré et remplacé par du milieu frais. Les cellules ont été laissées 10 jours en croissance, en retirant le milieu vicié et en ajoutant du nouveau milieu tous les deux jours. Les plaques ont été fixées puis colorées au crystal violet et scannées. Le logiciel *ImageJ* et le plugin *Colony Area* ont été utilisés afin de produire des données. Sur la figure 9.6, il est possible de voir que les cellules ont subi un effet du cisplatine, mais qu'elles ont tout de même réussi à croître.

Finalement, les tests 3D post-traitements ont démontré une apparition d'un noyau nécrotique important avec le traitement au cisplatine pour la lignée HEC-1-A (figure 9.7) démontrant l'effet encore ambivalent de cette chimiothérapie sur cette lignée. Pour ce qui est des thérapies ciblées en monothérapie, l'effet est peu présent quel que soit le test.

Afin d'expliquer ces résultats, nous avons procédé à l'analyse vidéo-microscopique de cellules pendant 3 jours post-traitement. Nous avons ainsi pu isoler diffé-

rentes variables comme la longueur moyenne entre deux cycles, la longueur moyenne entre T0 et la première division, le nombre de cycles mitotiques, le nombre de fusions, le nombre de mitoses non-dichotomiques, le nombre de mitoses anormales, le nombre de mitoses normales, le nombre de mitoses total, le nombre de mort avec mitose, le nombre de mort sans mitose ainsi que le nombre de morts total. Ces statistiques proviennent du logiciel créé lors de ma thèse en collaboration avec l'équipe de l'ULCO, *Toto-Cell*. D'autres paramètres existent via ce logiciel, mais n'ont pas été utilisés pour ce cas de figure ; ils sont disponibles dans le chapitre 6.

En premier lieu, il était important de regarder la condition cisplatine qui a été isolée auparavant au travers des autres tests. Comme mentionné auparavant, celle-ci avait des caractéristiques particulières. Dans les figures 9.8a et 9.8b, la longueur moyenne entre deux cycles semblait plus courte (15h versus 32h dans la condition contrôle), mais le temps entre le début de la vidéo-microscopie et la première division a lui, été allongé (21h versus 50h).

Du fait que les temps étaient différents, il était intéressant d'aller voir l'état de l'intégrité des divisions. Ainsi dans les figures 9.9 et 9.11, il est possible de constater la présence de moins de mitoses ; il en découle moins de mitoses anormales (figures 9.9d, et 9.9b), et pareillement pour le nombre de mitoses normales (figure 9.9c). Le nombre de fusions semble aussi impacté (figure 9.12).

Dans les figures 9.10a, 9.10b, 9.10c, il est possible de constater qu'il n'y a pas de mort post-mitose pour ces cellules, mais qu'en général il y a plus de morts que dans la condition contrôle.

Dans un second temps, la condition doxorubicine était plus simple à analyser : les cellules sont soit mortes ou ne sont pas divisées (figures 9.8b, 9.9a, et 9.11). La longueur du cycle semble allongée (figure 9.8b) mais les cellules sont restées sans se diviser au fond du puit, ce qui explique aussi le fait qu'il n'y ait pas de mortalité après mitose. On remarque par contre que les cellules mettent le même temps entre T0 et la première division que le contrôle (figure 9.8a). Une forte hétérogénéité au niveau des fusions et du nombre de mort est visible (figures 9.12 et 9.10a).

La thérapie ciblée de premier intérêt, AZD5363, s'est distinguée par un profil intéressant : tandis que la longueur du cycle (figures 9.8a et 9.8b), le nombre de morts (figures 9.10a, 9.10b et 9.10c), le nombre de cycles mitotiques (figure 9.11), ainsi que le nombre de mitoses normales (figure 9.9c) étaient comparables, une tendance au niveau des phénomènes anormaux s'est démarquée, avec une présence plus accrue de fusions et de mitoses non-dichotimiques (figures 9.9d, 9.12 et 9.9b).

De suite, le KPT330 a produit des résultats quelque peu semblables au contrôle : la longueur moyenne du cycle (figure 9.8b), le nombre de cycles mitotiques (figure 9.11), le nombre de fusions (figure 9.12) ainsi que le nombre de divisions non-dichotimiques (figure 9.9b) sont comparables à la condition contrôle. Cependant, le temps entre T0 et la première division semble légèrement plus long (figure 9.8a) et il y a une différence négative avec le nombre de mitoses (figures 9.9 et 9.11).

Finalement pour la condition TRAIL, comme pour la condition KPT330, la longueur moyenne du cycle est comparable au contrôle (figure 9.8b), mais aussi pour le nombre de cycles mitotiques (figure 9.11), le nombre de morts (figure 9.10a) et le nombre de fusions (figure 9.12). Une légère nuance est à noter pour le nombre de mitoses non-dichotimiques, avec une baisse notable entre la condition contrôle et la condition traitée (figure 9.9b). Il faut cependant noter qu'il y a aussi moins de mitoses en général (figures 9.9 et 9.11). Un dernier effet très important du traitement est l'hétérogénéité notable pour le temps entre T0 et la première division (figure 9.8a). Les résultats de cette lignée seront discutés dans le chapitre 10 ; il est cependant à noter que les résultats de cette expérience ont permis de démontrer, quel que soit le traitement, une réponse aux traitements très hétérogène.

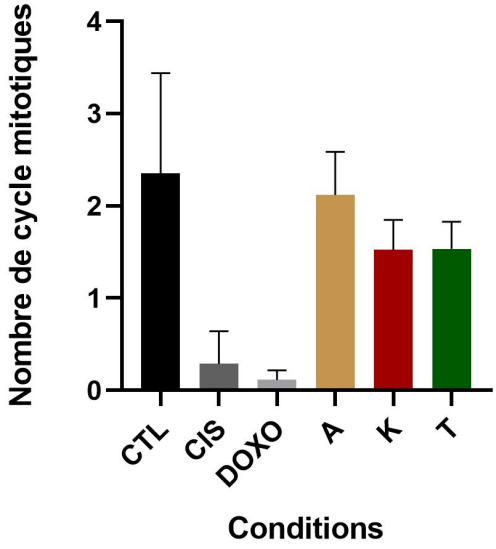


FIGURE 9.11 – Nombre de cycles mitotiques observés sur la lignée HEC-1-A post-traitement sous 3 jours d'observations, N=3, au minimum 150 cellules observées. CTL : Contrôle, CIS : Cisplatine, DOXO : Doxorubicine, A : AZD5363, K : KPT330, T : TRAIL.

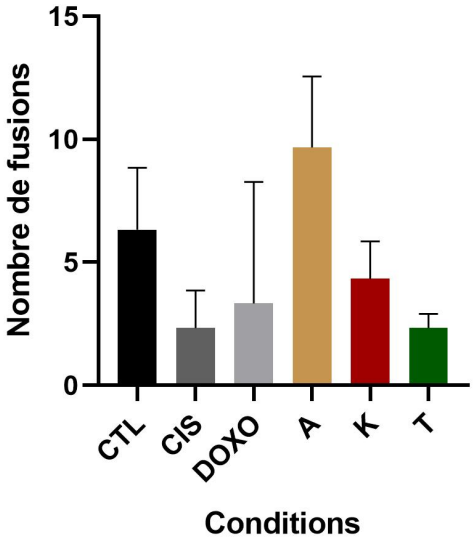


FIGURE 9.12 – Nombre de fusions observées sur la lignée HEC-1-A post-traitement sous 3 jours d'observations, N=3, au minimum 150 cellules observées. CTL : Contrôle, CIS : Cisplatine, DOXO : Doxorubicine, A : AZD5363, K : KPT330, T : TRAIL.

9.2.2 Lignée KLE.

Pour poursuivre, la lignée KLE a subit les mêmes tests que la lignée HEC-1-A. Cette lignée, de part de ses résultats d'IHCs et de Western Blot, est comparable aux lignées ovariennes. Elle sera donc comparée à celles-ci dans le chapitre 10. Pour les tests de cicatrices, représentés dans les figures 9.13 et 9.14, peu de différences ont été remarquées, à part pour la condition doxorubicine qui s'est très peu fermée, voir ré-ouverte, à cause de la mort des cellules suite au traitement.

Pour la suite des tests en 2D, la figure 9.15, nous offre une vision un peu plus précise de la réaction des cellules face aux traitements. Il est ainsi possible de voir que les cellules poussent très peu en situation de stress après traitement aux chimiothérapies. L'AZD5363, quant à lui, ne semble pas faire effet. Mais une réponse très hétérogène est visible pour les conditions KPT330 et TRAIL.

Afin de terminer les tests de caractérisation, les tests 3D ont été effectués comme précédemment. Il est possible de voir sur la figure 9.16 que les chimiothérapies n'ont pas le même effet. Le cisplatine semble laisser les cellules former de petits agglomérats, la sphéroïde ne ressemble pas à celle du contrôle, mais est quand même formée post-traitement. Pour la doxorubicine, l'effet est le même que pour nos tests 2D, les cellules n'arrivent pas à pousser. Pour les thérapies ciblées, l'effet le plus fort est vu avec l'AZD5363 : la tumeur est plus

petite visuellement, mais un noyau nécrotique s'est aussi formé. Les sphéroïdes pour les traitements aux KPT330 et au TRAIL sont comparables au contrôle.

Finalement, un Western Blot de la lignée a été effectuée 24h après le traitement (figure 9.17). Les cellules ont poussé en 2D pendant 24h, avant d'être traitées ; 24h plus tard elles ont été récoltées dans le but d'isoler les protéines et d'effectuer le Western Blot avec les principales cibles citées auparavant. Pour la protéine AKT, une différence notable et normale a été observée lors du traitement à l'AZD5363. Ainsi, une augmentation de p-AKT et une diminution d'AKT ont été observées. Pour P53, une légère différence a été observée avec le traitement à la doxorubicine. La caspase 3 sous sa forme clivée a été uniquement observée avec le traitement au TRAIL. P-p70S6k est fortement augmenté avec le traitement à l'AZD5363 et deux bandes apparaissent suite au traitement au TRAIL. Bad semble augmenté suite au traitement à l'AZD5363, Bid lui semble diminué avec le traitement au TRAIL, ainsi que PARP. XIAP semble augmenter lors du traitement au cisplatine. Enfin, pour Par-4, la caspase-8 sous sa forme clivée, et PTEN, aucune différence n'a été observée.

9.2.3 Lignée Ishikawa.

Finalement la lignée Ishikawa a elle aussi présenté des résultats très différents des deux précédentes. Lors des tests de cicatrices (figures 9.18 et 9.19), le traitement par la doxorubicine a entraîné une mortalité cellulaire importante, rendant impossible l'analyse de la migration cellulaire.

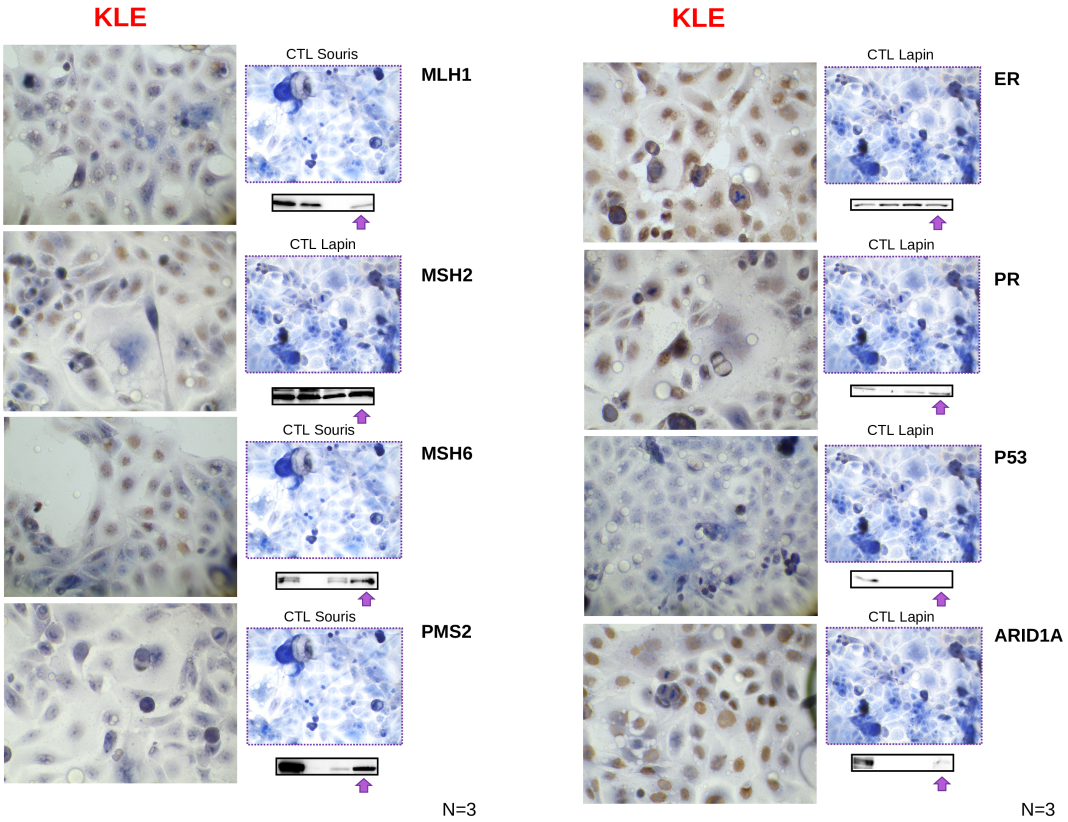
Lors des tests de clonogénicités (figure 9.20), la tendance qui s'était dessinée avec les tests de cicatrice s'est renforcée : les cellules qui mourraient avec la doxorubicine ont continué lors du test de clonogénicité. Pour le cisplatine, très peu de pousses ont pu être notées. En revanche, une différence statistiquement significative a été observée pour le traitement par l'AZD5363 (), alors qu'une différence encore plus marquée a été mise en évidence avec le KPT330 (**).

Ces résultats ont été confirmés par nos tests de sphéroïdes, visibles sur la figure 9.21. Pour le traitement à la doxorubicine, les résultats sont sans appel et il est impossible pour la sphéroïde de se former. La seconde chimiothérapie, le cisplatine, a par contre un effet qui résonne avec nos précédent résultats : comme nous avons pu le voir avec la figure 9.18, la cicatrice semblait se refermer, mais lentement ; sur nos résultats 3D, il est possible de voir la sphéroïde se former mais de façon difforme et on note l'apparition d'un noyau nécrotique. Enfin pour le traitement à l'AZD5363, la sphéroïde apparaît plus petite et condensée en un noyau nécrotique.

Comme précédemment pour la lignée KLE, un Western Blot de la lignée Ishikawa a été effectué post-traitement 2D (figure 9.22). Pour débuter, AKT et p-AKT ont une différence observable, comme précédemment, par leur plus forte expression avec le traitement AZD5363. Pour Par-4, une augmentation du signal a été remarquée pour les traitements au cisplatine, à la doxorubicine et au KPT330. Pour P53, une augmentation du signal nette a été observée pour l'AZD5363, et une plus discrète pour les traitement au KPT330 et au

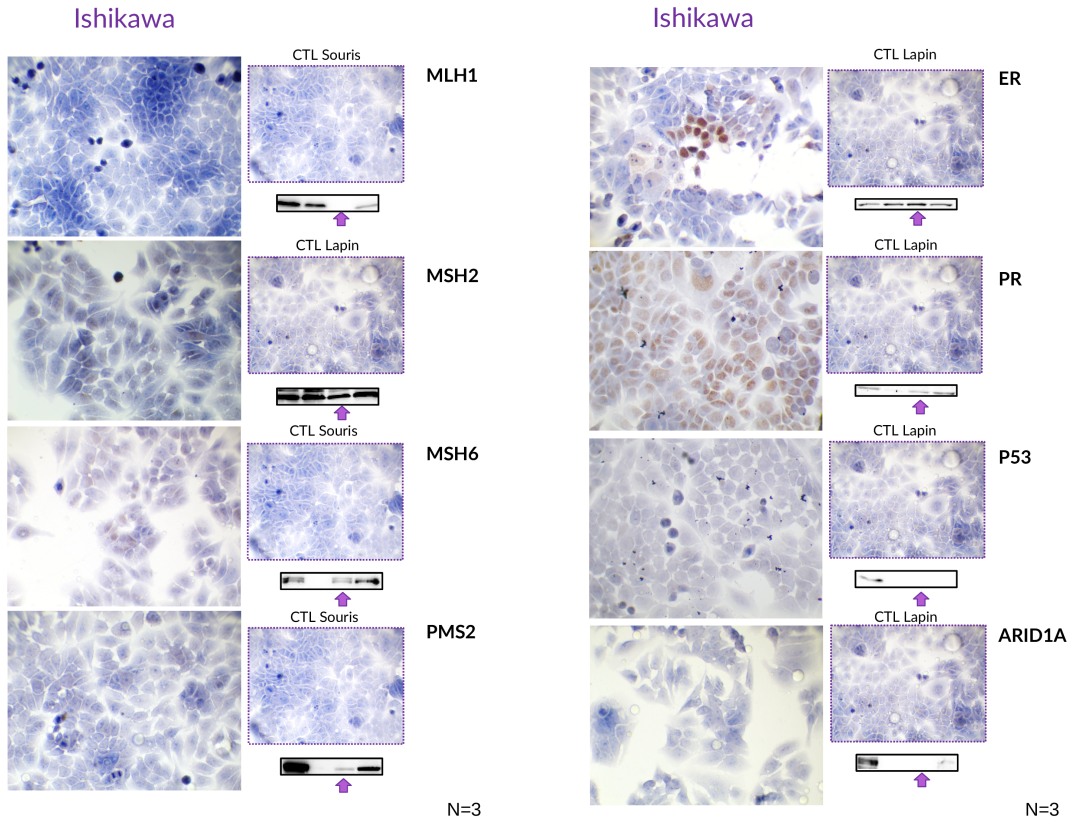
TRAIL. La caspase 3 sous sa forme clivée a été observée dans toutes les conditions, mais de façon plus marquée pour le TRAIL. De même, pour la caspase 8 clivée qui a son expression augmentée suite au traitement avec le TRAIL. La protéine p-P70S6K est aussi augmentée suite au traitement avec l'AZD5363, contrairement à l'expression de Bad, qui est elle, diminuée avec ce même traitement. L'expression de PARP est augmentée par l'utilisation du cisplatine.

Pour les expressions de PTEN bid, et XIAP aucune différence n'a été notée.



(a) (b)

FIGURE 9.2 – Expression des bio-marqueurs dans les cellules KLE à l'aide d'anticorps anti-lapin et anti-souris. Dilutions pour les IHCs : (a) MLH1 = 2/23, MSH2 = 1/24, MSH6 = 1/499, PMS2 = 1/49 - (b) ER = 1/24, PR = 1/24, P53 = 1/199, ARID1A = 1/499. Triplicat de plaques à 12 puits ensemencées avec 250 000 cellules/puits, images prises avec un microscope OPTIKA (40x) et une caméra OPTIKA série C-B5 (05x). Dilutions pour le SDS-PAGE/Western-Blot à dilution 1/4999. Les contrôles positifs pour ces marqueurs sont la lignée HELA (cancer de l'utérus). Les résultats de Western blot sont montrés à côté de chaque cible-IHC, les anticorps sont décrits dans la section *Matériel et méthodes* et ont été dilués à 1/4999.



(a) (b)

FIGURE 9.3 – Expression des bio-marqueurs dans les cellules Ishikawa à l'aide d'anticorps anti-lapin et anti-souris. Dilutions pour les IHCs : (a) MLH1 = 2/23, MSH2 = 1/24, MSH6 = 1/499, PMS2 = 1/49 - (b) ER = 1/24, PR = 1/24, P53 = 1/199, ARID1A = 1/499. Triplicat de plaques à 12 puits ensemencées avec 250 000 cellules/puits, images prises avec un microscope OPTIKA (40x) et une caméra OPTIKA série C-B5 (05x). Dilutions pour le SDS-PAGE/Western-Blot à dilution 1/4999. Les contrôles positifs pour ces marqueurs sont la lignée HELA (cancer de l'utérus). Les résultats de Western blot sont montrés à côté de chaque cible-IHC, les anticorps sont décrits dans la section *Matériel et méthodes* et ont été dilués à 1/4999.

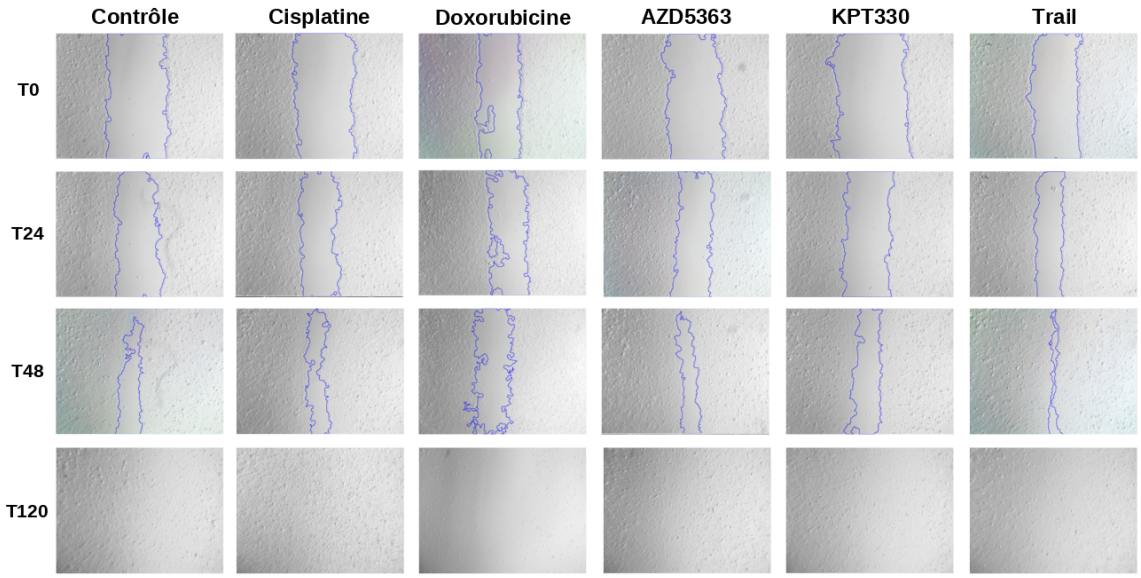


FIGURE 9.4 – Fermeture du test de cicatrice des HEC-1-A à 24h, 48h et 120h, N=3 après 24h de traitements en monothérapies.

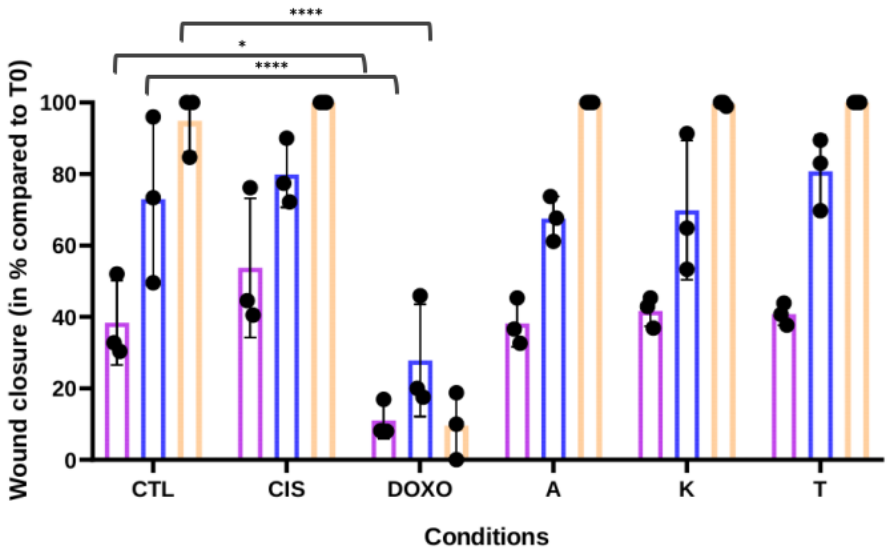


FIGURE 9.5 – Fermeture du test de cicatrice des HEC-1-A sous 5 jours, N=3, calcul effectué (T0-Tx)/T0 CTL = Contrôle, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A = AZD5363, K = KPT330, T = TRAIL. Anova two-ways ($p<0.0001$) et test de Dunnett's (**** : $p<0.0001$, et * : $p=0.0183$). En mauve les résultats à 24h après le scratch, en bleu 48h après le scratch et en orange 120h après le scratch.

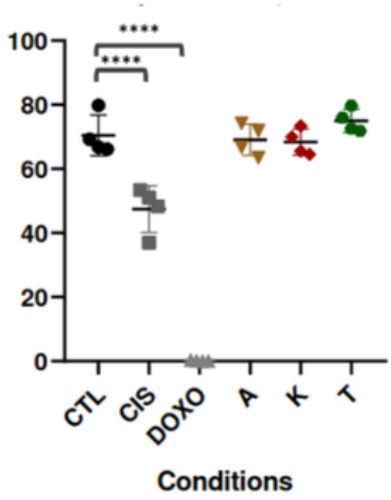


FIGURE 9.6 – Surface occupée par les colonies après 11 jours de pousse (24h de traitement) de la lignée cellulaire HEC-1-A, N=4, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A=AZD5363, K=KPT330 et T=TRAIL. Anova one-way ($p<0.0001$) et test de Dunnett's (**** : $p<0.0001$).

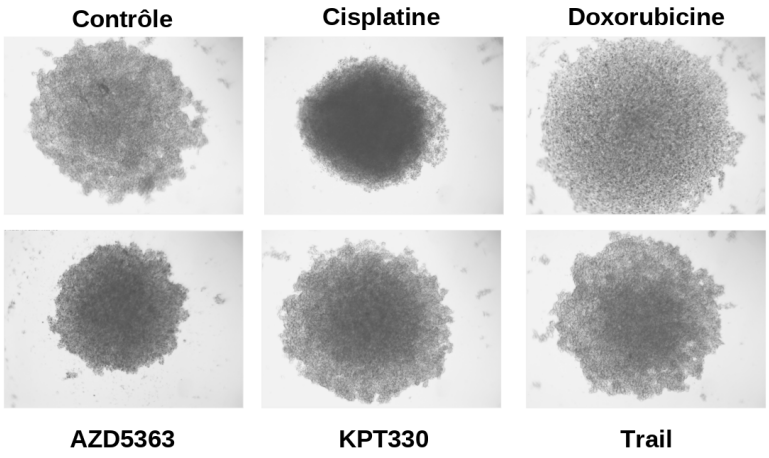
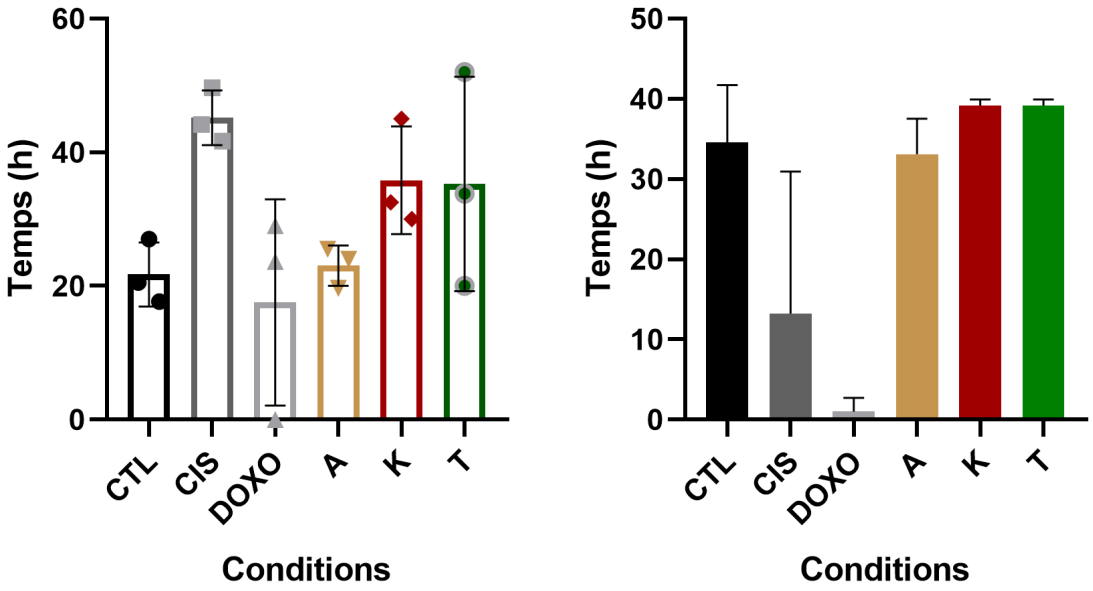
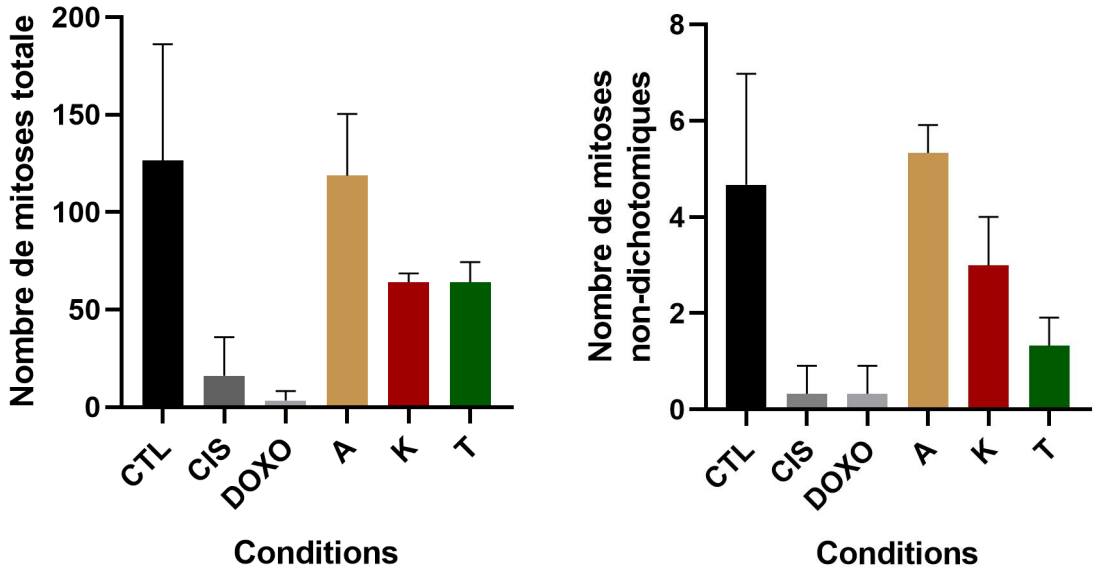


FIGURE 9.7 – Photographies de sphéroïdes de la lignée cellulaire HEC-1-A. Les cellules ont été ensemencées à 40 000 cellules en triplicata dans une plaque 96 puits à fonds ronds et à faibles adhérences, les cellules ont été ensuite centrifugées à 400G pendant 10min, les photographies ont été prises 8 jours après l'ensemencement sur l'Olympus IX70 avec l'objectif 4X. N=3.



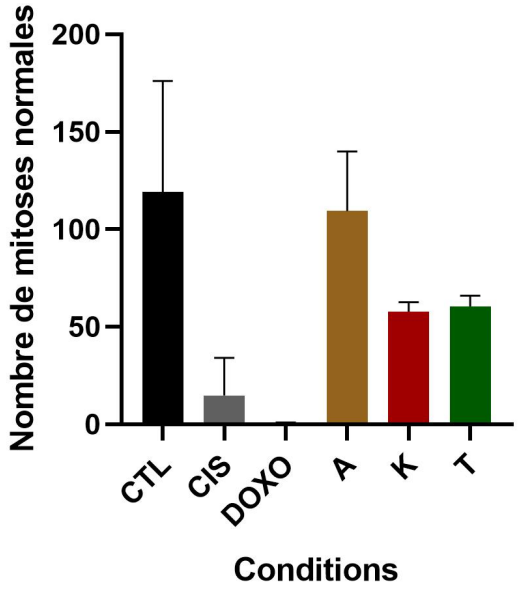
(a) (b)

FIGURE 9.8 – Longueur moyenne entre T0 et la première division (a) et Longueur moyenne entre deux cycles (b), observées sur la lignée HEC-1-A post-traitement sous 3 jours d'observations, N=3, au minimum 150 cellules observées. CTL : Contrôle, CIS : Cisplatine, DOXO : Doxorubicine, A : AZD5363, K : KPT330, T : TRAIL.

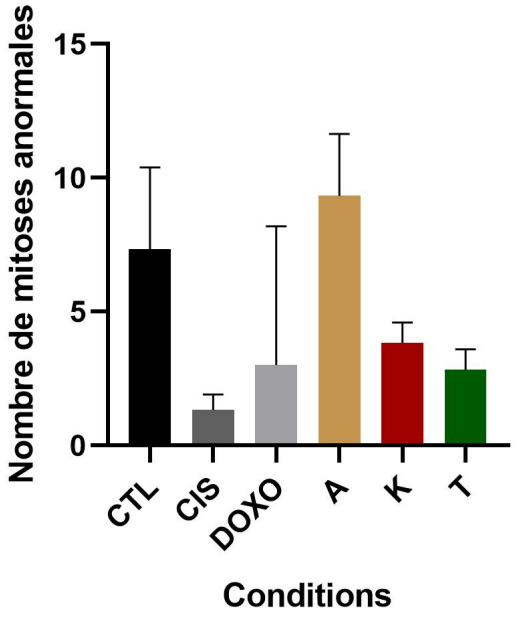


(a)

(b)

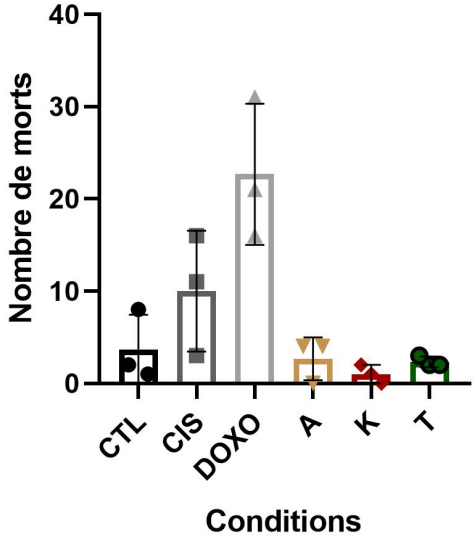


(c)

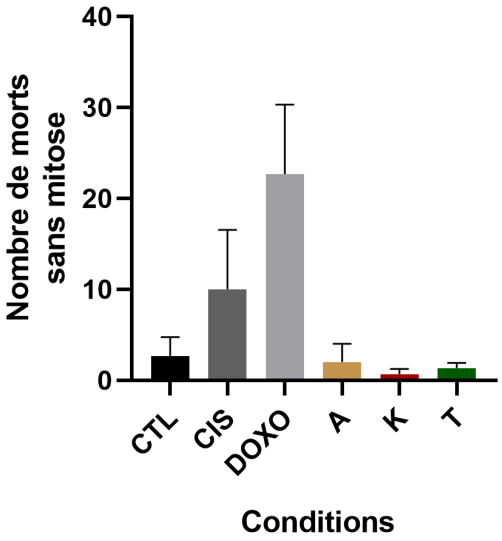


(d)

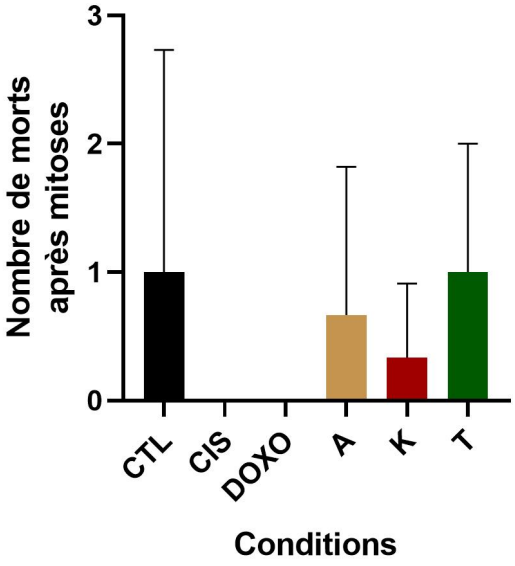
FIGURE 9.9 – Nombre de mitoses totales (a), non-dichotomiques (b), normales (c) et anormales (d) observées sur la lignée HEC-1-A post-traitement sous 3 jours d'observations, N=3 au minimum 150 cellules observées. CTL : Contrôle, CIS : Cisplatine, DOXO : Doxorubicine, A : AZD5363, K : KPT330, T : TRAIL.



(a)



(b)



(c)

FIGURE 9.10 – Nombre de morts total (a), sans mitose (b) et après mitose (c), observées sur la lignée HEC-1-A post-traitement sous 3 jours d'observations, N=3, au minimum 150 cellules observées. CTL : Contrôle, CIS : Cisplatine, DOXO : Doxorubicine, A : AZD5363, K : KPT330, T : TRAIL.

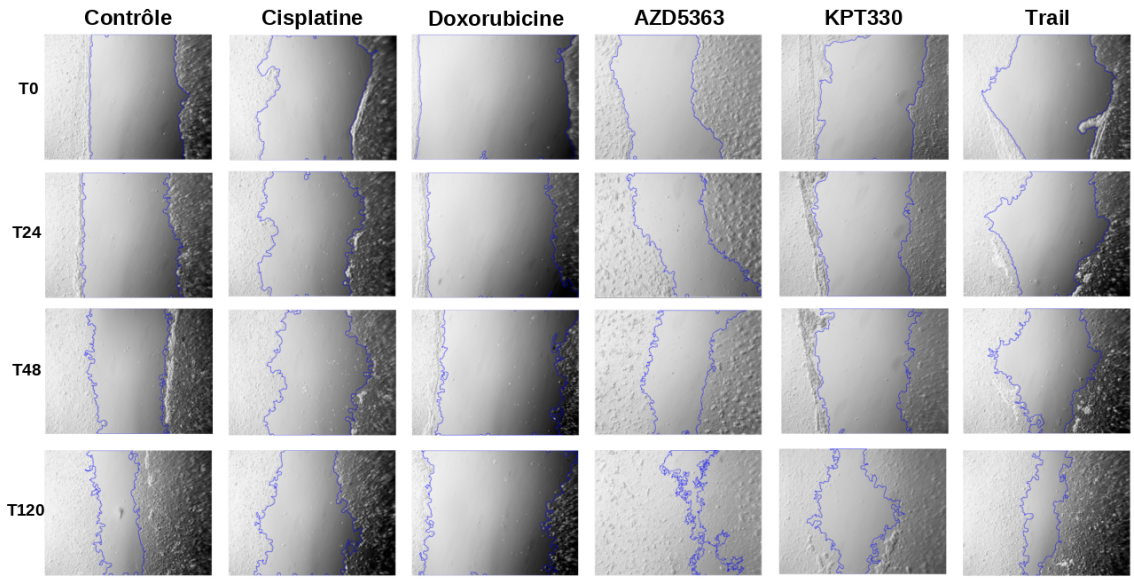


FIGURE 9.13 – Fermeture du test de cicatrice des KLE à 24h, 48h et 120h, N=4 après 24h de traitements en monothérapies.

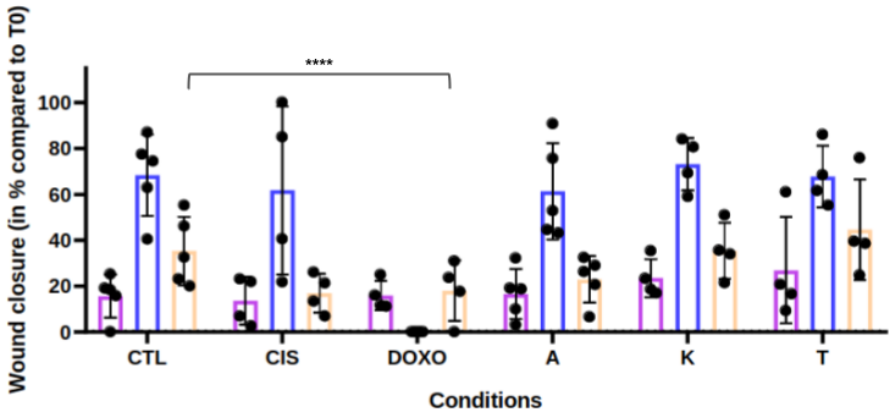


FIGURE 9.14 – Fermeture du test de cicatrice des KLE sous 5 jours, calcul effectué (T0-Tx)/T0 CTL = Contrôle, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A = AZD5363, K = KPT330, T = TRAIL. Anova two-ways ($p<0.0001$) et test de Dunnett's (**** : $p<0.0001$). En mauve les résultats à 24h après le scratch, en bleu 48h après le scratch et en orange 120h après le scratch.

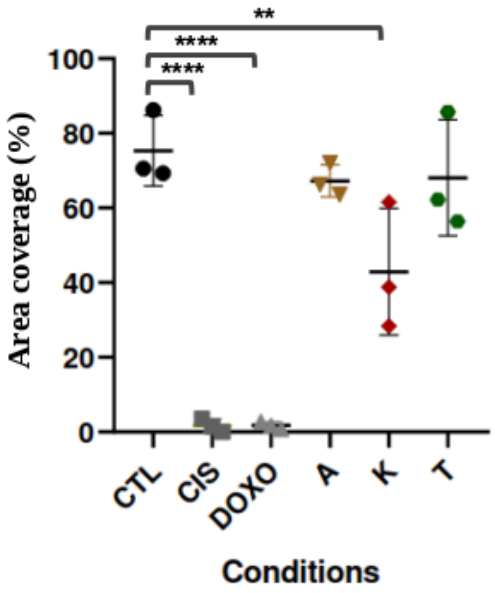


FIGURE 9.15 – Surface occupée par les colonies après 11 jours de pousse (24h de traitement) de la lignée cellulaire KLE, N=3, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A=AZD5363, K=KPT330 et T=TRAIL. Anova one-way ($p<0.0001$) et test de Dunnett's (**** : $p<0.0001$, ** : $p=0.0094$).

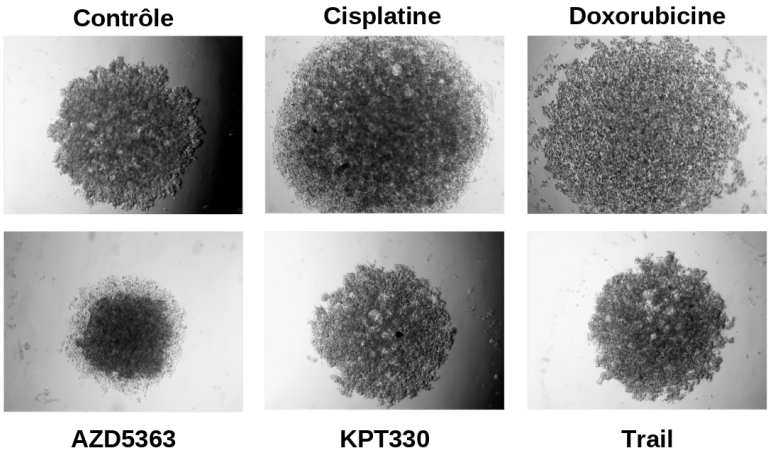


FIGURE 9.16 – Photographies de sphéroïdes de la lignée cellulaire KLE. Les cellules ont été ensemencées à 60 000 cellules en triplicata dans une plaque 96 puits à fonds ronds et à faibles adhérences, les cellules ont été ensuite centrifugées à 400G pendant 10min, les photographies ont été prises 8 jours après l'ensemencement sur l'Olympus IX70 avec l'objectif 4X. N=3.

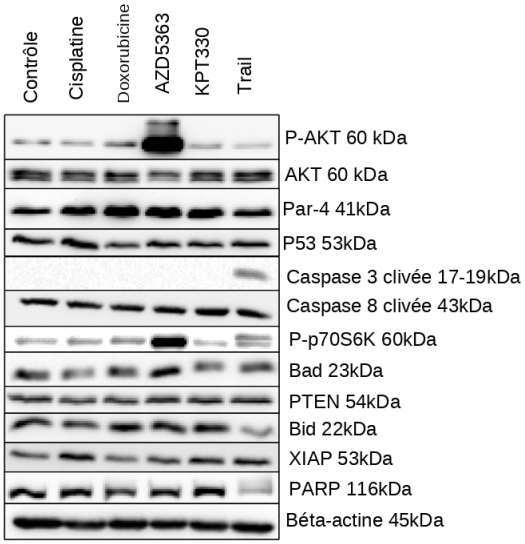


FIGURE 9.17 – Western Blot de la lignée KLE, après 24h de traitement en monothérapie, N=5. Dilutions pour le SDS-PAGE/Western-Blot à dilution 1/4999.

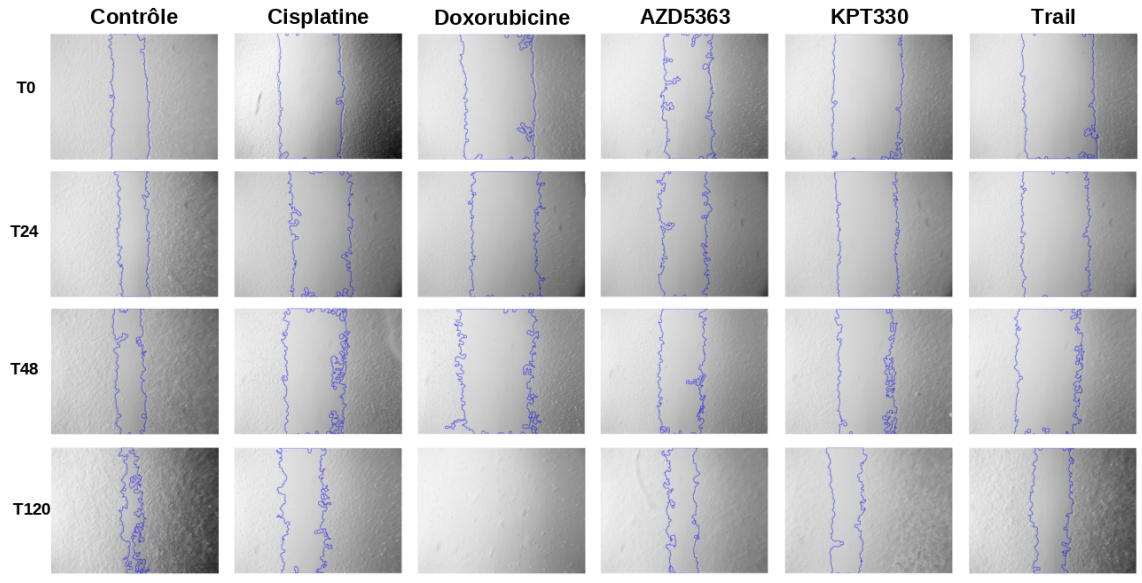


FIGURE 9.18 – Fermeture du test de cicatrice des Ishikawa à 24h, 48h et 120h, N=4 après 24h de traitements en monothérapies.

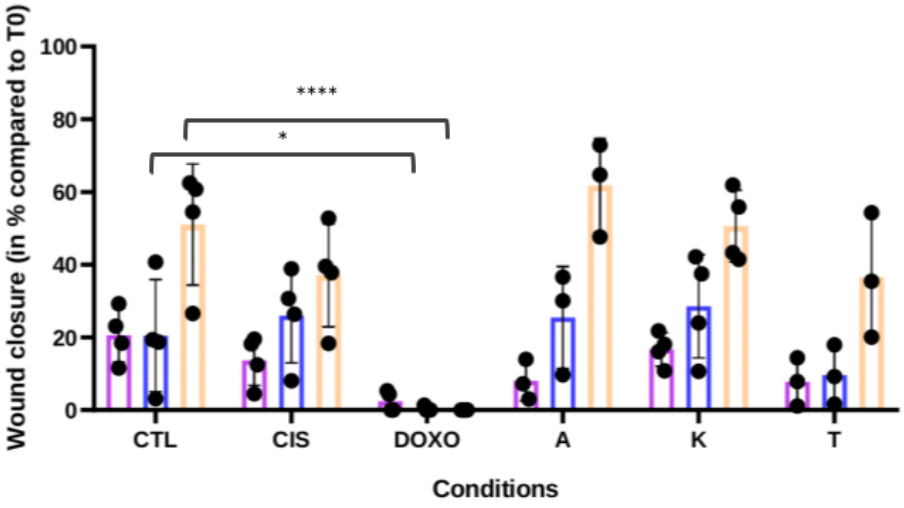


FIGURE 9.19 – Fermeture du test de cicatrice des Ishikawa sous 5 jours, calcul effectué (T0-Tx)/T0 CTL = Contrôle, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A = AZD5363, K = KPT330, T = TRAIL. Anova two-ways ($p<0.0001$) et test de Dunnett's (**** : $p<0.0001$). En mauve les résultats à 24h après le scratch, en bleu 48h après le scratch et en orange 120h après le scratch.

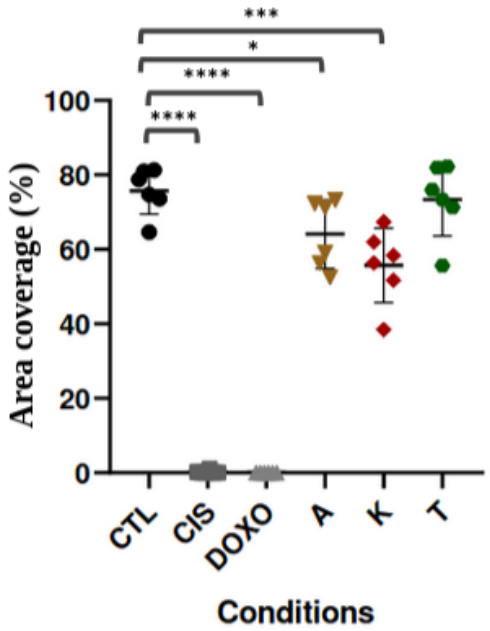


FIGURE 9.20 – Surface occupée par les colonies après 11 jours de pousse (24h de traitement) de la lignée cellulaire HEC-1-A, N=6 répétitions effectuées par E.St-Laurent sous supervision de L-I.Renaud, CIS = Cisplatine, DOXO = Doxorubicine, A=AZD5363, K=KPT330 et T=TRAIL. Anova one-way ($p<0.0001$) et test de Dunnett's (**** : $p<0.0001$, *** : $p=0.0002$ et * : $p=0.0403$).

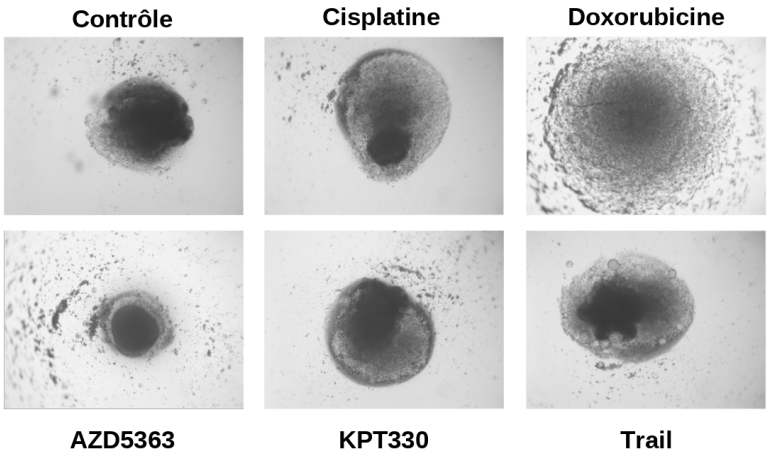
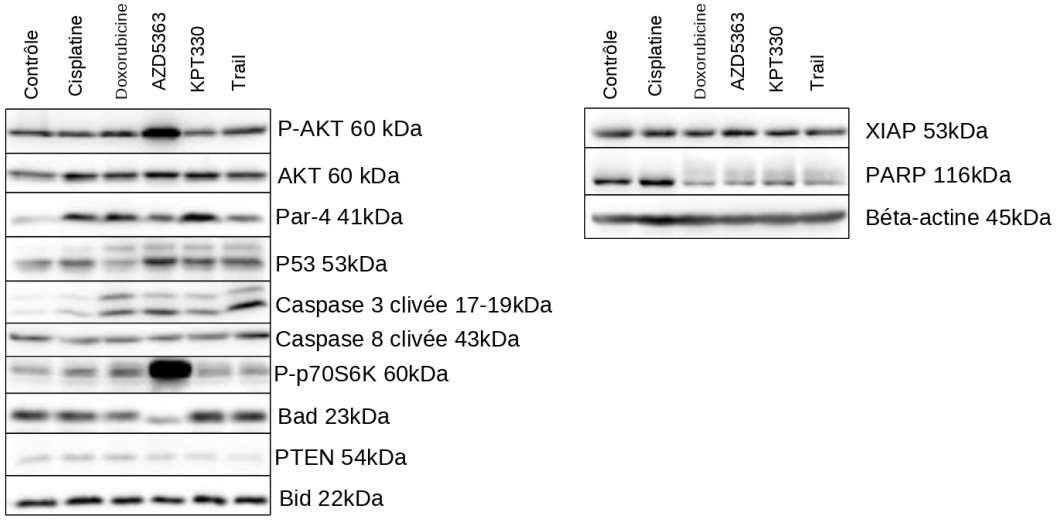


FIGURE 9.21 – Photographies de sphéroïdes de la lignée cellulaire Ishikawa. Les cellules ont été ensemencées à 20 000 cellules en triplicata dans une plaque 96 puits à fonds ronds et à faibles adhérences, les cellules ont été ensuite centrifugées à 400G pendant 10min, les photographies ont été prises 8 jours après l'ensemencement sur l'Olympus IX70 avec l'objectif 4X. N=3.



(a) (b)

FIGURE 9.22 – Western Blot de la lignée Ishikawa, après 24h de traitement en monothérapie, N=5. Dilutions pour le SDS-PAGE/Western-Blot à dilution 1/4999.

Chapitre 10

Discussion

10.1 Rappel synthétique des objectifs et principaux résultats.

La présente thèse avait pour objectif d'améliorer la compréhension de la sensibilité des cancers de l'endomètre et de l'ovaire à différentes thérapies ciblées, notamment le *Capivasertib*, le *Selinexor* et le TRAIL, comparées à deux chimiothérapies (cisplatine et doxorubicine). Dans ce cadre, nous avons mis en œuvre plusieurs approches expérimentales, incluant la vidéo-microscopie ainsi que l'analyse détaillée des données générées par cette technique.

La discussion qui suit est donc structurée autour de ces deux axes principaux et examine successivement leurs contributions, leurs limites et leurs implications pour la compréhension des mécanismes de réponse thérapeutique

Le cancer de l'endomètre et le cancer de l'ovaire représentent deux des principales tumeurs gynécologiques, bien que leurs épidémiologies, leurs biologies et leurs pronostics diffèrent. Le cancer de l'endomètre est le cancer gynécologique le plus fréquent dans les pays développés, affectant majoritairement des femmes post-ménopausées, avec un taux d'incidence significative et un fardeau clinique important [381]. Le cancer de l'ovaire, quant à lui, bien qu'étant moins fréquent, est responsable d'une proportion notable de décès par cancer gynécologique en raison d'un diagnostic souvent tardif et d'une forte hétérogénéité tumorale [382]. Ces deux cancers présentent des défis majeurs tels que la variabilité inter-tumeurs, la plasticité cellulaire, les mécanismes de résistance, et la plasticité phénotypique, ce qui rend les traitements standards, comme la chirurgie ou la chimiothérapie, parfois insuffisants ou non curatifs dans les formes avancées.

Dans ce contexte, les thérapies ciblées se sont imposées comme une stratégie prometteuse. Contrairement à la chimiothérapie conventionnelle, dont l'action cible indistinctement les cellules à forte activité prolifératives, les thérapies ciblées visent des molécules ou des voies de signalisation particulières (altérées dans les cellules tumorales) afin de bloquer la prolifération, induire l'apoptose, gêner la réparation de l'ADN ou moduler la survie cellulaire, tout en épargnant

davantage les cellules saines [383]. Cependant, malgré l'intérêt de ces approches, leurs résultats peuvent être limités par des mécanismes de résistance innés ou acquis, la redondance des voies de signalisation, ou la complexité de la biologie tumorale [383].

Au sein de cette thèse, et dans un premier temps nous avons étudié trois thérapies ciblées et leurs effets sur 7 lignées cellulaires :

— *capivasertib* — un inhibiteur pan-AKT (AKT1/2/3) qui bloque la phosphorylation et l'activation des effecteurs en aval de la voie PI3K/AKT/mTOR, une voie souvent derégulée dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre [384] ;
— *selinexor* — un inhibiteur de l'export nucléaire (Exportin-1, XPO1), dont l'action entraîne la rétention nucléaire de protéines suppresseurs de tumeur (p53, BRCA1), perturbant la réparation de l'ADN et favorisant l'apoptose des cellules tumorales [385] ;
— TRAIL (ou un agent basé sur le ligand TRAIL) — ciblant des récepteurs de mort cellulaire pour induire l'apoptose de cellules tumorales, en exploitant des vulnérabilités spécifiques à certaines cellules cancéreuses.

Ces thérapies ciblées ont pour objectif d'améliorer l'efficacité antitumorale tout en réduisant les effets secondaires, mais leur succès dépend fortement de la biologie tumorale, de la sélection des patientes, et de l'évaluation rigoureuse de la réponse — d'où l'importance d'outils analytiques robustes, comme la vidéo-microscopie et l'analyse automatisée. Nos expériences ont mis en évidence une hétérogénéité marquée des réponses cellulaires, à la fois entre les différentes lignées immortalisées et, dans une moindre mesure, au sein d'une même lignée.

Dans un second temps, nous avons montré que l'analyse des données issues de la vidéo-microscopie demeure particulièrement complexe, principalement en raison du volume important de données générées et du nombre limité d'outils logiciels disponibles. Afin de répondre à cette problématique, nous avons développé *Toto-cell*, un logiciel conçu pour assister l'expérimentateur dans le traitement et l'interprétation des séquences vidéo. Par ailleurs, notre étude a mis en évidence une hétérogénéité notable entre les analyses réalisées par différents opérateurs, révélant des disparités significatives dans les annotations et les jugements portés sur les mêmes jeux de données. Cette variabilité inter-observateur souligne une limite importante de la lecture manuelle, en particulier le manque de reproductibilité et d'uniformité des analyses. Dans ce contexte, elle met en évidence la nécessité de développer des approches standardisées et, à terme, des outils automatisés robustes permettant de réduire cette subjectivité et d'améliorer la cohérence des analyses. Ces observations ont conduit à l'établissement d'une collaboration internationale avec le laboratoire LISIC de l'Université du Littoral Côte d'Opale (France), permettant d'exploiter les données générées dans le cadre du développement exploratoire d'outils d'intelligence artificielle dédiés à l'analyse automatisée de la vidéo-microscopie.

10.2 Interprétation des résultats des lignées ovariennes.

Dans un premier temps, nous allons revenir sur le comportement de nos lignées ovariennes et faire un lien avec la littérature actuelle.

10.2.1 OVCAR-4

Les OVCAR-4 ont pour le premier test démontré de la résistance aux chimiothérapies lors du scratch, en réussissant à refermer partiellement la cicatrice malgré le traitement. Par contre, sous conditions de test de clonogénicités, donc avec un facteur limitant (peu de cellules présentes), la lignée démontrait de la sensibilité. Si nous essayons de traduire cela en terme de clinique, cela pourrait démontrer une tendance à répondre au traitement lorsque peu de cellules sont présentes, donc à des stades très précoces. Pour les 3 thérapies ciblées présentées dans cette thèse, peu d'effets ont pu être observés. Ces effets de chimio-résistances peuvent être expliqué par le fait que p53 était absent lors de nos Western Blot (figure 8.12).

Un mécanisme central susceptible d'expliquer le profil fortement chimiorésistant des OVCAR-4 réside dans l'absence de p53 (observée dans nos Western Blots). P53 est un régulateur essentiel de la réponse cellulaire aux dommages génotoxiques : en situation normale, il active l'expression de gènes clés de l'arrêt du cycle (p21), de la réparation de l'ADN ou de l'apoptose (via BAX, PUMA, NOXA, entre autres) [386]. En l'absence de p53 fonctionnel (que ce soit par mutation, délétion ou perte d'expression), la cellule échoue à initier efficacement la mort programmée après exposition à un agent cytotoxique, permettant ainsi la survie de cellules endommagées et favorisant la mise en place d'une chimiorésistance stable [387]. Dans ce contexte, l'absence de signal p53 dans la lignée OVCAR-4 constitue une explication cohérente de l'inefficacité des trois thérapies ciblées testées dans cette thèse (*Capivasertib*, *Selinexor*, et TRAIL). Toutes trois reposent, directement ou indirectement, sur la capacité des cellules à activer des voies apoptotiques dont l'efficacité est significativement réduite en l'absence de p53. Par exemple, l'activation de TRAIL dépend d'une intégrité minimale des effecteurs apoptotiques, tandis que l'inhibition d'AKT ou de CRM1 nécessite une machinerie apoptotique fonctionnelle pour induire une mort cellulaire robuste. La perte de p53 limite donc fortement la réactivité de la lignée à ces approches. Ainsi, dans nos cellules OVCAR-4, la combinaison d'un phénotype migratoire actif, d'une forte capacité collective de survie et de l'absence de p53, contribue à un profil très résistant *in vitro*, sauf dans des conditions limitantes comme les tests de clonogénicité. D'un point de vue clinique, ce comportement pourrait refléter un scénario où des tumeurs partageant ce profil pourraient répondre modestement aux traitements lorsque la masse tumorale est encore faible, mais deviendraient rapidement réfractaires à mesure que la densité cellulaire augmente et que les mécanismes coopératifs de survie se mettent en place. Ces observations s'inscrivent dans un cadre déjà

bien établi dans la littérature, où p53 est reconnu depuis plusieurs décennies comme un marqueur important de réponse thérapeutique et de pronostic dans de nombreux cancers. Elles soulignent néanmoins l'intérêt de préciser, dans de futurs travaux, le statut mutationnel de p53, d'évaluer l'induction de ses cibles pro-apoptotiques, ainsi que d'explorer des stratégies permettant de restaurer une apoptose p53-indépendante.

10.2.2 Ovsaho

En ce qui concerne les Ovsaho, les résultats des tests de cicatrices n'ont pas pu être observés du fait de leur lente division. Pour ce qui est des tests de clonogénicité, les cellules n'ont pas survécu aux chimiothérapies dans le test en 2D de clonogénicité. Le même effet s'est remarqué avec les tests de sphéroïdes. Ce qui indique que les cellules sont sensibles à ces chimiothérapies. Peu d'effet ont été observés dans les deux tests pour nos thérapies ciblées. Des combinaisons ou des tests plus poussés comme la vidéo-microscopie serait à effectuer afin d'avoir des conclusions précises. De plus, sur la figure 8.12 une surexpression d'ARID1A a été observée ainsi qu'une absence de p53 (comparaison faite avec le contrôle et les autres lignées).

La lignée Ovsaho présente un comportement biologique particulier, notamment une division lente qui n'a pas permis la réalisation des tests de cicatrices, dépendants d'une dynamique migratoire suffisante. Lors des essais de clonogénicité, les cellules n'ont pas survécu aux chimiothérapies testées, indiquant une sensibilité marquée lorsque les cellules sont soumises à un stress prolongé en condition de faible densité. Cette vulnérabilité est également retrouvée dans les cultures en sphéroïdes, où l'exposition aux agents cytotoxiques a conduit à une désorganisation structurelle et à une perte importante de viabilité. En revanche, les trois thérapies ciblées étudiées ont produit des effets limités, tant en 2D qu'en 3D, suggérant une faible dépendance de cette lignée aux voies ciblées dans notre projet. Les analyses par Western Blot révèlent deux éléments majeurs : l'absence de p53 et une surexpression d'ARID1A, tous deux susceptibles d'expliquer le profil thérapeutique observé.

D'une part, la perte de p53 empêche l'activation de p21, BAX, PUMA, NOXA et autres médiateurs critiques de l'arrêt du cycle ou de l'apoptose, comme expliqué auparavant [386]. Son absence compromet ainsi l'efficacité de nombreux traitements reposant sur l'activation de voies apoptotiques canoniques, ce qui peut expliquer la faible réponse aux thérapies ciblées dans cette lignée [388].

D'autre part, la surexpression d'ARID1A constitue un élément particulièrement intéressant. ARID1A est une sous-unité essentielle du complexe SWI/SNF [389], impliqué dans la régulation de la chromatine, la transcription, la stabilité génomique et la décision cellulaire entre survie et mort [390]. Alors que dans de nombreux cancers de l'ovaire (notamment les carcinomes endométrioïdes et à cellules claires) ARID1A est généralement muté ou perdu [391], la lignée Ovsaho présente un profil inverse avec une surexpression. Les

études montrent que l'expression élevée d'ARID1A peut stabiliser certaines structures de chromatine et favoriser une transcription plus contrôlée, réduisant la plasticité cellulaire et la capacité des cellules à activer des programmes adaptatifs face à des environnements hostiles (ce qui pourrait expliquer la forte sensibilité observée dans nos tests clonogéniques et sphéroïdes sous chimiothérapie) [392]. Par ailleurs, ARID1A influence des voies essentielles telles que PI3K/AKT, p21 et ATR, modulant ainsi la réponse aux dommages de l'ADN et la décision apoptotique [393]. Dans un contexte où p53 est absent, ARID1A peut partiellement compenser certaines fonctions de contrôle transcriptionnel, mais cette compensation est généralement insuffisante pour maintenir une réponse apoptotique robuste, créant un paysage cellulaire paradoxal : sensible aux contraintes extrêmes (chimiothérapies, faibles densités de cultures), mais peu réactif aux thérapies ciblées n'activant pas de dommages massifs [394].

Ainsi, la combinaison ARID1A élevé / p53 absent crée un état cellulaire unique où la survie dépend fortement de mécanismes alternatifs de réparation et de remodelage de la chromatine, ce qui pourrait influencer la réponse aux traitements. Des analyses complémentaires (comme notamment la vidéo-microscopie, analyses du cycle cellulaire en temps réel, ou encore la caractérisation de l'activation de voies ARID1A-dépendantes) seraient nécessaires pour préciser les mécanismes exacts expliquant la sensibilité aux chimiothérapies et la faible réponse aux thérapies ciblées.

Sur le plan clinique, le profil biologique observé dans la lignée Ovsaho présente plusieurs implications importantes pour la prise en charge des patientes atteintes d'HGSOC, ces cellules sont l'un des modèles les plus représentatifs grâce à l'absence d'expression de p53 (fréquemment associée à des mutations inactivatrices dans les tumeurs ovariennes avancées) correspond généralement à un phénotype agressif avec une réponse initiale variable aux traitements standards à base de platine et taxanes. Toutefois, la forte sensibilité des Ovsaho aux chimiothérapies en conditions clonogéniques et en 3D pourrait refléter la dépendance accrue de ces cellules à des mécanismes alternatifs de maintien de l'intégrité génomique, notamment ceux liés à ARID1A. En pratique clinique, un tel comportement pourrait suggérer que certaines tumeurs présentant une expression élevée d'ARID1A, même en absence d'un p53 fonctionnel, pourraient mieux répondre aux chimiothérapies conventionnelles lorsque la charge tumorale est faible. Ce type de tumeur pourrait notamment bénéficier d'approches thérapeutiques visant à renforcer les dommages à l'ADN (platine + inhibiteurs de réparation comme *Olaparib*) plutôt que des stratégies reposant sur l'inhibition de voies signalétiques. Enfin, ces observations renforcent l'importance du profilage moléculaire des tumeurs ovariennes pour mieux prédire les réponses thérapeutiques et optimiser les stratégies personnalisées en clinique.

10.2.3 Cov-362

Les cellules Cov-362 ont été un cas un peu plus particulier. En effet, lors du test de cicatrice, il a pu être observé que les chimiothérapies influençaient la vitesse de fermeture du scratch négativement. L'effet a été plus pondéré pour les tests de clonogénicités. Mais il était encore présent lors du test de formation de sphéroïdes. Cela indiquerait que la chimiothérapie serait une bonne option pour cette lignée et, ainsi, pour les patientes qui se rapprocheraient de cette classe. Par contre, il est à noter que des effets des thérapies ciblées sont aussi apparus comme bonne option ; plus discrets dans les tests 2D, ils ont cependant été confirmés par les tests 3D (AZD5363 et TRAIL). Sur la figure 8.12, une sous-expression de MSH2 et une absence de p53 ont été observées.

La lignée Cov-362 présente un profil intermédiaire de sensibilité thérapeutique, répondant de manière nette aux chimiothérapies classiques, tout en montrant l'intérêt particulier de certaines thérapies ciblées.

Lors du test de cicatrisation, l'exposition aux agents cytotoxiques a significativement ralenti la fermeture du scratch, indiquant une altération de la capacité migratoire des cellules sous pression chimiothérapeutique. Cet effet, bien que toujours observable, s'est révélé plus modéré dans les essais de clonogénicité, où un certain nombre de colonies ont pu persister malgré le traitement, suggérant une capacité de survie résiduelle en condition de haute densité cellulaire.

En revanche, dans les tests de formation de sphéroïdes, la diminution de viabilité induite par la chimiothérapie était de nouveau marquée, ce qui montre que ces cellules restent vulnérables aux dommages génotoxiques dans un environnement tridimensionnel, plus pertinent du point de vue physiologique.

Contrairement aux deux lignées précédentes, les Cov-362 ont également démontré une sensibilité intéressante à certaines thérapies ciblées. Les effets d'AZD5363 et du TRAIL sont restés discrets dans les tests 2D, mais ont été clairement confirmés en 3D, où ces traitements ont induit une altération de la formation sphéroïdale. Ce résultat suggère que les mécanismes de signalisation associés à la voie AKT et les voies apoptotiques extrinsèques deviennent plus déterminants lorsque l'architecture cellulaire se rapproche d'un contexte tumoral réel. Les observations issues du Western Blot révèlent deux aspects moléculaires susceptibles d'expliquer ce comportement : une sous-expression de MSH2 et une absence de p53 :

— MSH2, comme nous avons pu le voir au début de cette thèse, est un élément clé du système MMR ; il joue un rôle central dans la réparation des erreurs de réplication et dans l'induction de la mort cellulaire en cas de dommages importants à l'ADN [395]. Sa sous-expression peut rendre les cellules plus sensibles aux agents alkylants ou aux interruptions d'ADN, ce qui est cohérent avec la bonne réponse des Cov-362 aux chimiothérapies [396].

— En parallèle, l'absence de p53 (comme observé dans les autres lignées) peut limiter l'efficacité des thérapies reposant sur l'activation des voies

apoptotiques intrinsèques, mais peut également rendre les cellules davantage dépendantes de voies alternatives telles que PI3K/AKT [397]. Cela pourrait expliquer pourquoi l'inhibition d'AKT par AZD5363 ou l'activation de la voie extrinsèque via le TRAIL présente une efficacité observable, en particulier dans les conditions 3D [398].

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que la chimiothérapie demeure une option thérapeutique efficace pour cette lignée, possiblement renforcée par des combinaisons intégrant l'AZD5363 ou le TRAIL afin d'exploiter la dépendance accrue de ces cellules aux voies p53-indépendantes.

Sur le plan clinique, le profil observé *in vitro* pour la lignée Cov-362 suggère des pistes thérapeutiques potentiellement pertinentes pour des patientes atteintes de cancers ovariens présentant un profil moléculaire similaire (dépression de MSH2, absence de p53). En effet, la sous-expression de MSH2 pourrait rendre la tumeur plus sensible aux agents génotoxiques provoquant des dommages à l'ADN — en accord avec la réactivité de Cov-362 à la chimiothérapie « *classique* ». Toutefois, l'absence de p53 fonctionnel peut limiter l'efficacité des traitements basés sur l'activation des voies apoptotiques p53-dépendantes. Dans ce contexte, l'association d'un inhibiteur de la voie PI3K/AKT (comme l'AZD5363) et d'un agent pro-apoptotique indépendant de p53 (comme un ligand de mort cellulaire via TRAIL) pourrait représenter une stratégie thérapeutique judicieuse pour contourner la résistance. Cette combinaison, particulièrement si elle est efficace en 3D (sphéroïdes ou organoïdes), pourrait mieux refléter les conditions tumorales *in vivo*, en particulier dans des tumeurs à faible hétérogénéité cellulaire ou à faible densité cellulaire. Cliniquement, cela pourrait se traduire par une meilleure prise en charge des patientes dont les tumeurs présentent un défaut de MMR et une inactivation de p53, sous-groupe pour lequel les chimiothérapies seules peuvent être insuffisantes, mais pour lequel des thérapies combinées ciblées pourraient offrir un réel avantage.

Ces observations soulignent l'importance d'un profilage moléculaire systématique (statut MSH2/MMR, p53) avant traitement, afin de personnaliser les thérapies et d'optimiser les chances de réponse, en particulier dans un contexte de récurrences ou de résistance primaire.

10.2.4 Caov-3

Finalement, la dernière lignée cellulaire des Caov-3, elle, paraissait plus sensible lors des tests 2D, car les cellules décollaient rapidement, notamment avec les chimiothérapies. Par contre un effet à court terme a été décelé pour l'AZD5363 et le KPT330. Le TRAIL lui semblait fonctionner au bout de 120h. Les résultats semblaient eux aussi hétérogènes, mais la tendance du traitement avec le TRAIL a été confirmée avec le test 3D de sphéroïdes, où il a pu être vu que les niches anoxiques étaient de plus en plus présentes et avec une séparation de plus en plus importantes entre les cellules. Les Caov-3 ont été les seules cellules avec présence de p53 mais aussi absence d'ARID1A (figure

8.12).

Finalement, la lignée Caov-3 s'est révélée globalement plus sensible que d'autres aux chimiothérapies dans les conditions 2D. En effet, les cellules décrochaient et montraient une perte de viabilité rapide sous traitement cytotoxique, ce qui suggère une capacité réduite de survie dès les premières heures d'exposition. Les tests de migration (cicatrice) et les traitements 2D ont aussi mis en évidence des effets notables pour les thérapies ciblées testées, notamment l'AZD5363 et le KPT-330, qui ont entraîné une réduction de la fermeture du scratch à court terme.

En ce qui concerne l'agent pro-apoptotique TRAIL, un effet est apparu au bout de $\sim$120 h, bien que les résultats aient montré une certaine hétérogénéité, ce qui pourrait refléter des différences de sensibilité cellulaire ou des variations dans l'engagement des voies de mort cellulaire parmi la population. Cette hétérogénéité observée en 2D s'est retrouvée dans les tests 3D de formation de sphéroïdes, mais avec des tendances intéressantes : sous effet du TRAIL, les sphéroïdes de Caov-3 ont montré une augmentation des niches anoxiques et une séparation progressive des cellules, ce qui peut traduire une altération de la cohésion cellulaire et un affaiblissement de la viabilité dans un micro-environnement simulant la tumeur. Ce type de réponse en 3D suggère que la lignée Caov-3 est particulièrement sensible à des agents induisant la mort cellulaire ou perturbant la survie cellulaire, surtout dans un contexte où les contraintes du micro-environnement (densité, oxygénation, nutriments) sont simulées. Les résultats du Western Blot montrent que les cellules Caov-3 expriment p53, ce qui contraste avec certaines de nos autres lignées. Cela laisse présager que la machinerie classique de l'apoptose médiée par p53 pourrait être opérationnelle, expliquant ainsi la sensibilité marquée à certaines chimiothérapies et, potentiellement, au TRAIL. Par ailleurs, l'absence d'ARID1A pourrait influencer la structure chromatinienne et la régulation transcriptionnelle [390], affectant la plasticité cellulaire, la réparation de l'ADN ou la capacité de survie en conditions stressantes comme vu auparavant, ce qui pourrait favoriser l'activation de la mort cellulaire plutôt que la survie adaptative dans ce contexte [389].

Ainsi, le profil des CAOV-3 (p53 positif, ARID1A négatif) semble sensiblement plus favorable à l'efficacité des traitements, en particulier ceux induisant des dommages importants ou activant l'apoptose. Il apparaît que cette lignée constitue un modèle pertinent pour tester des combinaisons thérapiques ciblées, en particulier celles combinant agents cytotoxiques, inhibiteurs de survie, et agents pro-apoptotiques comme le TRAIL.

Cliniquement, les caractéristiques des Caov-3 suggèrent qu'un sous-type de tumeurs ovariennes exprimant p53, mais déficient en ARID1A, pourrait bénéficier particulièrement d'approches thérapeutiques combinées. Le fait que ces cellules soient sensibles aux chimiothérapies classiques dans des conditions 2D, associé à une réponse positive en 3D sous le TRAIL, indique que ces tumeurs pourraient réagir rapidement à un premier traitement standard, puis être efficacement consolidées par des traitements ciblés ou pro-apoptotiques

pour éliminer les cellules résistantes ou en micro-environnement hypoxique. Par conséquent, pour des patientes présentant ce profil moléculaire (p53 + / ARID1A –), un schéma thérapeutique incluant chimiothérapie initiale, suivie d'un traitement adjuvant combiné (par exemple TRAIL + inhibiteur de survie ou inhibiteur de voie pro-survie) pourrait améliorer l'efficacité globale et limiter les récidives. Ainsi, le profilage moléculaire serait encore une fois l'avenir de l'oncologie, afin de stratifier les patientes et d'orienter les traitements vers des stratégies optimisées en fonction du phénotype tumoral.

10.3 Interprétation des résultats sur les lignées endométriales.

Le même travail a été effectués avec nos 3 lignées endométriales, mais avec perspectives différentes. Nos résultats avec nos lignées du cancer de l'endomètre nous ont permis de voir et d'analyser des comportements très hétérogènes entre des tests 2D et 3D, mais aussi avec ou sans dynamisme.

10.3.1 HEC-1-A

La lignée HEC-1-A démontre un caractère résistant au cisplatine, la rendant très intéressante dans la perspective de faire des combinaisons de thérapies. De plus, nous avons pu expliquer sa pousse plus faible par un ralentissement de son cycle mitotique et non pas du fait d'une mortalité plus intense. Nous avons aussi pu voir que les cellules qui effectuaient une mitose ne décédaient pas ensuite, prouvant encore une fois le caractère résistant de cette lignée. Pour la condition doxorubicine et la lignée HEC-1-A, même si nos tests 2D et 3D non-dynamique ont démontrés une efficacité de la drogue, il est intéressant de voir que les cellules ont eues le même temps entre le début de la vidéo-microscopie et la première division que le contrôle. Cela permet donc d'envisager que la drogue met du temps à agir. De plus, une hétérogénéité est très présente avec cette condition. En ce qui concerne l'AZD5363 et la lignée HEC-1-A, nous avons pu voir peu d'effet sur nos tests non-dynamiques ; par contre nous avons pu remarquer avec la vidéo-microscopie, l'émergence de phénomènes anormaux. Il semblerait qu'en monothérapie l'AZD5363 rend les cellules de la lignée plus enclines à faire des divisions anormales. Le KPT330 a, lui, un léger effet en monothérapie sur la division cellulaire des HEC-1-A.

La lignée HEC-1-A, dérivée d'un adénocarcinome endométrial peu différencié, présente un profil moléculaire caractéristique d'un phénotype déficient en réparation des mésappariements (MMR / MSI-high). Avec des altérations documentées et provenant de nos résultats de Western Blot de PMS2 (mutation non-sens) et MSH6 (« *splice mutation* » entraînant une perte de la protéine), confirmées historiquement par des analyses fonctionnelles et des expériences de complémentation génique [399]. Ces anomalies confèrent à la lignée une instabilité des microsatellites et une altération de la stabilité génomique [400].

Sur le plan phénotypique, HEC-1-A manifeste une résistance au cisplatine, ce qui rend la lignée intéressante pour l'étude de stratégies combinatoires visant à contourner la résistance chimique. Nos approches dynamiques (vidéo-microscopie), clonogéniques et 3D, montrent que la croissance ralentie de HEC-1-A résulte d'un allongement du cycle mitotique, plutôt que d'une augmentation de la mortalité post-mitotique : les cellules effectuant une mitose ne décèdent pas ensuite, confirmant le caractère résistant de la population. Ce phénotype concorde avec un défaut MMR qui peut altérer la réponse au stress génotoxique et modifier les points de contrôle du cycle [400].

Concernant la doxorubicine, bien que les tests 2D et 3D statiques suggèrent une efficacité apparente, la vidéo-microscopie montre que le temps médian jusqu'à la première division après exposition reste comparable au contrôle. Ce résultat pourrait indiquer que le traitement n'affecte pas les cellules déjà engagées dans le cycle cellulaire, mais pourrait plutôt moduler l'entrée en cycle ou l'activation de checkpoints cellulaires.

L'AZD5363 a montré peu d'effet dans nos tests statiques, mais la vidéo-microscopie a mis en évidence l'émergence d'évènements mitotiques anormaux sous monothérapie (un signal d'alarme biologique indiquant que l'AZD5363 perturbe la progression du cycle et la mitose dans cette lignée, phénomène décrit pour les « *AKT inhibitors* » dans la littérature sur modèles gynécologiques [33]).

Enfin, le KPT-330 a induit une diminution modeste mais mesurable de la viabilité cellulaire en monothérapie[82], observation cohérente avec le rôle de l'inhibition de l'export nucléaire (XPO1) dans la restauration fonctionnelle de suppresseurs tumoraux et l'induction d'un stress pro-apoptotique [401].

Cliniquement, le profil moléculaire de la lignée HEC-1-A correspond à celui d'un carcinome de l'endomètre de type I, caractérisé par MSI-high et des altérations des gènes du système MMR (notamment PMS2 et MSH6). Les tumeurs endométriales MSI-high se distinguent par une réponse souvent limitée aux agents à base de platine, en accord avec la résistance au cisplatine observée dans nos expériences. En pratique clinique, ce sous-groupe de patientes est aujourd'hui d'un intérêt majeur, car il constitue une population à forte sensibilité à l'immunothérapie anti-PD-1 (pembrolizumab, dostarlimab), devenue un standard thérapeutique en rechute ou en stade avancé. Par ailleurs, la présence potentielle d'une mutation POLE, bien que rare mais associée à un phénotype « ultra-muté », renforcerait encore la réponse immunologique et la sensibilité aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Enfin, la résistance aux chimiothérapies classiques, combinée aux perturbations mitotiques induites par l'AZD5363 ou le KPT330 dans nos analyses dynamiques, ouvre la perspective clinique de thérapies combinées ciblant les voies AKT ou XPO1, en complément de l'immunothérapie pour les patientes présentant un profil tumoral similaire.

10.3.2 KLE

La lignée KLE, elle, a démontré une réaction linéaire pour le traitement à la doxorubicine : la diminution de P53, l'impossibilité de fermeture des scratchs, ainsi la non-formation de sphéroïdes signifient donc un résultat positif aux traitements. La réaction hétérogène de cette lignées face aux thérapies ciblées entraîne une comparaison immédiate aux lignées ovariennes utilisées précédemment 8. Ainsi, les cellules cancéreuses Caov-3 avaient aussi une réaction très hétérogène face au KPT330 et au TRAIL. Ce dernier traitement a permis une diminution des protéines Bid et PARP. Il est aussi à noter qu'une différence majeure a été observée lors de notre test 3D avec le traitement à l'AZD5363, résultat qui n'était pas présent avec nos tests 2D. Ceci est à mettre en lien avec l'augmentation de la protéine Bad.

La lignée KLE provient d'un carcinome endométrial peu différencié métastatique de stade III, ce qui lui confère un profil agressif et proche biologiquement des HGSOCs. Elle appartient au groupe moléculaire « *copy-number high* » (groupe 3 du *TCGA*) [402], caractérisé par une forte instabilité génomique et un taux élevé d'altérations de TP53 [403]. Nos immunobuvardages de type Western Blots confirment une expression altérée de p53, cohérente avec un statut muté.

Ce profil rend la lignée KLE particulièrement pertinente pour comparer les comportements des cancers endométriaux agressifs à ceux des cancers ovariens de haut grade [404] (ce qui se reflète dans nos observations expérimentales). En effet, les KLE ont démontré une réponse linéaire et marquée à la doxorubicine : l'impossibilité de fermer les scratchs, l'absence de formation de sphéroïdes, ainsi que la diminution de p53 après traitement, suggèrent une sensibilité élevée à cette anthracycline.

Cette sensibilité contraste fortement avec leur comportement face aux thérapies ciblées étudiées, où nous avons observé une hétérogénéité de réponse similaire à celle notée chez Caov-3. Le KPT330 et le TRAIL ont induit des réponses variables, mais néanmoins accompagnées d'une diminution des protéines apoptotiques Bid et PARP, indiquant une activation partielle des voies apoptotiques. À l'inverse, le traitement avec l'AZD5363 a entraîné une augmentation de BAD, pro-apoptotique, mais un effet net limité, sauf en 3D où un impact spécifique a été détecté.

Ces réponses disparates rappellent celles observées dans les lignées ovariennes agressives, renforçant l'idée que KLE partage des caractéristiques pharmacologiques et moléculaires avec les HGSOCs, plutôt qu'avec les cancers endométriaux de bas grade.

D'un point de vue clinique, la lignée KLE représente un modèle pertinent des carcinomes endométriaux de haut grade et métastatiques, dont le comportement s'aligne sur celui des carcinomes séreux ovariens avancés. Les patientes présentant ce type de tumeur sont souvent diagnostiquées à un stade III/IV, avec un mauvais pronostic et une survie restreinte, en raison d'une forte agressivité biologique liée notamment aux mutations de TP53. La sensibilité marquée

à la doxorubicine observée dans nos modèles suggère que, pour les tumeurs partageant ce profil moléculaire, les anthracyclines pourraient représenter une option thérapeutique pertinente [405], en particulier en récidive ou lorsque la chimiothérapie à base de platine est inefficace [406]. Cependant, la réponse hétérogène aux thérapies ciblées, similaire aux comportements observés dans les HGSOCs, souligne la nécessité de stratégies combinatoires personnalisées. Le fait que le KPT330 et le TRAIL induisent une modulation des protéines apoptotiques (par exemple diminution de PARP et Bid [407]) laisse entrevoir une possible utilisation en combinaison avec les chimiothérapies cytotoxiques pour renforcer les réponses apoptotiques [408]. De plus, l'augmentation de BAD avec l'AZD5363 suggère qu'un ciblage de la voie AKT pourrait être intéressant dans des approches multi-agents, notamment dans les tumeurs TP53-mutées [409], connues pour contourner l'apoptose dépendante de p53 [410].

En résumé, le profil clinique extrapolé à partir de KLE reflète celui de patientes atteintes de carcinomes endométriaux agressifs pour lesquelles des combinaisons thérapeutiques intégrant doxorubicine [411], inhibiteurs d'AKT [412] ou inhibiteurs d'export nucléaire pourraient constituer des pistes prometteuses [385].

10.4 Ishikawa

Pour la lignée Ishikawa, les résultats pour le traitement à la doxorubicine étaient sans surprise très mortifère. Par contre, une augmentation de la protéine par-4 a été notée. Le traitement au cisplatine, lui, a eu des résultats plutôt surprenants : en 2D il ne semblait pas avoir de pousse, mais en 3D la sphéroïde s'est tout de même formée. Une augmentation de par-4 ainsi que de PARP ont été notées en 2D. Pour les thérapies ciblées, une tendance se dégageait lors des tests de clonogénicités, la signature nécrotique dans les sphéroïde ainsi que l'augmentation de P53 et la diminution de la protéine Bad tendent vers l'efficacité de nos traitements. Le KPT330 a eu un effet remarquable uniquement lors des tests de clonogénicités, il augmentait aussi l'expression de par-4. Finalement le TRAIL entraînait une augmentation des protéines sous forme clivées caspase 3 et caspase 8 sans avoir d'effet lors de nos tests cellulaires.

La lignée cellulaire Ishikawa provient d'un carcinome de l'endomètre endométrioïde bien différencié (grade I, bas grade), représentant typiquement les tumeurs du groupe moléculaire 1 selon la classification TCGA, caractérisées par une signature POLE ultramutée [413], une forte instabilité génomique et un excellent pronostic clinique. Les altérations récurrentes de PTEN [414], fréquemment associées aux carcinomes endométrioïdes précoces, sont cohérentes avec le profil génétique observé dans Ishikawa. L'absence d'expression de MLH1 au Western Blot suggère une possible composante de MSI [415], fréquemment retrouvée dans les tumeurs de type endométrioïde et impliquée dans une

meilleure réponse à certains traitements cytotoxiques et à l'immunothérapie.

Cliniquement, les tumeurs représentées par Ishikawa répondent généralement bien à la chimiothérapie standard à base de platine ou d'anthracyclines. Cela se reflète dans les données expérimentales : la doxorubicine induit une cytotoxicité particulièrement marquée ainsi qu'une augmentation de Par-4, biomarqueur pro-apoptotique [416]. Le cisplatine, bien que limitant la prolifération en 2D, permet encore la formation de sphéroïdes en 3D, mais reste associé à une activation apoptotique (augmentation de Par-4 et PARP).

En ce qui concerne les thérapies ciblées, Ishikawa présente une signature de réponse plutôt favorable, avec une augmentation de p53, une diminution de BAD, et des effets notables sur la clonogénicité. Le KPT330 se distingue par un effet significatif uniquement en clonogénicité, accompagné d'une augmentation de Par-4. Enfin, le TRAIL active la voie apoptotique extrinsèque (augmentation des formes clivées de caspase-3 et caspase-8), malgré l'absence d'effet mesurable sur la viabilité cellulaire, reflétant une sensibilité partielle, typique des tumeurs endométrioïdes à bas grade [53].

10.5 Synthèse.

L'hétérogénéité perçue lors des expériences de vidéo-microscopie permet ainsi d'expliquer les échecs des traitements, les cellules, même provenant de lignées immortalisées, réagissent toutes différemment aux traitements. De plus, les différences de réaction des lignées face aux différents tests est aussi à prendre en compte, les résultats entre 2D et 3D étant très hétérogènes et parfois surprenants. Il est donc important de passer par plusieurs tests complémentaires avant de distinguer et de confirmer une tendance.

L'ensemble des résultats obtenus dans nos différents modèles cellulaires met en évidence une réponse largement hétérogène au TRAIL. Cette variabilité, observée à la fois entre lignées et entre conditions expérimentales (2D, 3D, clonogénicité, vidéo-microscopie), s'explique par plusieurs facteurs intrinsèques aux tumeurs gynécologiques dont dérivent ces cellules. Elle traduit la complexité des mécanismes régulant la voie apoptotique extrinsèque et souligne la robustesse des mécanismes de résistance adoptés par les cancers endométriaux et ovariens.

La première source majeure d'hétérogénéité réside dans les altérations génétiques propres à chaque modèle tumoral. Les lignées KLE (haut grade, p53 mutée) et Caov-3 (mutée pour ARID1A, présence de p53) présentent des profils compatibles avec une altération profonde de la régulation apoptotique, réduisant l'amplification du signal induit par le TRAIL. À l'inverse, les lignées Ishikawa et HEC-1-A, classées dans des sous-groupes moléculaires distincts (groupe 1 POLE-muté pour Ishikawa, groupe MSI/pMMR altéré pour HEC-1-A), possèdent des dérégulations dans la réparation de l'ADN (perte d'expression de MLH1, PMS2, MSH6) susceptibles de modifier la sensibilité à l'apoptose, mais pas nécessairement de manière homogène. Ainsi, selon le

statut mutationnel, certaines lignées activent plus difficilement la machinerie apoptotique en aval, même si le récepteur est stimulé.

La variabilité observée trouve également son origine dans l'expression hétérogène des régulateurs pro- et anti-apoptotiques au sein de la voie extrinsèque et de son couplage à la voie intrinsèque. Nos analyses montrent par exemple :

— une diminution de Bid et PARP sous TRAIL chez les KLE, mais sans corrélat fonctionnel suffisant pour induire la mort cellulaire ;
— une activation des caspases 3 et 8 chez les Ishikawa, qui paradoxalement ne s'accompagne pas d'un phénotype apoptotique marqué ;
— des réponses partielles chez les Caov-3, en cohérence avec leur hétérogénéité déjà décrite pour d'autres thérapies ciblées.

Ces observations suggèrent que, même lorsque l'amorçage extrinsèque est initié, la progression du signal apoptotique peut être entravée par des mécanismes compensatoires (surexpression de Bcl-2/Bcl-xL, présence de c-FLIP, dérégulation de Bad ou Bid). Cela aboutit à une apoptose « incomplète », détectable en Western Blot, mais insuffisante pour provoquer une mort cellulaire.

Un troisième élément explicatif repose sur l'équilibre entre les récepteurs fonctionnels du TRAIL (DR4, DR5) et les récepteurs dits « leurres » (DcR1, DcR2). Bien que nous n'ayons pas quantifié leur expression dans cette étude, la littérature montre que plusieurs lignées dérivées de cancers gynécologiques expriment fréquemment des récepteurs leurres capables de neutraliser TRAIL sans induire son signal apoptotique [417]. Une hétérogénéité dans ce ratio pourrait donc justifier la capacité variable des cellules à former ou non le DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), déterminant essentiel de l'engagement apoptotique [418].

Enfin, une propriété bien documentée des cancers ovariens et endométriaux est leur résistance constitutive au TRAIL [419], liée à des altérations de p53 [55], à l'hyper-activation de la voie AKT [420], à des boucles d'échappement apoptotique et à la présence de sous-clones génétiquement divergents [421].

10.6 Perspectives et directions futures.

10.6.1 Intégration de l'intelligence artificielle et du *Deep Learning.*

L'une des évolutions les plus prometteuses de la vidéo-microscopie réside dans l'intégration de l'intelligence artificielle pour l'acquisition, l'analyse et l'interprétation des données. Les algorithmes d'apprentissage profond (*Deep Learning*) ont déjà démontré leur efficacité dans la segmentation cellulaire, le suivi de trajectoires et la classification de phénotypes [318] [321]. À terme, ces systèmes devraient permettre une analyse en temps réel, sans intervention humaine, réduisant ainsi les biais d'observateur et accélérant considérablement le traitement des données.

L'IA ouvre également la voie à des applications prédictives. En intégrant des

données morpho-dynamiques issues de la vidéo-microscopie, il est désormais envisageable de prédire le devenir cellulaire, d'anticiper des réponses thérapeutiques ou de reconstruire des trajectoires de différenciation [422]. Cette évolution est particulièrement pertinente en oncologie, où la détection précoce de comportements résistants pourrait guider les décisions thérapeutiques.

10.6.2 Développement de systèmes automatisés et accessibles.

Les systèmes de vidéo-microscopie actuels restent souvent limités à des plateformes spécialisées, coûteuses et complexes à mettre en œuvre. Une tendance croissante vise à démocratiser l'accès à ces technologies, grâce à des microscopes automatisés compacts et intégrés. Des dispositifs portables ou à bas coût, combinés à des capteurs CMOS et à des logiciels *open source*, sont en développement pour les laboratoires disposant de ressources limitées [423].

Parallèlement, l'automatisation des protocoles d'acquisition, associée à la robotique et à la micro-fluidique, ouvre la voie à des expériences hautement standardisées et reproductibles. L'intégration de puces micro-fluidiques permet par exemple de suivre en temps réel des cellules individuelles dans des environnements contrôlés, tout en automatisant les manipulations (ajout de traitements, changements de milieu)[424].

10.6.3 Vers l'expérimentation *in silico* et la modélisation cellulaire.

La vidéo-microscopie ne se limite plus à la simple acquisition d'images ; elle tend à devenir une source de données massives (*big data*) pouvant alimenter des modèles computationnels. Les approches dites *in silico* visent à recréer virtuellement le comportement cellulaire, en intégrant des paramètres spatio-temporels mesurés expérimentalement [425].

Ces modèles permettent de simuler des processus complexes (division asymétrique, morphogenèse tissulaire, migration collective), ouvrant la voie à des approches prédictives et à des expérimentations virtuelles. À terme, la combinaison de la vidéo-microscopie et de la modélisation pourrait transformer la recherche biomédicale en réduisant la dépendance aux modèles animaux et en accélérant la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.

10.6.4 Accessibilité, coûts et démocratisation des technologies.

Un enjeu majeur reste l'accessibilité de la vidéo-microscopie. Les systèmes haut de gamme, intégrant la super-résolution ou l'imagerie multi-photonique, représentent des investissements de plusieurs centaines de milliers de dollars, ce qui limite leur diffusion aux grands centres de recherche. Des initiatives visant à développer des microscopes modulaires et *open source*, comme l'OpenSPIM

(*Selective Plane Illumination Microscopy*), cherchent à surmonter cette barrière financière [426].

Par ailleurs, la formation des chercheurs demeure un point critique. La maîtrise des techniques de vidéo-microscopie nécessite des compétences interdisciplinaires en optique, biologie cellulaire et analyse computationnelle. Des efforts de formation et de vulgarisation, via des plateformes collaboratives et des réseaux de partage de données, apparaissent indispensables pour maximiser l'impact de la vidéo-microscopie à l'échelle mondiale [427].

Au fil des dernières décennies, la vidéo-microscopie s'est imposée comme un outil incontournable de la biologie cellulaire et de la recherche bio-médicale. En intégrant la dimension temporelle à l'observation microscopique, elle a permis de dépasser les limites des approches statiques et de révéler la dynamique des processus vivants, de l'organisation du cytosquelette à la morphogenèse embryonnaire, en passant par la plasticité neuronale et la plasticité tumorale.

10.7 Limites de l'étude et pistes de recherches futures.

Plusieurs points sont à noter en ce qui concerne la réalisation de nos expériences et notamment sur les tests effectuées sur des lignées immortelles. Plusieurs points sont à noter concernant la réalisation de nos expériences, notamment les tests effectués sur les lignées immortelles. L'absence de signal p53 détecté par Western blot pourrait refléter une expression très faible de la protéine dans ces conditions expérimentales, mais ne permet pas de conclure à son statut fonctionnel ou génétique. En effet, le statut de p53 (mutation, délétion ou expression résiduelle de formes fonctionnelles) n'a pas été déterminé dans cette étude. Il demeure donc possible qu'une fraction de p53 fonctionnelle, indétectable par Western blot dans nos conditions expérimentales, soit présente dans certaines lignées. Cette incertitude constitue une limite importante dans l'interprétation du rôle de p53 dans la chimiorésistance observée. Pour approfondir cette question, il serait nécessaire de déterminer le statut mutationnel de p53 et d'évaluer l'induction de ses cibles transcriptionnelles (p21, PUMA, BAX) après traitement.

Une caractérisation génomique approfondie de nos lignées cellulaires aurait également pu être réalisée. Un séquençage, tel que celui accessible au CHU de Montréal, aurait permis de confirmer l'identité, la stabilité génétique et d'éventuelles altérations pertinentes pour l'interprétation des réponses thérapeutiques. Comme le souligne [428], [429] et [378] l'authentification et la caractérisation rigoureuse des lignées cellulaires constituent une étape essentielle, y compris lorsque celles-ci proviennent de sources considérées comme fiables. En effet, l'absence de validation systématique à l'entrée en culture peut introduire des biais majeurs liés à des erreurs d'identification, des contaminations ou des dérives génétiques progressives des modèles cellulaires. Dans ce contexte, la caractérisation précoce des cellules permet d'assurer la traçabilité et la fiabilité

des modèles expérimentaux, et contribue ainsi à garantir une interprétation robuste et reproductible des résultats, notamment dans les études de réponse aux composés pharmacologiques. Toutefois, cette analyse n'a pas pu être effectuée en raison de contraintes de temps et de ressources.

Enfin, nos travaux auraient pu être renforcés par l'utilisation de primocultures issues de patientes. Une telle approche aurait permis d'associer chaque échantillon à une classification clinique clairement définie, offrant ainsi des résultats plus précis et mieux contextualisés. Les expériences qui auraient pu être envisagées pour renforcer ces travaux reposent sur l'utilisation de primocultures dérivées d'échantillons tumoraux de patientes atteintes de cancers gynécologiques. L'établissement de ces modèles primaires aurait permis de travailler sur des systèmes cellulaires plus proches de la physiopathologie humaine et d'associer chaque échantillon à des données cliniques précises, facilitant ainsi une analyse plus fine des corrélations entre phénotypes cellulaires et classifications tumorales. Ces primo-cultures auraient notamment pu être utilisées pour évaluer la réponse aux traitements anticancéreux dans un contexte plus représentatif de l'hétérogénéité tumorale notamment via la vidéomicroscopie. Bien que cette approche ait été identifiée comme pertinente et envisagée en amont du projet, elle n'a pas pu être mise en œuvre en raison de l'absence de collaborations établies avec des centres cliniques partenaires. Malgré plusieurs démarches, notamment auprès de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Par ailleurs, l'intégration d'un volet *in vivo* aurait représenté une extension particulièrement pertinente du projet. L'utilisation d'un modèle murin immuno-compétent ou immuno-déficient, aurait permis de tester les combinaisons thérapeutiques évaluées *in vitro* dans un contexte tissulaire et microenvironnemental se rapprochant davantage de la physiopathologie humaine. Plusieurs stratégies expérimentales auraient ainsi pu être mises en œuvre, comme citées dans notre article de revue de littérature [160] :

- Implantation sous-cutanée (xénogreffes ou allogreffes), permettant un suivi aisé de la croissance tumorale, une quantification régulière du volume tumoral ainsi qu'un accès direct aux tumeurs pour des analyses histologiques *post-mortem*, contrairement aux modèles orthotopiques, dont l'accès est plus invasif et la quantification plus complexe.
- Modèles orthotopiques (injection ovarienne ou intra-utérine), plus complexes techniquement, mais offrant une meilleure pertinence biologique, en recréant un environnement anatomique et vasculaire comparable à celui observé chez les patientes ;
- Modèles dérivés de patientes (PDX), qui auraient permis d'évaluer directement la variabilité inter-individuelle et d'examiner la sensibilité tumorale réelle à nos combinaisons thérapeutiques.

Les schémas d'administration auraient également pu être diversifiés, incluant des injections intra-péritonéales, des administrations intraveineuses, des injections intra-tumorales ou encore des administrations orales. Un tel dispositif expérimental aurait permis de valider la tolérance, la pharmacocinétique, la bio-disponibilité et l'efficacité réelle des combinaisons thérapeutiques dans un

organisme entier, tout en constituant un pont essentiel entre les données *in vitro* et une éventuelle translation clinique.

Selon le modèle utilisé, plusieurs niveaux d'information auraient pu être obtenus. Les modèles sous-cutanés auraient permis une quantification robuste de la cinétique de croissance tumorale et une première estimation de la réponse aux traitements. Les modèles orthotopiques auraient apporté des informations plus fines sur l'invasion locale, la dissémination tumorale et l'interaction avec le micro-environnement tumoral. Enfin, les modèles dérivés de patientes (PDX) auraient permis d'évaluer l'hétérogénéité de réponse aux traitements et d'identifier des profils de sensibilité ou de résistance reflétant la variabilité interindividuelle observée en clinique.

De manière plus globale, ces approches auraient permis de caractériser la tolérance systémique des traitements, leur biodisponibilité ainsi que leur efficacité in vivo, constituant ainsi un niveau de validation supplémentaire entre les observations in vitro et une potentielle application clinique.

Finalement pour notre premier axe, notre approche de culture 3D aurait pu être davantage optimisée. Par manque de temps, il n'a pas été possible de finaliser certaines améliorations prévues, notamment la mise en place d'un protocole d'immunofluorescence sur coupes de sphéroïdes (protocole prévu avec le Dr Chitcholtan [430]). De même, l'application des traitements directement sur des sphéroïdes pré-formés, plutôt qu'avant leur constitution, aurait permis d'évaluer leur réponse thérapeutique réelle plutôt que leur capacité à reformer une tumeur après exposition (approche post-traitement 3D) ; nous aurions pu ainsi évaluer la biodisponibilité de notre composant et sa pénétration dans le sphéroïde. Nous aurions également pu constituer des organoïdes dérivés de patientes, en isolant des cellules tumorales primaires à partir de biopsies ou de prélèvements chirurgicaux, puis en les cultivant dans une matrice extracellulaire reconstituée de type *Matrigel* ou hydrogel, en présence de facteurs de croissance spécifiques (EGF, Noggin, R-spondin, selon le modèle). Ces modèles tridimensionnels permettent de mieux reproduire l'architecture tissulaire et l'hétérogénéité tumorale que les cultures en 2D classiques. Toutefois, leur mise en place reste techniquement exigeante, dépend fortement de la qualité du prélèvement initial et présente une variabilité inter-échantillon importante. De plus, ils ne reproduisent pas entièrement le micro-environnement tumoral, notamment les interactions avec le système immunitaire, le stroma et la vascularisation.

En ce qui concerne la vidéo-microscopie, le logiciel *Toto-cell* que nous avons développé est désormais disponible en libre accès. SSon utilisation demeure toutefois limitée, probablement en raison de sa faible diffusion dans certains domaines de recherche, liée à la nécessité d'équipements spécialisés, à des coûts d'acquisition élevés et à un manque de standardisation des analyses. Afin d'élargir son champ d'application, nous envisageons d'évaluer son potentiel pour l'analyse d'autres modèles biologiques, tels que *C. Elegans* ou encore le suivi de populations bactériennes, dont la dynamique cellulaire pourrait bénéficier d'une quantification automatisée ou semi-automatisée (avec annotation manuelle).

Par ailleurs, notre étude bio-statistique ne s'est appuyée que sur 18 vidéos provenant de deux lignées cellulaires distinctes. Une augmentation du nombre de lignées analysées, ainsi que du nombre de participants, permettrait d'obtenir une meilleure randomisation et une robustesse accrue des conclusions. De même, l'intégration de dispositifs d'imagerie supplémentaires — tels qu'un second microscope confocal ou d'autres plateformes de vidéo-microscopie en temps réel — offrirait la possibilité de comparer les performances analytiques entre différentes technologies. Enfin, des acquisitions vidéo ont été réalisées pour l'ensemble des lignées cellulaires étudiées dans cette thèse, ouvrant la voie à la poursuite de la collaboration entre l'UQTR et l'ULCO. Cette continuité permettra d'étendre les analyses à un plus grand nombre de cellules et de phénotypes, incluant des comportements, des morphologies et des réponses thérapeutiques diversifiées.

Les expériences de vidéo-microscopies pour les KLE et les Ishikawa ont été effectuées, et ont été delivrées en ligne ainsi qu'au sein du laboratoire, leurs analyses ainsi que les résultats des combinaisons des différentes drogues par MTT pourra permettre la création d'une nouvelle publication dans un avenir proche.

10.8 Conclusion synthétique de la discussion.

L'hétérogénéité observée au cours de nos expériences, en particulier grâce à la vidéo-microscopie, met en évidence la complexité des réponses cellulaires aux traitements anti-cancéreux. Même au sein de lignées immortalisées réputées homogènes, les cellules présentent des comportements distincts face aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées, révélant des sous-populations à la sensibilité variable. Cette variabilité est encore accentuée par les différences marquées entre les modèles 2D et 3D, dont les résultats se montrent parfois discordants, confirmant l'importance de recourir à une batterie de tests complémentaires pour valider une tendance thérapeutique.

Les analyses en vidéo-microscopie pour les lignées KLE et Ishikawa sont toujours en cours, tandis que le Western Blot de HEC-1-A devra être répété, les données initiales ayant été perdues suite à une défaillance matérielle.

Parallèlement, les premières combinaisons thérapeutiques ont été préparées, et les courbes de dose-réponse (MTT) établies pour les associations TRAIL/AZD5363/KPT330 avec le cisplatine ou la doxorubicine. Une fois l'IC50 optimale déterminée pour chaque lignée, l'ensemble des tests de caractérisation (2D, 3D, vidéo-microscopie) sera reproduit dans les conditions combinatoires. Ces travaux constitueront la base d'un article scientifique actuellement en préparation, qui sera poursuivi par les futur.e.s étudiant.e.s du laboratoire. L'ensemble de ces résultats contribuera à mieux comprendre les synergies potentielles entre thérapies ciblées et chimiothérapies conventionnelles, ainsi qu'à identifier des stratégies rationnelles pour contourner les mécanismes de résistance dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre.

La vidéo-microscopie constitue un outil particulièrement pertinent dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les cancers gynécologiques, car elle permet une analyse dynamique et en temps réel du comportement des cellules tumorales en réponse aux traitements. Contrairement aux approches statiques, elle offre la possibilité de suivre l'évolution des événements cellulaires tels que la prolifération, la migration, les altérations morphologiques ou encore l'induction de la mort cellulaire au cours du temps.

Cette approche est particulièrement utile pour l'évaluation des thérapies anticancéreuses, dans la mesure où elle permet de caractériser finement les cinétiques de réponse et d'identifier des phénotypes de résistance ou de sensibilité au niveau cellulaire individuel. Elle permet également de relier des événements dynamiques précoces à des issues cellulaires tardives, ce qui contribue à mieux comprendre les mécanismes d'action des agents thérapeutiques étudiés.

Dans le cadre de ce travail, la vidéo-microscopie a ainsi joué un rôle central en permettant de mettre en évidence de manière fonctionnelle l'impact des combinaisons thérapeutiques sur le devenir des cellules tumorales, constituant un pont essentiel entre l'observation cellulaire dynamique et la compréhension mécanistique des réponses aux traitements.

Dans notre second axe, nous avons mis en évidence les contraintes méthodologiques majeures associées à l'analyse de données de vidéo-microscopie, notamment la masse importante d'images générées et l'absence d'outils computationnels adaptés. Le développement du logiciel *Toto-cell* constitue une première réponse à ces limitations, en permettant une structuration et une standardisation partielle de l'analyse. Son utilisation au sein du laboratoire a par ailleurs révélé une hétérogénéité significative entre opérateurs, soulignant la persistance de biais humains et la nécessité de solutions automatisées robustes.

Notre collaboration engagée avec l'ULCO, a permis de valoriser les données produites dans une démarche exploratoire d'intégration de l'intelligence artificielle, ouvrant ainsi la voie à des approches d'analyse plus systématiques et potentiellement prédictives. Néanmoins, plusieurs limites demeurent, notamment la taille restreinte de la cohorte vidéo que nous avons fait analyser, le nombre limité de lignées cellulaires et l'utilisation d'un matériel homogène, qui réduisent la généralisation des observations. La possibilité d'étendre l'utilisation de *Toto-cell* à d'autres modèles biologiques, ainsi que la poursuite de la collaboration internationale, représente un potentiel important pour renforcer la portée méthodologique et biologique de ces travaux. Ainsi, ce dernier axe établit les fondations d'un cadre analytique visant à intégrer des outils computationnels avancés à la vidéo-microscopie, tout en mettant en lumière les ajustements nécessaires pour en améliorer la reproductibilité, la sensibilité et la transposition à d'autres systèmes expérimentaux.

Bibliographie

[1] F. Bray et al. « Global cancer statistics 2022 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. » In : *CA Cancer J Clin.* 74 (2024). DOI : 10.3322/caac.21834. (cf. p. 28).

[2] D. Hanahan et R.A. Weinberg. « The hallmarks of cancer. » In : *Cell.* 100 (2000). DOI : 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. (cf. p. 28).

[3] D. Hanahan et R.A. Weinberg. « Hallmarks of cancer : the next generation. » In : *Cell.* 144 (2011). DOI : 10.1016/j.cell.2011.02.013. (cf. p. 28, 30).

[4] I. Vivanco et C.L. Sawyers. « The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. » In : *Nat Rev Cancer.* 2 (2002). DOI : 10.1038/nrc839 (cf. p. 28).

[5] D.F. Quail et J.A. Joyce. « Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. » In : *Nat Med.* 19 (2013). DOI : 10.1038/nm.3394. (cf. p. 28, 30).

[6] C. Holohan et al. « Cancer drug resistance : an evolving paradigm. » In : *Rev Cancer.* 13 (2013). DOI : 10.1038/nrc3599. (cf. p. 29, 30).

[7] M. M. Gottesman. « Mechanisms of cancer drug resistance. » In : *Annu Rev Med.* 53 (2002). DOI : 10.1146/annurev.med.53.082901. (cf. p. 29).

[8] John M. Carethers et Brian H. Jung. « Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics : The growing complex landscape of hereditary colon cancer ». In : *World Journal of Gastroenterology* 21.31 (2015), p. 9253-9261. DOI : 10.3748/wjg.v21.i31.9253 (cf. p. 29, 32, 34).

[9] N.N. Pavlova et C.B. Thompson. « The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. » In : *Cell Metab.* 23 (2016). DOI : 10.1016/j.cmet.2015.12.006. (cf. p. 30).

[10] F. Janku et al. « Autophagy as a target for anticancer therapy. » In : *Nat Rev Clin Oncol.* 8 (2011). DOI : 10.1038/nrclinonc.2011.71. (cf. p. 30).

[11] J.G. Turner, J. Dawson et D.M. Sullivan. « Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. » In : *Biochem Pharmacol.* 83 (2012). doi : 10.1016/j.bcp.2011.12.016. (cf. p. 30-35, 37, 39, 41, 42, 45, 46).

[12] M.A. Nieto et al. « EMT : 2016. » In : *Cell.* 166 (2016). doi : 10.1016/j.cell.2016.06.028. (cf. p. 30).

[13] R.L. Dillon, D.E. White et W.J. Muller. « The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network : implications for human breast cancer. » In : *Oncogene* 26 (2007). doi : 10.1038/sj.onc.1210202. (cf. p. 30-33).

[14] H. Sung et al. « Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. » In : *CA Cancer J Clin.* 71 (2021). doi : 10.3322/caac.21660. (cf. p. 31, 32).

[15] L.A. Torre et al. « Ovarian cancer statistics, 2018. » In : *CA Cancer J Clin.* 71 (2018). doi : 10.3322/caac.21456. (cf. p. 31).

[16] S. Lheureux et al. « Epithelial ovarian cancer. » In : *Lancet.* 23 (2019). doi : 10.1016/S0140-6736(18)32552-2. (cf. p. 31).

[17] The Cancer Genome Atlas Research Network. « Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. » In : *Nature.* 474 (2011). doi : 10.1038/nature10166. (cf. p. 31).

[18] The Cancer Genome Atlas Research Network. « Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma ». In : *Nature* 497 (mai 2013). doi : 10.1038/nature12113. (cf. p. 31, 53, 54, 75, 81, 96, 99).

[19] D.T. Le et al. « Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. » In : *Science (New York, N.Y.).* 357 (2017). doi : 10.1126/science.aan6733. (cf. p. 31, 33, 34, 75).

[20] R.J. Hause et al. « Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. » In : *Nat Med.* 22 (2016). doi : 10.1038/nm.4191. (cf. p. 31, 33).

[21] E.J. Crosbie et al. « Human papillomavirus and cervical cancer. » In : *Lancet.* 382 (2013). doi : 10.1016/S0140-6736(13)60022-7. (cf. p. 31).

[22] W.T. Creasman, J.L. Phillips et H.R. Menck. « The National Cancer Data Base report on cancer of the vagina. » In : *Cancer.* 83 (1998) (cf. p. 32).

[23] Christoph Lengauer, Kenneth W. Kinzler et Bert Vogelstein. « Genetic instabilities in human cancers ». In : *Nature* 396.6712 (1998), p. 643-649. doi : 10.1038/25292 (cf. p. 32).

[24] The Cancer Genome Atlas Network. « Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer ». In : *Nature* 487.7407 (2012), p. 330-337. DOI : 10.1038/nature11252 (cf. p. 32).

[25] Henry T. Lynch et Albert de la Chapelle. « Hereditary colorectal cancer ». In : *New England Journal of Medicine* 348.10 (2003), p. 919-932. DOI : 10.1056/NEJMra012242 (cf. p. 33).

[26] Nadia El-Guendy et Vivek M. Rangnekar. « Par-4 is a novel mediator of apoptosis in ovarian cancer cells ». In : *Molecular Cell Biology* 23.16 (2003), p. 5516-5525. DOI : 10.1128/MCB.23.16.5516-5525.2003 (cf. p. 34, 35).

[27] Antonella Lucia Marretta et al. « Selinexor and the Selective Inhibition of Nuclear Export : A New Perspective on the Treatment of Sarcomas and Other Solid and Non-Solid Tumors ». In : *Pharmaceutics* 13.9 (sept. 2021), p. 1522. ISSN : 1999-4923. DOI : 10.3390/pharmaceutics13091522 (cf. p. 34, 37, 39, 45, 46).

[28] Natasha Rinne et al. « Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in epithelial ovarian cancer, therapeutic treatment options for platinum-resistant ovarian cancer ». In : *Cancer Drug Resistance* (2021). DOI : 10.20517/cdr.2021.05 (cf. p. 34).

[29] Stephen B. Howell et al. « Mechanisms of platinum drug resistance ». In : *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 66.1 (2010), p. 1-12. DOI : 10.1007/s00280-009-1170-x (cf. p. 34).

[30] Denis Lane et al. « Malignant ascites protect against TRAIL-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in human ovarian carcinoma cells ». In : *International Journal of Cancer* 121.6 (juill. 2007), p. 1227-1237. ISSN : 1097-0215. DOI : 10.1002/ijc.22840 (cf. p. 34, 39).

[31] Asfar S. Azmi, Mohammed H. Uddin et Ramzi M. Mohammad. « The nuclear export protein XPO1 — from biology to targeted therapy ». In : *Nature Reviews Clinical Oncology* 18.3 (nov. 2020), p. 152-169. ISSN : 1759-4782. DOI : 10.1038/s41571-020-00442-4 (cf. p. 34, 39). Corrected in « Author Correction : The nuclear export protein XPO1 — from biology to targeted therapy ». In : *Nature Reviews Clinical Oncology* 18.3 (nov. 2020), p. 190-190. ISSN : 1759-4782. DOI : 10.1038/s41571-020-00454-0.

[32] Jonathan L. Hecht et George L. Mutter. « Molecular and Pathologic Aspects of Endometrial Carcinogenesis ». In : *Journal of Clinical Oncology* 24.29 (oct. 2006), p. 4783-4791. ISSN : 1527-7755. DOI : 10.1200/jco.2006.06.7173 (cf. p. 34, 37, 38).

[33] François Fabi et al. « Pharmacologic inhibition of Akt in combination with chemotherapeutic agents effectively induces apoptosis in ovarian and endometrial cancer cell lines ». In : *Molecular Oncology* 15.8 (jan. 2021), p. 2106-2119. ISSN : 1878-0261. DOI : 10.1002/1878-0261.12888 (cf. p. 35, 37, 247).

[34] Barnett Rosenberg, Louis Van Camp et Thomas Krigas. « Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode ». In : *Nature* 205 (1965), p. 698-699. DOI : 10.1038/205698a0 (cf. p. 35, 36).

[35] Lloyd Kelland. « The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy ». In : *Nature Reviews Cancer* 7.8 (2007), p. 573-584. DOI : 10.1038/nrc2167 (cf. p. 35, 36).

[36] L Galluzzi et al. « Molecular mechanisms of cisplatin resistance ». In : *Oncogene* 31.15 (sept. 2011), p. 1869-1883. ISSN : 1476-5594. DOI : 10.1038/onc.2011.384 (cf. p. 35, 36).

[37] Caroline F. Thorn et al. « Doxorubicin pathways : pharmacodynamics and adverse effects ». In : *Pharmacogenetics and Genomics* 21.7 (juill. 2011), p. 440-446. ISSN : 1744-6872. DOI : 10.1097/fpc.0b013e32833ffb56 (cf. p. 36, 37).

[38] Yanti Octavia et al. « Doxorubicin-induced cardiomyopathy : From molecular mechanisms to therapeutic strategies ». In : *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52.6 (juin 2012), p. 1213-1225. ISSN : 0022-2828. DOI : 10.1016/j.yjmcc.2012.03.006 (cf. p. 36).

[39] John L. Nitiss. « Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy ». In : *Nature Reviews Cancer* 9.5 (avr. 2009), p. 338-350. ISSN : 1474-1768. DOI : 10.1038/nrc2607 (cf. p. 36).

[40] B. R. Davies et al. « Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT : pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background. » In : *Molecular cancer therapeutics.* 11 (2012). DOI : 10.1158/1535-7163.MCT-11-0824-T (cf. p. 37, 38, 42, 67, 71).

[41] David Jamieson et al. « A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor, WX-554, in patients with advanced solid tumours ». In : *European Journal of Cancer* 68 (nov. 2016), p. 1-10. ISSN : 0959-8049. DOI : 10.1016/j.ejca.2016.08.026 (cf. p. 37, 38).

[42] Tatsuya Okuzumi et al. « Inhibitor hijacking of Akt activation ». In : *Nature Chemical Biology* 5.7 (mai 2009), p. 484-493. ISSN : 1552-4469. DOI : 10.1038/nchembio.183 (cf. p. 37).

[43] Aws Khalid Abushanab et al. « The efficacy and safety of Capivasertib (AZD5363) in the treatment of patients with solid tumor : a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials ». In : *Expert Opinion on Drug Safety* 22.9 (juin 2023), p. 799-805. issn : 1744-764X. doi : 10.1080/14740338.2023.2218085 (cf. p. 37).

[44] Mengyang Xue et al. « AKT1 as a therapeutic target for platinum-resistant SOX2 positive ovarian cancer cells ». In : *Scientific Reports* 15.1 (avr. 2025). issn : 2045-2322. doi : 10.1038/s41598-025-92036-2 (cf. p. 37).

[45] Timothy A. Yap et al. « Phase I Trial of the PARP Inhibitor Olaparib and AKT Inhibitor Capivasertib in Patients with BRCA1/2- and Non–BRCA1/2-Mutant Cancers ». In : *Cancer Discovery* 10.10 (oct. 2020), p. 1528-1543. issn : 2159-8290. doi : 10.1158/2159-8290.cd-20-0163 (cf. p. 37).

[46] Ying Chen et al. « Inhibition of the Nuclear Export Receptor XPO1 as a Therapeutic Target for Platinum-Resistant Ovarian Cancer ». In : *Clinical Cancer Research* 23.6 (mars 2017), p. 1552-1563. issn : 1557-3265. doi : 10.1158/1078-0432.ccr-16-1333 (cf. p. 37).

[47] Suresh Kumar Balasubramanian, Asfar S. Azmi et Jaroslaw Maciejewski. « Selective inhibition of nuclear export : a promising approach in the shifting treatment paradigms for hematological neoplasms ». In : *Leukemia* 36.3 (jan. 2022), p. 601-612. issn : 1476-5551. doi : 10.1038/s41375-021-01483-z (cf. p. 37).

[48] Stella Newell, Pauline J. van der Watt et Virna D. Leaner. « Therapeutic targeting of nuclear export and import receptors in cancer and their potential in combination chemotherapy ». In : *IUBMB Life* 76.1 (août 2023), p. 4-25. issn : 1521-6551. doi : 10.1002/iub.2773 (cf. p. 37).

[49] J Etchin et al. « Antileukemic activity of nuclear export inhibitors that spare normal hematopoietic cells ». In : *Leukemia* 27.1 (juill. 2012), p. 66-74. issn : 1476-5551. doi : 10.1038/leu.2012.219 (cf. p. 37, 46).

[50] Albiruni R. Abdul Razak et al. « First-in-Class, First-in-Human Phase I Study of Selinexor, a Selective Inhibitor of Nuclear Export, in Patients With Advanced Solid Tumors ». In : *Journal of Clinical Oncology* 34.34 (déc. 2016), p. 4142-4150. issn : 1527-7755. doi : 10.1200/jco.2015.65.3949 (cf. p. 39).

[51] Qianlei Huang et al. « Treatment of multiple myeloma with selinexor : a review ». In : *Therapeutic Advances in Hematology* 15 (jan. 2024). issn : 2040-6215. doi : 10.1177/20406207231219442 (cf. p. 39).

[52] Kyaw Z. Thein et al. « Selinexor in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors : Results of a single-center, multi-arm phase Ib study ». In : *Investigational New Drugs* 40.2 (sept. 2021), p. 290-299. ISSN : 1573-0646. DOI : 10.1007/s10637-021-01188-1 (cf. p. 39).

[53] Maria M. Rubinstein et al. « A phase I open-label study of selinexor with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced ovarian or endometrial cancers ». In : *Gynecologic Oncology* 160.1 (jan. 2021), p. 71-76. ISSN : 0090-8258. DOI : 10.1016/j.ygyno.2020.10.019 (cf. p. 39, 250).

[54] Achim Dickmanns, Thomas Monecke et Ralf Ficner. « Structural Basis of Targeting the Exportin CRM1 in Cancer ». In : *Cells* 4.3 (sept. 2015), p. 538-568. ISSN : 2073-4409. DOI : 10.3390/cells4030538 (cf. p. 39).

[55] Avi Ashkenazi. « Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily ». In : *Nature Reviews Cancer* 2.6 (juin 2002), p. 420-430. ISSN : 1474-1768. DOI : 10.1038/nrc821 (cf. p. 39, 251).

[56] Henning Walczak et al. « Tumoricidal activity of tumor necrosis factor–related apoptosis–inducing ligand in vivo ». In : *Nature Medicine* 5.2 (fév. 1999), p. 157-163. ISSN : 1546-170X. DOI : 10.1038/5517 (cf. p. 39).

[57] J Lemke et al. « Getting TRAIL back on track for cancer therapy ». In : *Cell Death & Differentiation* 21.9 (juin 2014), p. 1350-1364. ISSN : 1476-5403. DOI : 10.1038/cdd.2014.81 (cf. p. 39).

[58] Athanasia Pavlidou et Nikos F. Vlahos. « Molecular Alterations of PI3K/Akt/mTOR Pathway : A Therapeutic Target in Endometrial Cancer ». In : *The Scientific World Journal* 2014 (2014), p. 1-9. ISSN : 1537-744X. DOI : 10.1155/2014/709736 (cf. p. 39).

[59] Constantine S Mitsiades et al. « Activation of NF-κB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells : therapeutic implications ». In : *Oncogene* 21.37 (août 2002), p. 5673-5683. ISSN : 1476-5594. DOI : 10.1038/sj.onc.1205664 (cf. p. 39).

[60] T. J. Sayers. « Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy ». In : *Cancer Immunology, Immunotherapy* 60.8 (2011), p. 1173-1180. DOI : 10.1007/s00262-011-1008-4 (cf. p. 39).

[61] Ricky W. Johnstone, Ailsa J. Frew et Mark J. Smyth. « The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy ». In : *Nature Reviews Cancer* 8.10 (oct. 2008), p. 782-798. ISSN : 1474-1768. DOI : 10.1038/nrc2465 (cf. p. 39).

[62] Julio M. Pimentel, Jun-Ying Zhou et Gen Sheng Wu. « The Role of TRAIL in Apoptosis and Immunosurveillance in Cancer ». In : *Cancers* 15.10 (mai 2023), p. 2752. issn : 2072-6694. doi : 10.3390/cancers15102752 (cf. p. 39).

[63] Mathieu J.M. Bertrand et al. « cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination ». In : *Molecular Cell* 30.6 (juin 2008), p. 689-700. issn : 1097-2765. doi : 10.1016/j.molcel.2008.05.014 (cf. p. 39).

[64] Brendan D. Manning et Lewis C. Cantley. « AKT/PKB Signaling : Navigating Downstream ». In : *Cell* 129.7 (juin 2007), p. 1261-1274. issn : 0092-8674. doi : 10.1016/j.cell.2007.06.009 (cf. p. 40).

[65] T F Franke. « PI3K/Akt : getting it right matters ». In : *Oncogene* 27.50 (oct. 2008), p. 6473-6488. issn : 1476-5594. doi : 10.1038/onc.2008.313 (cf. p. 40).

[66] Dos D. Sarbassov et al. « Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex ». In : *Science* 307.5712 (fév. 2005), p. 1098-1101. issn : 1095-9203. doi : 10.1126/science.1106148 (cf. p. 40).

[67] Min Sup Song, Leonardo Salmena et Pier Paolo Pandolfi. « The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor ». In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13.5 (avr. 2012), p. 283-296. issn : 1471-0080. doi : 10.1038/nrm3330 (cf. p. 40, 41).

[68] Sarah C. Baumgarten et al. « IGF1R Signaling Is Necessary for FSH-Induced Activation of AKT and Differentiation of Human Cumulus Granulosa Cells ». In : *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99.8 (août 2014), p. 2995-3004. issn : 1945-7197. doi : 10.1210/jc.2014-1139 (cf. p. 41).

[69] Pradeep Reddy et al. « Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the Primordial Follicle Pool ». In : *Science* 319.5863 (fév. 2008), p. 611-613. issn : 1095-9203. doi : 10.1126/science.1152257 (cf. p. 41).

[70] Pascal Adam et al. « The roles of AKT isoforms in decidualization and embryo implantation using a Progesterone Receptor-Cre mouse model ». In : *Biology of Reproduction* 112.6 (mars 2025), p. 1134-1147. issn : 1529-7268. doi : 10.1093/biolre/ioaf062 (cf. p. 41).

[71] G.L. Mutter et al. « Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. » In : *J Natl Cancer Inst.* 92 (2000) (cf. p. 41, 99).

[72] François Fabi et Eric Asselin. « Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus ». In : *REPRODUCTION* 148.5 (nov. 2014), R85-R95. issn : 1741-7899. doi : 10.1530/rep-14-0270 (cf. p. 41).

[73] Lydia W.T. Cheung et al. « High Frequency of PIK3R1 and PIK3R2 Mutations in Endometrial Cancer Elucidates a Novel Mechanism for Regulation of PTEN Protein Stability ». In : *Cancer Discovery* 1.2 (juill. 2011), p. 170-185. ISSN : 2159-8290. DOI : 10.1158/2159-8290.cd-11-0039 (cf. p. 41).

[74] Nikhil Hebbar, Chi Wang et Vivek M. Rangnekar. « Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor Par-4 ». In : *Journal of Cellular Physiology* 227.12 (août 2012), p. 3715-3721. ISSN : 1097-4652. DOI : 10.1002/jcp.24098 (cf. p. 41-44).

[75] Tweeny R. Kau, Jeffrey C. Way et Pamela A. Silver. « Nuclear transport and cancer : from mechanism to intervention ». In : *Nature Reviews Cancer* 4.2 (fév. 2004), p. 106-117. ISSN : 1474-1768. DOI : 10.1038/nrc1274 (cf. p. 41, 42, 45, 46).

[76] Robert A. Campbell et al. « Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated Activation of Estrogen Receptor α ». In : *Journal of Biological Chemistry* 276.13 (mars 2001), p. 9817-9824. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.m010840200 (cf. p. 41).

[77] Jennifer M. Spangle et Karl Münger. « The Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein Activates mTORC1 Signaling and Increases Protein Synthesis ». In : *Journal of Virology* 84.18 (sept. 2010), p. 9398-9407. ISSN : 1098-5514. DOI : 10.1128/jvi.00974-10 (cf. p. 41).

[78] Keng Boon Wee et Baltazar D. Aguda. « Akt versus p53 in a Network of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes Regulating Cell Survival and Death ». In : *Biophysical Journal* 91.3 (août 2006), p. 857-865. ISSN : 0006-3495. DOI : 10.1529/biophysj.105.077693 (cf. p. 42).

[79] Jing Xu et al. « An effective AKT inhibitor-PARP inhibitor combination therapy for recurrent ovarian cancer ». In : *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 89.5 (avr. 2022), p. 683-695. ISSN : 1432-0843. DOI : 10.1007/s00280-022-04403-9 (cf. p. 42).

[80] Kenji Tamura et al. « Safety and tolerability of AZD5363 in Japanese patients with advanced solid tumors ». In : *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 77.4 (mars 2016), p. 787-795. ISSN : 1432-0843. DOI : 10.1007/s00280-016-2987-9 (cf. p. 45, 46).

[81] R. Yi et al. « Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs ». In : *Genes & Development* 17.24 (2003), p. 3011-3016. DOI : 10.1101/gad.1158803 (cf. p. 45).

[82] Vinod Vijay Subhash et al. « Anti-tumor efficacy of Selinexor (KPT-330) in gastric cancer is dependent on nuclear accumulation of p53 tumor suppressor ». In : *Scientific Reports* 8.1 (août 2018). ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-018-30686-1 (cf. p. 45, 247).

[83] J. M. Stommel. « A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain : regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking ». In : *The EMBO Journal* 18.6 (mars 1999), p. 1660-1672. issn : 1460-2075. doi : 10.1093/emboj/18.6.1660 (cf. p. 45).

[84] Aurelia Noske et al. « Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer ». In : *Cancer* 112.8 (fév. 2008), p. 1733-1743. issn : 1097-0142. doi : 10.1002/cncr.23354 (cf. p. 45).

[85] A Srivastava, A Gupta et S. Patidar. « Review of biomarker systems as an alternative for early diagnosis of ovarian carcinoma ». In : *Clin Transl Oncol* (oct. 2021). doi : 10.1007/s12094-021-02604-x (cf. p. 48, 56, 57).

[86] K. Hatano Y.and Hatano et al. « Comprehensive Review of Ovarian Serous Carcinoma ». In : *Advances in anatomic pathology* 26.5 (sept. 2019), p. 329-339. doi : 10.1097/PAP.0000000000000243 (cf. p. 48-50, 52, 56).

[87] P. Gaona-Luviano, L. A. Medina-Gaona et K. Magaña-Pérez. « Epidemiology of ovarian cancer ». In : *Chinese clinical oncology* 4.47 (août 2020). doi : 10.21037/cco-20-34 (cf. p. 48, 55).

[88] P. Morice, S. Gouy et A. Leary. « Mucinous Ovarian Carcinoma. » In : *The New England journal of medicine* 13.380 (mars 2019). doi : 10.1056/NEJMra1813254 (cf. p. 48, 50-55).

[89] M Métairie et al. « Suggested Modification to FIGO Stage IV Epithelial Ovarian Cancer ». In : *Cancers* 15.3 (2023). doi : 10.3390/cancers15030706 (cf. p. 48).

[90] S. Javadi et al. « Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging ». In : *American journal of roentgenology* 206.6 (juin 2016), p. 1351-1360. doi : 10.2214/AJR.15.15199 (cf. p. 48).

[91] M. Köbel et E. Y. Kang. « The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification ». In : *Cancers* 14.2 (jan. 2022). doi : 10.3390/cancers14020416 (cf. p. 49, 50, 52).

[92] T. R. Soong et al. « Frontiers in the Pathology and Pathogenesis of Ovarian Cancer : Cancer Precursors and "Precursor Escape" ». In : *Hematology/oncology clinics of North America* 32.6 (déc. 2018), p. 915-928. doi : 10.1016/j.hoc.2018.07.013 (cf. p. 49-52, 56).

[93] M. F. Fathalla. « Incessant ovulation–a factor in ovarian neoplasia ? » In : *Lancet (London, England)* 2 (juill. 1971). doi : 10.1016/s0140-6736(71)92335-x (cf. p. 49, 51, 52).

[94] Robert J. Kurman et Ie-Ming Shih. « The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer : A Proposed Unifying Theory ». In : *American Journal of Surgical Pathology* 34.3 (mars 2010), p. 433-443. issn : 0147-5185. doi : 10.1097/pas.0b013e3181cf3d79. url : http://dx.doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79 (cf. p. 49).

[95] A De Leo et al. « What Is New on Ovarian Carcinoma : Integrated Morphologic and Molecular Analysis Following the New 2020 World Health Organization Classification of Female Genital Tumors ». In : *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 11.4 (avr. 2021), p. 697. doi : 10.3390/diagnostics11040697 (cf. p. 50-52).

[96] D.N. Church et al. « Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer ». In : *Journal of the National Cancer Institute* 107.1 (déc. 2014). doi : 10.1093/jnci/dju402 (cf. p. 50-52, 82).

[97] WG McCluggage. « Progress in the pathological arena of gynecological cancers ». In : *Int J Gynaecol Obstet* 155 (oct. 2021). doi : 10.1002/ijgo.13871 (cf. p. 50, 52).

[98] G. Santandrea et al. « Immunohistochemical Biomarkers as a Surrogate of Molecular Analysis in Ovarian Carcinomas : A Review of the Literature ». In : *Diagnostics* 11.2 (jan. 2021). doi : 10.3390/diagnostics110201992 (cf. p. 50-52).

[99] Y. Wu et al. « Clinical application of PARP inhibitors in ovarian cancer : from molecular mechanisms to the current status ». In : *Journal of ovarian research* 16 (jan. 2023). doi : 10.1186/s13048-023-01094-5 (cf. p. 50, 52).

[100] S. Kulkarni et al. « PARP inhibitors in ovarian cancer : Mechanisms of resistance and implications to therapy ». In : *DNA repair* 149 (mai 2025). doi : 10.1016/j.dnarep.2025.103830 (cf. p. 50, 52).

[101] I. Colombo et al. « Chasing Immune Checkpoint Inhibitors in Ovarian Cancer : Novel Combinations and Biomarker Discovery ». In : *Cancers* 15 (juin 2023). doi : 10.3390/cancers15123220 (cf. p. 50, 52).

[102] S.L. Gaillard, A. A. Secord et B. Monk. « The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer ». In : *Gynecologic oncology research and practice* 3 (nov. 2016). doi : 10.1186/s40661-016-0033-6 (cf. p. 50, 52).

[103] D. L. Richardson. « New and Novel Therapies for Gynecologic Cancers ». In : *Seminars in oncology nursing* 35 (avr. 2019). doi : 10.1016/j.soncn.2019.02.009 (cf. p. 51, 52).

[104] M.L. Torres et al. « Nutritional status, CT body composition measures and survival in ovarian cancer ». In : *Gynecologic oncology* 129 (juin 2013). doi : 10.1016/j.ygyno.2013.03.003 (cf. p. 51, 52).

[105] C. Evrard et J. Alexandre. « Predictive and Prognostic Value of Microsatellite Instability in Gynecologic Cancer (Endometrial and Ovarian) ». In : *Cancers* 13 (mai 2021). doi : 10.3390/cancers13102434. (cf. p. 51).

[106] T Bosse, NT ter Haar et LM Seeber. « Loss of ARID1A expression and its relationship with PI3K-Akt pathway alterations, TP53 and microsatellite instability in endometrial cancer. » In : *Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology* 26 (nov. 2013). doi : 10.1038/modpathol.2013.9. (cf. p. 51, 52).

[107] R.L. Chandler et al. « Coexistent ARID1A-PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling ». In : *Nature communications* 06 (jan. 2015). doi : 10.1038/ncomms7118 (cf. p. 51, 52).

[108] C.Y. Chen et al. « Increased circulating endothelial progenitor cells and improved short-term outcomes in acute non-cardioembolic stroke after hyperbaric oxygen therapy ». In : *Journal of translational medicine* 16 (sept. 2018). doi : 10.1186/s12967-018-1629-x (cf. p. 51, 52).

[109] K.M. Kinross et al. « In vivo activity of combined PI3K/mTOR and MEK inhibition in a Kras(G12D),Pten deletion mouse model of ovarian cancer ». In : *Molecular cancer therapeutics* 10 (août 2011). doi : 10.1158/1535-7163.MCT-11-0240 (cf. p. 52).

[110] F. Meric-Bernstam et al. « Efficacy and Safety of Trastuzumab Deruxtecan in Patients With HER2-Expressing Solid Tumors : Primary Results From the DESTINY-PanTumor02 Phase II Trial ». In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 42 (jan. 2024). doi : 10.1200/JCO.23.02005. (cf. p. 52).

[111] L.D. Goyal, B. Kaur et R.K. Badyal. « Malignant Mixed Germ Cell Tumors of the Ovary : A Series of Rare Cases ». In : *Journal of reproduction & infertility* 20 (déc. 2019), p. 231-236 (cf. p. 52, 53).

[112] L. Kunstmann et P. Fénichel. « Goitre ovarien : une forme particulière de tératome de l'ovaire ». In : *Gynecologie, obstetrique & fertilite* 35 (jan. 2007). doi : 10.1016/j.gyobfe.2006.10.030. (cf. p. 53).

[113] J.J. Low, A. Ilancheran et J.S. Ng. « Malignant ovarian germ-cell tumours ». In : *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 26 (juin 2012). doi : 10.1016/j.bpobgyn.2012.01.002. (cf. p. 53).

[114] C. Even et al. « Tumeurs du sac vitellin de l'ovaire : revue de la littérature ». In : *Bulletin du cancer* 98 (août 2011). doi : 10.1684/bdc.2011.1387. (cf. p. 53).

[115] P. Yen et al. « Ovarian fibromas and fibrothecomas : sonographic correlation with computed tomography and magnetic resonance imaging : a 5-year single-institution experience. » In : *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* 32 (jan. 2013). doi : 10.7863/jum.2013.32.1.13. (cf. p. 54, 55).

[116] I. Okada et al. « Ovarian thecoma associated in the first trimester of pregnancy ». In : *The journal of obstetrics and gynaecology research* 30 (oct. 2004). doi : 10.1111/j.1447-0756.2004.00212.x. (cf. p. 54, 55).

[117] M. Horta et T. M. Cunha. « Sex cord-stromal tumors of the ovary : a comprehensive review and update for radiologists. » In : *Diagnostic and interventional radiology (Ankara, Turkey)* 21 (août 2015). doi : 10.5152/dir.2015.34414. (cf. p. 54, 55).

[118] S. Javadi et al. « Comprehensive review of imaging features of sex cord-stromal tumors of the ovary. » In : *Abdominal radiology (New York)* 46 (avr. 2021). doi : 10.1007/s00261-021-02998-w. (cf. p. 54, 55).

[119] L. D. Goyal et al. « Fibrothecoma/Fibroma of ovary-rare ovarian tumors with varied presentation and different modes of management : 14 years' experience from tertiary care hospitals. » In : *Journal of cancer research and therapeutics* 21 (avr. 2025). doi : 10.4103/jcrt.jcrt_66_25. (cf. p. 54, 55).

[120] H. Chen et al. « Ovarian thecoma-fibroma groups : clinical and sonographic features with pathological comparison. » In : *Journal of ovarian research* 9 (nov. 2016). doi : 10.1186/s13048-016-0291-2. (cf. p. 54, 55).

[121] J. A. Fletcher et al. « Ovarian granulosa-stromal cell tumors are characterized by trisomy 12 ». In : *The American journal of pathology* 138 (mars 1991), p. 515-520 (cf. p. 54, 55).

[122] Shafeek Shamsudeen et Charles J Dunton. « Granulosa theca cell tumors of the ovary ». In : *StatPearls*. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, jan. 2025 (cf. p. 54, 55).

[123] *gp*. Accessed on Sept 08, 2025. 2018. url : https://gpnotebook.com/fr/pages/gynecologie/tumeurs-stromales-du-cordon-sexuel/caracteristiques (cf. p. 54, 55).

[124] *MEDcell*. Accessed on Sept 08, 2025. 2025. url : https://medcell.org/tbl/female_and_male_reproductive_systems/reading.php (cf. p. 54).

[125] L. de Kock et al. « DICER1 Mutations Are Consistently Present in Moderately and Poorly Differentiated Sertoli-Leydig Cell Tumors. » In : *The American journal of surgical pathology* 41 (sept. 2017). DOI : 10.1097/PAS.0000000000000895. (cf. p. 54).

[126] Y. Durmuş et al. « Sertoli-Leydig cell tumor of the ovary : Analysis of a single institution database and review of the literature. » In : *The journal of obstetrics and gynaecology research* 45 (juill. 2019). DOI : doi:10.1111/jog.13977 (cf. p. 54).

[127] T. Gui et al. « A clinicopathological analysis of 40 cases of ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. » In : *Gynecologic oncology* 127 (nov. 2012). DOI : 10.1016/j.ygyno.2012.07.114. (cf. p. 54).

[128] K. A. P. Schultz et al. « DICER1-related Sertoli-Leydig cell tumor and gynandroblastoma : Clinical and genetic findings from the International Ovarian and Testicular Stromal Tumor Registry. » In : *Gynecologic oncology* 147 (déc. 2017). DOI : doi:10.1016/j.ygyno.2017.09.034. (cf. p. 54).

[129] G. Garg et al. « Ovarian and uterine carcinosarcomas : a comparative analysis of prognostic variables and survival outcomes. » In : *Gynecological Cancer Society* 20 (juill. 2010). DOI : 10.1111/IGC.0b013e3181dc8292 (cf. p. 55, 56).

[130] J. Zheng et al. « Carcinosarcoma of the ovary : a case report and literature review. » In : *Frontiers in oncology* 13 (oct. 2023). DOI : 10.3389/fonc.2023.1278300. (cf. p. 55, 56).

[131] H. I. Ha et al. « Incidence and treatment outcomes of ovarian carcinosarcoma from the national cancer registry of Korea. » In : *Journal of gynecologic oncology* 35 (jan. 2024). DOI : 10.3802/jgo.2024.35.e31. (cf. p. 55, 56).

[132] S. Jordan et al. « Patterns of chemotherapy treatment for women with invasive epithelial ovarian cancer–a population-based study. » In : *Gynecologic oncology* 129 (mai 2013). DOI : 10.1016/j.ygyno.2013.02.007. (cf. p. 55, 56).

[133] Sood Anil K. et al. « Primary ovarian sarcoma : Analysis of prognostic variables and the role of surgical cytoreduction. » In : *Cancer* 82 (mai 1998). DOI : 10.1002/(SICI)1097-0142(19980501)82:9<1738::AID-CNCR21>3.0.CO;2-4 (cf. p. 55, 56).

[134] A. Nowicki et al. « Ovarian Cancer and Cancer Stem Cells-Cellular and Molecular Characteristics, Signaling Pathways, and Usefulness as a Diagnostic Tool in Medicine and Oncology. » In : *Cancers* 13 (août 2021). DOI : 10.3390/cancers13164178. (cf. p. 55, 56).

[135] D. H. Suh et al. « Incidence and treatment outcomes of uterine cervical cancer in Korea 1999-2018 from the national cancer registry. » In : *Journal of gynecologic oncology* 34 (jan. 2023). DOI : 10.3802/jgo.2023.34.e39 (cf. p. 56).

[136] NIH. *Enhancing Breast and Ovarian Cancer Care : The Discovery of BRCA1 and BRCA2*. Accessed on Sept 08, 2025. 2014. URL : https://www.cancer.gov/research/progress/discovery/brca?utm (cf. p. 56).

[137] Hudson Alpha. *Scientist who Discovered BRCA1 — Inherited Breast and Ovarian Cancer Gene — to Discuss Discovery at HudsonAlpha Tie the Ribbons*. Accessed on Sept 08, 2025. 2014. URL : https://www.hudsonalpha.org/scientist-who-discovered-brca1-inherited-breast-and-ovarian-cancer-gene-to-discuss-discovery-at-hudsonalpha-tie-the-ribbons/ (cf. p. 56).

[138] G. Szakács et al. « Targeting multidrug resistance in cancer. » In : *Nature reviews* 5 (mars 2006). DOI : 10.1038/nrd1984 (cf. p. 57).

[139] A. Gautam et al. « Managing Drug Resistance in Cancer : Role of Cancer Informatics. » In : *Methods in molecular biology* 1395 (2016). DOI : 10.1007/978-1-4939-3347-1_17. (cf. p. 57, 58).

[140] T. and Koltai. « The complex relationship between multiple drug resistance and the tumor pH gradient : a review. » In : *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)* 5 (avr. 2022). DOI : 10.20517/cdr.2021.134. (cf. p. 57).

[141] J. J. Lin et A. T. Shaw. « Targeted Therapies in Lung Cancer ». In : *Trends in cancer* 2 (juill. 2016). DOI : 10.1016/j.trecan.2016.05.010. (cf. p. 57, 58).

[142] G. Kroemer et J. Pouyssegur. « Tumor cell metabolism : cancer's Achilles' heel. » In : *Cancer cell* 13 (juin 2008). DOI : 10.1016/j.ccr.2008.05.005. (cf. p. 58).

[143] J. Bajaj, E. Diaz et T. Reya. « Stem cells in cancer initiation and progression. » In : *The Journal of cell biology* 219 (jan. 2020). DOI : 10.1083/jcb.201911053. (cf. p. 58, 59).

[144] D. Bisht et al. « Protocols for the diagnosis of pig viral diseases. » In : *Springer, US.* (2022). DOI : 0.1007/978-1-0716-2043-4_15 (cf. p. 59).

[145] A. Saburi et al. « A comprehensive survey into the role of microRNAs in ovarian cancer chemoresistance ; an updated overview. » In : *Journal of ovarian research* (juill. 2022). DOI : 10.1186/s13048-022-01012-1 (cf. p. 59-61, 63).

[146] R. A. Gatenby et J. S. Brown. « The Evolution and Ecology of Resistance in Cancer Therapy. » In : *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* (nov. 2020). DOI : 10.1101/cshperspect.a040972 (cf. p. 62).

[147] G. Bogani et al. « Lynch syndrome-related non-endometrioid endometrial cancer : analysis of outcomes. » In : *Gynecological Cancer Society* 30 (jan. 2020). DOI : 10.1136/ijgc-2019-000824 (cf. p. 62).

[148] L. Valle et al. « Genetic predisposition to colorectal cancer : syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. » In : *The Journal of pathology* 247 (avr. 2019). DOI : 10.1002/path.5229. (cf. p. 62).

[149] C. N. Baxevanis, M. Papamichail et S. A. Perez. « Immune classification of colorectal cancer patients : impressive but how complete ? » In : *Expert opinion on biological therapy* 13 (avr. 2013). DOI : 10.1517/14712598.2013.751971. (cf. p. 62).

[150] O. Murcia et al. « Serrated colorectal cancer : Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. » In : *World journal of gastroenterology* 22 (avr. 2016). DOI : 10.3748/wjg.v22.i13.3516. (cf. p. 62).

[151] Pamela N. Munster et al. « Phase I trial of a dual TOR kinase and DNA-PK inhibitor (CC-115) in advanced solid and hematologic cancers. » In : *Journal of Clinical Oncology* 34 (2016). DOI : 10.1200/JCO.2016.34.15. (cf. p. 62, 64, 65).

[152] U. A. Matulonis et al. « Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer : results from the phase II KEYNOTE-100 study. » In : *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (2019). DOI : 10.1093/annonc/mdz135. (cf. p. 62, 64).

[153] Vinayak Shaveta et al. « TOPACIO/Keynote-162 : Niraparib + pembrolizumab in patients (pts) with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC), a phase 2 trial. » In : *Journal of Clinical Oncology* 36 (2018). DOI : 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.1011 (cf. p. 62, 64).

[154] Kovacsovics Tibor et al. « TOPACIO/Keynote-162 : Niraparib + pembrolizumab in patients (pts) with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC), a phase 2 trial. » In : *Journal of Clinical Oncology* 37 (2019). DOI : 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.7001 (cf. p. 62, 64).

[155] John H. Farley et al. « A phase II evaluation of temsirolimus with carboplatin and paclitaxel followed by temsirolimus consolidation in clear cell ovarian cancer : An NRG oncology trial ». In : *Elsevier* 423 (2022). DOI : 10.1016/j.ygyno.2022.10.006 (cf. p. 65).

[156] S. E. Taylor et al. « Phase II study of everolimus and bevacizumab in recurrent ovarian, peritoneal, and fallopian tube cancer. » In : *Gynecologic oncology* 156 (2019). DOI : 10.1016/j.ygyno.2019.10.029. (cf. p. 65).

[157] S. N. Westin et al. « Phase Ib Dose Expansion and Translational Analyses of Olaparib in Combination with Capivasertib in Recurrent Endometrial, Triple-Negative Breast, and Ovarian Cancer. » In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 27 (2021). doi : 10.1158/1078-0432.CCR-21-1656. (cf. p. 65).

[158] Elizabeth K. Lee et al. « Results of an abbreviated phase II study of AKT inhibitor MK-2206 in the treatment of recurrent platinum-resistant high grade serous ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma (NCT 01283035) ». In : *Gynecologic Oncology Reports* 32 (2020). doi : 10.1016/j.gore.2020.100546 (cf. p. 65).

[159] A. W. Tolcher et al. « Phase I dose-escalation trial of the oral AKT inhibitor uprosertib in combination with the oral MEK1/MEK2 inhibitor trametinib in patients with solid tumors. » In : *Cancer chemotherapy and pharmacology* 85 (2020). doi : 10.1007/s00280-020-04038-8. (cf. p. 65).

[160] Léa-Isabelle Renaud et al. « Endometrial cancer : from clinical reality to molecular treatment ». In : *Discover Oncology* 16.1 (oct. 2025). issn : 2730-6011. doi : 10.1007/s12672-025-03652-3 (cf. p. 66, 254).

[161] International Agency for research on cancer. *Iarc*. Accessed on Sept 20, 2025. 2025. url : https://www.iarc.who.int/cancer-type/endometrial-cancer/ (cf. p. 66, 68).

[162] American cancer society. *ACS*. Accessed on Sept 20, 2025. 2025. url : https://www.cancer.org/cancer/types/endometrial-cancer.html (cf. p. 66, 68, 78).

[163] Société canadienne du cancer. *SCC*. Accessed on Sept 20, 2025. 2025. url : https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/uterine/what-is-uterine-cancer/endometrial-carcinoma (cf. p. 66, 68).

[164] National cancer institute. *NIH3*. Accessed on Sept 20, 2025. 2025. url : https://www.cancer.gov/types/uterine/patient/endometrial-treatment-pdq (cf. p. 66, 69).

[165] National cancer institute. *NIHstat*. Accessed on Sept 20, 2025. 2025. url : https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html (cf. p. 66, 69).

[166] C. Zhang et al. « Primary squamous cell carcinoma of the endometrium in a woman of perimenopausal age : A case report. » In : *Medicine.* 97 (2018). doi : 10.1097/MD.0000000000013418 (cf. p. 66, 69).

[167] D. W. Bell et L. H. Ellenson. « Molecular Genetics of Endometrial Carcinoma. » In : *Annual review of pathology.* 14 (2019). doi : 10.1146/annurev-pathol-020117-043609 (cf. p. 67, 82).

[168] S. Hutt et al. « The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia : a literature review. » In : *Acta oncologica (Stockholm, Sweden).* 58 (2019). DOI : 10.1080/0284186X.2018.1540886 (cf. p. 67, 83).

[169] T. Patra et al. « Akt inhibitor augments anti-proliferative efficacy of a dual mTORC1/2 inhibitor by FOXO3a activation in p53 mutated hepatocarcinoma cells. » In : *Cell death & disease.* 12 (2021). DOI : 10.1038/s41419-021-04371-7 (cf. p. 67).

[170] E. Stelloo et al. « Improved Risk Assessment by Integrating Molecular and Clinicopathological Factors in Early-stage Endometrial Cancer-Combined Analysis of the PORTEC Cohorts. » In : *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 22 (2016). DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-15-2878 (cf. p. 67, 71, 75).

[171] L. J. Hernández Borrero et W. S. El-Deiry. « Tumor suppressor p53 : Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. » In : *Reviews on cancer.* 1876 (2021). DOI : 10.1016/j.bbcan.2021.188556 (cf. p. 67, 71, 72).

[172] C. Toumpeki et al. « The Role of ARID1A in Endometrial Cancer and the Molecular Pathways Associated With Pathogenesis and Cancer Progression. » In : *In vivo (Athens, Greece)* 33 (2019). DOI : 10.21873/invivo.11524 (cf. p. 67, 71, 77).

[173] B. Konopka et al. « PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrial carcinomas : relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors. » In : *Human pathology* 42 (2011). DOI : 10.1016/j.humpath.2010.01.030. (cf. p. 67, 72).

[174] H.J. Kim et al. « Oncogenic KRAS : Signaling and Drug Resistance. » In : *Cancers* 13 (2021). DOI : 10.3390/cancers13225599. (cf. p. 68, 72).

[175] J. Liu et al. « Wnt/β-catenin signalling : function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. » In : *Signal transduction and targeted therapy* 7 (2022). DOI : 10.1038/s41392-021-00762-6. (cf. p. 68, 73, 76).

[176] G. Dixit et al. « FGFR2 mutations promote endometrial cancer progression through dual engagement of EGFR and Notch signalling pathways. » In : *Clinical and translational medicine* 13 (2023). DOI : 10.1002/ctm2.1223. (cf. p. 68, 73, 76).

[177] Y. Liu et al. « Pan-cancer analysis on the role of PIK3R1 and PIK3R2 in human tumors. » In : *Scientific reports* 12 (2022). DOI : 10.1038/s41598-022-09889-0. (cf. p. 68).

[178] D. Haesen et al. « Recurrent PPP2R1A Mutations in Uterine Cancer Act through a Dominant-Negative Mechanism to Promote Malignant Cell Growth. » In : *Cancer research* 76 (2016). doi : 10.1158/0008-5472.CAN-15-3342. (cf. p. 68, 73, 76).

[179] D. Caserta et al. « Endocrine Disruptors and Endometrial Cancer : Molecular Mechanisms of Action and Clinical Implications, a Systematic Review. » In : *International journal of molecular sciences* 23 (2022). doi : 10.3390/ijms23062956. (cf. p. 69, 70).

[180] M.S. Islam et al. « Selective Progesterone Receptor Modulators-Mechanisms and Therapeutic Utility. » In : *Endocrine reviews* 41 (2020). doi : 10.1210/endrev/bnaa012. (cf. p. 70).

[181] A.J. O'Hara et D.W. Bell. « The genomics and genetics of endometrial cancer. » In : *Advances in genomics and genetics* 2012 (2012). doi : 10.2147/AGG.S28953. (cf. p. 70, 71, 78).

[182] T. Okuda et al. « Genetics of endometrial cancers. » In : *Obstetrics and gynecology international* 2010 (2010). doi : 10.1155/2010/984013. (cf. p. 71, 78).

[183] R.A. Brooks et al. « Current recommendations and recent progress in endometrial cancer. » In : *CA : a cancer journal for clinicians* 69 (2019). doi : 10.3322/caac.21561. (cf. p. 71).

[184] M. Mallozzi et al. « Endocrine Disrupting Chemicals and Endometrial Cancer : An Overview of Recent Laboratory Evidence and Epidemiological Studies. » In : *International journal of environmental research and public health* 14 (2017). doi : 10.3390/ijerph14030334. (cf. p. 71, 78, 79).

[185] National library of medicine. *ERBB2*. Accessed on Sept 23, 2025. 2025. url : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Cmd=DetailsSearch&Term=2064 (cf. p. 71, 73, 74, 76).

[186] K.C. Kurnit, S.N. Westin et R.L. Coleman. « Microsatellite instability in endometrial cancer : New purpose for an old test. » In : *Cancer* 125 (2019). doi : 10.1002/cncr.32058. (cf. p. 72-74, 76).

[187] N.A.J. Ryan et al. « The proportion of endometrial cancers associated with Lynch syndrome : a systematic review of the literature and meta-analysis. » In : *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.* 21 (2019). doi : 10.1038/s41436-019-0536-8. (cf. p. 73, 74, 76).

[188] K.A. Kilowski et al. « KRAS mutations in endometrial cancers : Possible prognostic and treatment implications. » In : *Gynecologic oncology.* 191 (2024). doi : 10.1016/j.ygyno.2024.10.026 (cf. p. 74, 76).

[189] S.F. Lax et al. « The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma : evidence of distinct molecular genetic pathways. » In : *Cancer.* 88 (2000). doi : 10.1016/j.ygyno.2024.10.026 (cf. p. 74, 76).

[190] A. Dutt et al. « Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. » In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105 (2008). doi : 10.1073/pnas.0803379105. (cf. p. 74, 75, 91).

[191] T. Pal, J. Permuth-Wey et T.A. Sellers. « A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. » In : *Cancer.* 113 (2008). doi : 10.1002/cncr.23601. (cf. p. 75).

[192] M. Mac Partlin et al. « Interactions of the DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 with c-MYC and MAX. » In : *Oncogene.* 22 (2003). doi : 10.1038/sj.onc.1206252. (cf. p. 75, 76).

[193] J.M. van Oers et al. « PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance. » In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107 (2010). doi : 10.1073/pnas.1008589107. (cf. p. 75, 76).

[194] K.C. Kurnit et al. « CTNNB1 (beta-catenin) mutation identifies low grade, early stage endometrial cancer patients at increased risk of recurrence. » In : *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 30 (2017). doi : 10.1038/modpathol.2017.15. (cf. p. 75).

[195] G. Moreno-Bueno et al. « Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. » In : *Oncogene.* 21 (2002). doi : 10.1038/sj.onc.1205924. (cf. p. 75, 76).

[196] A. León-Castillo et al. « Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. » In : *The Journal of pathology.* 250 (2020). doi : 10.1002/path.5372. (cf. p. 75, 76, 96, 100).

[197] I. Zighelboim et al. « Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type. » In : *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 25 (2007). doi : 10.1200/JCO.2006.08.2107. (cf. p. 75).

[198] B.M. Slomovitz et R.L. Coleman. « The PI3K/AKT/mTOR Pathway as a Therapeutic Target in Endometrial Cancer. » In : *Clin Cancer Res.* 18 (2012). doi : 10.1158/1078-0432.CCR-12-0662. (cf. p. 76, 91, 97, 99, 100).

[199] K.L. Ring et al. « Endometrial Cancers With Activating KRas Mutations Have Activated Estrogen Signaling and Paradoxical Response to MEK Inhibition. » In : *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 27 (2017). doi : 10.1097/IGC.0000000000000960. (cf. p. 76).

[200] M.L. Parrish, R.R. Broaddus et A.B. Gladden. « Mechanisms of mutant β-catenin in endometrial cancer progression. » In : *Frontiers in oncology.* 12 (2022). doi : 10.3389/fonc.2022.1009345. (cf. p. 77).

[201] J.J. Reske et al. « Co-existing TP53 and ARID1A mutations promote aggressive endometrial tumorigenesis. » In : *PLoS genetics.* 17 (2021). doi : 10.1371/journal.pgen.1009986. (cf. p. 77).

[202] F.M. Carvalho et J.P. Carvalho. « Unraveling the Heterogeneity of Deficiency of Mismatch Repair Proteins in Endometrial Cancer : Predictive Biomarkers and Assessment Challenges. » In : *Cancers.* 16 (2024). doi : 10.3390/cancers16203452. (cf. p. 77).

[203] B.M. Slomovitz et al. « Phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma. » In : *J Clin Oncol.* 33 (2015). doi : 10.1200/JCO.2014.58.3401. (cf. p. 77, 94, 100).

[204] NIH. *PDQ Screening and Prevention Editorial Board.* Sous la dir. de National Cancer Institute (US). Accessed 14 September 2025. 2025. url : https://www.cancer.gov/publications/pdq/editorial-boards/screening-prevention (cf. p. 78, 79).

[205] A.K. Höhn et al. « 2020 WHO Classification of Female Genital Tumors. » In : *Geburtshilfe und Frauenheilkunde.* 81 (2021). doi : 10.1055/a-1545-4279. (cf. p. 78-81).

[206] J.E. Johnson et al. « Risk of endometrial cancer in patients with polycystic ovarian syndrome : A meta-analysis. » In : *Oncology letters.* 25 (2023). doi : 10.3892/ol.2023.13754. (cf. p. 78, 80).

[207] A. Shukla, L.I. Rasquin et C Anastasopoulou. *Polycystic Ovarian Syndrome.* Sous la dir. de Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing. Juill. 2025. url : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459251/ (cf. p. 78).

[208] Y.X. Wang et al. « Endometriosis and uterine fibroids and risk of premature mortality : prospective cohort study. » In : *BMJ (Clinical research ed.)* 387 (2024). doi : 10.1136/bmj-2023-078797. (cf. p. 78, 79, 81).

[209] Nierengarten M.B. « Women with more severe forms of endometriosis have a nearly 10-fold higher risk of ovarian cancer. » In : *Cancer.* 130 (2024). doi : 10.1002/cncr.35595. (cf. p. 79, 81).

[210] S.J. Ledesma-Pacheco et al. « Regulatory mechanisms of microRNAs in endocrine disorders and their therapeutic potential. » In : *Frontiers in genetics.* 14 (2023). doi : 10.3389/fgene.2023.1137017. (cf. p. 79).

[211] C.M. Klinge. « miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. » In : *Molecular and cellular endocrinology.* 418 (2015). doi : 10.1016/j.mce.2015.01.035. (cf. p. 79).

[212] I. Iavarone et al. « MicroRNA Expression in Endometrial Cancer : Current Knowledge and Therapeutic Implications. » In : *Medicina (Kaunas, Lithuania).* 60 (2024). doi : 10.3390/medicina60030486. (cf. p. 79, 80).

[213] F. Chen, M. Zhu et W. Li. « Advances in research on malignant transformation of endometriosis-associated ovarian cancer. » In : *Frontiers in oncology.* 14 (2024). doi : 10.3389/fonc.2024.1475231. (cf. p. 80, 81).

[214] Z.H. Wang et al. « Identification of novel cell glycolysis related gene signature predicting survival in patients with endometrial cancer. » In : *Cancer cell international.* 19 (2019). doi : 10.1186/s12935-019-1001-0. (cf. p. 80).

[215] A. Liu et al. « Identification of novel cell glycolysis related gene signature predicting survival in patients with endometrial cancer. » In : *Journal of cellular biochemistry.* 120 (2019). doi : 10.1002/jcb.29027. (cf. p. 80).

[216] A. Liu et al. « PI3K/AKT/mTOR inhibitors for advanced or recurrent endometrial cancer. » In : *The Cochrane database of systematic reviews.* 10 (2019). doi : 10.1002/14651858.CD012160.pub2. (cf. p. 81, 94).

[217] V.W. Setiawan et al. « Type I and II endometrial cancers : have they different risk factors ?. » In : *J Clin Oncol.* 31 (2013). doi : 10.1200/JCO.2012.48.2596. (cf. p. 81).

[218] D.C. Ding et al. « Association between polycystic ovarian syndrome and endometrial, ovarian, and breast cancer : A population-based cohort study in Taiwan. » In : *Medicine (Baltimore).* 97 (2018). doi : 10.1097/MD.0000000000012608. (cf. p. 81).

[219] J.S. Berek et al. « FIGO staging of endometrial cancer : 2023. » In : *Int J Gynaecol Obstet.* 97 (2023). doi : 10.1002/ijgo.14923. (cf. p. 81).

[220] C.T. Tay et al. « International Evidence-Based Polycystic Ovary Syndrome Guideline Update : Insights From a Systematic Review and Meta-Analysis on Elevated Clinical Cardiovascular Disease in Polycystic Ovary Syndrome. » In : *J Am Heart Assoc.* 13 (2024). doi : 10.1161/JAHA.123.033572. (cf. p. 81).

[221] K.M. Mair, R. Gaw et M.R. MacLean. « Obesity, estrogens and adipose tissue dysfunction - implications for pulmonary arterial hypertension. » In : *Pulm Circ.* 10 (2020). doi : 10.1177/2045894020952023. (cf. p. 81).

[222] M.A. Onstad, R.E. Schmandt et K.H. Lu. « Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. » In : *J Clin Oncol.* 34 (2016). doi : 10.1200/JCO.2016.69.4638. (cf. p. 81).

[223] S. Kommoss et al. « Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. » In : *Ann Oncol.* 29 (2018). doi : 10.1093/annonc/mdy058. (cf. p. 82).

[224] S. Marnitz et al. « A Modern Approach to Endometrial Carcinoma : Will Molecular Classification Improve Precision Medicine in the Future ?. » In : *Cancers (Basel).* 12 (2020). doi : 10.3390/cancers12092577. (cf. p. 82).

[225] American cancer society. *ACS*. Accessed on Sept 24, 2025. 2025. url : https://www.cancer.org/cancer/types/endometrial-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html (cf. p. 83).

[226] I.C. van Gool et al. « POLE Proofreading Mutations Elicit an Antitumor Immune Response in Endometrial Cancer. » In : *Clin Cancer Res.* 21 (2015). doi : 10.1158/1078-0432.CCR-15-0057. (cf. p. 83).

[227] L. Vermij et al. « Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. » In : *Histopathology.* 76 (2020). doi : 10.1111/his.14015. (cf. p. 83).

[228] R.A. Soslow et al. « Endometrial Carcinoma Diagnosis : Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice : Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists. » In : *Int J Gynecol Pathol.* 38 (2019). doi : 10.1097/PGP.0000000000000518. (cf. p. 83).

[229] S. Imboden et al. « Phenotype of POLE-mutated endometrial cancer. » In : *PLoS One.* 14 (2019). doi : 10.1371/journal.pone.0214318. (cf. p. 83).

[230] Société canadienne du cancer. *SCC*. Accessed on Sept 24, 2025. 2025. url : https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/uterine/signs-and-symptoms (cf. p. 83).

[231] N. Colombo et al. « SMO-ESGO-ESTRO Endometrial Consensus Conference Working Group. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer : diagnosis, treatment and follow-up. » In : *Ann Oncol.* 27 (2016). doi : 10.1093/annonc/mdv484. (cf. p. 85).

[232] N. Concin et al. « ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. » In : *Int J Gynecol Cancer.* 1 (2021). doi : 10.1136/ijgc-2020-002230. (cf. p. 85-88, 91, 92, 95, 96, 100).

[233] N. Abu-Rustum et al. « Uterine Neoplasms, Version 1.2023, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. » In : *J Natl Compr Canc Netw.* 21 (2023). doi : 10.6004/jnccn.2023.0006. (cf. p. 85, 88).

[234] M. Ballester et al. « Detection rate and diagnostic accuracy of sentinel-node biopsy in early stage endometrial cancer : a prospective multicentre study (SENTI-ENDO). » In : *Lancet Oncol.* 12 (2011). doi : 10.1016/S1470-2045(11)70070-5. (cf. p. 85).

[235] E.C. Rossi et al. « A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial) : a multicentre, prospective, cohort study. » In : *Lancet Oncol.* 18 (2017). doi : 10.1016/S1470-2045(17)30068-2. (cf. p. 85).

[236] A. Travaglino et al. « Immunohistochemical predictive markers of response to conservative treatment of endometrial hyperplasia and early endometrial cancer : A systematic review. » In : *Acta Obstet Gynecol Scand.* 98 (2019). doi : 10.1111/aogs.13587. (cf. p. 85, 86).

[237] M. Koskas et al. « Progestin treatment of atypical hyperplasia and well-differentiated adenocarcinoma of the endometrium to preserve fertility. » In : *Anticancer Res.* 32 (2012) (cf. p. 85, 86).

[238] Nout R.A. et al. « Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2) : an open-label, non-inferiority, randomised trial. » In : *Lancet.* 375 (2010). doi : 10.1016/S0140-6736(09)62163-2. (cf. p. 86).

[239] S.M. de Boer et al. « PORTEC study group. Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3) : final results of an international, open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. » In : *Lancet Oncol.* 19 (2018). doi : 10.1016/S1470-2045(18)30079-2. (cf. p. 86).

[240] M.E. Randall et al. « Phase III Trial : Adjuvant Pelvic Radiation Therapy Versus Vaginal Brachytherapy Plus Paclitaxel/Carboplatin in High-Intermediate and High-Risk Early Stage Endometrial Cancer. » In : *J Clin Oncol.* 37 (2019). doi : 10.1200/JCO.18.01575. (cf. p. 86).

[241] D.S. Miller et al. « Carboplatin and Paclitaxel for Advanced Endometrial Cancer : Final Overall Survival and Adverse Event Analysis of a Phase III Trial (NRG Oncology/GOG0209). » In : *J Clin Oncol.* 38 (2020). doi : 10.1200/JCO.20.01076. (cf. p. 86, 91).

[242] M. Koskas et al. « Prognostic factors of oncologic and reproductive outcomes in fertility-sparing management of endometrial atypical hyperplasia and adenocarcinoma : systematic review and meta-analysis. » In : *Fertil Steril.* 101 (2014). doi : 10.1016/j.fertnstert.2013.11.028. (cf. p. 86, 87).

[243] A. Raffone et al. « Should progesterone and estrogen receptors be assessed for predicting the response to conservative treatment of endometrial hyperplasia and cancer ? A systematic review and meta-analysis. » In : *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica.* 98 (2019). doi : 10.1111/aogs.13586. (cf. p. 87).

[244] A. Marabelle et al. « Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer : Results From the Phase II KEYNOTE-158. » In : *Study. J Clin Oncol.* 38 (2020). doi : 10.1200/JCO.19.02105. (cf. p. 89, 91, 96, 97, 100).

[245] A. Oaknin et al. « Dostarlimab in advanced/recurrent (AR) mismatch repair deficient/microsatellite instability–high or proficient/stable (dMMR/MSI-H or MMRp/MSS) endometrial cancer (EC) : The GARNET study. » In : *Journal of Clinical Oncology.* 40 (2022). doi : 10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.5509 (cf. p. 89-91).

[246] V. Makker et al. « Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Previously Treated Advanced Endometrial Cancer : Updated Efficacy and Safety From the Randomized Phase III Study 309/KEYNOTE-775. » In : *Clin Oncol.* 41 (2023). doi : 10.1200/JCO.22.02152 (cf. p. 89, 90, 97, 100).

[247] M.R. Mirza et al. « RUBY Investigators. Dostarlimab for Primary Advanced or Recurrent Endometrial Cancer. » In : *N Engl J Med.* 23 (2023). doi : 10.1056/NEJMoa2216334. (cf. p. 90).

[248] A.N. Fader et al. « Randomized Phase II Trial of Carboplatin-Paclitaxel Versus Carboplatin-Paclitaxel-Trastuzumab in Uterine Serous Carcinomas That Overexpress Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neu. » In : *J.Clin Oncol.* 36 (2018). doi : 10.1200/JCO.2017.76.5966. (cf. p. 90, 91, 97, 100).

[249] P. Mur et al. « Role of POLE and POLD1 in familial cancer. » In : *Genet Med.* 22 (2020). doi : 10.1038/s41436-020-0922-2. (cf. p. 92).

[250] P.A. Konstantinopoulos et al. « A Phase II, Two-Stage Study of Letrozole and Abemaciclib in Estrogen Receptor-Positive Recurrent Endometrial Cancer. » In : *J Clin Oncol.* 41 (2023). doi : 10.1200/JCO.22.00628. (cf. p. 92).

[251] My cancer genome. *A Study of DKN-01 as a Monotherapy or in Combination With Paclitaxel in Patients With Recurrent Epithelial Endometrial or Epithelial Ovarian Cancer or Carcinosarcoma.* Accessed on Sept 26, 2025. 2025. url : https://www.mycancergenome.org/content/clinical_trials/NCT03395080/ (cf. p. 92).

[252] J. Yu et al. « Structural model of human PORCN illuminates disease-associated variants and drug-binding sites. » In : *J Cell Sci.* 134 (2021). doi : 10.1242/jcs.259383. (cf. p. 92).

[253] I. Drocaş et al. « VEGF Immunoexpression in Endometrioid Endometrial Carcinomas. » In : *Current health sciences journal.* 48 (2022). doi : 10.12865/CHSJ.48.02.03. (cf. p. 93).

[254] D.L. Zhu et al. « Fibroblast growth factor receptor signaling as therapeutic targets in female reproductive system cancers. » In : *J Cancer.* 11 (2020). doi : 10.7150/jca.44727. (cf. p. 93).

[255] N. and Buza. « HER2 Testing in Endometrial Serous Carcinoma : Time for Standardized Pathology Practice to Meet the Clinical Demand. » In : *Arch Pathol Lab Med.* 145 (2021). DOI : 10.5858/arpa.2020-0207-RA. (cf. p. 93, 94).

[256] M. Sideris et al. « The Role of KRAS in Endometrial Cancer : A Mini-Review. » In : *Anticancer Res.* 39 (2019). DOI : 10.21873/anticanres. (cf. p. 94).

[257] D.A. Fennell et al. « Olaparib maintenance versus placebo monotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (PIN) : A multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. » In : *EClinicalMedicine.* 52 (2022). DOI : 10.1016/j.eclinm.2022.101595. (cf. p. 94).

[258] S. Banerjee et al. « ATARI trial : ATR inhibitor in combination with olaparib in gynecological cancers with ARID1A loss or no loss (ENGOT/GYN1/NCRI). » In : *Int J Gynecol Cancer.* 31 (2021). DOI : 10.1136/ijgc-2021-002973. (cf. p. 94).

[259] R. Murali, R.A. Soslow et B. Weigelt. « Classification of endometrial carcinoma : more than two types. » In : *Lancet Oncol.* 15 (2014). DOI : 10.1016/S1470-2045(13)70591-6. (cf. p. 92).

[260] C. Korch et al. « DNA profiling analysis of endometrial and ovarian cell lines reveals misidentification, redundancy and contamination. » In : *Gynecol Oncol.* 127 (2012). DOI : 10.1016/j.ygyno.2012.06.017. (cf. p. 92).

[261] S. Domcke et al. « Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. » In : *Nat Commun.* 4 (2013). DOI : 10.1038/ncomms3126. (cf. p. 92, 205).

[262] Y. Maru et al. « Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. » In : *Gynecol Oncol.* 154 (2019). DOI : 10.1016/j.ygyno.2019.05.005. (cf. p. 93).

[263] C. Pauli et al. « Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. » In : *Cancer Discov.* 7 (2017). DOI : 10.1158/2159-8290.CD-16-1154. (cf. p. 93).

[264] M. Hidalgo et al. « Patient-derived xenograft models : an emerging platform for translational cancer research. » In : *Cancer Discov.* 4 (2014). DOI : 10.1158/2159-8290. (cf. p. 93).

[265] A.T. Byrne et al. « Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. » In : *Nat Rev Cancer.* 17 (2017). DOI : 10.1038/nrc.2016.140. (cf. p. 94, 96).

[266] J.I. Risinger et al. « PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. » In : *Cancer Res.* 57.21 (1997), p. 4736-4738 (cf. p. 94, 95).

[267] M. Boretto et al. « Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. » In : *Nat Cell Biol.* 21 (2019). doi : 10.1038/s41556-019-0360-z. (cf. p. 95, 103).

[268] J.T. Neal et al. « Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. » In : *Cell.* 175 (2018). doi : 10.1016/j.cell.2018.11.021. (cf. p. 95, 96).

[269] A. Skardal, T. Shupe et A. Atala. « Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling. » In : *Drug Discov Today.* 21 (2016). doi : 10.1016/j.drudis.2016.07.003. (cf. p. 95).

[270] T. Tanaka et al. « Endometrial Cancer Patient-Derived Xenograft Models : A Systematic Review. » In : *Journal of clinical medicine.* 11 (2022). doi : 10.3390/jcm11092606. (cf. p. 103).

[271] Ingber DE. and. « Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. » In : *Nat Rev Genet.* 23 (2022). doi : 10.1038/s41576-022-00466-9. (cf. p. 103).

[272] A.M. Oza et al. « Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer : a trial of the NCIC Clinical Trials Group. » In : *J Clin Oncol.* 29 (2011). doi : 10.1200/JCO.2010.34.1578. (cf. p. 95).

[273] A. León-Castillo et al. « TransPORTEC consortium. Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer : Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy. » In : *J Clin Oncol.* 38 (2020). doi : 10.1200/JCO.20.00549. (cf. p. 96, 100).

[274] I. Martincorena et al. « Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. » In : *Cell.* 171 (2017). doi : 10.1016/j.cell.2017.09.042. (cf. p. 97, 100).

[275] W. Bulten et al. « Automated deep-learning system for Gleason grading of prostate cancer using biopsies : a diagnostic study. » In : *Lancet Oncol.* 21 (2020). doi : 10.1016/S1470-2045(19)30739-9. (cf. p. 97, 100).

[276] The Cancer Genome Atlas Research Network. « The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. » In : *Nat Genet.* 45 (2013). doi : 10.1038/ng.2764. (cf. p. 98, 100).

[277] Kyung H Yi et Josh Lauring. « Recurrent AKT mutations in human cancers : functional consequences and effects on drug sensitivity. » In : *Oncotarget* 7 (2016). doi : 10.18632/oncotarget.6648. (cf. p. 98).

[278] OncoKB. *AKT1E17K.* Accessed on Sept 29, 2025. 2025. url : https://www.oncokb.org/gene/AKT1/E17K/Endometrial%20Cancer (cf. p. 98).

[279] A. Bellacosa et al. « Activation of AKT kinases in cancer : implications for therapeutic targeting. » In : *Adv Cancer Res.* 94 (2005). doi : 10.1016/S0065-230X(05)94002-5. (cf. p. 98).

[280] Kaname Nakatani et al. « Up-regulation of Akt3 in Estrogen Receptor-deficient Breast Cancers and Androgen-independent Prostate Cancer Lines ». In : *Journal of Biological Chemistry* 274.31 (juill. 1999), p. 21528-21532. issn : 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.274.31.21528 (cf. p. 99).

[281] Léa-Isabelle Renaud, Kelliane Béland et Eric Asselin. « Video microscopy : an old story with a bright biological future ». In : *BioMedical Engineering OnLine* 24.1 (avr. 2025), p. 44. issn : 1475-925X. doi : 10.1186/s12938-025-01375-8 (cf. p. 105).

[282] A.A. Mandawala et al. « Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling : Towards a general characterisation of embryogenesis ». In : *Animal Reproduction Science* 174 (nov. 2016), p. 2-10. issn : 0378-4320. doi : 10.1016/j.anireprosci.2016.09.015 (cf. p. 105-107, 112).

[283] Christine Terryn et al. « Video-microscopic imaging of cell spatio-temporal dispersion and migration ». In : *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 69.2 (2009), p. 144-152. issn : 1040-8428. doi : https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.06.005 (cf. p. 105, 106).

[284] WJ Croft. *Under the microscope : a brief history of microscopy.* Hackensack, NJ : World Scientific, 2006 (cf. p. 105-107).

[285] Science Learning Hub. *History of microscopy – timeline.* Accessed on Sept 11, 2025. 2014. url : https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1692-history-of-microscopy-timeline (cf. p. 105).

[286] A.J. Wollman et al. « From Animaculum to single molecules : 300 years of the light microscope. » In : *Open Biology* 5 (2015). doi : 10.1098/rsob.150019. (cf. p. 105, 107).

[287] Oliver Trevelyan. *What is Microscopy ?* Accessed on Sept 11, 2025. 2021. url : https://www.azolifesciences.com/article/What-is-Microscopy.aspx (cf. p. 105, 107).

[288] B.R. Masters. « History of the optical microscope in cell biology and medicine. » In : *Encyclopedie Life Sciences* (2008). doi : 10.1002/9780470015902.a0003082 (cf. p. 105, 107).

[289] N. Lane. « The unseen world : reflections on Leeuwenhoek (1677) Concerning little animals. » In : *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* (2015). doi : 10.1098/rstb.2014.0344. (cf. p. 105, 107).

[290] W. Wimmer. « Carl Zeiss, Ernst Abbe, and advances in the light microscope. » In : *Microscopy Today.* 25 (2017). doi : 10.1017/s155192951700058x (cf. p. 105, 107, 108).

[291] Yolanda Smith. Accessed on Sept 11, 2025. 2017. URL : https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-the-Electron-Microscope.aspx (cf. p. 105, 107).

[292] Z. Yin, T. Kanade et M. Chen. « Carl Zeiss, Ernst Abbe, and advances in the light microscope.Understanding the phase contrast optics to restore artifact-free microscopy images for segmentation. » In : *Med Image Anal.* 16 (2012). DOI : 10.1016/j.media.2011.12.006. (cf. p. 105, 107).

[293] The Editors of Encyclopædia Britannica. *cable television*. Accessed 14 September 2025. URL : https://www.britannica.com/technology/cable-television (cf. p. 105, 107).

[294] S Inoué et al. « Video microscopy. » In : *New York : Springer Science and Business Media* (1986). DOI : 10.1007/978-1-4757-6925-8. (cf. p. 105, 107, 109).

[295] K Chrzanowski. « Review of night vision technology. » In : *Opto Electr Rev.* (2013). DOI : 10.2478/s11772-013-0089-3. (cf. p. 105, 107).

[296] L. Zech. « TV-contrast enhancement methods for chromosome analysis. » In : *Technical advances in biomedical physics. Dordrecht : Springer* 6 (1984) (cf. p. 105, 107).

[297] A. Khouani et al. « Automated recognition of white blood cells using deep learning. » In : *Reprod Biomed Online.* 10 (2020). DOI : 10.1007/s13534-020-00168-3. (cf. p. 105).

[298] Romualdo Sciorio et Marcos Meseguer. « Focus on time-lapse analysis : blastocyst collapse and morphometric assessment as new features of embryo viability ». In : *Reproductive BioMedicine Online* 43.5 (2021), p. 821-832. ISSN : 1472-6483. DOI : https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.08.008 (cf. p. 106, 110, 112).

[299] Sartorius. *Live-Cell Analysis Instruments*. Accessed on Sept 11, 2025. 2020. URL : https://www.sartorius.com/en/products/live-cell-imaging-analysis/live-cell-analysis-instruments (cf. p. 106, 110, 112).

[300] T. Li. « Methods And Protocols For Live Imaging In Development. » In : *Journal of visualized experiments : JoVE* 191 (2023). DOI : 10.3791/64642 (cf. p. 106, 111).

[301] M. Okabe et al. « An approach for live imaging of first cleavage in mouse embryos using fluorescent chemical probes for DNA, microtubules, and microfilaments. » In : *Reproductive medicine and biology.* 22 (2023). DOI : 10.1002/rmb2.12551. (cf. p. 106, 112).

[302] J.T Lima, A.J. Pereira et J.G. Ferreira. « The LINC complex ensures accurate centrosome positioning during prophase. » In : *Sci Alli* (2024). DOI : 10.26508/lsa.202302404. (cf. p. 106, 112).

[303] A. Ryoko et al. « StayGold variants for molecular fusion and membrane-targeting applications ». In : *Nature methods* 21 (2024). doi : 10.1038/s41592-023-02085-6. (cf. p. 106).

[304] J. Klein et al. « TLM-Tracker : software for cell segmentation, tracking and lineage analysis in time-lapse microscopy movies ». In : *Bioinformatics* 28 (2012). doi : 10.1093/bioinformatics/bts424 (cf. p. 106).

[305] Y.G. Santin et al. « Author Correction : Lifecycle of a predatory bacterium vampirizing its prey through the cell envelope and S-layer. » In : *Nature communications* 16 (2025). doi : 10.1038/s41467-025-58758-7 (cf. p. 106, 113).

[306] N. Nafee et al. « Enzyme-Linked Lipid Nanocarriers for Coping Pseudomonal Pulmonary Infection. Would Nanocarriers Complement Biofilm Disruption or Pave Its Road ?. » In : *International journal of nanomedicine* 19 (2024). doi : 10.2147/IJN.S445955 (cf. p. 106, 113, 114).

[307] Q. Jiang et al. « CancerCellTracker : a brightfield time-lapse microscopy framework for cancer drug sensitivity estimation. » In : *Bioinformatics (Oxford, England)* 38 (2022). doi : 10.1093/bioinformatics/btac417. (cf. p. 106, 113).

[308] Z. Kan et T.J. Liu. « Video microscopy of tumor metastasis : using the green fluorescent protein (GFP) gene as a cancer-cell-labeling system. » In : *Clin Exp Metast.* 17 (1999). doi : 10.1023/A:1026478105365. (cf. p. 106, 113).

[309] M.H.S. Deurloo et al. « Rasal1 regulates calcium dependent neuronal maturation by modifying microtubule dynamics. » In : *Cell & bioscience* 14 (2024). doi : 10.1186/s13578-024-01193-w. (cf. p. 106, 112).

[310] Z. Wang et al. « Learnings about $A\beta$ from human brain recommend the use of a live-neuron bioassay for the discovery of next generation Alzheimer's disease immunotherapeutics. » In : *Acta neuropathologica communications* 11 (2023). doi : 10.1186/s40478-023-01511-2. (cf. p. 106, 112).

[311] O. Doszyn, T. Dulski et J Zmorzynska. « Diving into the zebrafish brain : exploring neuroscience frontiers with genetic tools, imaging techniques, and behavioral insights. » In : *Frontiers in molecular neuroscience* 17 (2024). doi : 10.3389/fnmol.2024.1358844 (cf. p. 106, 112).

[312] Z. Xiang et al. « Two-photon live imaging of direct glia-to-neuron conversion in the mouse cortex. » In : *Neural regeneration research* 19 (2024). doi : 10.4103/1673-5374.386401 (cf. p. 106, 112).

[313] A. Sahu et al. « In vivo tumor immune microenvironment phenotypes correlate with inflammation and vasculature to predict immunotherapy response. » In : *Nature communications* 13 (2022). doi : 10.1038/s41467-022-32738-7 (cf. p. 106, 113).

[314] Walter R.J. et Berns M.W. « Computer-enhanced video microscopy : digitally processed microscope images can be produced in real time. » In : *Proc Natl Acad Sci USA.* 78 (1981). doi : 10.1073/pnas.78.11.6927 (cf. p. 106, 114).

[315] A. Kiepas et al. « Optimizing live-cell fluorescence imaging conditions to minimize phototoxicity. » In : *Journal of cell science.* 133 (2020). doi : doi.org/10.1242/jcs.242834 (cf. p. 106, 110, 113).

[316] A. Montanari et V. Wittamer. « Live Imaging and Characterization of Microglia Dynamics in the Zebrafish Embryo. » In : *Journal of visualized experiments : JoVE.* 207 (2024). doi : 10.3791/66533 (cf. p. 106, 113, 114).

[317] J. Kim et al. « Imaging and Quantifying Mitochondrial Morphology in C. elegans During Aging. » In : *Journal of visualized experiments : JoVE.* 215 (2025). doi : 10.3791/67610 (cf. p. 106, 114).

[318] Celltrackingchallenge.net. *History of the Cell Tracking Challenge.* Accessed on Sept 14, 2025. 2017. url : https://celltrackingchallenge.net/history/ (cf. p. 106, 114, 115, 251).

[319] M. Maška et al. « The Cell Tracking Challenge : 10 years of objective benchmarking. » In : *Nature methods.* 20 (2023). doi : 10.1038/s41592-023-01879-y (cf. p. 106, 114, 115).

[320] E. Apolinario et al. « Antisera against flagellin A or B inhibits Pseudomonas aeruginosa motility as measured by novel video microscopy assay. » In : *Journal of immunological methods.* 531 (2024). doi : 10.1016/j.jim.2024.113701 (cf. p. 106, 115).

[321] A. Atiyeh et al. « A benchmarked comparison of software packages for time-lapse image processing of monolayer bacterial population dynamics. » In : *Microbiology Spectrum.* 12 (2024). doi : 10.1128/spectrum.00032-24 (cf. p. 106, 111, 115, 251).

[322] G. Sancataldo et al. « Flexible Multi-Beam Light-Sheet Fluorescence Microscope for Live Imaging Without Striping Artifacts. » In : *Frontiers in neuroanatomy.* 13 (2019). doi : 10.3389/fnana.2019.00007 (cf. p. 106).

[323] Science learning hub. *History of microscopy–timeline.* Accessed on Sept 14, 2025. 2014. url : https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1692-history-of-microscopy-timeline (cf. p. 107).

[324] L.V. Upham et D.F. Englert. « chapter 13 : Radionuclide imaging. » In : *Handbook of radioactivity analysis (second edition).* Michael F. L'Annunziata MF, 2003 (cf. p. 108, 109).

[325] A. Hand et al. « Automated tracking of migrating cells in phase-contrast videomicroscopy sequences using image registration. » In : *J Microsc.* 234 (2009). doi : 10.1111/j.1365-2818.2009.03144.x (cf. p. 108).

[326] R. Schnabel et al. « Assessing normal embryogenesis in Caenorhabditis elegans using a 4D microscope : variability of development and regional specification. » In : *Dev Biol.* 184 (1997). doi : 10.1006/dbio.1997.8509. (cf. p. 108).

[327] Z. Bao et al. « Automated cell lineage tracing in Caenorhabditis elegans. » In : *Proc Natl Acad Sci USA.* 103 (2006). doi : 10.1073/pnas.0511111103. (cf. p. 108).

[328] S. Bisht et al. « Cancer Stem Cells : From an Insight into the Basics to Recent Advances and Therapeutic Targeting. » In : *Stem cells international* (juin 2022). doi : 10.1155/2022/9653244. (cf. p. 108).

[329] Malte Renz. « Fluorescence microscopy—A historical and technical perspective ». In : *Cytometry Part A* 83 (9 2013), p. 767-779. doi : 10.1002/cyto.a.22295 (cf. p. 108).

[330] Yan Zeng, Qiqi Sun et Jianan Y. Qu. « Nonlinear Multimodal Optical Imaging ». In : *Handbook of Photonics for Biomedical Engineering*. Sous la dir. d'Aaron Ho-Pui Ho, Donghyun Kim et Michael G. Somekh. Dordrecht : Springer Netherlands, 2017, p. 461-501. isbn : 978-94-007-5052-4. doi : 10.1007/978-94-007-5052-4_9 (cf. p. 108).

[331] V. Parodi et al. « Nonlinear Optical Microscopy : From Fundamentals to Applications in Live Bioimaging. » In : *Frontiers in bioengineering and biotechnology.* 8 (2020). doi : 10.3389/fbioe.2020.585363 (cf. p. 108).

[332] M. Rehberg et al. « Label-free 3D visualization of cellular and tissue structures in intact muscle with second and third harmonic generation microscopy. » In : *PloS one.* 6 (2011). doi : 10.1371/journal.pone.0028237 (cf. p. 108).

[333] S. Li et al. « Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy and Its Applications. » In : *Frontiers in Physics.* 8 (2020). doi : 10.3389/fphy.2020.598420 (cf. p. 108).

[334] E. Dlugosz, M. Butkus et D McCoy. *Multiphoton microscopy evolves with the aid of laser systems.* Accessed on Sept 14, 2025. 2023. url : https://www.photonics.com/Articles/Multiphoton_Microscopy_Evolve_with_the_Aid_of/a69271 (cf. p. 108).

[335] Y. Zhang et al. « Super-resolution fluorescence microscopy by stepwise optical saturation. » In : *Biomedical optics express* 9 (2018). doi : 10.1364/BOE.9.001613. (cf. p. 108).

[336] Timothy R. Corle et Gordon S. Kino. « CHAPTER 1 - Introduction ». In : *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems*. Sous la dir. de Timothy R. Corle et Gordon S. Kino. Burlington : Academic Press, 1996, p. 1-66. isbn : 978-0-12-408750-7. doi : https://doi.org/10.1016/B978-012408750-7/50009-4 (cf. p. 108).

[337] Teledyne Photometrics. *Anatomy of a microscope*. Accessed on Sept 14, 2025. url : https://www.photometrics.com/learn/microscopy-basics/anatomy-of-a-microscope (cf. p. 109).

[338] R. Rottenfusser, E.E. Wilson et M.W. Davidson. *ZEISS microscopy online campus, microscopy basics, numerical aperture and resolution*. Accessed on Sept 14, 2025. 2024. url : https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/resolution. (cf. p. 109).

[339] L. Fulghum. *Understanding microscope objectives : world precision instruments*. Accessed on Sept 14, 2025. 2013. url : https://www.wpiinc.com/blog/post/understanding-microscope-objectives (cf. p. 109).

[340] R. Rottenfusser, E.E. Wilson et M.W. Davidson. *ZEISS microscopy online campus, microscopy basics, objectives*. Accessed on Sept 14, 2025. 2024. url : https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/objectives. (cf. p. 109).

[341] Y. Xia et al. « Research and application of online monitoring of coal and biomass co-combustion and biomass combustion characteristics based on combustion flame. » In : *J Energy Inst.* 108 (2023). doi : 10.1016/j.joei.2023.101191. (cf. p. 109).

[342] Microscopeworld. *Monochrome microscopy cameras and their benefits*. Accessed on Sept 14, 2025. 2024. url : https://www.microscopeworld.com/t-monochrome_microscopy_cameras. (cf. p. 109).

[343] K.R. Spring, J.C. Russ et Davidson M.W. *Digital imaging in optical microscopy-basic concepts in digital image processing*. Accessed on Sept 14, 2025. 2020. url : https://evidentscientific.com/en/microscope-resource/knowledge-hub/digital-imaging/digitalimagebasics (cf. p. 110).

[344] N. Supriya. *What is bright field microscopy ? Definition, steps and working-biology reader*. Accessed on Sept 14, 2025. 2019. url : https://biologyreader.com/bright-field-microscopy. (cf. p. 110).

[345] Y. Taichi. *What is brightfield microscopy ?* Accessed on Sept 14, 2025. 2023. url : https://evidentscientific.com/en/insights/what-is-brightfield-microscopy (cf. p. 110).

[346] F. Mokobi. *Brightfield Microscope (Compound Light Microscope)-Definition, Principle, Parts*. Accessed on Sept 14, 2025. 2022. url : https://microbenotes.com/brightfield-microscope/ (cf. p. 110).

[347] R.W. Lovitt et C.J. Wright. « Microscopy : Light Microscopy ». In : *Encyclopedia of Food Microbiology : Second Edition*. Avr. 2014, p. 684-692. doi : 10.1016/B978-0-12-384730-0.00213-5 (cf. p. 110).

[348] J. Piper et T. Piper. « Microscopic Modalities and Illumination Techniques ». In : *Modern Trends in Diatom Identification : Fundamentals and Applications*. Sous la dir. de Gabriel Cristóbal, Saúl Blanco et Gloria Bueno. Cham : Springer International Publishing, 2020, p. 53-93. isbn : 978-3-030-39212-3. doi : 10.1007/978-3-030-39212-3_5 (cf. p. 110).

[349] M. Abramowitz et M.W. Davidson. *Phase contrast microscopy–introduction*. Accessed on Sept 14, 2025. 2020. url : https://evidentscientific.com/en/microscope-resource/knowledge-hub/techniques/phasecontrast/phase (cf. p. 110).

[350] R. Rottenfusser, E.E. Wilson et M.W. Davidson. *ZEISS Microscopy online campus, microscopy basics, enhancing contrast in transmitted light*. Accessed on Sept 14, 2025. 2024. url : https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast. (cf. p. 110).

[351] K.R Spring et M.W. Davidson. *Introduction to fluorescence microscopy. Nikon's MicroscopyU*. Accessed on Sept 14, 2025. 2024. url : https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy (cf. p. 110).

[352] J. Chen et al. « Leveraging the IncuCyte Technology for Higher-Throughput and Automated Chemotaxis Assays for Target Validation and Compound Characterization. » In : *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* 23 (2018). doi : 10.1177/2472555217733437 (cf. p. 110).

[353] N. Findikli et E. Oral. « Time-lapse embryo imaging technology : does it improve the clinical results ?. » In : *Current opinion in obstetrics & gynecology* 26 (2014). doi : 10.1097/GCO.0000000000000072 (cf. p. 110).

[354] P P. Laissue et al. « Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. » In : *Nature methods* 14 (2017). doi : 10.1038/nmeth.4344 (cf. p. 110, 113).

[355] O. Sen, A.T. Saurin et J.M.G. Higgins. « The live cell DNA stain SiR-Hoechst induces DNA damage responses and impairs cell cycle progression. » In : *Scientific reports* 8 (2018). doi : 10.1038/s41598-018-26307-6 (cf. p. 110).

[356] Thermo Fisher Scientific. *Exposure times*. Accessed on Sept 14, 2025. 2024. url : https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/capturing-analyzing-your-samples/exposure-times.html (cf. p. 111).

[357] A.P. Cuny et al. « Live cell microscopy : From image to insight. » In : *Biophysics reviews* 3 (2022). doi : 10.1063/5.0082799 (cf. p. 111).

[358] Ping Liu et al. « Software Tools for 2D Cell Segmentation ». In : *Cells* 13.4 (2024). issn : 2073-4409. doi : 10.3390/cells13040352 (cf. p. 111).

[359] H. Aragaki et al. « LIM Tracker : a software package for cell tracking and analysis with advanced interactivity. » In : *Scientific reports* 12 (2022). doi : 10.1038/s41598-022-06269-6 (cf. p. 111, 114).

[360] Celltrackingchallenge.net. *History and publications–cell tracking challenge.* Accessed on Sept 14, 2025. 2017. url : https://celltrackingchallenge.net/history/ (cf. p. 111).

[361] G. Bastianello et al. « Mechanical stress during confined migration causes aberrant mitoses and c-MYC amplification. » In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 121 (2024). doi : 10.1073/pnas.2404551121 (cf. p. 111).

[362] X. Chen et al. « Caspase-mediated AURKA cleavage at Asp132 is essential for paclitaxel to elicit cell apoptosis. » In : *Theranostics* 14 (2024). doi : 10.7150/thno.97842 (cf. p. 111).

[363] R. Ando et al. « StayGold variants for molecular fusion and membrane-targeting applications. » In : *Nature methods* 21 (2024). doi : 10.1038/s41592-023-02085-6 (cf. p. 112).

[364] T. Funakoshi et N. Imamoto. « Reconstitution of nuclear envelope subdomain formation on mitotic chromosomes in semi-intact cells. » In : *Cell structure and function* 49 (2024). doi : 10.1247/csf.24003. (cf. p. 112).

[365] V. Hutchison et al. « Inducible tricolor reporter mouse for parallel imaging of lysosomes, mitochondria, and microtubules. » In : *The Journal of cell biology* 223 (2024). doi : 10.1083/jcb.202305086 (cf. p. 112).

[366] J.A. Kellermeier et A.T. Heaslip. « Myosin F controls actin organization and dynamics in Toxoplasma gondii. » In : *Molecular biology of the cell* 35 (2024). doi : 10.1091/mbc.E23-12-0510 (cf. p. 112).

[367] H. Bragulat-Teixidor et al. « The endoplasmic reticulum connects to the nucleus by constricted junctions that mature after mitosis. » In : *EMBO reports* 25 (2024). doi : 10.1038/s44319-024-00175-w (cf. p. 112).

[368] S. Márquez-Hinojosa, L. Noriega-Hoces et L. Guzmán. « Time-Lapse Embryo culture : A better understanding of embryo development and clinical application. » In : *JBRA assisted reproduction* 26 (2022). doi : 10.5935/1518-0557.20210107 (cf. p. 112).

[369] J.E. Sulston et al. « The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans. » In : *Developmental biology* 100 (1983). doi : 10.1016/0012-1606(83)90201-4 (cf. p. 112).

[370] E. Babayev et E.C. Feinberg. « Embryo through the lens : from time-lapse cinematography to artificial intelligence. » In : *Fertility and sterility* 113 (2020). doi : 10.1016/j.fertnstert.2019.12.001 (cf. p. 112).

[371] J.K. Griesbach et al. « Mechanoregulation analysis of bone formation in tissue engineered constructs requires a volumetric method using time-lapsed micro-computed tomography. » In : *Acta biomaterialia* 179 (2024). doi : 10.1016/j.actbio.2024.03.008 (cf. p. 112).

[372] C. Handler, G. Scarcelli et J. Zhang. « Time-lapse mechanical imaging of neural tube closure in live embryo using Brillouin microscopy. » In : *Scientific reports* 13 (2023). doi : 0.1038/s41598-023-27456-z (cf. p. 112).

[373] S.M. Gross et P. Rotwein. « Akt signaling dynamics in individual cells. » In : *Journal of cell science* 128 (2015). doi : 10.1242/jcs.168773 (cf. p. 113).

[374] H. Narotamo, M. Silveira et C.A. Franco. « 3DVascNet : An Automated Software for Segmentation and Quantification of Mouse Vascular Networks in 3D. » In : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 44 (2024). doi : 10.1161/ATVBAHA.124.320672 (cf. p. 114).

[375] Ruei-Zhen Lin et Hwan-You Chang. « Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research ». In : *Biotechnology Journal* 3.9–10 (oct. 2008), p. 1172-1184. issn : 1860-7314. doi : 10.1002/biot.200700228 (cf. p. 121, 127, 128).

[376] Alexander P Browning et al. « Quantitative analysis of tumour spheroid structure ». In : *eLife* 10 (nov. 2021). issn : 2050-084X. doi : 10.7554/elife.73020 (cf. p. 121, 128).

[377] Léa-Isabelle Renaud et al. « Toto-Cell : A new software to analyze cellular events during video-microscopy ». In : *PLOS ONE* 19.6 (juin 2024), p. 1-15. doi : 10.1371/journal.pone.0302042 (cf. p. 129).

[378] Ralf Weiskirchen. « Genetic Insights into the Economic Toll of Cell Line Misidentification : A Comprehensive Review ». In : *Medical Sciences* 14.1 (jan. 2026), p. 25. issn : 2076-3271. doi : 10.3390/medsci14010025. url : http://dx.doi.org/10.3390/medsci14010025 (cf. p. 205, 253).

[379] Cellosaurus. *Cellosaurus HEC-1-A (CVCL_0293)*. Accessed on Oct 16, 2025. 2025. url : https://www.cellosaurus.org/CVCL_0293 (cf. p. 218).

[380] M. Nishida. « The Ishikawa cells from birth to the present. » In : *Hum Cell.* 15 (2002). doi : 10.1111/j.1749-0774.2002.tb00105.x. (cf. p. 219).

[381] H. Mahdy, E.S. Vadakekut et D. Crotzer. « Endometrial Cancer. » In : *StatPearls* (2004) (cf. p. 238).

[382] Xiao Ma et al. « Advances in ovarian cancer : biological insights, therapeutic innovations, and future perspectives ». In : *Journal of Ovarian Research* (déc. 2025). issn : 1757-2215. doi : 10.1186/s13048-025-01921-x (cf. p. 238).

[383] Kristen R. Ibanez, Tzu-Ting Huang et Jung-Min Lee. « Combination Therapy Approach to Overcome the Resistance to PI3K Pathway Inhibitors in Gynecological Cancers ». In : *Cells* 13.12 (juin 2024), p. 1064. issn : 2073-4409. doi : 10.3390/cells13121064 (cf. p. 239).

[384] Jinghong Chen et Rutie Yin. « AKT inhibitors in gynecologic oncology : past, present and future ». In : *Frontiers in Oncology* 15 (juill. 2025). issn : 2234-943X. doi : 10.3389/fonc.2025.1547083 (cf. p. 239).

[385] Giorgio Bogani et al. « Selinexor in patients with advanced and recurrent endometrial cancer ». In : *Current Problems in Cancer* 47.6 (déc. 2023), p. 100963. issn : 0147-0272. doi : 10.1016/j.currproblcancer.2023.100963 (cf. p. 239, 249).

[386] Consuelo Pitolli et al. « p53-Mediated Tumor Suppression : DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms ». In : *Cancers* 11.12 (déc. 2019), p. 1983. issn : 2072-6694. doi : 10.3390/cancers11121983 (cf. p. 240, 241).

[387] Ling Yang et al. « Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer (Review) ». In : *Oncology Reports* 47.4 (fév. 2022). issn : 1791-2431. doi : 10.3892/or.2022.8293 (cf. p. 240).

[388] Akinori Morita et al. « Sodium Orthovanadate Inhibits p53-Mediated Apoptosis ». In : *Cancer Research* 70.1 (jan. 2010), p. 257-265. issn : 1538-7445. doi : 10.1158/0008-5472.can-08-3771 (cf. p. 241).

[389] Priya Mittal et Charles W. M. Roberts. « The SWI/SNF complex in cancer — biology, biomarkers and therapy ». In : *Nature Reviews Clinical Oncology* 17.7 (avr. 2020), p. 435-448. issn : 1759-4782. doi : 10.1038/s41571-020-0357-3 (cf. p. 241, 245).

[390] Xuan Cheng et al. « ARID1A Mutation in Metastatic Breast Cancer : A Potential Therapeutic Target ». In : *Frontiers in Oncology* 11 (nov. 2021). issn : 2234-943X. doi : 10.3389/fonc.2021.759577 (cf. p. 241, 245).

[391] Jaren Mullen et al. « Targeting ARID1A mutations in cancer ». In : *Cancer Treatment Reviews* 100 (nov. 2021), p. 102287. issn : 0305-7372. doi : 10.1016/j.ctrv.2021.102287 (cf. p. 241).

[392] Ali Bakr et al. « ARID1A regulates DNA repair through chromatin organization and its deficiency triggers DNA damage-mediated anti-tumor immune response ». In : *Nucleic Acids Research* 52.10 (avr. 2024), p. 5698-5719. ISSN : 1362-4962. DOI : 10.1093/nar/gkae233 (cf. p. 242).

[393] Jianfeng Shen et al. « ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade ». In : *Nature Medicine* 24.5 (mai 2018), p. 556-562. ISSN : 1546-170X. DOI : 10.1038/s41591-018-0012-z (cf. p. 242).

[394] Shanshan Zhang et al. « mTORC1 Promotes ARID1A Degradation and Oncogenic Chromatin Remodeling in Hepatocellular Carcinoma ». In : *Cancer Research* 81.22 (août 2021), p. 5652-5665. ISSN : 1538-7445. DOI : 10.1158/0008-5472.can-21-0206 (cf. p. 242).

[395] Hua Tian et al. « Hypermethylation of mismatch repair gene hMSH2 associates with platinum-resistant disease in epithelial ovarian cancer ». In : *Clinical Epigenetics* 11.1 (oct. 2019). ISSN : 1868-7083. DOI : 10.1186/s13148-019-0748-4 (cf. p. 243).

[396] Xue Xiao, David W. Melton et Charlie Gourley. « Mismatch repair deficiency in ovarian cancer — Molecular characteristics and clinical implications ». In : *Gynecologic Oncology* 132.2 (fév. 2014), p. 506-512. ISSN : 0090-8258. DOI : 10.1016/j.ygyno.2013.12.003 (cf. p. 243).

[397] Yi-Hui Wu et al. « Comparing PI3K/Akt Inhibitors Used in Ovarian Cancer Treatment ». In : *Frontiers in Pharmacology* 11 (mars 2020). ISSN : 1663-9812. DOI : 10.3389/fphar.2020.00206 (cf. p. 244).

[398] Michael Fraser et al. « Chemoresistance in human ovarian cancer : the role of apoptotic regulators ». In : *Reproductive Biology and Endocrinology* 1.1 (oct. 2003). ISSN : 1477-7827. DOI : 10.1186/1477-7827-1-66 (cf. p. 244).

[399] John I. Risinger et al. « A hPMS2 Mutant Cell Line Is Defective in Strand-specific Mismatch Repair ». In : *Journal of Biological Chemistry* 270.31 (août 1995), p. 18183-18186. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.270.31.18183 (cf. p. 246).

[400] Mohamed E. Salem et al. « Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors ». In : *International Journal of Cancer* 147.10 (juin 2020), p. 2948-2956. ISSN : 1097-0215. DOI : 10.1002/ijc.33115 (cf. p. 246, 247).

[401] Jayasree S. Nair, Elgilda Musi et Gary K. Schwartz. « Selinexor (KPT-330) Induces Tumor Suppression through Nuclear Sequestration of IκB and Downregulation of Survivin ». In : *Clinical Cancer Research* 23.15 (août 2017), p. 4301-4311. ISSN : 1557-3265. DOI : 10.1158/1078-0432.ccr-16-2632 (cf. p. 247).

[402] Matthieu Le Gallo et al. « Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes ». In : *Nature Genetics* 44.12 (oct. 2012), p. 1310-1315. ISSN : 1546-1718. DOI : 10.1038/ng.2455 (cf. p. 248).

[403] Krishana Kumar Sharma et al. « Molecular Pathways and Biomarkers in Endometrial Carcinoma : Paving the Way for Precision Medicine ». In : *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 25 (août 2025). ISSN : 1871-5206. DOI : 10.2174/0118715206390892250803033306 (cf. p. 248).

[404] Maria-Bianca Anca-Stanciu et al. « Comprehensive Review of Endometrial Cancer : New Molecular and FIGO Classification and Recent Treatment Changes ». In : *Journal of Clinical Medicine* 14.4 (fév. 2025), p. 1385. ISSN : 2077-0383. DOI : 10.3390/jcm14041385 (cf. p. 248).

[405] Suwei Wang et al. « Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms ». In : *Journal of Biological Chemistry* 279.24 (juin 2004), p. 25535-25543. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.m400944200 (cf. p. 249).

[406] DB Longley et PG Johnston. « Molecular mechanisms of drug resistance ». In : *The Journal of Pathology* 205.2 (jan. 2005), p. 275-292. ISSN : 1096-9896. DOI : 10.1002/path.1706 (cf. p. 249).

[407] A. Hamid Boulares et al. « Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis ». In : *Journal of Biological Chemistry* 274.33 (août 1999), p. 22932-22940. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.274.33.22932 (cf. p. 249).

[408] Zbigniew Wyżewski et al. « Bid Protein : A Participant in the Apoptotic Network with Roles in Viral Infections ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 26.6 (mars 2025), p. 2385. ISSN : 1422-0067. DOI : 10.3390/ijms26062385 (cf. p. 249).

[409] Juan Ángel Fresno Vara et al. « PI3K/Akt signalling pathway and cancer ». In : *Cancer Treatment Reviews* 30.2 (avr. 2004), p. 193-204. ISSN : 0305-7372. DOI : 10.1016/j.ctrv.2003.07.007 (cf. p. 249).

[410] Brendan D. Manning et Alex Toker. « AKT/PKB Signaling : Navigating the Network ». In : *Cell* 169.3 (avr. 2017), p. 381-405. ISSN : 0092-8674. DOI : 10.1016/j.cell.2017.04.001 (cf. p. 249).

[411] Jitendra Gupta et al. « Beyond TRAIL resistance : Novel strategies for potentiating TRAIL-induced apoptosis in cancer ». In : *Experimental Cell Research* 450.1 (juill. 2025), p. 114619. ISSN : 0014-4827. DOI : 10.1016/j.yexcr.2025.114619 (cf. p. 249).

[412] Mudra Binju et al. « Therapeutic Inducers of Apoptosis in Ovarian Cancer ». In : *Cancers* 11.11 (nov. 2019), p. 1786. ISSN : 2072-6694. DOI : 10.3390/cancers11111786 (cf. p. 249).

[413] Camilla Nero et al. « POLE mutations in endometrial carcinoma : Clinical and genomic landscape from a large prospective single-center cohort ». In : *Cancer* 131.3 (jan. 2025). issn : 1097-0142. doi : 10.1002/cncr.35731 (cf. p. 249).

[414] Camilla Nero et al. « PTEN and Gynecological Cancers ». In : *Cancers* 11.10 (sept. 2019), p. 1458. issn : 2072-6694. doi : 10.3390/cancers11101458 (cf. p. 249).

[415] Francesca Addante et al. « Mismatch Repair Deficiency as a Predictive and Prognostic Biomarker in Endometrial Cancer : A Review on Immunohistochemistry Staining Patterns and Clinical Implications ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 25.2 (jan. 2024), p. 1056. issn : 1422-0067. doi : 10.3390/ijms25021056 (cf. p. 249).

[416] Anees Rahman Cheratta et al. « Prostate apoptosis response-4 and tumor suppression : it's not just about apoptosis anymore ». In : *Cell Death & Disease* 12.1 (jan. 2021). issn : 2041-4889. doi : 10.1038/s41419-020-03292-1 (cf. p. 250).

[417] Cheng Luo et al. « The Role of TRAIL Signaling in Cancer : Searching for New Therapeutic Strategies ». In : *Biology* 13.7 (juill. 2024), p. 521. issn : 2079-7737. doi : 10.3390/biology13070521 (cf. p. 251).

[418] Feng Wang, Junsheng Lin et Ruian Xu. « The Molecular Mechanisms of TRAIL Resistance in Cancer Cells : Help in Designing New Drugs ». In : *Current Pharmaceutical Design* 20.42 (oct. 2014), p. 6714-6722. issn : 1381-6128. doi : 10.2174/1381612820666140929100735 (cf. p. 251).

[419] Claudia Marchetti et al. « Chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer : Mechanisms and emerging treatments ». In : *Seminars in Cancer Biology* 77 (déc. 2021), p. 144-166. issn : 1044-579X. doi : 10.1016/j.semcancer.2021.08.011 (cf. p. 251).

[420] Ningni Jiang et al. « Role of PI3K/AKT pathway in cancer : the framework of malignant behavior ». In : *Molecular Biology Reports* 47.6 (avr. 2020), p. 4587-4629. issn : 1573-4978. doi : 10.1007/s11033-020-05435-1 (cf. p. 251).

[421] Maria Rosaria Ruocco et al. « Editorial : Tumor Microenvironment and Cancer Cell Interactions in Solid Tumor Growth and Therapy Resistance ». In : *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (avr. 2022). issn : 2296-634X. doi : 10.3389/fcell.2022.896194 (cf. p. 251).

[422] O. Kleinberger Riedrich. *AI for microscopy image analysis–now and beyond.* Accessed on Sept 14, 2025. 2024. url : https://www.zeiss.com/microscopy/en/resources/insights-hub/life-sciences/ai-for-microscopy-image-analysis.html (cf. p. 252).

[423] S. Bhattiprolu. « From Machine Learning to Deep Learning : Revolutionizing Microscopy Image Analysis. » In : *Microscopy Today* 32 (2024). doi : 10.1093/mictod/qaae082 (cf. p. 252).

[424] A. Bilodeau et al. « Development of AI-assisted microscopy frameworks through realistic simulation with pySTED. » In : *Nature machine intelligence* 6 (2024). doi : 10.1038/s42256-024-00903-w (cf. p. 252).

[425] S. Imboden et al. « Trustworthy in silico cell labeling via ensemble-based image translation. » In : *Biophysical reports.* 3 (2023). doi : 0.1016/j.bpr.2023.100133 (cf. p. 252).

[426] Vizgen. *MERFISH spatial transcriptomics.* Accessed on Sept 14, 2025. 2024. url : https://vizgen.com/technology (cf. p. 253).

[427] Cai Lab. *seqFISH.* Accessed on Sept 14, 2025. 2020. url : https://spatial.caltech.edu/seqfish/ (cf. p. 253).

[428] Nicole Y Souren et al. « Cell line authentication : a necessity for reproducible biomedical research ». In : *The EMBO Journal* 41.14 (juin 2022). issn : 1460-2075. doi : 10.15252/embj.2022111307. url : http://dx.doi.org/10.15252/embj.2022111307 (cf. p. 253).

[429] Ralf Weiskirchen. « Misidentified cell lines : failures of peer review, varying journal responses to misidentification inquiries, and strategies for safeguarding biomedical research ». In : *Research Integrity and Peer Review* 10.1 (juill. 2025). issn : 2058-8615. doi : 10.1186/s41073-025-00170-2. url : http://dx.doi.org/10.1186/s41073-025-00170-2 (cf. p. 253).

[430] Kenny Chitcholtan, Peter H Sykes et John J Evans. « The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer ». In : *Journal of Translational Medicine* 10.1 (mars 2012). issn : 1479-5876. doi : 10.1186/1479-5876-10-38 (cf. p. 255).

Annexe A

Annexes

Renaud *et al. BioMedical Engineering OnLine* (2025) 24:44
https://doi.org/10.1186/s12938-025-01375-8

BioMedical Engineering OnLine

REVIEW Open Access

Video microscopy: an old story with a bright biological future

Léa-Isabelle Renaud[1], Kelliane Béland[1] and Eric Asselin[1*]

*Correspondence:
eric.asselin@uqtr.ca

[1] Département de Biologie Médicale, Laboratoire de Gynéco-Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada

Abstract

Single-cell analysis is increasingly popular in the field of biology, enabling more precise analyses of heterogeneous phenomena, particularly in the fields of embryology and the study of different diseases. At the heart of this evolution is video microscopy, an ancient but revolutionary technique. From its first use on embryos, through the study of *C. Elegans*, with the development of algorithms for its automation, the history of video microscopy has been fascinating. Unfortunately, many unresolved issues remain, such as the sheer volume of data produced and the quality of the images taken. The aim of this review is to explore the past, present and future of this technique, which could become indispensable in recent decades, to understand cell fate and how diseases affect their destiny.

Keywords: Video microscopy, Biology, Microscopy, Cell cycle, Cancer, Neurology, History

Introduction

The word video-microscopy is a combination of the Latin word "*video*" standing for "*I see*" and "*mikros*" "*skopein*" in Greek, meaning "*little*" "*examination*". Over the past two decades, dynamic studies of live beings have gained popularity. The concept of video microscopy is part of this process: capturing videos or pictures of living beings in a defined amount of time.

What are the benefits of video microscopy? In contrast to the current methods, which are limited to the capture of a snapshot only at the end of the experiment, a camera allows pictures to be taken at defined intervals ranging from milliseconds to weeks. Video microscopy leads to a complete dynamic analysis of the treatment response. Moreover, the microscope is patient and methodical; pictures will be taken with the same watchfulness and desired details. Multiple clamps can be performed at the same time; for example, hundreds of cancer cells can be followed during a one-week period, or hundreds of Drosophila embryos can be imaged simultaneously [1].

The main purpose of video microscopy is to perform experiments with living beings on the microscope stage. For example, cells must be in conditions that promote their growth and normal function. Different types of video microscopes, such as confocal

© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/.

microscopes, are now equipped with environmental culture chambers, thus ensuring that crucial conditions such as temperature, air conditions, pH, or humidity are not disrupted. This technique is noninvasive and permits continuous observation of live and living samples [1, 2].

On NCBI, more than 11,000 publications are linked to timelapse. With time, there are increasing applications of this technology in different fields. Owing to progress in computing and imaging techniques, analyzing the morphology and motility of cells is gaining importance. The first use of time-lapse video microscopy was in 1929, when the development of rabbit embryos was studied. This field of research is not limited to only animals: mice, hamsters, rabbits, zebrafish, *C. Elegans* and others have been used, including in humans [1]. The technique of video microscopy allows the characterization of embryo development in humans. This discovery had a significant effect on the evolution of in vitro fertilization. In fact, the most valuable aspect of this method is that it makes it possible to culture and monitor embryos without disturbing them, thus leading to a better selection of embryos with a greater chance of implantation success [3]. Another interesting characteristic of video microscopy is that it provides information on the position, motility, and shape of the cell. Indeed, during some events, such as morphogenesis, a failure or error in migration can result in living damage. Cell migration is also crucial for homeostasis, such as the immune response [2]. Moreover, analysis of in vitro motility is a useful tool for understanding the cellular response to a drug, for example. It is vital to analyze these parameters because changes in cell behavior can be promising indicators of drug response, cell development and differentiation during embryogenesis, or in vitro *fertilization* [4]. This principle is attractive for other research fields as well: *C. Elegans* models can be used not only to follow the different stages of larval development but also to visualize how proteins are moving, which is made possible by the transparency of the organism. Time-lapse imaging is an advantage in that these proteins cannot be overlooked [5]. For bacterial populations, antibiotic resistance is an ongoing issue caused mainly by the appearance of phenotypic variations in microbial populations. Single-cell analysis is necessary to understand the nature of bacterial resistance behaviors and to determine how these behaviors are affected by treatments to obtain interesting insights into this problem [6].

Finally, in medical biology, personalized oncology is the new future for treatment; it will replace "bulk therapy" in which there is no patient-specific treatment strategy. Single-cell analyses, such as sequencing or video microscopy, are used as more precise techniques for understanding the effects of drugs [7]. Moreover, video microscopy makes it possible to visualize the effects of drugs not only in vitro but also in vivo. It is possible to monitor cancer cell activity in live animals. Intravital video microscopy allows us to understand the metastatic process, nature (adherence, migration, vascularization), and timing of the proteins or RNAs implicated. An important benefit of this approach consists of a better understanding of the metastasis process [8].

However, video microscopy has many challenges. Biologists can be confronted with poor-quality images and low-contrast microscope images. In addition, expensive microscope equipment is necessary to perform state-of-the-art analyses. Even if a large variety of devices, software, and modalities exist, there are always limitations. For example, brightfield microscopy leads to a decrease in resolution and contrast, whereas

fluorescence microscopy requires the use of dyes that most of the time interfere with cell behavior. Finally, phase contrast microscopy is expensive, and a halo effect is sometimes visible [7]. In brief, there are always limitations for the human eye.

Another important limitation to consider is that the human analysis of video-microscopy images is time-consuming; for a long time-lapse (> 24 h), it can take more than two hours for the experimenter to analyze the video and several hours for data processing [9]. In fact, the main way to track cells is by manually marking each image of the video, which is not only a lengthy process but can also lead to errors. This motivated the increased research on the development of automated cell-tracking systems since the 90's [4, 10, 11]. In addition, video microscopy generates many data, so it is crucial to have the necessary drive space [1].

The main purpose of this review is to provide an overview of the video-microscopy technique. First, we will approach a historical perspective of microscopy and time-lapse microscopy, followed by a detailed section on the principles of video microscopy, and finally, the subject of image acquisition and analysis will be discussed.

Historical perspective

Early developments in microscopy

Microscopy, as it is known today, was initiated by a rather simple concept that was subjected to numerous improvements. As presented in Fig. 1, the earliest appearance of the magnification concept was an enlargement of letters using a globe of water by Seneca in the first century A.D. [12]. In 1284, this concept was used by Salvino D'Armate to design the original eyeglasses, which rapidly gained popularity [13]. A few years later, approximately 1595, Zacharias and Hans Janssen created the first compound microscope, which consisted of multiple lenses in a tube. The instrument was further developed by Galileo Galilei in 1609 with two lenses: the first lens collects light, whereas the second lens magnifies the image. It was not until 1625 that the instrument was named "*microscope*" by Giovanni Faber [14]. The word microscope evolved from the Greek words standing for "*small*" and "*to view*" [15]. The first observations recorded with a compound microscope were made in 1665 by Robert Hooke in *Micrographia*. Hooke analyzed seeds, plants, and the eye of a fly and used the term "cells" for the first time to describe the structure of cork [14]. While Hooke focused on multiple-lens apparatuses, Anthony van Leeuwenhoek explored the potential of single-lens microscopes and built over 500 of them [12]. His handmade instruments were quite simple, with a base, adjusting screws, and, in some instances, a system to control the illumination, which came from an external light source. The use of one lens rather than two lenses significantly improved the quality of the images by reducing the optical aberration that was observed at the time [14]. Some of his lenses had a magnification power of 300X and a resolution of 1.4 microns [12]. Leeuwenhoek used his microscopes to observe microorganisms such as bacterial cells that he described as "animalcules", and because of this discovery, he is known as the father of microbiology [16, 17].

In the following years, improvements were made to the resolution limit of the microscope. When more than one lens is used, spherical aberration disturbs the image, thus limiting the resolution of the microscope. In 1830, Joseph Jackson Lister reported that combining low-magnification lenses at precise distances from each other prevents

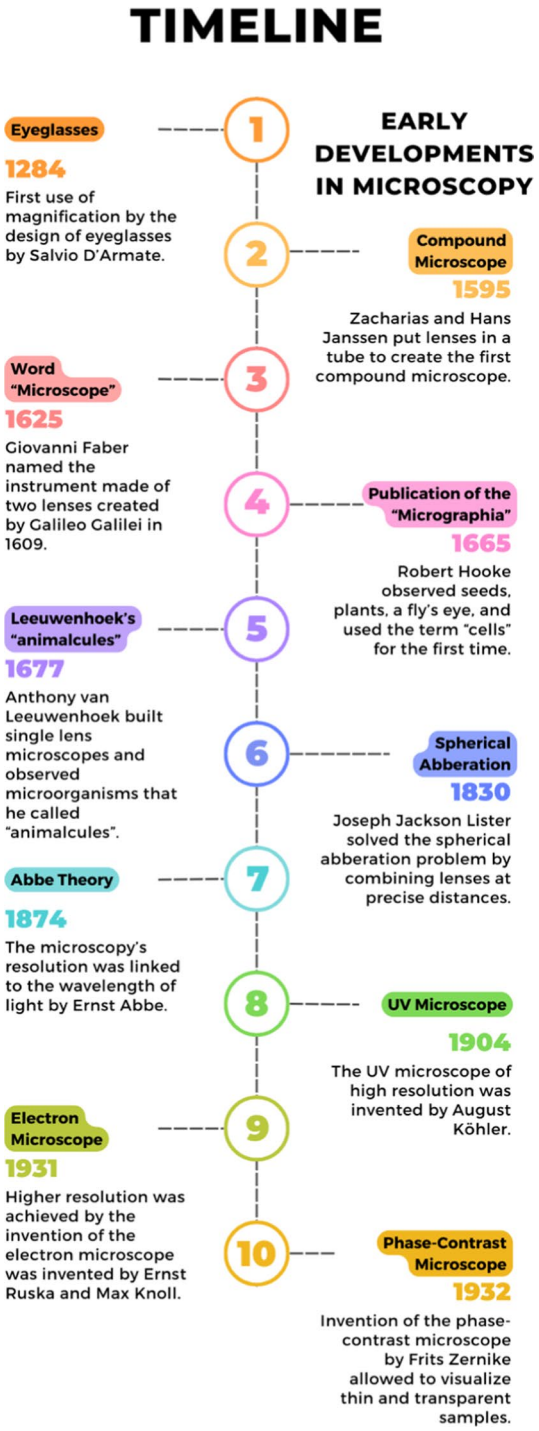


Fig. 1 Timeline representing the early developments in microscopy and important milestones from the first appearance of eyeglasses to phase-contrast microscopy [10–18]

spherical aberration caused by the subsequent lenses [12]. Forty years later, in 1874, Ernst Abbe published his theory that related the wavelength of light to the resolution of the microscope, which indicates that the resolution could only be smaller if a shorter wavelength was used. Therefore, in 1904, August Köhler made the first UV microscope

that overcame the classical light microscope because of the higher wavelengths used [18]. However, the greatest breakthrough came from the invention of the electron microscope in 1931 by Ernst Ruska and Max Knoll. Their original microscope had a magnification of 400x, and two years later, Ruska developed a more advanced model that surpassed the resolution of classical optical microscopes. Ruska analyzed the possible applications of this new microscope in 1937 with the help of Bodo von Borries and Helmut Ruska. Around the same time, the scanning electron microscope was designed by Manfred von Ardenne and was available commercially in 1938 [19]. Another crucial invention of the 1930 s was the phase-contrast microscope, which was developed by Frits Zernike. This new microscope has had a significant impact on biological research because of its ability to convert the light variations induced by a phase change into varying light amplitudes. This principle makes it possible to visualize transparent and thin samples such as living cells [20].

Milestones in video microscopy

Along with the development of microscopy, new technologies have been developed in the field of video imaging. Not only was it a significant discovery for recording and television, but it also allowed microscopy to become an even more powerful imaging tool. One important factor in the origins of video microscopy is the appearance of the closed-circuit television (CCTV) system. This technology, invented in 1927, uses video cameras to record and transmit images to a specific audience. The signal is thus not publicly available but is refined to viewers who were given permission; for example, CCTV is used in many stores for owners to discourage and potentially catch thieves or other criminals [21]. Scientifics started using CCTV to enhance the contrast of their microscopy images and to record time-lapse videos. It also facilitates classroom instruction and enables the use of a larger spectral range [22]. In the following years, different combinations of video imaging systems and microscopes were used, but crucial challenges were encountered, such as damage to living cells due to the use of UV light, insufficiently bright light sources, and a lack of image quality [22]. Some early apparatuses include a phase-contrast microscope used in conjunction with an RCA system, a flying-spot microscope, and a tandem-scanning reflected-light microscope [22]. The invention of image intensifier tubes during World War II made it possible to amplify incoming light and create a brighter image from a low light-level input image. These vacuum tubes can generate photoelectrons from light and increase their intensity to return a brighter image [23]. When applied to microscopy, the recurrent problem of a lack of bright light sources could be solved. In approximately 1970, Caspersson and his team developed a technique to image chromosomes via a camera combined with a fluorescence microscope [24]. Using a TV camera with a zoom lens and an amplifier, they made it possible to amplify the video signal to visualize the chromosome regions, which presented important variations in their fluorescence intensities. They project the photographic negatives of fluorescence-stained metaphases on a monitor and optimize the contrast depending on the chromosomes to analyze. The team also developed a similar system to analyze Giemsa-stained chromosomes and connected a TV camera directly to the microscope. This allowed us to produce a video of the chromosomes' localization but required high-quality optics that could be obtained with an ocular of

great zoom and an image intensifier tube. Both systems are time saving and overall more efficient than the previous karyotyping methods while allowing multiple people to look at the monitor simultaneously to conduct the analysis [24]. More recently, automated microscopy was developed for the detection and segmentation of biological structures such as cells. The algorithms and deep learning methods greatly simplified the analysis of microscopy and video-microscopy outputs in the field of hematology and in biomedical research [22, 25].

Evolution of imaging technologies in cell biology

Since the first cells were observed with a microscope, numerous techniques have been developed to image even smaller objects such as proteins and chromosomes. In 1936, the invention of a microscope photometer provided better contrast for the visualization of biological cells and tissues. A novel technique called microspectrophotometry was then developed by Caspersson and made it possible to quantify the concentration of specific substances in a sample. Given that cellular components absorb light at specific wavelengths, it is possible to use light absorption as a tool for chemical quantification. With this technique, Caspersson can identify nucleic acids and certain proteins in the nucleus and cytoplasm, respectively [16, 26]. A few years later, Evgenii Brumberg described the ultrachemiscope, which images biological samples using three different UV wavelengths and merges the images to obtain a "color transformation". This process produces an image in which nucleic acids, proteins, and pigments are shown and can be analyzed on the basis of their specific distribution [27]. During the same period, researchers such as Hans R used the principle of time-lapse imaging to visualize biological phenomena such as meiotic divisions. Spermatocytes and embryonic cells from *Tamalia coweni were studied* to investigate how chromosomes move during cellular division. Using a camera lucida, they recorded the distance between the daughter chromosomes over time and produced a graph describing the apparent movement [28].

In parallel, fluorescent dyes were discovered and developed for use in both cell biology and medicine. One of the most notorious dyes, fluorescein, was initially synthesized in 1871 by Adolf Ritter von Baeyer. This dye was used by Paul Ehrlich to study the relationship between intraocular pressure and aqueous humor production in the eye [29]. Ehrlich also applied a fluorescent dye to cell biology by staining bacteria, which led to a significant increase in contrast, thereby facilitating microscope imaging [18]. In 1893, August Köhler presented a novel illumination technique composed of a field and an aperture iris diaphragm in a microscopy setup. This would prevent the presence of an obscuring glare while providing a bright image [30]. Twenty years later, a new collaboration between Köhler and Zeiss Optical Works generated a microscope with ultraviolet illumination, which proved to be a significant advancement in microscopy [30]. The Zeiss factory pursued advancements in the field and presented its first fluorescence microscope in the early 1990 s. However, imaging organisms is still difficult because of their thickness and opacity. The issue was partially solved via incident light rather than transmitted light, an idea that was introduced by Ellinger and Hirt and which they called an intravital microscope. Their technique, which resembles modern fluorescence microscopy, involves the use of fluorescent dyes and ultraviolet

illumination to better visualize organisms [31]. Fluorescence microscopy was initially presented as a tool in pathology and histology by Herwig Hamperl, who also observed autofluorescence phenomena in plant tissues and different proteins. In collaboration with Max Haitinger, Hamperl is also at the origin of fluorescence staining used for fluorescence microscopy [16, 32]. Giemsa cellular staining made it possible for Halberstäedter and von Prowazek to identify trachoma inclusion bodies in the conjunctivae scrapings of baboons treated with trachoma secretions and thus demonstrated chlamydia pathogenicity [33, 34]. The potential of Giemsa staining has increased the scientific interest in fluorescence staining. In 1929, an intravital microscope composed of vertical UV illumination and a water immersion objective was commercialized by Zeiss. With such a microscope, it was possible to examine fluorescent dyes in the kidneys and liver of frogs and mice and to analyze their distribution; thus, it is a novel tool for the visualization of different living organs [16]. Another dye was also discovered that serves as a cell vitality indicator; the acridine orange dye presented by the Siegfried Strugger fluorescently stains cells green if they are alive and red when they are dead because of the difference in absorption capacity [35]. Immunofluorescence was presented by Albert H. Coons as a technique for the detection and visualization of mammalian antigens in biological samples when fluorescent conjugated antibodies are used. This approach is extensively used in virology and for the study of bacteria [36].

Currently, most microscopic methods rely on nonlinear optics, which include but are not limited to two-photon excitation fluorescence, harmonic generation, and stimulated light scattering [37]. Such processes were made possible via infrared pulsed lasers. Nonlinear optical microscopy and the related working wavelengths increased the penetration depth in biological samples and reduced the need for staining, which was, in some instances, detrimental to the samples. The technique can also be used for functional imaging since it allows for 3D sectioning, has a small focal volume and does not require any labels to observe samples. Some nonlinear optical processes include two-photon excited fluorescence, second- and third-harmonic generation, and coherent Raman scattering microscopy [38]. Second- and third-harmonic generation microscopy techniques are particularly relevant for the observation of biological samples because of their ability to construct 3D images in the absence of an out-of-focus background. However, the dependency on focal plane signal generation restricts the use of second harmonic generation for collagen fibers and striated muscle myosin. With third-harmonic generation, a greater number of structures can be observed because they can be induced from tissue interfaces and from colorants, which intensifies the signal [39]. For coherent Raman scattering microscopy, the use of two laser beams for sample excitation generates four coherent Raman phenomena, thus leading to a faster imaging speed [40]. Another technique relying on the use of a laser called multiphoton excitation microscopy is extensively used for the observation of tissue in vivo, especially in the field of neuroscience. The ultrafast pulsed laser in this technique provides great depth, speed, and versatility [41]. Biologists continue to make improvements and develop new laser sources, objectives, and molecular probes to further enhance the quality of biological imaging with microscopy [16].

Advanced video-microscopy techniques

Confocal microscopy

Described for the first time in 1953 but commercially available at the end of the 1980 s, confocal microscopy is different from optical microscopy; it has the particularity of taking optical sections with a low depth (400 nm). This makes it possible to obtain a series of images that can then be used to obtain a 3D representation of the object. To proceed with such modeling, the images are recomposed with a computer. Confocal microscopy can be performed using either reflected light or fluorescence. The illumination is made by a laser, which is condensed by a lens and then scanned in a pinhole beside the detector. This allows for the photons that are coming from the focal plane only to reach the pinhole. Thus, it is possible to obtain an optical slide of the focal plane only, and when proceeding to slides, a 3D representation of the observed object can be obtained [42, 43].

Multiphoton microscopy

Multiphoton microscopy is an imaging technique developed in 1990 that combines the techniques of fluorescence microscopy and two-photon absorption. It is used to image living tissues at depths of less than 1 mm. The main difference with fluorescence microscopy is the lower excitation light. The technique also results in fewer background signals. This method is also appreciated for its limited photobleaching effect [44–46].

Superresolution microscopy

The main limit of microscopy is the resolution, which implies that when a small sample is observed, the principal source of light is received as a distributed pattern. When many patterns overlap, the diffraction phenomenon makes it difficult to clearly observe two objects that are close together. Superresolution microscopes can overcome this limit and are thus very popular in biomedical research. However, their cost is high, and they can only be used with thin objects [47, 48].

Principles of video microscopy

Basics of light microscopy

All microscopes have the same main optical components, including an eyepiece, objectives, and an illumination source, which can also be referred to as a condenser [49]. Lenses are at the heart of the microscope components. Convex lenses are used to converge light and thus induce a magnification of an image. However, in microscopy, the convex lenses used are complex, as they should not only offer great magnification to allow for the observation of biological structures or other miniature objects but also account for aberrations that can reduce image quality. The objectives are described in terms of their magnification and numerical aperture (NA), which represents the lens focal length and is an influencing factor for the resulting resolution [50]. Different types of objectives exist, but the most widely used objectives are called achromatic objectives. Achromatic objectives converge light into a single focal point and are designed for axial chromatic aberration correction in blue and red

and spherical aberration in green. Such corrections can be sufficient in the majority of microscopy experiments, but in some cases, a higher degree of correction is necessary [51]. High-level chromatic correction can be achieved via apochromatic objectives, which are corrected in deep blue, blue, green, and red while also providing spherical aberration correction in deep blue, blue and green. These lenses with high numerical apertures are more expensive but are a better choice when observing samples in different colors [52]. A more economic choice can be to use fluorite objectives; their specially designed glass material gives them spherical aberration correction in up to three colors instead of one for achromatic objectives. Such objectives have improved contrast, image brightness, and resolving power [53].

In regard to sample illumination, numerous factors must be considered to optimize the technique used and ensure good image quality. Before deciding on an illumination method, the sample opacity, physical characteristics, composition, and sensitivity to heat or ultraviolet light must be established. For example, translucent samples should be visualized via transmitted illumination, such as brightfield, polarized, oblique or darkfield illumination [54]. One of the most widely used illumination techniques is Köhler illumination. In this technique, the light source is scrambled when it reaches the sample, which results in better control of the field size, power, and angle of the illumination. The overlying principle is that lenses produce parallel light rays from a lateral structure; thus, when the illumination source is placed on the focal point, the structure is scrambled. Köhler illumination greatly depends on the use of an aperture stop that controls the light power and can be adjusted depending on the sample to be observed [50].

Video-microscopy components

When proceeding to a video-microscopy experiment, the microscope of choice is used in combination with a video camera and a monitor. The microscope is first chosen and adjusted to optimize the visualization of the sample and obtain an image of great quality, which is then transferred to the image intensifier tube of a video camera. The input the camera receives is a 2D image; it must be processed to produce a video signal. The apparatus transforms the image into a linear train of high-frequency electrical impulses, most commonly referred to as a video signal. A monitor will receive this signal and will convert it back to its original form, i.e., a 2D image [22].

One of the key components of video microscopy is thus the video camera. There are a variety of video camera types to choose from, but one popular and reliable choice is the charge-coupled device (CCD) camera. This type of camera is known for its high resolution and its capacity to image samples when the light source intensity is limited. Furthermore, scientists particularly favor CCD cameras because they are associated with high resolution and are more sensitive than other cameras [55]. There are several drawbacks associated with those cameras, as their antinoise capacity is limited when the microscopy application requires a low frame acquisition time. They still represent a better choice than complementary metal oxide semiconductor (CMOS) cameras, which are associated with greater noise and do not provide the same level of image quality. CMOS cameras can still be used in some cases when noise removal is not crucial since they have high yield and low integration and are generally less expensive than CCD

cameras are [56]. Other types of microscopy cameras include monochrome and color cameras. For the latter, an optical filter will process the color data, which will then be interpolated by a color filter array that uses a demosaicing algorithm. Therefore, the colors are not measured directly, and the interpolation involves an inevitable margin of error. Furthermore, most color cameras use infrared filters to limit the presence of color aberrations, which in turn reduces the number of photons that can pass. When a monochrome camera is used instead of a color camera, the color filter array and the infrared filters are absent. This allows monochrome cameras to be less sensitive and have a broader spectrum of detection. Therefore, monochrome cameras work significantly better with low illumination and overall produce brighter images of higher resolution and do not have the margin of error that is introduced with the color filter array [57].

Finally, a digital image processor is required to increase the quality of the video-microscopy output. This type of processing is equivalent to darkroom transformations that are performed with analog images. Digital processing relies on algorithms based on a matrix of integers to reversibly remove the noise in images. This step is crucial, as even the most powerful microscopes can output images with noise, uneven backgrounds, artifacts, and many more unwanted defaults. Furthermore, with video microscopy, the camera can introduce additional imperfections in the image from the video signal processing, thus resulting in aliasing, camera noise, and poor contrast, among other things. Therefore, a digital image processor is imperative and must be fast, reliable, and efficient. Some digital image processing techniques include look-up tables, flat-field correction, background subtraction, image integration, convolution filters, and Fourier transforms [58].

Resolution and contrast

In any microscopy or video microscopy system, the most crucial parameters are the resolution and contrast obtained for the output images. It is imperative to understand the underlying principles of these two concepts to obtain high-quality images.

Resolution is described as a measurement of a microscope's capacity to distinguish two neighboring points. In other words, it is the level of detail that can be captured with optical systems [59]. The limit of resolution is, therefore, the smallest distance at which a microscope can detect two objects that are illuminated [60]. In microscopy, the resolution of the objectives is limited by diffraction because the angle at which light waves pass through the lenses impacts the apparent resolution. This is particularly true at high magnifications, where out-of-focus images might still be optically resolved even if they do not appear sharp [51].

In contrast, this concept refers to the ability of a microscopy system to differentiate a sample from the background. Contrast is also commonly known as the difference in light intensity between an image and background. While the way the sample interacts with the light is important to consider, the optical system also plays a crucial role in contrast enhancement. The level of contrast is affected by the aperture settings, grade of optical aberration, and detector, among other factors [61]. The user can adjust the contrast through several parameters. For example, the settings of the field and condenser aperture diaphragm can be optimized depending on the sample and application.

Other techniques to increase contrast include the use of an electronic camera, image processing, and sample staining [62].

The number of techniques, including video microscopy, significantly improved contrast adjustment. To name a few such techniques, differential interference contrast, polarized light, phase contrast, and darkfield microscopy have important impacts on the field [63]. One technique is called video-enhanced contrast microscopy. This advanced microscopy system makes use of a high-resolution high-light-level video camera and a light microscope with optimized settings that diverge from those of conventional systems. With digital image processing, including contrast enhancement and background subtraction, the output of video-enhanced contrast microscopy is a high-quality image. This allows individual microtubules to be visualized and to even image axonal transport in great contrast. For the first time, objects smaller than the resolution limit of the apparatus could be visualized [64].

Imaging modes

As previously mentioned, multiple imaging and illumination techniques exist because of their specific advantages. In this section, an overview of the main microscopy imaging modes is presented.

The simplest imaging mode, called brightfield, involves a compound light microscope and staining of the sample of interest. This technique is the one of choice for the study of biological samples when their motility behavior, morphology, or replication are of interest [65]. However, simple and efficient this technique is, its limitations are rather important to consider. First, staining of the samples for observation is crucial, and in some cases, it can be insufficient and impossible to have enough contrast for visualization. Furthermore, brightfield microscopy cannot be used when the background color is too similar to that of the sample or if the latter is transparent [66]. Brightfield imaging is still commonly used and sufficient for diverse applications in cellular and microbiology, bacteriology, and parasitology, among other fields. Negative and Gram staining are popular staining methods that are used in combination with brightfield microscopy [67].

On the other hand, the dark-field imaging mode is more complex and better at providing great contrast. The system is similar to a brightfield microscope setting, but the condenser is made differently; it includes a black disc to block the illuminating light. This results in the sample being illuminated by peripheral oblique light, thus enhancing the darkness of the background [49, 68]. Different types of condensers with varying diameter sizes are available. Furthermore, certain condensers are made specifically for dry or immersion objectives. Dark-field condensers must be used with objectives with a numerical aperture smaller than theirs. It is also possible to use central light rather than peripheral light with dark-field illumination; an image is generated from the light that is bent by the sample [68].

Phase-contrast microscopy is an imaging mode that was revolutionary as a nonstaining method. This technique is based on the destructive interference of light waves when they are out of phase at half a wavelength. This microscopy system thus works by speeding up the light that is directly shining on the sample to create a phase shift of half of the wavelength with deviated light. The image generated by this positive phase contrast

has darker features and details, whereas the background appears lighter [69]. The setup consists of a phase plate or phase rings and annular grooves that allow the diffracted light to be delayed. Together with the wavelength retardation caused by the specimen itself, the resulting light rays are in the optimal phase difference range to generate an image of great contrast [49].

The last imaging type that will be described in this section is fluorescence microscopy. Fluorescence microscopes are designed to isolate the emitted light, which enhances the contrast of the fluorescent structures with the background. To be more precise, filters are used to ensure that the reflected light has a higher wavelength than the excitation light. The excitation light rays are generated from multispectral light induced from an arc-discharge lamp and pass through an excitation filter. The resulting light is then reflected on a dichromatic mirror or a beam splitter, which allows the sample to be fully illuminated. The fluorescence of a sample causes light emission, which is redirected to the dichromatic mirror and passes through a barrier or emission filter. This ensures that only the wavelengths of interest keep obtaining the final image. Fluorescence microscopy is unique in that it is the only imaging mode in which the sample produces its own fluorescence, which is emitted spherically after excitation, independent of the angle at which the light source is directed [70].

Sample preparation

Cell culture techniques

During a time lapse, cells or other live beings must be under the same conditions that they would be under if they were in incubators. For this reason, an environmental chamber can be coupled to a video microscope. The first time-lapse incubator became commercially available in 2009 [71]. There are two types of chambers (Fig. 2); the first one is described as an "open chamber", which allows the user to put Petri or multiwell dishes. When the chamber area is accessible, manipulation of the cells is possible, which allows, for example, adding drugs or changing the medium. The second type is a "closed chamber" that provides better isolation from the environment and better control over the temperature. There are an increasing number of custom-made video microscope incubators that are being designed for specific purposes, and some private companies, such as *Incucyte, have* also commercialized different live-cell imaging and analysis systems [2, 72]. The main difference lies in the price of the available products, which is

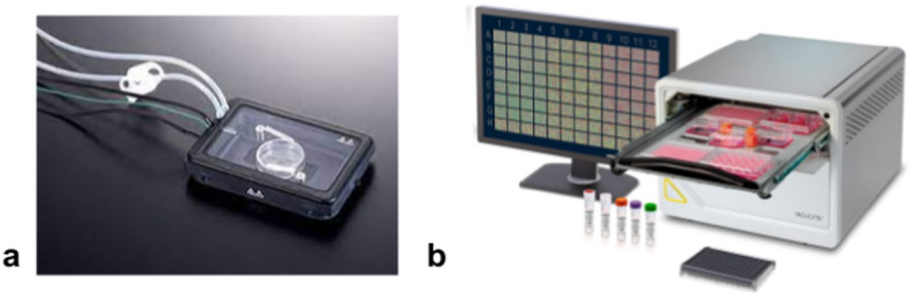


Fig. 2 Examples of different chambers; **a** INUB-GSI TOKAI HIT standard heating stage top incubator [77], **b** Sartorius' IncuCyte live-cell imaging [78]

directly linked to the related application. *The IncuCyte* is used principally for monitoring cell migration chemotaxis and is automated [73]. On the other hand, different models of time-lapse embryo monitoring systems exist; the first group consists of building an incubator environment around a previously available microscope. There is also a second group in which a time-lapse microscope system is placed in a standard incubator. Finally, the third group consists of a device with a specifically designed incubation environment and a generated microscope system inside it [74].

In all cases, live-cell chambers are coupled with a metal heating plate under thermistor control, and generally, a ring is placed around the microscope's optical lens. Not only are cells extremely sensitive to temperature variations, but microscopes are also highly sensitive. A shift in temperature can introduce unwanted movement in the optical path, causing a loss of focus [2].

Depending on the experimentation, there are different methods of image acquisition. In a long-term video-microscopy experiment, frames can be acquired every 10 min or over longer periods. In the short term, it is possible to take a maximum of 100 frames per second [75, 76].

Labeling and staining methods

One major problem in video microscopy is live sample labeling. Many biologists underestimate phototoxicity, which affects living organisms and can lead to death. Most of these deaths are caused by the production of reactive oxygen species (ROS). The deterioration of the samples is primarily the result of illumination overhead, which means that the fluorescence is not captured by the camera and still illuminates the samples [79]. One example of this phenomenon is the exposure of unlabeled green monkey kidney (Vero) cells for two to five minutes to blue light. Compared with cells exposed to direct sunlight, the authors reported a substantial reduction in cell proliferation with long exposure to blue light [80]. In general, fluorescent molecules absorb light energy and become excited. However, some of them can undergo photobleaching and generate ROS during the time-lapse process. These ROS can induce the production of catalases, peroxidases, or antioxidants [80]. This further delays the cell cycle. The high number of ROS produced in addition to the physiological ROS already present in cells cause enzymes to be overwhelmed, thus preventing the detoxification of ROS and causing cell death due to DNA damage. It is possible to measure the intensity of excitation with a power meter [80]. However, phototoxicity and photobleaching are two phases of this phenomenon; phototoxicity can affect organisms long before photobleaching is measurable [80]. To resolve this issue, two different solutions exist. The first consists of decreasing the power of the excitation light and compensating for it by increasing the exposure time. The second consists of decreasing the exposure time and increasing the power of the excitation light. This issue has been assessed by the development of fast-switching lamps (LED or not) and transitor-transitor logic circuits [79]. An example of a probe used for time lapse is SiR-DNA, a far-red fluorescent molecule that dyes DNA red and is well commercialized (Fig. 3). It is reported to be nontoxic, but some studies have shown that at concentrations less than 1 µM, SiR-DNA induces DNA damage responses and G2 arrest. This can be explained by the photochemical toxicity caused by

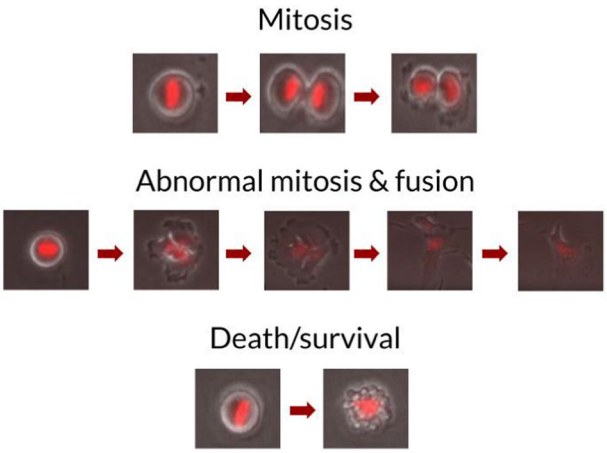


Fig. 3 An example of manipulations with Sir-DNA. Using this dye, we can identify different phenomena, such as mitosis, abnormal mitosis and fusion and cell death

the fluorescent excitation of molecules or by the DNA dying products that cause damage [81].

It is difficult to provide a general overview or protocol to prevent photo damage because it depends not only on the illumination but also on the nature of the sample and duration of the observation. Even the life cycle stage of a sample can affect the process; in fact, the early stages of cell development are more sensitive to illumination and damage [80]. Putting controls in total darkness without illumination is a good indicator of stress due to the illumination factor. Another phenomenon called "splash damage" is caused by excitation near the imaging field [80]. The majority of available cell-tracking systems are designed primarily for use with fluorescently labeled images [4]. However, time-lapse devices employ visible light imaging, which does not have a destructive effect on cells. This technique is a compromise between image quality and preservation of cell viability [2].

Image acquisition and analysis

Setting acquisition parameters

In a video-microscopy setting, the optimization of acquisition parameters is crucial for obtaining reliable high-quality data. The two main parameters that can be adjusted to better suit the experiment are the exposure time and the frame rate. The exposure time is defined as the number of photons that reach the camera detector and is time dependent; a longer exposure time is associated with a greater number of photons. This in turn intensifies the pixels, which results in a brighter image. The exposure time to be used must be adjusted depending on the camera choice and its associated dynamic range. The optimal exposure time requires some trial and error to be determined and is highly dependent on the signal or staining of the samples. In instances where the signal is not even, the exposure time must be set to obtain the best image possible, which might require some compromises. As a rule of thumb, a longer exposure time is better, but pixel saturation must be avoided. Luckily, most software shows the pixel intensity in red when it is saturated, thus making it possible to adjust the exposure time

so that most pixels are right below the saturation limit [82]. The second parameter that can be optimized depending on the experiment is the frame rate, which is related to the exposure time. The appropriate frame rate is determined by evaluating the speed at which the specimens move and thus how close each frame is to one another. However, high frame rates imply that the luminosity must be sufficiently high, thus limiting the exposure time [83].

Image processing software and image analysis

Once the video-microscopy experiment is complete and time-lapse images are obtained, processing software can be used to analyze the data quantitatively and qualitatively. Different analyses can be performed, but segmentation and cell tracking are among the most important methods and are discussed in this section. First, segmentation consists of the automatic detection of individual cells via a computer model. Most available methods rely on the intensity of the pixels and their distribution in the 2D space, but optimization of such techniques for a specific experiment is necessary and must be performed with extensive knowledge in code adaptation and image processing. The number of parameters, such as the threshold, can be subjective and affected by background noise, thus resulting in poor segmentation. Numerous algorithms have been developed and used in combination to overcome such issues [84]. Once segmentation is completed, the cells can be tracked to analyze their migration, cell cycle, and behavior. Video microscopy and cell migration analysis are crucial for the study of embryonic development, cell differentiation, the immune response, and tumor invasion. The plug-in Trackmate in Fiji (ImageJ) can perform both segmentation and tracking of cells [85]. While it is a powerful and user-friendly tool, it is not optimal for all types of images, and the output is not interactive, thus making it difficult and lengthy to analyze the results [85]. On the other hand, CellProfiler can also be used for tracking, but it does not provide a graphical user interface, thus making it difficult to verify the results while the images are being processed and to understand the effect of varying each parameter [85]. These software programs have difficulty using cancer cell lines when video microscopy is the tool used to study their comportment. For this reason, new software is being developed to facilitate cell segmentation, tracking, and other image analysis processes.

Computational advances and machine learning in image analysis

One major problem of time-lapse imaging is image analysis; analyzing the images composing videos can be time-consuming. To resolve this issue, the Cell Tracking Challenge was launched in 2012. The main goal of this challenge is to develop algorithms that can help biologists in their research. Moreover, with the share of robust cell segmentation and tracking algorithms, developers can evaluate their peers'algorithms. Since February 2017, the challenge has been opened for submissions that are ranked monthly and posted on the website, thus helping developers evaluate their algorithmic development. The first edition was dedicated to segmentation and tracking for time latches of labeled cells and nuclei in 2D and 3D. The second edition of the challenge in 2014 was dedicated to phase contrast in 2D and 3D developmental fluorescence data. Over the years, the cell tracking challenge has attracted increasing attention worldwide [86]. In 2023, the Cell Tracking Challenge published updates in

Nature Methods, presenting state-of-the-art methods and datasets [87]. Some other improvements in computational advances will be presented in this section as a sample of what the literature offers. As mentioned previously, the FIJI plug-in module TrackMate can be used for different experiments; for example, bacteria can be detected by this module, thus allowing the user to follow the total displacement of the bacteria [88]. A study compared 4 software programs for bacterial 2D time-lapse images: CellProfiler, SuperSegger-Omnipose, Deep Learning for Time-Lapse Analysis (DeLTA), and Feature Assisted Segementer Tracker (FAST). They discovered that deep-learning scripts performed the best. The main point to consider is how the software can perform segmentation of the bulk group of cells. Traditional segmentation involves watershed and thresholding adjustments, and both parameters are included with CellProfiler and FAST. For machine learning-based algorithms, DeLTA is trained on input images and corresponding annotations. Once the models are trained, they can generate annotations without the need for exterior input from the user [89].

Some scientists have also developed custom-made scripts for the following parameters. For example, a MATLAB code was designed for the measurement and analysis of cell morphology with *B. exovorus,* which allows the extraction of cell length and area [90]. In fact, an increasing number of homemade algorithms have been adapted to issues associated with biological research. Cancer Cell Tracker was developed to quantify the percentage of living myeloma cells and to identify the best therapeutic options for patients. In the age of precision medicine, this method has been revolutionary. It is standardized and easily reproducible; it makes documentation available to help participants use their algorithms [7]. Other researchers improved the analysis of virus time-lapse images by applying a superresolution algorithm, which resolved the issue of limited frame resolution. Their algorithm made it possible to detect and track the growth of viruses on individual plaques [91].

Application

Cell biology

Video microscopy can be used for live beings such as worms; it has been used since 1977 with the *C. Elegans* model [92]. Different fields of research use time lapse microscopy, but this technique was initiated mainly in the field of cell biology [76]. It is used to provide information on the transport and localization of proteins and their involvement in cell fate. Unlike fixed-cell techniques, time-lapse microscopy allows dynamic analysis, in contrast to a "snapshot" of a precise moment [93].

However, the benefit of such a technique also comes with some challenges; it can be difficult to focus on cells that are suspended. Some researchers have used agar pads to force the cells to be suspended at a defined location [93]. Additionally, when studying cells or complex organisms, disorganized or intricate movements can complicate analysis, whether conducted by humans or automated systems. The longer the sequence, the greater the complexity. [94, 95].

As explained earlier, personalized medicine is an emerging domain that will surely be revolutionary. This represents the future for serious illnesses that used to be considered untreatable, such as cancers [96]. As an example, Sahu et al. used reflectance confocal microscopy to capture the real-time evolution of basal cell carcinoma and melanoma

in vivo in patients. Video microscopy is perfectly appropriate for such research, as an analysis of patient-derived cells significantly helps clinicians make decisions on optimal treatment options. Moreover, it can be applied at any time during the progression of the disease. In other words, video microscopy is reusable for each patient at each time point. Furthermore, this technique is complementary to the use of genomic or proteomic data. In this case, the main goal is not to identify prognostic markers but to determine the single-cell evolution of cells exposed to a particular treatment. In other words, video microscopy can define, in a heterogeneous cancer cell population derived from patient tumors, how cancer cells respond individually to a specific drug and/or drug combination and predict the best treatment for the patient. Finally, this technique is noninvasive [7].

Cell division and its dynamics

Mitosis is the principle of division, which is highly regulated during cell life to protect against aberrant genetic transmission of information [97]. In terms of cell division, several noteworthy examples emerge, such as divisions for the development of individuals. With the *C. In the Elegans* model, researchers were able to measure seam cell division and distal tip cell migration. Using video microscopy, they monitored and controlled the cell cycle of *C.elegans* during embryogenesis as well as gene expression [98, 99]. Moreover, in cell division, it is crucial to know the cell cycle and which stage the cell is in. With temporally multiplexed imaging, it is possible to analyze the relationships between kinase activities in a single-cell manner, thus making it possible to identify different cell cycle signals and signal transduction cascades. This technique is interesting because it allows us to understand the precise relationships between the signals. Temporally multiplex imaging is an inexpensive strategy for analyzing signals in living cells and understanding the temporal properties of the cell cycle. The authors showed a relationship between CDK2 and CDK4/6 in specific phases of the cell cycle. However, it is not suitable for the detection of fast-changing dynamics (less than 0.5 s), and the intense illumination that is required must be considered [100]. In the field of live-cell imaging and quantification of proteins involved in the cell cycle, Cyclin B1 was quantified after nocodazole treatment, and mechanical stress and aberrant mitoses were evaluated [101]. Finally, cell division can also be studied in the context of diseases; Aurora kinase A was assessed in HEK293 T cells for chemoresistance via fluorescence time lapse [102].

What about the dynamic inside the cells? Many phenomena are characterized by changes in organelles or the cytoskeleton. Video microscopy offers an opportunity to gain insight into such events and to understand the underlying dynamics [103]. Observation of organelles and the cytoskeleton allows the elucidation of several points, such as embryo development [104]. Conventionally, the behavior of DNA is observed by injecting mRNA, which makes it possible to visualize the gene via fluorescence. Currently, live-cell imaging allows the observation of DNA (chromosomes), microtubules or microfilaments by dying agents [104]. During mitosis, the position of the centrosome is crucial and is regulated by a number of factors, either cytoplasmic, nuclear or extracellular. High-resolution video microscopy revealed that the centrosome in RPE-1 cells is regulated only by nuclear signals [105]. Another possibility for observing

chromosomes is to use StayGold, a fluorescent protein that is currently used to visualize cell fusion or for other membrane-targeting applications [106]. Furthermore, it can be used to observe the dynamics of chromosomes. With its improvements, StayGold is now able to target mitotic chromosomes, movement of the Golgi apparatus, and repartitioning of actin in live-cell imaging [106]. For the nuclear envelope, the envelope disassembles during the prophase stage and reassembles at telophase. Images were taken every minute with a DeltaVision RT microscope. However, the authors determined that some elements are lacking in their system to perfectly mimic the formation of the nuclear envelope subdomain [107].

In another study, an analysis of live images of organelles after virus infection was performed. With a reporter fluorescent label, the subcellular parts, such as microtubules, lysosomes and mitochondria, are colored [108]. Furthermore, it is now possible to visualize the dynamics of F-actin and MyoF into the cytosol of a parasite via video microscopy. The authors showed that MyoF organizes actin in Toxoplasma to promote cargo movement [109].

Moreover, observation of the structure of the endoplasmic reticulum and the nuclear envelope was made possible via video microscopy. There is no doubt that these junctions are vital for cells, but little is known about their structures. To resolve this issue, the authors investigated the ultrastructure during the cell cycle via live-cell imaging and high-resolution 3D imaging [110].

Developmental biology

Embryonic development studies

A number of studies were conducted on *C.elegans*; one notable article published in 1983 by Sulson and al. showed the complex embryonic cell lineage of the nematode [111]. Additionally, in the 1970 s, *Fertility and Sterility* published the article "In Vitro *Fertilization of Rabbit Ova: Time Sequence of Events*", in which the author provided documentation on the timing of spermatozoa penetrating the oocyte, polar body extrusion, formation of pronuclei, and cell division. During the experiment, 16 pictures were taken every minute [112]. With the rapid advances in microscopy technology and, more specifically, video microscopy, embryonic development studies in live time have been conducted. It is a powerful tool for recording living embryonic cells over time. This technology has been used for the selection of single embryos.

One of the most important aspects of this technology is that it is noninvasive and thus allows researchers to follow the morphology and development of embryos postfertilization. Most importantly, the observation period from fertilization to transfer is uninterrupted. Previously, embryo monitoring before implantation involved multiple steps back and forth from the environment to evaluate different parameters (morphology and developmental progression, for example). With this method, embryologists end with a single picture a day and disturbed culture conditions, which led to detrimental impacts on the embryo. With video microscopy, embryologists have more detailed information, such as the timing of cell division and changes in embryo morphology. The multiple advantages of video microscopy and the data quality it provides allow the selected embryos to have greater implantation potential.

Previous studies have shown that time-lapse devices allow the identification of morphokinetic parameters such as the disappearance of pronuclei and the duration of the cell cycle, which are indicative of low implantation rates or a greater risk of blastocyst development. Similarly, aneuploidy (an abnormal number of chromosomes) is a major hurdle *in* in vitro fertilization (IVF). Most tests used to verify whether an embryo is aneuploid require the extraction of one or more embryonic cells via biopsy or are invasive, which frequently leads to the death of the embryo. However, video microscopy provides a noninvasive alternative; some of the morphokinetic parameters remarkable by video microscopy are used to identify ploidy. Interobserver and intraobserver variability in video-microscopy evaluations are extremely consistent and reproducible, in contrast to static embryo culture and assessment [1, 71]. Moreover, the availability of video-microscopic devices for human studies has facilitated the use of this technique [74]. Owing to the development of artificial intelligence (AI) analysis of time-lapse embryo development, spontaneous abortion of a selected embryo can be predicted with 77% accuracy [112].

Tissue morphogenesis

In the context of tissue morphogenesis, bones are an interesting subject. They are highly regulated in terms of microstructure owing to mechano-regulation. This principle was investigated via in vivo video microscopy [113]. Obviously, some video-microscopy techniques also exist for tissue morphogenesis imaging in embryology. In fact, neural tube closure was investigated because of its designation as the most common human birth defect. This study is based principally on previous research on Axolotl and Xenopus. Even if it is impossible to compare different species, numerous similarities could be observed [114]. The closure of the neural tube was visualized via tdTomato fluorescence in the two species previously mentioned as well as in mouse models [115]. Finally, the same technique can be applied to vegetal studies; time-lapse imaging was combined with mechanical measurements to map the age of the cell wall and determine its elasticity in *Marchantia polymorpha gemmae* and *Arabidopsis Thaliana*. Indeed, the different parts of the plant do not grow in an isotropic manner and have some preferences in terms of growth direction [116].

Neuroscience

Neuronal imaging and synaptic activity

Studies using video microscopy for neuronal imaging and synaptic activity are numerous. Transfection with fusion proteins such as Rasal1 is common, and depolarizing solutions are used. Pictures are generally taken in a short time to understand the dynamics of the cells. For example, Rasal1 and its translocation have been implicated in neuronal development [117]. In another study, neurons were used to assess neurite integrity, and pictures were taken every 2 h over a period of 6 h via an IncuCyte. The neurite length and number of branch points were calculated, and the data were used in the study of Alzheimer's disease [118]. On the other hand, it is also possible to explore neurons in living animals. Owing to their transparency, zebrafish can be used to observe the fluorescence of dyed neurons [119]. Two-photon

live imaging is also possible and was used to track individual cells in the mouse cortex. The focus of this study was to understand astrocyte-to-neuron conversion [120].

Microbiology

Microbial populations show many variations, which is why investigations of individual cell behavior have increased in interest. The heterogeneity of bacteria originates mainly at the level of gene expression. Currently, gene and protein dynamics are analyzed via transcriptome and/or proteome analysis. Unfortunately, such techniques do not allow the detection of gene variation throughout the lifetime. However, the apparition of video microscopy was a revolution and made it possible to overcome this issue [6]. A protein can be tagged, and its evolution in cells can be followed in real time, which further provides an analysis of the characteristics of the cell morphology. For example, it is possible to analyze the protein AKT in individual cells and to observe the motility of *P. aeruginosa* via the use of green fluorescent protein [121]. AKT is an important protein in cell division and replication. Another application made possible by video microscopy is the monitoring of prey predator interactions between *B. exovorus* and its prey fate via time lapse. The research group who first studied this phenomenon presented new information about *B. exovorus* attacks and the role of the S-layer [90]. In the context of biofilms such as *P. aeruginosa* biofilms, 3D time lapse confocal imaging makes it possible to investigate the diffusion of proteins such as lectins. It was shown that chitosan nanoparticle penetration was improved in the presence of DNAse with both *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [122].

For viruses and viral particles, it is challenging to focus on cells, particularly on suspended cells. Some researchers have used agar pads to monitor the cells correctly and control their location. For example, it was used for human immunodeficiency virus type 1 [93]. Moreover, time-lapse imaging can be used for investigating the behavior of viral plaques, which is crucial for understanding their spatial dynamics [91].

Discussion

Technical limitations

One of the main drawbacks of video microscopy is sample visualization: dyeing the nucleus or organelles has a severe impact on biological processes. In addition, phototoxicity and photobleaching effects must be considered to prevent side effects that can impact living beings, which is of particular importance in reproductive biology [79].

On the other hand, currently used embryology video microscopy does not allow for embryo rotation, a phenomenon that is particularly important for understanding blastomeres [74]. Monitoring a population of heterogeneous cells is also a major hurdle in video microscopy. This is particularly true when a biopsy is taken from a cancer patient and cultured, even when a single cancer cell line is cultured. Studying these types of cells in vitro is still a great challenge.

Finally, the majority of the studies are made on transparent subjects, making it easier the visualization of the components or stains [123, 124].

Overcoming imaging artifacts

An artifact is an object that has undergone even the slightest transformation by humans; thus, it is distinct from any object whose modification is due to a natural phenomenon. Scientists have been trying to understand how to overcome artifacts for many years. An analysis of vascular networks revealed that representing 3D vascular networks is laborious and involves many artifacts. To resolve this issue, the authors created 3DVascNet, a deep learning-based software for automation and quantification [125]. Artifacts can also result from the inherent contractile movements of the lungs or heart. New software was developed to balance these effects [126]. In oncology, artifacts limit the ability of radiologists to analyze mammography; computer-aided diagnosis was created to overcome these difficulties [127]. When biological samples are imaged, the interaction between light and the object can affect the image formation process. Artifacts generally come from single-sided illumination, which makes stripes appear and contributes to the poor quality of the images. To reduce this effect, light-sheet fluorescence microscopy was developed with selective illumination of a single plane of a sample. However, sometimes, this path occludes the light sheet. A study presented a solution with a flexible multibeam light sheet [128]. Furthermore, imaging systems such as EVOS (produced by *ThermoScientific*) encounter some issues with image analysis. Some of these issues involve stitching artifacts that impact the efficiency of the analysis. To overcome these problems, scientists created cell counting pipelines from the images taken by EVOS. Illumination correction was automatically applied [129].

Future directions in video microscopy

Finally, what could be the future of video microscopy? However, the progression of this technique has occurred in recent years; some improvements are still needed. The integration of an automatic cell tracking system coupled with a video-microscope device could save time but would also reduce the subjectivity of the analysis.

Artificial intelligence, particularly deep learning and machine learning, offers new perspectives. However, as mentioned earlier, image artifacts can pose significant challenges. Moreover, progress is hindered by a general lack of understanding surrounding AI. Regular updates are essential to help biologists learn how to effectively integrate this tool into their daily work [130–133]. Improvements in artificial intelligence will make in silico experiments possible with computer simulations. Far surpassing the human capacity to generate experiences, as well as inter- and intra-experimental variability [134].

But for the moment, guidelines on the duration of illumination must be established to provide generalized protocols. Moreover, this technology benefits from being accessible to everyone at reduced costs to help in the linearization of time-lapse imaging [112].

With this aim in mind, we developed a new software named Toto-Cell that can provide quantifying and qualifying data of lime imaging information [76].

Conclusion

In conclusion, the advancement of single-cell analysis has grown exponentially in recent years. Alongside video microscopy, techniques such as genomic and proteomic sequencing at the single-cell level have emerged. Novel methods like seqFISH and MERFISH enable researchers to analyze the spatial distribution and copy number of RNA or DNA within cells on a larger scale [135–138].

Video microscopy has led to significant improvements in biological research, providing novel insights into cellular and subcellular processes. This review outlined the historical development of microscopy and the parallel evolution of video microscopy and emphasized the significance of this technique in various research fields. Furthermore, the challenges and limitations of this technique, such as phototoxicity, photobleaching, and difficulty in cell tracking, were mentioned, and several potential solutions were presented. Video microscopy opens the realm of possibilities, especially when combined with other imaging technologies, and provides answers to a variety of biological questions and for the study of many human diseases.

Author contributions
LIR and KB wrote the manuscript, and EA supervised, reviewed and revised the manuscript.

Funding
Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to EA, RGPIN-2025-05564.

Data availability
No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Received: 11 September 2024 Accepted: 1 April 2025
Published online: 16 April 2025

References

1. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: towards a general characterisation of embryogenesis. Anim Reprod Sci. 2016;174:2–10. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.015.
2. Terryn C, et al. Video-microscopic imaging of cell spatio-temporal dispersion and migration. Crit Rev Oncol Hematol. 2009;69(2):144–52. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.06.005.
3. Márquez-Hinojosa S, Noriega-Hoces L, Guzmán L. Time-lapse embryo culture: a better understanding of embryo development and clinical application. JBRA Assist Reprod. 2022;26(3):432–43. https://doi.org/10.5935/1518-0557.20210107.
4. Hand A, Sun T, Barber D, Hose D, MacNeil S. Automated tracking of migrating cells in phase-contrast video microscopy sequences using image registration. J Microsc. 2009;234(1):62–79. https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03144.x.
5. Siete C, Xiong R, Khalid A, Hsieh YW, Chuang CF. Immobilization of *C. elegans* with different concentrations of an anesthetic for time-lapse imaging of dynamic protein trafficking in neurons. MicroPubl Biol. 2024. https://doi.org/10.17912/micropub.biology.001069.
6. Klein J, Leupold S, Biegler I, Biedendieck R, Münch R, Jahn D. TLM-Tracker: software for cell segmentation, tracking and lineage analysis in time-lapse microscopy movies. Bioinformatics. 2012;28(17):2276–7. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts424.
7. Jiang Q, et al. CancerCellTracker: a brightfield time-lapse microscopy framework for cancer drug sensitivity estimation. Bioinformatics. 2022;38(16):4002–10. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac417.
8. Kan Z, Liu T-J. Video microscopy of tumor metastasis: using the green fluorescent protein (GFP) gene as a cancer-cell-labeling system. Clin Exp Metast. 1999;17(1):59–66. https://doi.org/10.1023/A:1026478105365.
9. Walter RJ, Berns MW. Computer-enhanced video microscopy: digitally processed microscope images can be produced in real time. Proc Natl Acad Sci USA. 1981;78(11):6927–31. https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6927.

10. Schnabel R, Hutter H, Moerman D, Schnabel H. Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification. Dev Biol. 1997;184(2):234–65. https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8509.
11. Bao Z, Murray JI, Boyle T, Ooi SL, Sandel MJ, Waterston RH. Automated cell lineage tracing in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(8):2707–12. https://doi.org/10.1073/pnas.0511111103.
12. Croft WJ. Under the microscope : a brief history of microscopy. Hackensack: World Scientific; 2006.
13. History of microscopy–timeline. Science learning hub. 2014. https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1692-history-of-microscopy-timeline. Accessed 20 Jan 2025.
14. Wollman AJ, Nudd R, Hedlund EG, Leake MC. From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. Open Biol. 2015;5(4): 150019. https://doi.org/10.1098/rsob.150019.
15. Trevelyan O. AZoLifeSciences. AZoLifeSciences, 2021. https://www.azolifesciences.com/article/What-is-Microscopy.aspx#:~:text=The%20word%20microscope%20is%20derived,science%20of%20using%20a%20microscope. Accessed 20 Jan 2025.
16. Masters BR. History of the optical microscope in cell biology and medicine. Encycl Life Sci. 2008. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003082.
17. Lane N. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) Concerning little animals. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015;370(1666):20140344. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0344.
18. Wimmer W. Carl Zeiss, Ernst Abbe, and advances in the light microscope. Microsc Today. 2017;25(4):50–7. https://doi.org/10.1017/s155192951700058x.
19. Smith Y. News-medical. 2017. https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-the-Electron-Microscope.aspx#:~:text=It%20was%20Ernst%20Ruska%20and,was%20possible%20with%20electron%20microscopy. Accessed 20 Jan 2025.
20. Yin Z, Kanade T, Chen M. Understanding the phase contrast optics to restore artifact-free microscopy images for segmentation. Med Image Anal. 2012;16(5):1047–62. https://doi.org/10.1016/j.media.2011.12.006.
21. The Editors of Encyclopædia Britannica. Cable television, definition, history, and facts. Britannica. In: Encyclopædia Britannica. 2024.
22. Inoué S, Walter RJ, Berns MW, Ellis GW, Hansen E. Video microscopy. New York: Springer Science+Business Media, LLC.; 1986. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6925-8.
23. Chrzanowski K. Review of night vision technology. Opto Electr Rev. 2013. https://doi.org/10.2478/s11772-013-0089-3.
24. Zech L. TV-contrast enhancement methods for chromosome analysis. In: Dendy PP, Ernst DW, Şengün A, editors. Technical advances in biomedical physics. Dordrecht: Springer; 1984. p. 111–6.
25. Khouani A, El Habib Daho M, Mahmoudi SA, Chikh MA, Benzineb B. Automated recognition of white blood cells using deep learning. Biomed Eng Lett. 2020;10(3):359–67. https://doi.org/10.1007/s13534-020-00168-3.
26. Hárosi FI. Microspectrophotometry: the technique and some of its pitfalls. In: Ali MA, editor. Vision in fishes: new approaches in research. Boston: Springer; 1975. p. 43–54.
27. Brodsky V. 100th anniversary of the birth of Evgenii Mikhailovich Brumberg. Biol Bull. 2007;34:208–9. https://doi.org/10.1134/S1062359007020161.
28. Ris H. A quantitative study of anaphase movement in the aphid tamalia. Biol Bull. 1943;85(2):164–78. https://doi.org/10.2307/1538278.
29. Wienert V, Lentner A, Böhler U. Methodology and application of fluorescence techniques in dermatology. In: Frosch PJ, Kligman AM, editors. Noninvasive methods for the quantification of skin functions: an update on methodology and clinical applications. Berlin: Springer; 1993. p. 291–308.
30. Davidson MW. Pioneers in optics: James bradley and August köhler. Microscopy Today. 2013;21(5):50–2. https://doi.org/10.1017/S155192951300076X.
31. Renz M. Fluorescence microscopy—a historical and technical perspective. Cytometry A. 2013;83(9):767–79. https://doi.org/10.1002/cyto.a.22295.
32. Gross D, Kaiser S, Gräf C, Uhlendahl H, Schmidt M. Between fiction and reality: Herwig Hamperl (1899–1976) and the Third Reich as reflected in his autobiography. Pathol Res Pract. 2019;215(4):832–41. https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.12.019.
33. Gilkes MJ, Smith CH, Sowa J. Staining of the inclusion bodies of trachoma and inclusion conjunctivitis. Br J Ophthalmol. 1958;42(8):473–7. https://doi.org/10.1136/bjo.42.8.473.
34. Taylor HR, Agarwala N, Johnson SL. Detection of experimental Chlamydia trachomatis eye infection in conjunctival smears and in tissue culture by use of fluorescein-conjugated monoclonal antibody. J Clin Microbiol. 1984;20(3):391–5. https://doi.org/10.1128/jcm.20.3.391-395.1984.
35. Bertalanffy LV. Acridine orange fluorescence in cell physiology, cytochemistry and medicine. Protoplasma. 1963;57:51–83.
36. Bisht D, Saxena S, Kharayat NS, Gautam S. Protocols for immunofluorescence techniques. In: Deb R, Yadav AK, Rajkhowa S, Malik YS, editors. Protocols for the diagnosis of pig viral diseases. New York: Springer, US; 2022. p. 215–29.
37. Zeng Y, Sun Q, Qu JY. Nonlinear multimodal optical imaging. In: Ho AH-P, Kim D, Somekh MG, editors. Handbook of photonics for biomedical engineering. Dordrecht: Springer; 2017. p. 461–501.
38. Parodi V, Jacchetti E, Osellame R, Cerullo G, Polli D, Raimondi MT. Nonlinear optical microscopy: from fundamentals to applications in live bioimaging. Front Bioeng Biotechnol. 2020. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.585363.
39. Rehberg M, Krombach F, Pohl U, Dietzel S. Label-free 3D visualization of cellular and tissue structures in intact muscle with second and third harmonic generation microscopy. PLoS ONE. 2011;6(11): e28237. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028237.
40. Li S, Li Y, Yi R, Liu L, Qu J. Coherent anti-stokes raman scattering microscopy and its applications. Front Phys. 2020. https://doi.org/10.3389/fphy.2020.598420.
41. Dlugosz E. Multiphoton microscopy evolves with the aid of laser systems. Photonics.com. 2023. https://www.photonics.com/Articles/Multiphoton_Microscopy_Evolves_with_the_Aid_of/a69271. Accessed 20 Jan 2025.

42. Nasse MJ, Woehl JC, Huant S. High-resolution mapping of the three-dimensional point spread function in the near-focus region of a confocal microscope. Appl Phys Lett. 2007. https://doi.org/10.1063/1.2431764.
43. Rovensky Y, Saparin G. Handbook of biological confocal microscopy, revised edition Edited by James B. Pawley Plenum Press, New York and London (1990, 1989) 232 pages, illustrations ISBN 0-306-43538-1. Scanning. 1992. https://doi.org/10.1002/sca.4950140210.
44. Kaiser W, Garrett CGB. Two-photon excitation in Ca${\mathrm{F}}_{2}$: ${\mathrm{Eu}}^{2+}$. Phys Rev Lett. 1961;7(6):229–31. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.229.
45. Abella ID. Optical double-photon absorption in cesium vapor. Phys Rev Lett. 1962;9(11):453–5. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.9.453.
46. Kaminer I, Nemirovsky J, Segev M. Optimizing 3D multiphoton fluorescence microscopy. Opt Lett. 2013;38(19):3945–8. https://doi.org/10.1364/OL.38.003945.
47. Zhang Y, et al. Super-resolution fluorescence microscopy by stepwise optical saturation. Biomed Opt Expr. 2018;9(4):1613–29. https://doi.org/10.1364/BOE.9.001613.
48. Corle TR, Kino GS. Chapter 1-introduction. In: Corle TR, Kino GS, editors. Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems. Burlington: Academic Press; 1996. p. 1–66.
49. Lovitt RW, Wright CJ. Microscopy, light microscopy. In: Robinson RK, editor. Encyclopedia of food microbiology. Oxford: Elsevier; 1999. p. 1379–88.
50. Anatomy of a microscope. Teledyne Photometrics. 2022. https://www.photometrics.com/learn/microscopy-basics/anatomy-of-a-microscope#:~:text=For%20the%20purposes%20of%20microscopy,cone%20cells%20can%20detect%20it. Accessed 20 Jan 2025.
51. Rottenfusser R, Wilson EE, Davidson MW. ZEISS microscopy online campus, microscopy basics, numerical aperture and resolution. Fsu edu. 2024. https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/resolution.html#:~:text=URL%3A%20https%3A%2F%2Fzeiss. Accessed 20 Jan 2025.
52. Fulghum L. Understanding microscope objectives: world precision instruments. Wpiinc.com. 2013. https://www.wpiinc.com/blog/post/understanding-microscope-objectives?srsltid=AfmBOorxmgdfYBqdMPQWqzRw5Yc0M7mgYg6SmcPcPOH8czY-1h3eNYxg. Accessed 20 Jan 2025.
53. Rottenfusser R, Wilson EE, Davidson MW. ZEISS microscopy online campus, microscopy basics, objectives. Fsu.edu. 2024. https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/objectives.html. Accessed 20 Jan 2025.
54. Nothnagle PW, Chambers W, Fellers TJ, Davidson MW. Reflected (Episcopic) Light Illumination. Nikon's MicroscopyU. 2024. https://www.microscopyu.com/techniques/stereomicroscopy/reflected-episcopic-light-illumination. Accessed 20 Jan 2025.
55. Upham LV, Englert DF. 13-Radionuclide imaging. In: L'Annunziata MF, editor. Handbook of radioactivity analysis (second edition). San Diego: Academic Press; 2003. p. 1063–127.
56. Xia Y, Zhang J, Tang C, Pan W. Research and application of online monitoring of coal and biomass co-combustion and biomass combustion characteristics based on combustion flame. J Energy Inst. 2023;108:101191. https://doi.org/10.1016/j.joei.2023.101191.
57. Monochrome microscopy cameras and their benefits. Microscopeworld.com. 2024. https://www.microscopeworld.com/t-monochrome_microscopy_cameras.aspx. Accessed 20 Jan 2025.
58. Spring KR, Russ JC, Davidson MW. Digital imaging in optical microscopy - basic concepts in digital image processing, Olympus LS. Olympus-lifescience.com. 2020. https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/digitalimaging/imageprocessingintro/. Accessed 20 Jan 2025.
59. 10.6: Resolution and Imaging. Engineering LibreTexts. 2019. https://eng.libretexts.org/Bookshelves/Materials_Science/TLP_Library_II/10%3A_Optical_Micoscopy_and_Specimen_Preparation/10.6%3A_Resolution_and_Imaging. Accessed 20 Jan 2025.
60. Inoué S. Chapter 3 Imaging of unresolved objects, superresolution, and precision of distance measurement with video microscopy. In: Taylor L, Wang YL, editors. Methods in cell biology, vol. 30. Amsterdam: Academic Press; 1989. p. 85–112.
61. Ockenga W. Optical contrast methods. Leica-microsystems.com. 2011. https://www.leica-microsystems.com/science-lab/microscopy-basics/optical-contrast-methods/. Accessed 20 Jan 2025.
62. Murphy DB, Hoffman R, Spring KR, Davidson MW. Specimen contrast in optical microscopy. Nikon's MicroscopyU. 2024. https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/specimen-contrast-in-optical-microscopy. Accessed 20 Jan 2025.
63. Rottenfusser R, Wilson EE, Davidson MW. ZEISS Microscopy online campus, microscopy basics, enhancing contrast in transmitted light. Fsu.edu. 2024. https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html#:~:text=URL%3A%20https%3A%2F%2Fzeiss. Accessed 20 Jan 2025.
64. Shotton DM. Review: video-enhanced light microscopy and its applications in cell biology. J Cell Sci. 1988;89(2):129–50. https://doi.org/10.1242/jcs.89.2.129.
65. Supriya N. What is bright field microscopy? Definition, steps and working-biology reader. Biol Read. 2019. https://biologyreader.com/bright-field-microscopy.html.
66. Taichi Y. What is brightfield microscopy?. Olympus-lifescience.com. 2023. https://www.olympus-lifescience.com/en/discovery/what-is-brightfield-microscopy/. Accessed 20 Jan 2025.
67. F. Mokobi, "Brightfield Microscope (Compound Light Microscope)- Definition, Principle, Parts," *Microbe Notes,* 2022. [Online]. Available: https://microbenotes.com/brightfield-microscope/.
68. Piper J, Piper T. Microscopic modalities and illumination techniques. In: Cristóbal G, Blanco S, Bueno G, editors. Modern trends in diatom identification: fundamentals and applications. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 53–93.
69. Abramowitz M, Davidson MW. Phase contrast microscopy–introduction, olympus LS, Olympus-lifescience.com. 2020. https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/phasecontrast/phase/. Accessed 20 Jan 2025.
70. Spring KR, Davidson MW. Introduction to fluorescence microscopy. Nikon's MicroscopyU, 2024. https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy. Accessed 20 Jan 2025.

71. Sciorio R, Meseguer M. Focus on time-lapse analysis: blastocyst collapse and morphometric assessment as new features of embryo viability. Reprod Biomed Online. 2021;43(5):821–32. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.08.008.
72. Live cell analysis instruments, Sartorius. Sartorius. 2020. https://www.sartorius.com/en/products/live-cell-imaging-analysis/live-cell-analysis-instruments. Accessed 20 Jan 2025.
73. Chen J, et al. Leveraging the IncuCyte technology for higher-throughput and automated chemotaxis assays for target validation and compound characterization. SLAS Discov. 2018;23(2):122–31. https://doi.org/10.1177/2472555217733437.
74. Findikli N, Oral E. Time-lapse embryo imaging technology: does it improve the clinical results? Curr Opin Obstet Gynecol. 2014;26(3):138–44. https://doi.org/10.1097/gco.0000000000000072.
75. Hur SW, et al. Capturing cell morphology dynamics with high temporal resolution using single-shot quantitative phase gradient imaging. J Biomed Opt. 2024;29(Suppl 2):S22712. https://doi.org/10.1117/1.Jbo.29.S2.S22712.
76. Renaud LI, Renaud C, Delepoulle S, Asselin E. Toto-cell: a new software to analyze cellular events during video-microscopy. PLoS ONE. 2024;19(6): e0302042. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302042.
77. INUB-GSI TOKAI HIT Standard heating stage top incubator. Spectra services. 2024. https://spectraservices.com/product/INUB-GSI.html.
78. Incucyte live-cell analysis systems. Laboratory talk. Laboratorytalk.com. 2022. https://laboratorytalk.com/article/2091660/incucyte-live-cell-analysis-systems.
79. Kiepas A, Voorand E, Mubaid F, Siegel PM, Brown CM. Optimizing live-cell fluorescence imaging conditions to minimize phototoxicity. J Cell Sci. 2020. https://doi.org/10.1242/jcs.242834.
80. Laissue PP, Alghamdi RA, Tomancak P, Reynaud EG, Shroff H. Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. Nat Methods. 2017;14(7):657–61. https://doi.org/10.1038/nmeth.4344.
81. Sen O, Saurin AT, Higgins JMG. The live cell DNA stain SiR-Hoechst induces DNA damage responses and impairs cell cycle progression. Sci Rep. 2018;8(1):7898. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26307-6.
82. Exposure times, Thermo fisher scientific-CA. Thermofisher.com. 2024. https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/capturing-analyzing-your-samples/exposure-times.html. Accessed 20 Jan 2025.
83. Cuny AP, Schlottmann FP, Ewald JC, Pelet S, Schmoller KM. Live cell microscopy: from image to insight. Biophys Rev. 2022. https://doi.org/10.1063/5.0082799.
84. Liu P, et al. Software tools for 2D cell segmentation. Cells. 2024. https://doi.org/10.3390/cells13040352.
85. Aragaki H, Ogoh K, Kondo Y, Aoki K. LIM Tracker: a software package for cell tracking and analysis with advanced interactivity. Sci Rep. 2022. https://doi.org/10.1038/s41598-022-06269-6.
86. History and publications–cell tracking challenge. Celltrackingchallenge.net, 2017. https://celltrackingchallenge.net/history/. Accessed 20 Jan 2025.
87. Maška M, et al. The cell tracking challenge: 10 years of objective benchmarking. Nat Methods. 2023;20(7):1010–20. https://doi.org/10.1038/s41592-023-01879-y.
88. Apolinario E, et al. Antisera against flagellin A or B inhibits Pseudomonas aeruginosa motility as measured by novel video microscopy assay. J Immunol Methods. 2024;531: 113701. https://doi.org/10.1016/j.jim.2024.113701.
89. Ahmadi A, Courtney M, Ren C, Ingalls B. A benchmarked comparison of software packages for time-lapse image processing of monolayer bacterial population dynamics. Microbiol Spectr. 2024. https://doi.org/10.1128/spectrum.00032-24.
90. Santin YG, Sogues A, Bourigault Y, Remaut HK, Laloux G. Lifecycle of a predatory bacterium vampirizing its prey through the cell envelope and S-layer. Nat Commun. 2024;15(1):3590. https://doi.org/10.1038/s41467-024-48042-5.
91. Han C, Yang C. Viral plaque analysis on a wide field-of-view, time-lapse, on-chip imaging platform. Analyst. 2014;139(15):3727–34. https://doi.org/10.1039/c3an02323k.
92. Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol. 1977;56(1):110–56. https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0.
93. Ivanusic D, Madela K, Bannert N, Denner J. Time-lapse imaging of CD63 dynamics at the HIV-1 virological synapse by using agar pads. MicroPubl Biol. 2022. https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000648.
94. Hiraiwa S, Kojima T. Long-term live imaging of drosophila pupal leg development after puparium removal. J Vis Exp. 2025. https://doi.org/10.3791/67597.
95. Bedggood P, et al. Improved tracking of corneal immune cell dynamics using in vivo confocal microscopy. Biomed Opt Expr. 2024;15(11):6277–98. https://doi.org/10.1364/boe.536553.
96. Sahu A, et al. In vivo tumor immune microenvironment phenotypes correlate with inflammation and vasculature to predict immunotherapy response. Nat Commun. 2022;13(1):5312. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32738-7.
97. Budzyński MA, Wong AKL, Faghihi A, Teves SS. A dynamic role for transcription factors in restoring transcription through mitosis. Biochem Soc Trans. 2024;52(2):821–30. https://doi.org/10.1042/bst20231022.
98. Gritti N, Kienle S, Filina O, van Zon JS. Long-term time-lapse microscopy of *C. elegans* post-embryonic development. Nat Commun. 2016;7(1):12500. https://doi.org/10.1038/ncomms12500.
99. Bao Z, Zhao Z, Boyle TJ, Murray JI, Waterston RH. Control of cell cycle timing during *C. elegans* embryogenesis. Dev Biol. 2008;318(1):65–72. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.054.
100. Qian Y, Celiker OT, Wang Z, Guner-Ataman B, Boyden ES. Temporally multiplexed imaging of dynamic signaling networks in living cells. Cell. 2023;186(25):5656-5672.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.010.
101. Bastianello G, et al. Mechanical stress during confined migration causes aberrant mitoses and c-MYC amplification. Proc Natl Acad Sci USA. 2024;121(29): e2404551121. https://doi.org/10.1073/pnas.2404551121.
102. Chen X, et al. Caspase-mediated AURKA cleavage at Asp(132) is essential for paclitaxel to elicit cell apoptosis. Theranostics. 2024;14(10):3909–26. https://doi.org/10.7150/thno.97842.
103. Li T. Methods and protocols for live imaging in development. J Vis Exp. 2023. https://doi.org/10.3791/64642.

104. Okabe M, et al. An approach for live imaging of first cleavage in mouse embryos using fluorescent chemical probes for DNA, microtubules, and microfilaments. Reprod Med Biol. 2023;22(1): e12551. https://doi.org/10.1002/rmb2.12551.
105. Lima JT, Pereira AJ, Ferreira JG. The LINC complex ensures accurate centrosome positioning during prophase. Life Sci Alli. 2024. https://doi.org/10.26508/lsa.202302404.
106. Ando R, et al. StayGold variants for molecular fusion and membrane-targeting applications. Nat Methods. 2024;21(4):648–56. https://doi.org/10.1038/s41592-023-02085-6.
107. Funakoshi T, Imamoto N. Reconstitution of nuclear envelope subdomain formation on mitotic chromosomes in semi-intact cells. Cell Struct Funct. 2024;49(2):31–46. https://doi.org/10.1247/csf.24003.
108. Hutchison V, Lynch A, Gutierrez-Gamez AM, Chen J. Inducible tricolor reporter mouse for parallel imaging of lysosomes, mitochondria, and microtubules. J Cell Biol. 2024. https://doi.org/10.1083/jcb.202305086.
109. Kellermeier JA, Heaslip AT. Myosin F controls actin organization and dynamics in *Toxoplasma gondii*. Mol Biol Cell. 2024;35(4):57. https://doi.org/10.1091/mbc.E23-12-0510.
110. Bragulat-Teixidor H, Ishihara K, Szücs GM, Otsuka S. The endoplasmic reticulum connects to the nucleus by constricted junctions that mature after mitosis. EMBO Rep. 2024;25(7):3137–59. https://doi.org/10.1038/s44319-024-00175-w.
111. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol. 1983;100(1):64–119. https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4.
112. Babayev E, Feinberg EC. Embryo through the lens: from time-lapse cinematography to artificial intelligence. Fertil Steril. 2020;113(2):342–3. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.001.
113. Griesbach JK, Schulte FA, Schädli GN, Rubert M, Müller R. Mechanoregulation analysis of bone formation in tissue engineered constructs requires a volumetric method using time-lapsed micro-computed tomography. Acta Biomater. 2024;179:149–63. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2024.03.008.
114. Handler C, Scarcelli G, Zhang J. Time-lapse mechanical imaging of neural tube closure in live embryo using Brillouin microscopy. Sci Rep. 2023;13(1):263. https://doi.org/10.1038/s41598-023-27456-z.
115. Molè MA, Galea GL, Copp AJ. Live-imaging analysis of epithelial zippering during mouse neural tube closure. Methods Mol Biol. 2023;2608:147–62. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2887-4_10.
116. Bonfanti A, et al. Stiffness transitions in new walls post-cell division differ between *Marchantia polymorpha* gemmae and *Arabidopsis thaliana* leaves. Proc Natl Acad Sci. 2023;120(41): e2302985120. https://doi.org/10.1073/pnas.2302985120.
117. Deurloo MHS, et al. Rasal1 regulates calcium dependent neuronal maturation by modifying microtubule dynamics. Cell Biosci. 2024;14(1):13. https://doi.org/10.1186/s13578-024-01193-w.
118. Wang Z, et al. Learnings about Aβ from human brain recommend the use of a live-neuron bioassay for the discovery of next generation Alzheimer's disease immunotherapeutics. Acta Neuropathol Commun. 2023;11(1):39. https://doi.org/10.1186/s40478-023-01511-2.
119. Doszyn O, Dulski T, Zmorzynska J. Diving into the zebrafish brain: exploring neuroscience frontiers with genetic tools, imaging techniques, and behavioral insights. Front Mol Neurosci. 2024;17:1358844. https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1358844.
120. Xiang Z, et al. Two-photon live imaging of direct glia-to-neuron conversion in the mouse cortex. Neural Regen Res. 2024;19(8):1781–8. https://doi.org/10.4103/1673-5374.386401.
121. Gross SM, Rotwein P. Akt signaling dynamics in individual cells. J Cell Sci. 2015;128(14):2509–19. https://doi.org/10.1242/jcs.168773.
122. Nafee N, Gaber DM, Abouelfetouh A, Alseqely M, Empting M, Schneider M. Enzyme-linked lipid nanocarriers for coping pseudomonal pulmonary infection. would nanocarriers complement biofilm disruption or pave its road? Int J Nanomedicine. 2024;19:3861–90. https://doi.org/10.2147/ijn.S445955.
123. Montanari A, Wittamer V. Live imaging and characterization of microglia dynamics in the zebrafish embryo. J Vis Exp. 2024. https://doi.org/10.3791/66533.
124. Kim J, et al. Imaging and quantifying mitochondrial morphology in *C. elegans* during aging. J Vis Exp. 2025. https://doi.org/10.3791/67610.
125. Narotamo H, Silveira M, Franco CA. 3DVascNet: an automated software for segmentation and quantification of mouse vascular networks in 3D. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2024;44(7):1584–600. https://doi.org/10.1161/atvbaha.124.320672.
126. Kavanagh DPJ, Kalia N. Live intravital imaging of cellular trafficking in the cardiac microvasculature—beating the odds. Front Immunol Rev. 2019. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02782.
127. Larroza A, Pérez-Benito FJ, Tendero R, Perez-Cortes JC, Román M, Llobet R. Breast delineation in full-field digital mammography using the segment anything model. Diagnostics (Basel). 2024. https://doi.org/10.3390/diagnostics14101015.
128. Sancataldo G, et al. Flexible multi-beam light-sheet fluorescence microscope for live imaging without striping artifacts. Front Neuroanat. 2019;13:7. https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00007.
129. Klimaj SD, Licon Munoz Y, Del Toro K, Hines WC. A high-throughput imaging and quantification pipeline for the EVOS imaging platform. PLoS ONE. 2020;15(8): e0236397. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236397.
130. von Chamier L, Laine RF, Henriques R. Artificial intelligence for microscopy: what you should know. Biochem Soc Trans. 2019;47(4):1029–40. https://doi.org/10.1042/bst20180391.
131. Kleinberger Riedrich O. AI for microscopy image analysis–now and beyond. ZEISS. Zeiss.com. 2024. https://www.zeiss.com/microscopy/en/resources/insights-hub/life-sciences/ai-for-microscopy-image-analysis.html.
132. Bhattiprolu S. From machine learning to deep learning: revolutionizing microscopy image analysis. Microsc Today. 2024;32(6):13–9. https://doi.org/10.1093/mictod/qaae082.
133. Bilodeau A, et al. Development of AI-assisted microscopy frameworks through realistic simulation with pySTED. Nat Mach Intell. 2024;6(10):1197–215. https://doi.org/10.1038/s42256-024-00903-w.
134. Imboden S, Liu X, Payne MC, Hsieh CJ, Lin NYC. Trustworthy in silico cell labeling via ensemble-based image translation. Biophys Rep (N Y). 2023;3(4):100133. https://doi.org/10.1016/j.bpr.2023.100133.

135. MERFISH spatial transcriptomics, Vizgen. Vizgen. 2024. https://vizgen.com/technology/#merfish. Accessed 20 Jan 2025.
136. seqFISH, Cai Lab. Caltech.edu. 2020. https://spatial.caltech.edu/seqfish/. Accessed 20 Jan 2025.
137. Moffitt JR, Zhuang X. RNA imaging with multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization (MERFISH). Methods Enzymol. 2016;572:1–49. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.03.020.
138. Chen KH, Boettiger AN, Moffitt JR, Wang S, Zhuang X. Spatially resolved highly multiplexed RNA profiling in single cells. Science. 2015;348(62):6090. https://doi.org/10.1126/science.aaa6090.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Renaud *et al. Discover Oncology* (2025) 16:1874
https://doi.org/10.1007/s12672-025-03652-3

Discover Oncology

REVIEW Open Access

Endometrial cancer: from clinical reality to molecular treatment

Léa-Isabelle Renaud[1], Elisabeth St-Laurent[1], Coralie Compare[2], Raphaëlle Proulx[1], Jasmine Nolan[1] and Eric Asselin[1*]

*Correspondence:
Eric Asselin
eric.asselin@uqtr.ca
[1]Département de Biologie Médicale, Laboratoire de Gynéco-Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada
[2]CNRS 7258, INSERM 1068, Institute Paoli-Calmettes, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Université Aix-Marseille, Marseille, France

Abstract
Endometrial cancer (EC) is the most prevalent gynecological malignancy in developed countries, with incidence rates steadily increasing due to factors such as obesity, aging populations, and changes in reproductive behavior. While mortality rates have remained relatively stable, survival outcomes have improved little in recent years, underscoring the need for advancements in prevention, diagnosis, and treatment strategies. This review provides a comprehensive overview of both the clinical and fundamental aspects of EC, aiming to bridge the gap between biological research and clinical practice. On the clinical side, we assess genetic predispositions, hormonal and metabolic risk factors, classification systems, detection methods, treatment options, and their impact on survival and quality of life. From a research perspective, we highlight the models commonly used to study EC, including cell lines and animal models, and delve into the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, a critical driver of tumor progression and a promising therapeutic target. By synthesizing these insights, this review aims to inform future efforts to improve patient outcomes and advance the understanding of EC.

1 Introduction

EC is the most common type of gynecological cancer in developed countries, with an increasing trend over the past 10 years [1–3]. This increase is partly attributed to various known risk factors for EC, such as rising obesity rates, an aging population and changes in reproductive behavior. In 2023, the highest incidence rates were reported in North America, Eastern Europe and Western Europe [1]. On the other hand, mortality rates have shown a more stable trend in recent years [4, 5], with a slight increase in some countries. EC is generally associated with a favorable prognosis, with a 5-year relative survival rate of approximately 81% in Canada and the United States [2, 6]. However, despite advances in treatment and earlier diagnosis, the 5-year relative survival rate has not improved significantly in recent years. Thus, current trends highlight the importance of continuing to improve prevention, early diagnosis and treatment strategies to better manage the increasing incidence and significant impact of EC worldwide. In fundamental cancer research, one protein is highly important: p53. Deletion of this protein or its inactivation by *PTEN* mutations plays a part in endometrioid carcinoma. This mutation

© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/.

is considered a "driver" protein for this type of cancer, and loss of *TP53* leads to the majority of serous carcinomas [7]. However, a mutation in this first gene is present in 83% of endometrial adenocarcinomas, and its deletion or loss is associated with high levels of AKT phosphorylation [8]. Thus, the PI3K-AKT signaling axis has been identified as a promoter of EC. This pathway is well known for its high mutation rate in ECs [9–11], as well as its involvement in proliferation and the cell cycle. New AKT inhibitors are emerging and are being used clinically as single or dual therapies. Our lab is studying the role of AKT in endometrial cancer, and we have dedicated a final section to exploring the current changes and the involvement of these proteins in the progression of EC.

As mentioned earlier, clinical observations in this field have remained stagnant for years. However, what progress has been made on the fundamental research side? While research in this area continues, bridging the gap between clinical practice and biological insights remains a challenge. The aim of this literature review is to evaluate the situation from both clinical and fundamental perspectives, providing researchers and clinicians with updated information on recent developments.

2 In the clinic

2.1 Etiology and risk factors

2.1.1 Genetic factors and hereditary syndromes

Inherited genetic mutations, such as those found in Lynch syndrome, significantly increase the risk of EC. Patients with this syndrome generally inherit a mutation in one of the genes involved in DNA mismatch repair (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*) (Fig. 1), and these mutations predispose individuals to earlier onset of EC [12–14].

MSH2 and MSH6 form the heterodimeric complex MutSα [15]. MSH2 leads to the stabilization of MSH6, which interacts with double-stranded DNA and scans for mismatched bases [16]. At the end of the scanning process, MutSα associates with MLH1 to repair damaged DNA [17].

MLH1 regulates protein–protein interactions during the recognition of mismatches, followed by the discrimination of strands and their removal [18]. The formation of MutSα accommodates the creation of the MutLα heterodimer [19], which is formed of MLH1 and PMS2 [20]. PMS2 is involved in endonuclease activity; it is the active site of MutLα. This leads the complex to nick into the discontinuous DNA strand [21]. MLH1 interacts with PMS2 at residues 506–756 [22].

The interaction between MutSα and MutLα occurs upon mismatch binding. When MutSα reaches the mismatch recognition stage, MutLα has weaker ATPase activity. The mismatched DNA strand is then degraded at the end of the process by EXO1 [23].

Cowden syndrome is caused by inherited mutations in the *PTEN* tumor suppressor gene. The product of this gene is a protein that antagonizes the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, resulting in reduced cell proliferation and survival. In this syndrome, loss of function of this gene leads to increased cell proliferation and survival, promoting tumorigenesis. The appearance of numerous benign hamartomas is characteristic of this disease, and their transformation into malignant tumors is often observed in the endometrium, leading to a 5–26% increase in the risk of developing EC [14, 24–26].

Polymerase proofreading-associated polyposis (PPAP) is caused by germline mutations in the exonuclease domain of the catalytic subunit of the DNA polymerase epsilon and delta 1, which are encoded by the *POLE* and *POLD1* genes, respectively. The

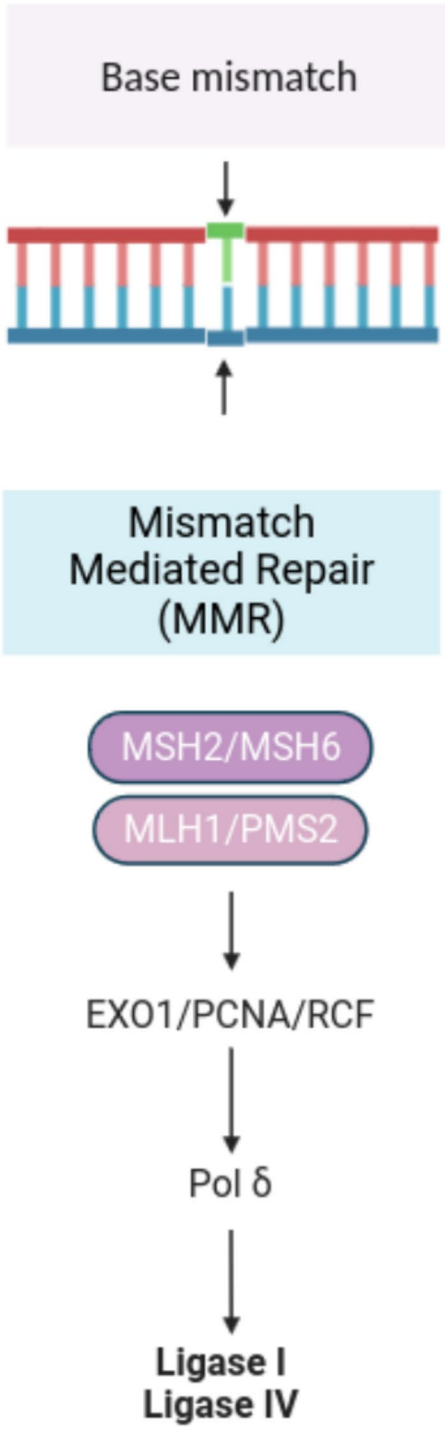


Fig. 1 Schematic representation of the DNA mismatch repair mechanism. Here, the ratios of the MSH2/MSH6 and MLH1/PMS2 complexes and their roles in DNA repair and the search for mismatched bases are presented

exonuclease domain of these enzymes is responsible for detecting and correcting nucleotide errors to ensure the fidelity of DNA replication. The increased risk of EC in PPAP patients is due to a significant increase in the somatic mutation rate caused by dysfunctional corrective activity in pathogenic variants of the exonuclease domain of the *POLE* and *POLD1* genes [20, 24–26].

Most endometrial carcinomas (ECs) arise from sporadic somatic mutations rather than from hereditary causes, which account for only 5–10% of cases. Although the specific mutations involved can vary between tumors, certain genes, such as those mentioned above, are recurrently altered across many EC cases, contributing to the molecular heterogeneity observed. This variability is reflected in the wide range of clinical presentations and histopathological subtypes that will be addressed later in this review[27, 28].

2.1.2 Hormonal factors

Estrogens are a group of steroids that act primarily as female sex hormones. They are mostly produced by the developing follicles of the ovaries or by the placenta. Some estrogens are also produced in small quantities by other tissues, such as the liver, adrenal glands, breasts and adipose tissue. The three types of estrogens are estradiol, estriol and estrone. Estradiol is produced from testosterone, and estrone is produced from androstenedione. The main estrogen receptors are intracellular proteins encoded by two distinct genes in animals that possess both types of receptors: estrogen receptor alpha (*ERα*) and estrogen receptor beta (*ERβ*). Two types of effects can occur upon binding to the receptor: genomic (mainly gene expression) and nongenomic (protein) [29].

Progesterone (P4) is synthesized from cholesterol by luteinizing hormone (LH). This hormone can then be converted into androstenedione, testosterone or estradiol by granulosa cells surrounding the ovarian follicle. The concentration of progesterone varies during the menstrual cycle. Progesterone is secreted in greater quantities from ovulation onward by the granulosa cells of the corpus luteum. It helps to maintain and thicken the uterine mucosa, promotes endometrial vascularization, and promotes the formation of the uterine glands responsible for the serrated appearance of the uterine wall. If fertilization does not occur, progesterone levels return to normal, and the cells of the corpus luteum in which it is produced immediately decrease and disappear [29].

The vast majority of lesions in EC (approximately 80%) are associated with hyperestrogenism, which is characteristic of endometrioid-type neoplasms. Conversely, estrogen-independent neoplasms are generally associated with poor differentiation and are not associated with previous hyperplasia or dysplasia [29]. P4 can also participate in EC growth; unlike E2, exposure to P4 is a "protective" factor. This is caused by the transcription of FOXO1 and the upregulation of IGFBP-1 and its targets, which has antiproliferative effects on EC cells. Thus, P4 has been chosen as a primary treatment for premenopausal patients with EC, with a response rate of 60%. The expression of PRs in the glands of the endometrium is induced by E2 or progesterone. P4 also regulates the TGF-β pathway by decreasing SMAD and E-cadherin levels and increasing vimentin levels, leading to epithelial–mesenchymal transition (EMT), which greatly impacts cancer cell viability. Therefore, PR expression in tumors is a good prognostic indicator because the receptor is required to respond to P4 treatment. Restoring these receptors and sensitizing tumors to progestin therapy could be potential therapeutic options [30].

As mentioned previously, prolonged unopposed estrogen exposure is a primary risk factor for EC, i.e., a hormonal imbalance exposing the endometrium to more estrogen than progesterone [31]. Several circumstances can lead to such an imbalance and thus increase the risk of developing EC. These include early menarche and/or late menopause, which extends the period of estrogen secretion by the ovaries; the absence of pregnancy; infertility; hormone replacement therapy for menopause consisting solely of estrogen;

and tamoxifen, which acts as an antiestrogen in the breast tissue but as an estrogen in the uterus [29, 31]. Importantly, the benefits of tamoxifen as a treatment for and prevention of breast cancer outweigh the risks associated with EC [31]. Prolonged unopposed exposure of the endometrium to estrogen can lead to the development of endometrial hyperplasia, i.e., excessive proliferation of endometrial glandular cells [31–33]. There are different types of endometrial hyperplasia: "simple" or "complex" and "with" or "without atypia". Although this condition is mainly benign, the presence of atypia, i.e., abnormal cells, increases the risk of progression to EC in the absence of treatment [31, 33].

Other conditions, such as endocrine disruptors, can cause estrogen/progesterone imbalance. According to the WHO, an endocrine disruption chemical is "*an exogenous substance or mixture that alters the function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations*". They can be found in persistent contaminants, pesticides, and industrial or natural substances; they can also be found in the environment or in nutrient intake environments. They mostly have estrogenic activities and can be considered oncogenic factors [34]. As a result, inappropriate responses to these activities lead to breast, ovarian and uterine cancers. Endocrine disruptors usually have delayed and heterogeneous effects, leading to various carcinogenic mechanisms. Thus, determining the dangerous dosage is challenging since it is impossible to define each patient's exposure during her entire life and obtain epidemiological evidence of a carcinogenic effect. The possible mechanisms are oxidative stress, hormone-sensitive action, and proinflammatory mechanisms. These compounds mostly alter epigenetic processes such as methylation to promote or reduce gene expression, which induces a phenotype, rather than inducing mutations directly in the DNA sequence. Another point to consider is the "cocktail effect"; individuals are usually exposed to a vast array of endocrine disruptors at the same time. Currently, their interactions are unpredictable. It is necessary to implement measures to limit exposure during the most vulnerable periods of life, i.e., the embryonic period and puberty [34]. Overall, the individual effects of these molecules are known, but their combined impacts on ECs are still unclear and need to be further studied.

For example, bisphenol A (BPA) (Fig. 2) is a completely synthetic substance. It is produced by mixing two phenols and acetone. BPA is similar to E2 and is considered an ERα and ERβ agonist. Low doses of BPA for a long period alter the estrogenic cycle; these effects are comparable to those of estrogenic therapies. It favors epithelial mesenchymal transition (EMT) and COX2 production, leading to invasion and metastasis. The correlation between BPA levels in the environment and tumor development in humans is now well established. [33, 34].

miRNAs regulate estrogen signaling by modulating ERα expression. Several miRNAs, such as miR-18a, miR-22, miR-206, miR-221, and miR-222, can directly bind to the 3'UTR of ERα mRNA, reducing its stability and translation. Dysregulation of these miRNAs by treatment with tamoxifen or exposure to endocrine-disrupting chemicals can alter estrogen-responsive gene expression, potentially contributing to endometrial carcinogenesis [35–37].

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is another major risk factor for EC. This syndrome is characterized by excessive androgen production (hyperandrogenism), irregular or absent menses and an accumulation of immature follicles (polycystic ovaries) [29, 31, 38, 39]. Owing to hyperandrogenism, PCOS is one of the most common causes of

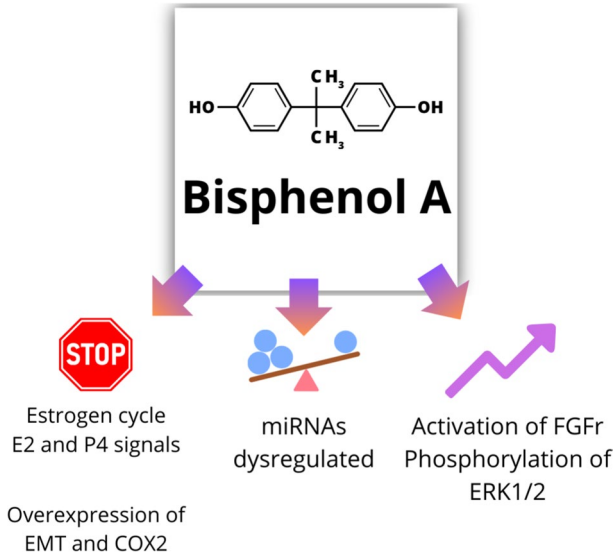


Fig. 2 Schematic representation of the impact of BPA. It affects the estrogen cycle (E2 and P4 agonists), promotes EMT and COX2 production, deregulates miRNAs and activates ERK1/2 phosphorylation

anovulation and infertility in patients [34, 39–42]. As a result, the chronic anovulation observed in these patients is central to prolonged unopposed estrogen exposure of the endometrium, which is directly associated with the risk of endometrial hyperplasia and EC [34, 39, 40].

Other common female hormonal diseases are uterine fibroids and endometriosis. Uterine fibroids are outgrowths inside the uterus and benign tumors growing around the myometrium, whereas endometriosis is the migration of the endometrium outside the uterus. These lesions can adhere to other organs, and their activation depends on many factors, including estrogen. Like cancer cells, endometriotic cells can invade and metastasize. These two diseases are now associated with an increased risk of gynecological cancer development [42]**.** Although it is not linked with EC, endometriosis has been shown to increase the risk of developing ovarian endometriomas, with a particular predominance of ovarian clear cell carcinoma and ovarian endometrioid carcinoma [43, 44].

2.1.3 Modifiable and metabolic factors

Metabolic factors and lifestyle habits, such as obesity, type 2 diabetes, a poor diet and a sedentary lifestyle, are directly linked to the development of EC. This is due mainly to the considerable levels of estrogen produced by adipose tissue, particularly after menopause, when the ovaries stop producing it [33, 45–47]. Thus, as a person's body fat increases, so do estrogen levels; weighing more than 200 lbs increases the risk of developing EC by approximately sevenfold [33, 45, 47]. Indirectly, a sedentary lifestyle and a poor diet are risk factors for EC, since these factors promote the development of obesity [33, 47, 48]. Type 2 diabetes is a chronic disease characterized mainly by high levels of glucose (hyperglycemia), insulin (hyperinsulinemia) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) [46, 47].

First, excessive blood glucose provides a sugar-rich environment that can contribute to the growth and invasiveness of cancer cells [49, 50]. Furthermore, increased insulin and IGF-1 levels promote overactivation of the PI3K-AKT-mTOR and MAPK signaling

pathways, which are frequently altered in EC cells. These pathways, discussed later in this review, play a central role in tumor development since they are involved in regulating mechanisms such as cell proliferation, growth and survival [51–56].

2.2 Pathophysiology and classification

EC has had numerous classifications since its discovery. It can be classified into two main categories: Type I, also known as endometrioid, which is associated with excess estrogen, is often diagnosed at an early stage and has a favorable prognosis, and Type II, nonendometrioid, which is more aggressive, is not associated with excess estrogen, includes serous and clear-cell carcinomas, and has a less favorable prognosis [53].

We have produced tables to summarize the existing classifications: the FIGO staging system, the histological classification by the WHO, and the molecular classification.

FIGO staging system (updated in 2023) [54]

Stage 1: Cancer confined to the body of the uterus and ovary.

- **1A:** Confined to the endometrium or nonaggressive histological type (low-grade endometrioid type with invasion of less than half the myometrium, without invasion of the lymphovascular space or localized invasion (LVSI)) or good prognosis.
    - **1A1**: Nonaggressive histological type limited to an endometrial polyp or confined to the endometrium.
    - **1A2**: Nonaggressive histological type involving less than 50% of the myometrium with no or focal lymphovascular space invasion (LVSI) as defined by the WHO criteria.
    - **1A3:** Low-grade endometrioid carcinoma confined to the uterus and ovary.
- **1B**: Nonaggressive histological types with invasion of half or more of the myometrium and negative or LVSI.
- **1C:** Aggressive histological types limited to a polyp or confined to the endometrium.

Stage 2: Invasion of the cervical stroma without ectopic expansion or with significant LVSI or aggressive histological types with invasion of the myometrium.

- **2A:** Invasion of the cervical stroma by nonaggressive histological type.
- **2B:** Significant LVSI according to nonaggressive histological type.
- **2C:** Aggressive histological types with any myometrial invasion.

Stage 3: Local and/or regional spread of a tumor of any histological subtype.

- **3A:** Invasion of the uterine serosa, uterine adnexa (ovaries/fallopian tubes) or both by direct spread or metastasis.
    - **3A1:** Spread to ovaries or fallopian tubes (unless stage 1 A criteria are met).
    - **3A2:** Invasion of the uterine submucosa or spread through the uterine serosa.
- **3B:** Direct or metastatic spread to the vagina and/or parametrium (connective tissue surrounding the uterus) or pelvic peritoneum.
    - **3B1**: Direct or metastatic spread to the vagina and/or parametrium.
    - **3B2:** Metastases to the pelvic peritoneum.

- **3C:** Metastases to the pelvic and/or para-aortic lymph nodes.
  - **3C1:** Metastases to pelvic lymph nodes.
    - **3C1i**: Micrometastasis
  - **3C1ii:** Macrometastases**3C2:** Metastases to para-aortic lymph nodes to renal vessels, with or without metastases to pelvic lymph nodes
    - **3C2i**: Micrometastasis
    - **3C2ii:** Macrometastases

Stage 4: Spread to the bladder mucosa and/or intestinal mucosa and/or distant metastases.

- **4A:** Invasion of the bladder mucosa and/or intestinal mucosa.
- **4B:** Abdominal peritoneal metastases beyond the pelvis.
- **4C:** Distant metastases, including metastases to intra- or extra-abdominal lymph nodes located above the renal vessels, lungs, liver, brain or bones.

2.2.1 WHO histological classification (updated in 2020) [55–57]

Classification by morphology, immunohistochemistry (IHC) and from the classification of The Cancer Genome Atlas program (TCGA).

Endometrioid: Most frequent type (80%), variable architecture (glandular, papillary or solid), composed of cells with endometrioid differentiation and usually with atypical hyperplasia. Recognition of TCGA molecular classification to enable better prediction of clinical outcome than later classification on the basis of morphology, stage and presence or absence of LVSI.

The second most common type (approximately 10% of cases), high-grade carcinoma (aggressive tumors = 40% of EC deaths), is characterized by nuclear pleomorphism and papillary and/or glandular architecture (sometimes solid), usually with atrophy and the potential to metastasize via the tubules. Almost all samples were classified as *TP53* abnormal (copy high-number) or had aberrant p53 expression on IHC with nuclear overexpression or complete absence of staining.

The exact frequency of clear cells is unknown but possibly accounts for approximately 2% of ECs (diagnostic criteria imprecise). These cells are composed of pleomorphic cells that may be polygonal, cuboid, flat or nail shaped with clear or eosinophilic cytoplasm (affinity for eosin), papillary, tubulocystic and/or solid architecture. The vague definition leads to overlap with the endometrioid and serous types. The highly heterogeneous molecular profile consists of a mix of TCGA subtypes, but *TP53* is generally WT and negative for estrogen receptor and progesterone receptor expression.

Undifferentiated and dedifferentiated: Aggressive carcinomas with no specific linear differentiation and a solid sheet-like architecture. The sudden appearance of keratinization foci is possible and is often accompanied by necrosis and high mitotic activity. In 40% of cases, tumors are composed of a mixture of endometrioids of stage 1 or 2 but rarely stage 3 or serous type. Molecular profiling revealed that in 50–75% of cases, tumors are MMR deficient, and a large proportion contain inactivating mutations in core genes of the SWI/SNF complex (*SMARCA4, SMARCB1, ARID1A, ARID1B*).

Mixed: Represents less than 10% of ECs, composed of two distinct types morphologically and by proteins (IHC), at least one of which is either a serous or a clear cell. Dedifferentiated and carcinosarcoma types, which are mixed by definition, are excluded from the diagnosis. Tumor behavior is generally dictated by the worst histotype.

Mesonephric adenocarcinoma: Very rarely derived from mesonephric remnants (embryonic-stage renal ducts), tumors are generally composed of small tubules with dense eosinophilic colloid material and diverse architectures (papillary, ductal, retiform, solid, fusiform). Molecular profile of WT *TP53* and p53, which are negative for ER and PR.

Mesonephric adenocarcinoma type: Very rare type with an absence of mesonephric remnants; otherwise, morphologically, proteins were detected via immunohistochemistry (IHC) (GATA3 +, ER-, TTF1 +, CD10 +, p53 WT) and molecularly very similar to mesonephric adenocarcinoma.

Epidermoid: Very rare type in the body of the uterus with a poor prognosis, originating from squamous cells (epithelial cell type). It is associated with risk factors such as chronic inflammatory conditions, previous irradiation and HPV infection. Morphologically identical to squamous cell carcinomas seen elsewhere on the body and may present with broad invasive fronts.

Mucinous gastrointestinal type: Aggressive tumors that are most common in the cervix and have a glandular architecture with mucin-secreting epithelium and may include caliciform cells (mucus synthesis). Negative molecular profiles for ER and PR differentiated them from the endometrioid type with mucinous differentiation.

Carcinosarcoma: Aggressive tumors with LVSI and recategorization as endometrial carcinoma, since sarcomatous elements (malignant cells originating from connective tissue) have been shown to be transdifferentiated from carcinoma during tumor evolution. Molecular profiling revealed that 78% or more are *TP53* abnormal, 22–38% are *TP53* WT, and fewer than 5% are *POLE*-mutated or MMR-deficient.

Neuroendocrine carcinoma (poorly differentiated = NEC) is very uncommon (> 1% of NECs) and has a poor prognosis. Two distinct morphological variants have been identified: small-cell and large-cell variants. Frequent distant metastases, nuclear pleomorphism, a leaf-shaped architecture and high mitotic activity (highly invasive) are common.

Neuroendocrine tumors (well-differentiated NETs), which are very uncommon and have stages I and II disease, are associated with a poor prognosis. Composed of small, uniform cells with nesting, trabecular or serpentine architecture.

In general, we have summarized the general information in Table 1.

2.2.2 Molecular classification

Over time, similarities between endometrioid and serous tumors have highlighted the importance of genomic-based classification to manage the treatment of patients [7]. Since the identification of different subtypes can be difficult, TCGA, supported by the ProMisE (Proactive Molecular Risk Classifier for EC) project, distinguished in 2017 four different types of EC on a molecular basis, with different prognoses.

These 4 groups are summarized in Table 2. In summary, the current classification is applied clinically to 3 parameters: p53 status, MSI, and mutated *POLE*. These subtypes are analogous to those used in TCGA: mismatch repair defect mismatch repair (MMR), which involves one or more gaps in repair proteins (corresponding to the hypermutated

Table 1 Summary of WHO histological classifications

Stage	Characterization
Low grade	Endometrioid (depending on proportion of solid zone)
	Stage I: < 5%
	Stage II: between 6–50%
High Grade	Stage III endometrioid (> 50% solid zone)
	Serous
	Clear-Cell
	Mesonephric like
	Mixed
	Mucinous gastrointestinal type
	Undifferentiated/differentiated
	Squamous
	Carcinosacorma
	Neuroendocrine (NEC)

Table 2 Summary of molecular and physiopathological classifications

Classification	Hypermutated (MSI) [10]	POLE mutated [7]	p53 mutated [58–61]	p53 wild-type [62]
Classical features	Mismatch repair defect (MMR-D), one or more gaps in DNA repair proteins	DNA polymerase epsilon with mutation in exonuclease domain 9–14 (exons)	Corresponds to the high number of copies subtype	Corresponds to the low number of copies subtype
Patient prognosis	Good prognosis	Excellent prognosis. Very rarely relapses (if it occurs, very aggressive)	Worst rate and prognosis	Intermediate prognosis
Prognosis at 5 years [57]	Approximately 75%	Approximately 90%	Approximately 30%	Approximately 85%
Molecular characteristics of the patient	Unstable microsatellites	Tumor heterogeneity	Mutations in the p53 gene present in endometrial adenocarcinomas	Low copy rate. Low mutation rate
	Important mutations in MMR proteins: MSH2, MSH6, MLH1, PMS1, PMS2	Preponderance of transitions between C and A. Amino acid substitution	Similar to serous uterine tumors,	Low KRAS alteration, low PI3K alteration
	Hypermethylation of the MLH1 promoter is very common	MSS	Basal breast cancers or HGSOCs	p53 WT
Most frequently associated histotypes	Endometrioid high grade. Undifferentiated and dedifferentiated	Endometrioid high grade in younger, nonobese women	Endometrioid low grade, serous cases, clear cell or mesonephric	Serous, carcino-sarcoma, endometrioid, or mixt

group); mutated *POLE* (DNA polymerase epsilon), which has a mutation in the domain of the exonuclease 9–14 domain (exons); abnormally mutated p53 protein, which corresponds to the high-copy-number subtype; and finally, the *TP53* wild-type, which corresponds to the low-copy-number subtype [63].

2.2.2.1 Hypermutated (MSI) MSI-high ECs have important mutations in the MMR proteins MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 and PMS2. Associations between MMR status and adverse clinical effects: Hypermethylation of the MLH1 promoter is very common in MSI patients, with a mutation rate of 18*10^6 mutations/Mb. Reijnen et al. demonstrated

that this mutation status is a predictive marker for radiotherapy, which was confirmed through the ProMise study (stage IB-II) [10, 64]. EC is also comparable to colorectal carcinoma because of its MSI and *POLE* classification, which is associated with extremely high mutation rates [58].

2.2.2.2 POLE mutants *POLE* mutants have an excellent prognosis [65] and are high-grade endometrioid type, with tumor heterogeneity and invasion of the lymphovascular space. They have other features, such as a preponderance of transitions between nucleotides C and A, amino acid substitutions and microsatellite stability groups [59], with mutation rates that can exceed 232*10^6 mutations/Mb [10]. In addition, other studies have shown that ECs frequently have very high TIL levels and are often accompanied by a patient with a reaction similar to that of Crohn's disease [59]. In most cases, *POLE* mutants are MSS (microsatellite stable), but there are reports of cases with loss of MMR proteins [60]. *POLE* mutants rarely relapse. This type of mutation tends to occur in younger nonobese patients, and despite greater aggressiveness, relapse is rare [61]. Because *POLE*-mutated ECs have many T-cell responses intratumorally, they have excellent prognosis for these cancers [59].

2.2.2.3 p53 mutation In 1990, *TP53* mutations were diagnosed in 90% of serous carcinomas, and loss of p53 led to the majority of serous carcinomas [10]. Grade 3 mutated p53 patients with endometrioid carcinoma relapsed more frequently than did those without the mutation [66]. The role of p53 in EC and hyperplasia has shown that mutations in the *TP53* gene are present in endometrial adenocarcinomas but absent in hyperplasia. Currently, a greater proportion of patients with mutated p53 mutants have nonendometrioid histology (leaning toward serous) and have the worst survival rates [57]. On the other hand, ECs, with frequent p53 mutations, resemble serous uterine tumors, basal breast cancers and high-grade serous ovarian carcinomas (HGSOCs). *TP53* is mutated in 96% of HGSOCs [58]. As has been demonstrated, EC can be compared mutationally with HGSOCs or breast carcinomas, despite a much higher mutation rate. However, high mutation rates of *FBXW7*, *PPP2R1A* and *ARIDA* in serous carcinomas of the uterus are not found in basal breast cancer or HGSOCs [59].

This classification currently shows promising clinical results [61]. ProMisE can be applied to diagnostic samples and to choose surgical procedures or adjuvant therapies [7]. With that in mind and its potential, clinicians can reduce overtreatment and undertreatment, leading both to complications [58].

3 Diagnostics

3.1 How do we diagnose EC?

3.1.1 Symptoms

EC can cause a variety of signs and symptoms as the disease progresses. Other medical conditions, such as uterine fibroids and PCOS, can cause similar symptoms, making diagnosis challenging.

The most common symptom is abnormal vaginal bleeding. This includes menstrual changes (heavier, longer or more frequent periods), bleeding between periods, postmenopausal bleeding and light vaginal bleeding. Other signs and symptoms include unusual vaginal discharge, which may be foul-smelling, pus-like or tinged with blood,

pain during intercourse, pain or pressure in the pelvis, lower abdomen, back or legs, pain during urination, difficulty urinating or blood in the urine, pain during defecation, difficulty defecating or blood in the stool, bleeding from the bladder or rectum, accumulation of fluid in the abdomen (called ascites) or legs (called lymphedema), weight loss, loss of appetite and difficulty breathing [67, 68].

3.1.2 Methods of detection

First, the patient is offered a pelvic exam, where a professional observes the external appearance of the vulva and vaginal opening for signs such as redness, discharge, masses (such as cysts or genital warts) and other abnormal conditions. After this step, a speculum is inserted into the vagina to widen it to visualize the cervix and the wall of the vagina (searching for masses, inflammation and abnormal discharge). A Pap test may also be performed. Finally, for bimanual examination, healthcare professionals place one or two gloved fingers inside the vagina, place the other hand on the lower part of the abdomen, and apply little pressure. This allows them to evaluate the texture, size and shape of the uterus and ovaries. It also allows the detection of any sensitive areas or masses. If uncertain, a professional can perform a rectovaginal examination.

After these first exams, the ultrasound probe or transducer is inserted into the patient's vagina (pelvi-genital tract) to produce images of pelvic structures and organs, including the vagina, uterus, ovaries, fallopian tubes and bladder.

Hysteroscopy is a procedure involving the use of an endoscope to examine or treat the uterus and fallopian tubes. The cells or tissue can be removed for microscopic examination. Doctors may also use hysteroscopy to remove polyps, uterine fibroids or tumors.

If a biopsy is performed, the biological sample (tissue or tumor removed for examination) is analyzed to diagnose cancer or to determine whether an abnormality is cancerous. Typically, a sample is taken from the endometrium.

As a less invasive method, blood samples can be taken. They establish the stage of uterine cancer and perform the following biochemical blood tests: BUN and creatinine levels can also be measured to assess kidney function. Higher-than-normal levels could indicate that the cancer has spread to the ureters or kidneys. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST) and alkaline phosphatase can be measured to assess liver function. Higher-than-normal levels could indicate that the cancer has spread to the liver. Tumor antigen 125 (CA 125) can be measured. A higher-than-normal level could indicate advanced or metastatic uterine cancer.

Finally, magnetic resonance imaging (MRI) uses magnetic forces and radio waves to produce cross-sectional images of the body's organs, tissues, bones and blood vessels. A computer assembles the images into 3-dimensional snapshots. MRI is used to determine the extent of cancer invasion in the muscular layer of the uterine wall (called the myometrium). It can also help doctors determine whether the cancer has spread to other organs or reappeared after treatment [68–70].

3.1.3 What are the curative/therapeutic options?

Therapeutic options are offered depending on the classifications previously presented. In fact, patients with type 1 cancer with a FIGO grade of 1 A G1/G2 are offered a hysterectomy, adnexectomy or salpingectomy. If the patient is FIGO 1B but still type 1, in addition to the previous treatment, the patient can undergo lymphonodectomy and

brachytherapy. When there is a high or intermediate prognosis, i.e., type I FIGO IA group 3 or FIGO IA/B G1/G2 with lymphovascular invasion, clinicians can consider radiotherapy. Finally, for the other types, such as type I FIGO IB G3, FIGO superior at 1 or type II cancer, cytoreductive surgery and chemotherapy are considered [64]. Other therapies, such as immunotherapies and targeted therapies, will be presented further. The molecular classification is currently used to determine the treatment that will be used. In fact, patients with POLE are classified as having a good prognosis and are offered surgery with or without radiotherapy. Patients with type 1 or 2 MMR defects will be tested for surgery and immunotherapy with or without radiotherapy. A woman with high-grade endometrial cancer (EC) with either a p53 abnormality or wild-type (WT) p53 will undergo surgery and radiotherapy, with or without chemotherapy. The same approach applies to women who are at high risk of metastases. Finally, if all the markers are negative or at low levels, only surgery is performed [65].

3.2 Survival

3.2.1 Survival rate

While considering the classifications that have been previously named, it is possible to classify the survival rates in that manner [64]:

Type I, FigoIA, G1/G2: 93.4% survival at 5 years.

Type I, FIGO IB, G1/G2: 86.3% survival at 5 years.

Type I FIGO IA G3 and type I FIGO IA/B G1/G2 with LVSI: 82% survival at 5 years.

Type I, FIGO IB, G3, type II, and FIGO > I: < 74% survival at 5 years.

3.2.2 Quality of life after an EC

Quality of life (QOL) after an EC is important for clinicians to consider in order to manage the healthcare professionals involved with the patient and for biologists to understand the impact of treatment on the patient's life. Many factors, such as socioeconomic, psychological, and physical factors, are involved. The effect of each factor on tumor grade also needs to be considered.

Socioeconomic effects: The cost of any cancer therapy is high in some countries, and the time and cost of travel between home and hospital must be considered. Some studies have shown that low income and lower education are associated with poor QOL. Some patients may look for less expensive treatment options that are less efficient. Owing to the high cost, some patients may decide to discontinue their treatment [71]. Finally, while very few studies have demonstrated this in the case of EC, socioeconomic factors play a significant role, similar to the disparities observed in breast cancer outcomes, for example. The difficulty in accessing early screening emphasizes that low-income patients are less likely to survive cancer [72, 73].

Physical effects: Individuals with obesity and EC seem to have a worse quality of life, with more fatigue, urological symptoms, and pain in the back and pelvic regions [74]. Moreover, the most important symptom that appears is menopausal symptoms; even if EC generally occurs after menopause, patients who undergo a premenopausal hysterectomy have difficulties with menopausal symptoms afterwards [75]. Chemoradiation has been reported to cause lower physical and quality of life scores [71].

Psychological effects: Many studies have shown that patients with EC have depressive and anxiety symptoms, which are linked to lower overall survival, even in some patients

4.5 years after the end of treatment and those with early-stage EC [71]. If we look at psychological and physical effects, in terms of sexuality, patients with an EC had less sexual interest than did the general population. After surgery, 55.9% never returned to being sexually active, not because of physical sexual dysfunction but because of a lack of interest [74].

It is essential to consider these studies and provide the necessary support for these individuals. Psychosocial education should be an integral part of EC treatment, as the emotional impact of the diagnosis is significant. Furthermore, discussions about life after EC show that most women like psychological support as well as lifestyle coaching. In fact, they appreciate services such as nutritional guidance to prevent overweight or obesity, advice on the increased risk of cardiovascular disease, and support with physical activity to maintain good health [76–81].

3.3 Recent research and future prospects

There are many different types of therapies that are used to treat EC depending on the stage, type of mutation and genetic characteristics, as listed previously. Surgery and radiation therapy are often used in the early stages of cancer. Chemotherapy, hormonotherapy, targeted therapy and immunotherapy are treatment options that depend on the condition of the patient [74, 82].

Importantly, younger patients usually want to have children in the future. Unfortunately, chemotherapies are highly harmful to the body. For this reason, other therapies can be prioritized. Hormones can be administered to patients with early-stage, low-grade EC. It can be given to patients with recurrent, low-grade and slow-grade cancer. They can be used as monotherapies or in combination with other treatments. Patients are often given progestins such as megestrol (progestogenic activity, antigonadotropic effects) and medroxyprogesterone (progestin). Other options include aromatase inhibitors, such as letrozole (antiestrogen, which prevents aromatase from producing estrogen); estrogen receptor modulators, such as tamoxifen (selective, which requires estrogen receptors on the surface of cancer cells, competitive inhibition); and gonadotropin-releasing hormone agonists, such as goserelin (which stimulates the production of sex hormones and disrupts the feedback system, ultimately resulting in downregulation) [83, 84].

Chemotherapy is an important treatment option. There are platinum (which causes crosslinking in DNA), anthracycline (which intercalates between the nitrogenous base pairs of DNA and inhibits the activity of topoisomerase II) and taxane-based chemotherapy drugs (inhibits microtubule function). The most common chemotherapy drugs for EC include cisplatin, carboplatin, paclitaxel (mitotic spindle poison, which blocks the mechanism of mitosis) and doxorubicin (anthracycline, which intercalates between two DNA base pairs, preferably between two G–C bases). They can be used alone or in combination [85].

Unfortunately, chemotherapies are not precise and can also target healthy cells that die because of their generic mechanisms of action. As mentioned above, immunotherapy can be used alone or in combination with chemotherapy [86]. The combination of immunotherapy drugs with other treatments has been shown to be beneficial for patients with MMR or MSI-H subtypes. Ongoing studies regarding the outcome of this type of combined therapy are in progress for those with advanced as well as metastatic

EC [86]. For example, *Jemperli*, also known as Dostarlimab ((PD-1)–blocking monoclonal antibody), is an immunotherapy drug that was recently approved (2021–2023). It can be used alone or in combination with carboplatin or paclitaxel. Dostarlimab is indicated for patients with recurrent mismatch repair deficiency and high microsatellite instability tumors. Clinical trials have shown that patients with primary advanced or recurrent EC with MMRD/MSI-H that has been treated with chemotherapy and Dostarlimab have increased progression-free survival [87]. Another drug that targets immune checkpoint inhibitors in patients with advanced EC is *Keytruda*, also known as pembrolizumab (another PD-1-blocking monoclonal antibody). This treatment is usually given after another type of therapy for patients with MMR, MSI-H or high mutational burden (TMB-H) tumors. It can also be used with targeted therapies, such as lenvatinib (brand name: *Lenvima*, kinase inhibitor against VEGFR1/2/3), for MMR-proficient patients [87]. Unfortunately, as is the case in many instances, the beneficial effects are largely attributable to the overall condition of the patients. A recent study involving nearly 5,200 patients demonstrated that Dostarlimab improved survival outcomes, whereas pembrolizumab had a more moderate response rate. On the other hand, the two studies were similar in terms of induced deaths and treatment discontinuations [88].

Finally, targeted therapy drugs such as lenvatinib and larotrectinib (brand name: *Vitrakvi*, an inhibitor of tropomyosin kinase TrkA/B/C), which are kinase inhibitors, and everolimus, an mTOR inhibitor, are interesting future prospects for EC treatment. Many clinical trials are ongoing regarding the combination of targeted therapy with other types of treatments. For example, in patients with recurrent EC, the combination of everolimus and letrozole has been studied during a phase II trial by the GOG Foundation Study and has shown beneficial results. Combinations of targeted therapy with immunotherapy are also possible. For example, pembrolizumab can be combined with lenvatinib for patients whose previous treatments did not work and for those with non-MSI-H, non-MMR-d and advanced EC [89, 90].

Targeted therapies are promising new treatments, but several challenges are emerging: tumor heterogeneity, resistance that develops as treatment progresses, and the limitations of biomarkers (for example, different AKT isoforms, which may not all respond to the same inhibitors). Additionally, toxicity profiles, similar to those seen with other therapies, can also arise [91–96].

In summary, the names of the studies and each target are as follows: (Tables 3, 4, 5, 6, 7).

Table 3 Clinical studies of patients with EC receiving immunotherapy

Target	Names of the studies	Scientific reasoning
PD-1	RUBY (part 1 and 2), NRG-GY018, KEYNOTE-158, GARENT, PODIUM-101	PD-1 is a protein located on T lymphocytes, whose role is to negatively regulate the immune system: when a PDL1 protein binds to the PD1 receptor, the T lymphocyte is deactivated Some tumor cells possess PDL1 ligand. They bind to PD1 receptors on T lymphocytes, preventing them from activating and destroying tumor cells. They can therefore continue to grow
PD-L1	AtTEND, DUO-E, MITO-END3	Cancer cells are thus no longer recognized by the immune system and can continue to grow. Immunotherapy prevents the binding between PD1 and PD-L1, thus stimulating the immune system to work on these cells [89]

Table 4 Clinical study of ECs with no specific profile

Target	Names of the studies	Scientific reasoning
Progestogen	GOG81, GOG119, GOG153	Progesterone key hormone in counter balancing estrogen in EC [28]
Aromatase and mtTOR	NCT01068249, NCT02730923/VICTORIA	The PI3K pathway is generally dysregulated in EC on the first hand. On the other hand, hormonal manipulation leads to a patient's answer but there is resistance coming from PI3K pathway dysregulated, targeting mTOR + hormones may overcome this resistance [97]
Aromatase and CDK4/6	NGSO-PALEO/ENGOT-EN3NCT02657928, NCT03675893	ER + EC are generally altered in the PI3K pathway, these cancers are frequently with a high ER transcriptional activity and upregulation of cdk4 and 6. They are key regulators in hormonal therapy resistance [97, 98]
DKK-1	NCT03395080	*DKK1* modulates Wnt signaling and gynecologic endometrioid tumors have a high prevalence of β-catenin mutations [98]
PORCN	NCT02521844	PORC is required for the posttranslational modification of Wnt [99]

Table 5 Clinical study of ECs with growth factor receptors

Target	Names of the studies	Scientific reasoning
VEGFR	GOGO209, EORTC, GOG229E, NCT00462826, AMG386, GOG229J	VEGF is one of the most important stimulators of angiogenesis in EC [100]
FGFR	KEYNOTE775, LEAP001, NCT00888173, NCT01225887, NCT01379534, NCT01111461, KEYNOTE 146	Mutations in the FGFR pathways have been identified in endometrium cancer [101]
HER 2	NCT01367002, NCCH1615/STATICE, DESTINY-PanTumor02, NCT042053630, NCT04235101, NCT05150691	Prolonged survival when patient have HER-2 + in serous EC [102]

Table 6 Clinical study of EC with signaling pathways

Target	Names of the studies	Scientific reasoning
mTOR	NCT00739830, AGO-GYN8, NCT02725268	The PI3K/AKT/mTOR pathway is the most altered pathway in EC [102]
PI3K	SAR245408 XL147	
PI3K/mtor	MAGGIE	
KRAS Pathway	NCT01935934, code break101	*KRAS* mutations associated with type I estrogen-related EC. *KRAS* mutations occur at the early stages of the EC pathway, *KRAS* mutations are present in 6–16% of endometrial hyperplasia [90]
HRD	UTOLA	Target DNA repair in EC. Parp-inhibitor maintenance for advanced and metastatic EC [52]
ARID1A	ATARI, NCT05523440	*ARID1A* mutations have been reported in gynecological cancers, including clear cell carcinoma. Studies show that *ARID1A* mutant cells display sensitivity to ATR inhibition [103–105]
PTEN	ENDOLA	*PTEN* has been identified as a marker for premalignant endometrial hyperplasia, target it can stop the switch between hyperplasia and cancer [106]

Table 7 Characterization of the human cell lines most frequently used to model endometrial cancer

Cell line	Type of EC	Age of patient	Characterization	Other
Ishikawa	Endometrial adenocarcinoma, Grade 1	39 years old	Receptors ER and PR presents, Type I, **Hypermutated (MSI) molecular group**	ER and PR disappear after long term culture and the cells transform themselves into undifferentiated cells 80% of the genome is from East Asian North
KLE	Endometrial adenocarcinoma, but cells are coming from the colon's metastasis Grade 3	Between 64 and 68 years old depending on sources	Receptors ER and PR presents, Poorly differentiated, *KRAS* wild type, Low microsatellite instability, **P53 WT molecular group**	Mostly type II due to mutation, age of the patient 60% of the genome is from North of Europe and 30% is from South Europe
HEC-1-A	Endometrial adenocarcinoma, Grade 2	71 years old	Receptors ER and PR absents, Diploid, Heterozygous *KRAS*, Homozygous *TP53*, **P53 WT molecular group**	Most likely, type II in function of the mutation, 91% of the genome is from East Asian North
HEC-1-B	Endometrial adenocarcinoma, Grade 2	71 years old	Receptors ER and PR mostly absents (not in all cells), Tetraploid, Heterozygous *KRAS*, Homozygous *TP53*, **P53 WT molecular group**	Child of the subtype HER-1-A, Most likely, type II in function of the mutations, 92% of the genome is from East Asian North

3.4 Clinical conclusions

EC represents a major clinical challenge because of its increasing incidence and the diversity of its clinical and biological forms. Recent advances offer new prospects for diagnosis and treatment, but further efforts are needed to improve the prognosis and quality of life of patients.

3.5 Fundamental research

3.5.1 Cellular lineages: description

When we search for "EC" in the ATCC database, 25 results appear, with Ishikawa, HEC-1-A, HEC-1-B, and KLE being the most commonly used cell lines in research [106]. However, the use of cell lines presents challenges, particularly with respect to reproducibility [107–109]. Variations in cell density, culture media, and experimental techniques across studies can lead to inconsistent results, especially in cancer biology and drug development. Over time, cell lines undergo genetic, epigenetic, and morphological changes, further distancing their behavior from that of primary tissues or cells, which limits their clinical applicability. Additionally, cell line contamination is a significant concern that applies to all cell lines, including ECs. For example, residues of MCF-7 or HeLa cells have been detected in the ECC-1 cell line, raising questions about the reliability of certain experimental models.

Below, we briefly describe the four major EC cell lines and their profiles, with all the information sourced from [109].

On the basis of current molecular classification, we were able to link cell lines to their group. However, we would like to add that some of the cell lines have high mutation rates and are sometimes very different from the primary cells taken from the patient, so the validation of molecular features prior to experimental use is recommended.

3.5.2 Animal model with cell lineages

Several cell lines are used in research, each with different genetic characteristics typical of EC, such as Ishikawas with PTEN loss or KLE with PIK3CA mutations. These findings allow researchers to study tumor behavior in vitro, as well as the response of tumors to various treatments. However, even though in vitro models are becoming increasingly relevant (e.g., organoids) and help reduce the use of animals, in vivo models remain essential in the field of medical research. The use of more complex and complete models not only enables cells to be grown in 3D but also, in the case of orthotopic models, enables interactions with the tumor microenvironment within the organ of interest to be taken into account, as well as the organism's metabolism, which cannot be accomplished in vitro [110, 111]. Mice are among the most widely used animals in research, since they have several advantages over other in vivo models: they are small, easy to handle and take up very little space, they multiply rapidly, and their rapid metabolism enables faster tumor development than that of humans, enabling faster results. Therefore, various models are commonly used in EC research [112].

Over time, these models have become increasingly complex. Some spontaneously develop ECs, such as Han: Wistar rats, Donryu rats, DA/Han rats or BDII/Han rats [112]. Other models are chemically induced with estrogen injections, such as indole-3-carbinol, or chemical molecules that induce breaks in single- and double-stranded DNA, such as N-ethyl-N'-nitro-N- nitrosoguanidine [113]. Transgenic models present mutations characteristic of EC, such as mutations in PTEN [114], p53 [115], PPAP (POLE et POLD1) [116], and Mig6 [112, 117].

Currently, some models are more relevant to ECs since they have a greater resemblance with human patients. These models involve the grafting of tumor cells from murine or human cell lines or directly from patients, either subcutaneously or orthotopically. This approach gives researchers control over the tumor, allowing them to select mutations of the cells relevant to their studies. For example, established cell lines can be used as xenograft models or genetically modified to overexpress or underexpress specific genes, allowing the study of tumor behavior and treatment responses [118]. Similarly, patient-derived xenografts (PDXs) involve the use of cells from patients to better reflect the genetic heterogeneity observed in clinical settings [119]. Finally, patient-derived organoid xenograft (PDOX) models involve generating organoids from patient biopsy cells and grafting them into the uterus of an in vivo model, further enhancing their clinical relevance (Table 7) [120].

In conclusion, these models allow researchers to study the involvement of genes in the development of EC, as well as to test different molecules and their impact on tumors in a much more representative way than they do in vitro [118]. Thus, it is also possible to study chemical resistance or the impact of diet on the evolution of EC, as *Ke Shen* et al. did by studying the effect of a high-fat diet on PDOX model mice, which confirmed that these models can consider the impact of an individual's metabolism and tumor microenvironment [121]. Overall, these models closely replicate patient characteristics, preserving biomarkers, genetic profiles, and tissue structures observed in clinical settings [122].

However, the immune system has not been studied thoroughly, and in vivo models are ideal for studying its mechanisms. Thus, in future studies, the various stages of development and maturation of immune cells can be studied within the tumor (immune

infiltration, cytotoxicity, response to treatment, etc.) as well as in the various organs in which the cells develop and mature (Table 8).

3.5.3 AKT isoforms and ECs

The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is one of the most frequently dysregulated pathways in cancer and plays a critical role in cell growth, survival, proliferation, and metabolism [124, 125]. It is activated by external signals such as growth factors and hormones, which bind to receptor tyrosine kinases (RTKs) on the cell surface, initiating a cascade of intracellular events (Fig. 3) [126]. Dysregulation of this axis, through mutations or other mechanisms, leads to increased tumorigenic potential by promoting cell cycle progression, evasion of apoptosis, and metabolic reprogramming.

EC has the highest prevalence of mutations in the PI3K/AKT/mTOR pathway, with alterations found in more than 80% of cases [8, 127]. While the involvement of this pathway in tumorigenesis is well established, its exceptionally high mutation rate in EC highlights a unique vulnerability that could be exploited for therapeutic interventions.

3.5.4 Overview of the PI3K/AKT/mTOR pathway and its mutations

PI3K is a heterodimer consisting of the regulatory subunit PIK3R1 and the catalytic subunit PIK3CA [128]. Upon activation by RTKs or G-protein coupled receptors (GPCRs), PI3K phosphorylates phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) into phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3). This lipid product recruits downstream effectors such as AKT to the plasma membrane [126–131]. In EC, PIK3CA mutations, including hotspot mutations such as H1047R, increase PI3K activity, leading to persistent pathway activation. Notably, the H1047R mutation selectively activates AKT2 over AKT1, driving processes such as EMT, metastasis, and chemoresistance [124].

PTEN, a tumor suppressor, antagonizes PI3K by dephosphorylating PIP3 back to PIP2, thereby suppressing AKT activation [132]. Loss-of-function mutations or deletions in this gene occur in up to 60% of ECs, leading to unchecked PI3K signaling [133]. Its inactivation is especially prevalent in early-stage endometrial tumors, highlighting its role in the initiation of tumorigenesis [134].

Table 8 Summary of the strengths and limitations of the PDX/PDOX models

	Strengths	Limitations
PDX/PDOX	Cells grown in 3D (Takes into account intercellular interaction) Can consider the impact of an individual's metabolism and tumor microenvironment. [111, 121] In the future, these models may be useful for studying the immune system Preserve patient characteristics (biomarkers, genetic profiles) observed in clinical settings [122] Good representation of the genetic heterogeneity observed in clinical settings. [119] Clinical relevance [120] Enables study of tumor evolution and drug efficacy [118]	Creating a mouse model is expensive [115] Cell culture takes time (PDOX) Variable grafting success rate (10 to 90%) [123] Models can take a long time to set up (6 months to 2 years) [123] Sometimes, the time to generate enough PDOX to test drugs is longer than the patient's lifespan [123] It is challenging to recover all of the patient data [123] Murin microenvironment is different from humans (e.g., cancer-associated fibroblasts, endothelial cells) [123] Potential selection of subclonal tumor cells during the transplantation phase [123] Particularly in the case of orthotopic grafting, organs are sometimes difficult to access due to their location or size (pancreas, mouse, kidneys)

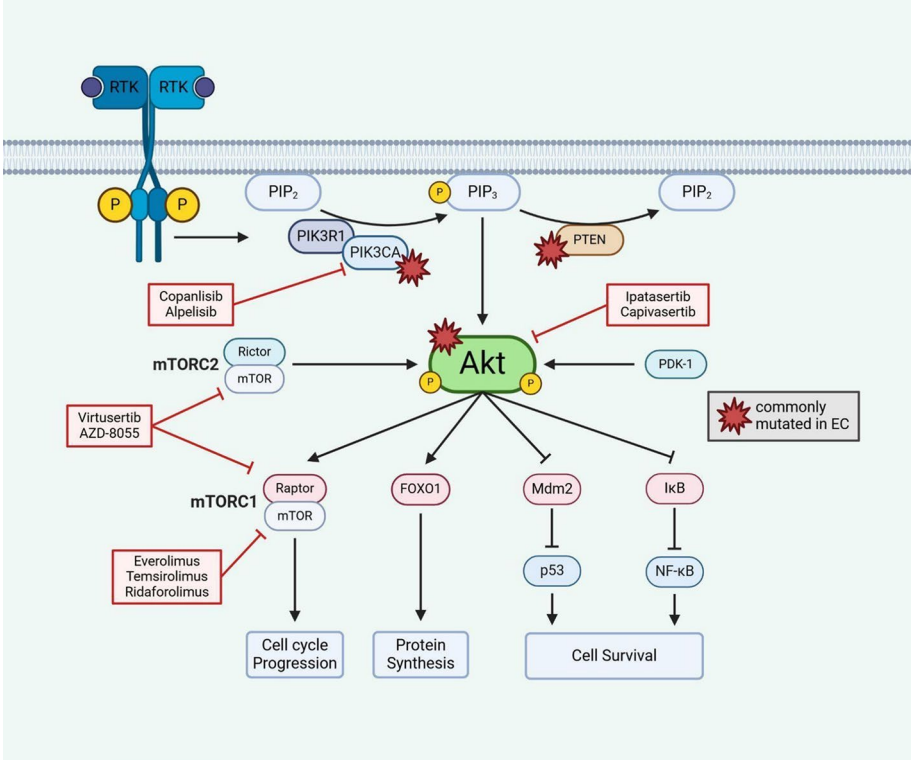


Fig. 3 Major inhibitors and the most commonly mutated components of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. The diagram illustrates the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and the mode of action of the major inhibitors. The most commonly mutated components of this pathway are PTEN, PIK3CA, and AKT

AKT is a serine/threonine kinase that acts as a central mediator in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Activation of the pathway results in the recruitment of AKT to the plasma membrane through its pleckstrin homology (PH) domain, where it is phosphorylated by PDK1 and mTORC2, where it becomes fully active [134–137]. AKT then phosphorylates a variety of downstream substrates involved in cell survival, growth, metabolism, and apoptosis. Some major substrates of this kinase include the cell cycle regulator FOXO, the NFkB regulator IKK, and the p53 inhibitor MDM2 [138, 139]. Through these interactions, AKT plays pivotal roles in promoting cell proliferation, survival, and resistance to apoptosis, all of which are key processes in tumorigenesis.

There are three isoforms of AKT—AKT1, AKT2, and AKT3—which share a conserved structural framework but differ in tissue distribution, subcellular localization, and specific functions. All three isoforms contain a PH domain, a central kinase domain, and a regulatory hydrophobic motif, with variations in these domains contributing to isoform-specific functions [140]. Differences in the PH domain, for example, affect their affinity for PIP3 and other membrane lipids, which influences their localization and activity [92]. Chemoresistance is one of the major challenges in cancer therapy, and AKT isoforms are central to this phenomenon [141].

AKT1 is ubiquitously expressed and primarily regulates cell growth, survival, and proliferation. In EC, dysregulation of AKT1 contributes to increased tumor proliferation and evasion of apoptosis. While AKT1 plays a key role in promoting tumor growth, its involvement in chemoresistance is less pronounced than that of other isoforms [142, 143].

On the other hand, AKT2 is strongly associated with metastasis, EMT, and chemoresistance. It is critical for survival following chemotherapy, particularly in response to cisplatin, as its activation induces the upregulation of antiapoptotic proteins such as Bcl-2, reducing cell death and facilitating drug resistance [141, 143]. The role of AKT2 is further underscored by its selective activation in the presence of the *PIK3CA* H1047R mutation, which enhances tumor invasiveness and resistance to treatment [124]. Additionally, AKT2 mediates the activation of the NFκB pathway, which promotes angiogenesis and tumor invasiveness, potentially contributing to chemoresistance in EC [144, 145].

AKT3 remains comparatively less characterized in EC but has been implicated in metabolic regulation and drug resistance. While its role in EC remains to be fully elucidated, studies have shown that downregulation of AKT3 sensitizes cells to doxorubicin but does not significantly affect cisplatin sensitivity [141]. In ovarian cancer, reducing AKT3 expression in tumor cells results in reduced metastasis but does not fully mimic the effects of AKT1 inhibition, which decreases tumor growth and angiogenesis [146]. In triple-negative breast cancer, AKT3 downregulation promotes tumor cell migration and metastasis via the upregulation of S100A4 [147], suggesting a role in metastatic potential across various cancers. These findings highlight that the function of AKT3 in cancer progression may be context dependent, but its role in EC still requires further investigation to understand its full impact on tumor biology and therapy response.

Although AKT mutations are rare (~2%) in EC [143], the functional divergence of AKT isoforms emphasizes their distinct contributions to tumorigenesis and chemoresistance. These isoform-specific roles suggest that targeted therapies aimed at selectively modulating AKT isoforms could offer promising strategies for overcoming resistance and improving treatment outcomes in patients with EC.

mTOR is a serine/threonine kinase that acts as a central regulator of cellular metabolism, growth, proliferation, and survival upstream and downstream of AKT. It functions as part of two distinct complexes: mTORC1 and mTORC2 [148]. mTORC1 integrates signals from growth factors, nutrient availability, and energy status to regulate processes such as protein synthesis, autophagy, and lipid metabolism. This process is mediated through key downstream effectors, such as S6 kinase (S6K) and 4E-BP1, which promote protein translation and cell growth [143]. On the other hand, mTORC2 is involved primarily in cytoskeletal organization and cell survival. It phosphorylates and activates AKT at Ser473, completing its activation and enabling its full functionality [149]. Aberrant activation of mTOR signaling, often driven by mutations in *PIK3CA* or loss of *PTEN*, is a hallmark of EC [127]. Persistent mTOR activation promotes tumor growth, angiogenesis, and resistance to apoptosis, contributing to the aggressive behavior of endometrial tumors [142].

3.5.5 Treatments targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway

Treatments targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in endometrial cancer (EC) represent a promising therapeutic avenue, as this pathway is frequently dysregulated in this malignancy. Several inhibitors targeting different nodes of the pathway are currently under investigation or are in clinical use. PI3K inhibitors include alpelisib [150, 151], which specifically targets PIK3CA mutations and has shown clinical activity in advanced gynecological cancers, and copanlisib [152], which is being evaluated in phase II trials

for PIK3CA-mutated endometrial carcinoma. AKT inhibitors, such as ipatasertib and capivasertib, are in clinical trials, with evidence suggesting their potential to improve outcomes when combined with other therapies, including antiangiogenic agents and immune checkpoint inhibitors [153, 154]. mTOR inhibitors include everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, AZD-8055, and vistusertib. Everolimus and temsirolimus are more advanced and have been tested in combination with hormonal therapies in recurrent or metastatic cases, whereas ridaforolimus and vistusertib are still being evaluated in earlier trials [155–157].

3.6 Discussion: One or more cure(s) for EC?

EC and its treatments show considerable diversity. Over time, many classifications have been developed, both from a clinical perspective (stage, grade, and histology) and a more theoretical biological standpoint (immortalized cell lines and molecular classification). Over the years, categorizations have become more refined, allowing for improved patient care. Treatments have evolved through a variety of approaches, including hormonal therapies, chemotherapies, targeted inhibitors (e.g., mTOR and PI3K inhibitors), and immunotherapies. The pace of translation from preclinical studies to clinical practice has occasionally led to discrepancies between laboratory efficacy and real-world clinical outcomes. EC is heterogeneous, with some subtypes sharing molecular features with colorectal cancer, such as microsatellite instability (MSI), POLE mutations, and defective mismatch repair, whereas others resemble high-grade serous ovarian carcinoma in terms of p53 mutations and genomic instability. The fact that EC is linked to the female reproductive system and regulated by hormones further complicates the tumor environment, making treatment challenging. Acquired therapeutic resistance, or even disease progression despite treatment, is a possible outcome, and preserving a woman's fertility can also pose a significant challenge.

Another important issue, as previously discussed, is the difficulty of diagnosing patients at an early stage. Unfortunately, gender-related barriers sometimes complicate this process. In some countries, access to care is politically unfeasible, whereas in others, follow-up is hindered by a lack of financial or time resources [71–81]. This leads to delays in diagnosis, and diagnosing women with advanced EC makes treatment even more difficult [158]. If the cancer has metastasized, more complex and expensive surgeries and treatments must be considered. Although recent advances in targeted therapies and combination regimens offer encouraging prospects, significant challenges remain in optimizing efficacy, managing toxicity, and overcoming therapeutic resistance. Research is ongoing, and promising new approaches are emerging. Combination therapies represent a significant step forward, offering the potential to manage and reduce side effects in affected women. In particular, the PI3K/AKT signaling pathway appears to be a promising target given its high mutation frequency; however, emerging evidence from clinical trials indicates that while some patients benefit from these inhibitors, toxicity profiles and the development of resistance remain substantial obstacles [158]. Although our laboratory is focused on these inhibitors, their clinical efficacy remains variable depending on the therapeutic context: 56% of patients in SAR245408/XL147 had a progression-free survival of 6 months or more [159], and 38% of patients discontinued their treatment as a result of disease progression in NCT00739830 [160] and 40% in AGO-GYN8 [161]. Significant challenges remain to be addressed in this field [157–161].

Artificial intelligence, whether in predictive modeling, histopathological image analysis, risk stratification or direct inspection, is a path to explore that will undoubtedly lead to effective, real-world solutions for endometrial cancer. Models such as CgMLP, EndoNet and HIENet are already helping to detect and/or classify endometrial cancers more accurately than humans alone [162–164].

4 Conclusion

Currently, treatment for EC primarily involves surgery, particularly hysterectomy, followed by adjuvant radiotherapy and/or chemotherapy, depending on the stage and tumor characteristics. For advanced or recurrent cancers, targeted therapies—such as those targeting the PI3K–AKT–mTOR pathway—and immunotherapy are being explored, although their efficacy remains variable and patient dependent. While inhibitors of this pathway show promise, they face challenges such as managing side effects and overcoming tumor resistance. Research continues to focus on further personalizing treatments, improving therapeutic options, and reducing inequalities in access to care.

In summary, while significant advances have been made in the management of EC, there is still a need for new therapeutic strategies and more personalized approaches to optimize outcomes.

Glossary

PTEN	Phosphatase and TENsin homolog, PI3K-AKT pathway antagonist, tumor suppressor.
TP53	Cellular tumor antigen P53 is a transcription factor that promotes the transcription of genes involved in DNA repair, apoptosis, cell cycle arrest, and tumor suppression [165].
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1 A, a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, which, when mutated, induces loss of function of this complex, causing disturbances in the cell cycle, cell survival and proliferation signals, and tumor suppressors [166].
PIK3CA	PI3-Kinase subunit alpha leads to overactivation of the PI3K-AKT pathway, which is considered an oncogene [167].
KRAS	a GTPase, leads to the activation of pathways such as the PI3K-AKT-mTOR and MAPK-ERK pathways, which are involved in cell proliferation, growth and survival, and oncogenes [168].
CTNNB1	CaTeNiN Beta-1, a transcriptional coactivator of the canonical Wnt signaling pathway that interacts with the TCF/LEF family to initiate the transcription of target genes involved in cell proliferation and oncogenes [169].
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2 has not yet been elucidated, but its mutation contributes to tumorigenesis, metastasis, and oncogene expression [170].
PIK3R1	PhosphatIdylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha 1 induces

	increased cell proliferation and invasion through overactivation of the oncogenic PI3K-AKT pathway [171].
PPP2R1A	Serine/threonine-protein phosphatase 2 A scaffold subunit Aα (PR65α), the PR65α subunit (A) of protein phosphatase 2 A (PP2A), serves as a scaffold molecule during assembly of the enzyme in its trimeric form and links the regulatory (B) and catalytic (C) subunits. Mutations in the PR65α subunit affect PP2A function and are thought to increase the expression of the enzyme's oncogenic substrates, such as AKT and the oncogenic p70S6K proteins [172].
ERBB2	ErythroBlastic oncogene B2, which produces HER2. The concentration of this protein is high in many cancers [173].
MSI	MicroSatellite Instability. All genomes are more or less predisposed to mutation; hypermutability is the result of impaired DNA mismatch repair (MMR). MSI shows that the MMR does not function normally. Different levels of MSI exist, ranging from high to low [174].
MSS	MicroSatellite Stable [12].
POLE	This gene encodes the DNA polymerase epsilon catalytic subunit.
PCOS	Polycystic ovary syndrome, a hormonal disease that can cause imbalances in hormone levels and excess androgen levels. A leading cause of infertility [175].
IGF-1	Insulin-like growth factor-1.
LVSI	LymphoVascular space invasion.
Micrometastases	0.2 to 2 mm [176].
Macrometastases	> 2 mm [176].
IHC	Iimmunohistochemistry.
EC	Endometrial carcinoma.
ER	Estrogen receptor.
PR	Progesterone receptor.
ERα	Estrogen receptor α is a nuclear receptor that is activated by estrogen.
ERβ	Estrogen receptor β is a nuclear receptor that is activated by estrogen.
P4	Progesterone.
LH	Luteinizing hormone.
MLH1	MutL protein homolog 1.
MSH2	MutS homolog 2.
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2.
MSH6	MutS homolog 6.
EMT	Epithelial–mesenchymal transition.
BPA	BisPhenol A.
COX2	Cyclooxygenase 2 (PTGS2).
ProMisE	Proactive Molecular Risk classifier for EC.
LVSI	LymphoVascular space invasion.
QOL	Quality of Life.

TILs	Tumor-Infiltrating Lymphocytes.
PDX	Patient-derived xenograft.
PDOX	Patient-derived orthotopic xenograft.
miRNAs	MicroRNAs.

Author contributions
LIR, and EA conceived and designed the review. EA contributed reagents/materials/scholarships/analysis tools. LIR, EST, CC, RP, JN and EA co-wrote the review. All authors read and approved the final manuscript.

Funding
Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, 2019- 06151 to EA.

Availability of data and material
No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Ethics approval and consent to participate
Not Applicable.

Consent for publication
All the authors provided consent for publication.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Received: 23 January 2025 / Accepted: 15 September 2025
Published online: 14 October 2025

References

1. https://www.iarc.who.int/cancer-type/endometrial-cancer/
2. https://www.cancer.org/cancer/types/endometrial-cancer.html
3. https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/uterine/treatment/endometrial-carcinoma
4. https://www.cancer.gov/types/uterine/patient/endometrial-treatment-pdq
5. https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html
6. Zhang C, Zhang H, Yang L, Wang Y, Li X, Guo J, et al. Primary squamous cell carcinoma of the endometrium in a woman of perimenopausal age: a case report. Medicine (Baltimore). 2018;97(48):e13418. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000013418.
7. Bell DW, Ellenson LH. Molecular genetics of endometrial carcinoma. Annu Rev Pathol. 2019;24(14):339–67. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043609. (**Epub 2018 Oct 17 PMID: 30332563**).
8. Hutt S, Tailor A, Ellis P, Michael A, Butler-Manuel S, Chatterjee J. The role of biomarkers in EC and hyperplasia: a literature review. Acta Oncol. 2019;58(3):342–52. https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1540886. (**Epub 2019 Jan 7 PMID: 30614360**).
9. Patra T, Meyer K, Ray RB, Kanda T, Ray R. AKT inhibitor augments anti-proliferative efficacy of a dual mTORC1/2 inhibitor by FOXO3a activation in p53 mutated hepatocarcinoma cells. Cell Death Dis. 2021;12(11):1073. https://doi.org/10.1038/s41419-021-04371-7.
10. Stelloo E, Nout RA, Osse EM, Jürgenliemk-Schulz IJ, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. Improved risk assessment by integrating molecular and clinicopathological factors in early-stage endometrial cancer-combined analysis of the PORTEC Cohorts. Clin Cancer Res. 2016;22(16):4215–24. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2878. (**Epub 2016 Mar 22 PMID: 27006490**).
11. Davies BR, Greenwood H, Dudley P, Crafter C, Yu DH, Zhang J, et al. Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background. Mol Cancer Ther. 2012;11(4):873–87. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0824-T. (**Epub 2012 Jan 31 PMID: 22294718**).
12. Ryan NAJ, Glaire MA, Blake D, Cabrera-Dandy M, Evans DG, Crosbie EJ. The proportion of endometrial cancers associated with Lynch syndrome: a systematic review of the literature and meta-analysis. Genet Med. 2019;21(10):2167–80. https://doi.org/10.1038/s41436-019-0536-8.
13. Soubrier F. Prédispositions héréditaires au cancer de l'endomètre. Bull Acad Natl Med. 2023;207(2):204–10. https://doi.org/10.1016/j.banm.2022.12.002.
14. Yasin HK, Taylor AH, Ayakannu T. A narrative review of the role of diet and lifestyle factors in the development and prevention of endometrial cancer. Cancers (Basel). 2021;13(9):2149. https://doi.org/10.3390/cancers13092149.PMID:33946913;PMCID:PMC8125712.
15. Pitsikas P, Lee D, Rainbow AJ. Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2. Mutagenesis. 2007;22(3):235–43. https://doi.org/10.1093/mutage/gem008. (**Epub 2007 Mar 9 PMID: 17351251**).
16. Christmann M, Kaina B. Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents. J Biol Chem. 2000;275(46):36256–62. https://doi.org/10.1074/jbc.M005377200. (**PMID: 10954713**).

17. Qiu R, DeRocco VC, Harris C, Sharma A, Hingorani MM, Erie DA, Weninger KR. Large conformational changes in MutS during DNA scanning, mismatch recognition and repair signaling. EMBO J. 2012;31(11):2528–40. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.95. Epub 2012 Apr 13. Erratum in: EMBO J. 2019;38(4):e101518. PMID: 22505031; PMCID: PMC3365432.
18. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene%26Cmd=ShowDetailView%26TermToSearch=4292
19. Pal T, Permuth-Wey J, Sellers TA. A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. Cancer. 2008;113(4):733–42. https://doi.org/10.1002/cncr.23601.
20. Mac Partlin M, Homer E, Robinson H, McCormick CJ, Crouch DH, Durant ST, et al. Interactions of the DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 with c-MYC and MAX. Oncogene. 2003;22(6):819–25. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206252. (**PMID: 12584560**).
21. van Oers JM, Roa S, Werling U, Liu Y, Genschel J, Hou H Jr, et al. PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(30):13384–9. https://doi.org/10.1073/pnas.1008589107.
22. Guerrette S, Acharya S, Fishel R. The interaction of the human MutL homologs in hereditary nonpolyposis colon cancer. J Biol Chem. 1999;274(10):6336–41.
23. Cannavo E, Gerrits B, Marra G, Schlapbach R, Jiricny J. Characterization of the interactome of the human MutL homologs MLH1, PMS1, and PMS2. J Biol Chem. 2007;282(5):2976–86. https://doi.org/10.1074/jbc.M609989200. (**Epub 2006 Dec 4 PMID: 17148452**).
24. Garofola C, Jamal Z, Gross GP. Cowden Disease. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525984/
25. Gammon A, Jasperson K, Champine M. Genetic basis of Cowden syndrome and its implications for clinical practice and risk management. Appl Clin Genet. 2016;13(9):83–92. https://doi.org/10.2147/TACG.S41947.
26. Palles C, Martin L, Domingo E, Chegwidden L, McGuire J, Cuthill V, et al. The clinical features of polymerase proof-reading associated polyposis (PPAP) and recommendations for patient management. Fam Cancer. 2022;21(2):197–209. https://doi.org/10.1007/s10689-021-00256-y.
27. Andrianova MA, Seplyarskiy VB, Terradas M, Sánchez-Heras AB, Mur P, Soto JL, et al. Discovery of recessive effect of human polymerase δ proofreading deficiency through mutational analysis of POLD1-mutated normal and cancer cells. Eur J Hum Genet. 2024;32(7):837–45. https://doi.org/10.1038/s41431-024-01598-8.
28. Mur P, García-Mulero S, Del Valle J, Magraner-Pardo L, Vidal A, Pineda M, et al. Role of POLE and POLD1 in familial cancer. Genet Med. 2020;22(12):2089–100. https://doi.org/10.1038/s41436-020-0922-2.
29. Caserta D, De Marco MP, Besharat AR, Costanzi F. Endocrine disruptors and endometrial cancer: molecular mechanisms of action and clinical implications, a systematic review. Int J Mol Sci. 2022;23(6):2956. https://doi.org/10.3390/ijms23062956.
30. Islam MS, Afrin S, Jones SI, Segars J. Selective progesterone receptor modulators-mechanisms and therapeutic utility. Endocr Rev. 2020;41(5):bnaa012. https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa012.
31. O'Hara AJ, Bell DW. The genomics and genetics of endometrial cancer. Adv Genomics Genet. 2012;2012(2):33–47. https://doi.org/10.2147/AGG.S28953.
32. Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nagatsuka M, Morioka M, Hayashi M, et al. Genetics of endometrial cancers. Obstet Gynecol Int. 2010;2010:984013. https://doi.org/10.1155/2010/984013.
33. American Cancer Society. Endometrial cancer causes, risk factors, and prevention. Atlanta: American Cancer Society; 2019.
34. Mallozzi M, Leone C, Manurita F, Bellati F, Caserta D. Endocrine disrupting chemicals and endometrial cancer: an overview of recent laboratory evidence and epidemiological studies. Int J Environ Res Public Health. 2017;14(3):334. https://doi.org/10.3390/ijerph14030334.
35. Ledesma-Pacheco SJ, Uriostegui-Pena AG, Rodriguez-Jacinto E, Gomez-Hernandez E, Estrada-Meza C, Banerjee A, et al. Regulatory mechanisms of microRNAs in endocrine disorders and their therapeutic potential. Front Genet. 2023;21(14):1137017. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1137017.
36. Klinge CM. miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. Mol Cell Endocrinol. 2015;418(03):273–97. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.035.
37. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Endometrial Cancer Prevention (PDQ®): Patient Version. 2023 Aug 21. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65758/
38. Johnson JE, Daley D, Tarta C, Stanciu PI. Risk of endometrial cancer in patients with polycystic ovarian syndrome: a meta-analysis. Oncol Lett. 2023;25(4):168. https://doi.org/10.3892/ol.2023.13754.
39. Rasquin LI, Anastasopoulou C, Mayrin JV. Polycystic Ovarian Disease. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
40. Wang YX, Farland LV, Gaskins AJ, Wang S, Terry KL, Rexrode KM, et al. Endometriosis and uterine fibroids and risk of premature mortality: prospective cohort study. BMJ. 2024;20(387):e078797. https://doi.org/10.1136/bmj-2023-078797.
41. Nierengarten MB. Women with more severe forms of endometriosis have a nearly 10-fold higher risk of ovarian cancer. Cancer. 2024;130(22):3784. https://doi.org/10.1002/cncr.35595. (**PMID: 39450551**).
42. Chen F, Zhu M, Li W. Advances in research on malignant transformation of endometriosis-associated ovarian cancer. Front Oncol. 2024;9(14):1475231. https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1475231.
43. Ding DC, Chen W, Wang JH, Lin SZ. Association between polycystic ovarian syndrome and endometrial, ovarian, and breast cancer: a population-based cohort study in Taiwan. Medicine (Baltimore). 2018;97(39):e12608. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000012608.
44. Tay CT, Mousa A, Vyas A, Pattuwage L, Tehrani FR, Teede H. 2023 International evidence-based polycystic ovary syndrome guideline update: insights from a systematic review and meta-analysis on elevated clinical cardiovascular disease in polycystic ovary syndrome. J Am Heart Assoc. 2024;13(16):e033572. https://doi.org/10.1161/JAHA.123.033572.
45. Mair KM, Gaw R, MacLean MR. Obesity, estrogens and adipose tissue dysfunction - implications for pulmonary arterial hypertension. Pulm Circ. 2020;10(3):2045894020952019. https://doi.org/10.1177/2045894020952023.
46. Onstad MA, Schmandt RE, Lu KH. Addressing the role of obesity in endometrial cancer risk, prevention, and treatment. J Clin Oncol. 2016;34(35):4225–30. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.4638.
47. Yasin HK, Taylor AH, Ayakannu T. A narrative review of the role of diet and lifestyle factors in the development and prevention of endometrial cancer. Cancers (Basel). 2021;13(9):2149. https://doi.org/10.3390/cancers13092149.
48. American Cancer Society. Cancer facts & figures 2023. Atlanta: American Cancer Society; 2023.

49. Masur K, Vetter C, Hinz A, Tomas N, Henrich H, Niggemann B, et al. Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptom and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. Br J Cancer. 2011;104(2):345–52. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606050.
50. Wang ZH, Zhang YZ, Wang YS, Ma XX. Identification of novel cell glycolysis related gene signature predicting survival in patients with endometrial cancer. Cancer Cell Int. 2019;14(19):296. https://doi.org/10.1186/s12935-019-1001-0.
51. Liu A, Zhang D, Yang X, Song Y. Estrogen receptor alpha activates MAPK signaling pathway to promote the development of endometrial cancer. J Cell Biochem. 2019;120(10):17593–601. https://doi.org/10.1002/jcb.29027. (**Epub 2019 May 29 PMID: 31140648**).
52. Roncolato F, Lindemann K, Willson ML, Martyn J, Mileshkin L. PI3K/AKT/mTOR inhibitors for advanced or recurrent endometrial cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2019;10(10):CD012160. https://doi.org/10.1002/14651858.CD012160.pub2.
53. Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? J Clin Oncol. 2013;31(20):2607. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.2596.
54. Berek JS, Matias-Guiu X, Creutzberg C, et al. FIGO staging of endometrial cancer: 2023. Int J Gynaecol Obstet. 2023;162:383–94. https://doi.org/10.1002/ijgo.14923.
55. Höhn AK, Brambs CE, Hiller GGR, May D, Schmoeckel E, Horn LC. 2020 WHO classification of female genital tumors. Geburtshilfe Frauenheilkd. 2021;81(10):1145–53. https://doi.org/10.1055/a-1545-4279.
56. Cancer Genome Atlas Research Network; Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature. 2013;497(7447):67–73. https://doi.org/10.1038/nature12113. Erratum in: Nature. 2013 Aug 8;500(7461):242. PMID: 23636398; PMCID: PMC3704730.
57. Kommoss S, McConechy MK, Kommoss F, Leung S, Bunz A, Magrill J, et al. Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. Ann Oncol. 2018;29(5):1180–8. https://doi.org/10.1093/annonc/mdy058. (**PMID: 29432521**).
58. van Gool IC, Eggink FA, Freeman-Mills L, Stelloo E, Marchi E, de Bruyn M, et al. POLE proofreading mutations elicit an antitumor immune response in endometrial cancer. Clin Cancer Res. 2015;21(14):3347–55. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0057.
59. Hutt S, Tailor A, Ellis P, Michael A, Butler-Manuel S, Chatterjee J. The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review. Acta Oncol. 2019;58(3):342–52. https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1540886.
60. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, et al. Endometrial carcinoma diagnosis: use of FIGO grading and genomic subcategories in clinical practice: recommendations of the international society of gynecological pathologists. Int J Gynecol Pathol. 2019. https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000518.
61. Imboden S, Nastic D, Ghaderi M, Rydberg F, Rau TT, Mueller MD, et al. Phenotype of POLE-mutated endometrial cancer. PLoS ONE. 2019;14(3):e0214318. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214318.PMID:30917185;PMCID:PMC6436745.
62. American Cancer Society. *Endometrial (Uterine) Cancer*. 2015.
63. Marnitz S, Walter T, Schömig-Markiefka B, Engler T, Kommoss S, Brucker SY. A modern approach to endometrial carcinoma: Will molecular classification improve precision medicine in the future? Cancers (Basel). 2020;12(9):2577. https://doi.org/10.3390/cancers12092577.
64. Church DN, Stelloo E, Nout RA, Valtcheva N, Depreeuw J, ter Haar N, et al. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. J Natl Cancer Inst. 2014;107(1):402. https://doi.org/10.1093/jnci/dju402.PMID:25505230;PMCID:PMC4301706.
65. Vermij L, Smit V, Nout R, Bosse T. Incorporation of molecular characteristics into endometrial cancer management. Histopathology. 2020;76(1):52–63. https://doi.org/10.1111/his.14015.
66. https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/uterine/signs-and-symptoms
67. https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/uterine/finding-cancer-early
68. https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/uterine/diagnosis
69. Banning K, Fucinari J, Fielder A, Ruterbusch JJ, Beebe-Dimmer JL, Schwartz AG, et al. Quality of life in endometrial cancer survivors by grade of disease. Cancer Med. 2023;12(12):13675–86. https://doi.org/10.1002/cam4.5987.
70. Warring S, Yost KJ, Cheville AL, Dowdy SC, Faubion SS, Kumar A, et al. The quality of life after endometrial cancer study: baseline characteristics and patient-reported outcomes. Curr Oncol. 2024;31(9):5557–72. https://doi.org/10.3390/curroncol31090412.
71. Ferrandina G, Petrillo M, Mantegna G, Fuoco G, Terzano S, Venditti L, et al. Evaluation of quality of life and emotional distress in endometrial cancer patients: a 2-year prospective, longitudinal study. Gynecol Oncol. 2014;133(3):518–25. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.015. (**2014 Mar 14. PMID: 24637198**).
72. www.partnershipagainstcancer.ca/fr/news-events/news/article/
73. Sandoval JL, et al. Magnitude and temporal variations of socioeconomic inequalities in the quality of life after early breast cancer: results from the multicentric French CANTO cohort. JCO. 2024;42:2908–17. https://doi.org/10.1200/JCO.23.02099.
74. https://www.cancer.org/cancer/types/endometrial-cancer/treating/radiation.html
75. https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/uterine/treatment/endometrial-carcinoma
76. Armbruster SD, Brow K, Locklear T, Frazier M, Harden SM. Mixed-method approach to informing a lifestyle intervention to improve the survivorship of patients with endometrial cancer. Gynecol Oncol. 2024;180:160–7. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2023.11.028.
77. DeMari JA, Dressler EV, Foraker RE, Wells BJ, Smith S, Klepin H, et al. Endometrial cancer survivors' perceptions of their cardiovascular disease risk (results from WF-1804CD AH-HA). Gynecol Oncol. 2023;174:208–12. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2023.05.009.
78. Johnston EA, Ekberg S, Jennings B, Jagasia N, van der Pols JC. Discussing diet, nutrition, and body weight after treatment for gynecological cancer: a conversation analytic study of outpatient consultations. J Cancer Surviv. 2024;18(3):1016–31. https://doi.org/10.1007/s11764-023-01345-w.
79. King L, Gajarawala S, McCrary MD. Endometrial cancer and obesity: addressing the awkward silence. JAAPA. 2023;36(1):28–31. https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000902884.01725.a3. (**PMID: 36573814**).
80. Peerenboom R, Ackroyd SA, Chang C, Moore ED, Vogel TJ, Lippitt MH, et al. Surviving and thriving: What do survivors of gynecologic cancer want? Gynecol Oncol Rep. 2022;26(41):101011. https://doi.org/10.1016/j.gore.2022.101011.PMID:35663850;PMCID:PMC9160655.

81. Gorzelitz J, Costanzo E, Gangnon R, Koltyn K, Dietz AT, Spencer RJ, et al. Feasibility and acceptability of home-based strength training in endometrial cancer survivors. J Cancer Surviv. 2023;17(1):120–9. https://doi.org/10.1007/s11764-021-00990-3.
82. Mahdy H, Casey MJ, Vadakekut ES, Crotzer D. Endometrial Cancer. 2024 In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
83. Fillon M. Adding immunotherapy to chemotherapy improves survival for endometrial cancer patients. CA Cancer J Clin. 2023;73(5):445–7. https://doi.org/10.3322/caac.21809.
84. Bogani G, Monk BJ, Powell MA, Westin SN, Slomovitz B, Moore KN, et al. Adding immunotherapy to first-line treatment of advanced and metastatic endometrial cancer. Ann Oncol. 2024;35(5):414–28. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2024.02.006.
85. Wagner VM, Backes FJ. Do not forget about hormonal therapy for recurrent endometrial cancer: a review of options, updates, and new combinations. Cancers (Basel). 2023;15(6):1799. https://doi.org/10.3390/cancers15061799.
86. El-Ghazzi N, Durando X, Giro A, Herrmann T. Targeted treatment of advanced endometrial cancer: focus on pembrolizumab. Onco Targets Ther. 2023;2(16):359–69. https://doi.org/10.2147/OTT.S368050.PMID:37288137;PMCID:PMC10243542.
87. Slomovitz BM, Filiaci VL, Walker JL, Taub MC, Finkelstein KA, Moroney JW, et al. A randomized phase II trial of everolimus and letrozole or hormonal therapy in women with advanced, persistent or recurrent endometrial carcinoma: A GOG Foundation study. Gynecol Oncol. 2022;164(3):481–91.
88. Kokori E, Olatunji G, Abdulbasit M, et al. The efficacy and safety of pembrolizumab and dostarlimab in advanced endometrial carcinoma: a systematic review. Discov Med. 2024;1:46. https://doi.org/10.1007/s44337-024-00062-2.
89. Mirza MR, Chase DM, Slomovitz BM, dePont Christensen R, Novák Z, Black D, et al. Dostarlimab for primary advanced or recurrent endometrial cancer. N Engl J Med. 2023;388(23):2145–58. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2216334.
90. Slomovitz BM, Jiang Y, Yates MS, Soliman PT, Johnston T, Nowakowski M, et al. Phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma. J Clin Oncol. 2015;33(8):930–6. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3401.
91. Degan SE, Gelman IH. Emerging roles for AKT isoform preference in cancer progression pathways. Mol Cancer Res. 2021;19(8):1251–7. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-1066.
92. Hinz N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. Cell Commun Signal. 2019;17(1):154. https://doi.org/10.1186/s12964-019-0450-3.
93. Liu S, Kurzrock R. Toxicity of targeted therapy: implications for response and impact of genetic polymorphisms. Cancer Treatment Rev. 2014;40(7):883–91.
94. Zhou, Y., Tao, L., Qiu, J. et al. Tumor biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy. *Sig Transduct Target Ther* **9**, 132 (2024). https://doi.org/10.1038/s41392-024-01823-2
95. Sabnis AJ, Bivona TG. Principles of resistance to targeted cancer therapy: lessons from basic and translational cancer biology. Trends Mol Med. 2019;25(3):185–97. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.12.009.
96. Fedele C, Tothill RW, McArthur GA. Navigating the challenge of tumor heterogeneity in cancer therapy. Cancer Discov. 2014;4(2):146–8. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1042.
97. Konstantinopoulos PA, Lee EK, Xiong N, Krasner C, Campos S, Kolin DL, et al. A phase II, two-stage study of letrozole and abemaciclib in estrogen receptor-positive recurrent endometrial cancer. J Clin Oncol. 2023;41(3):599–608. https://doi.org/10.1200/JCO.22.00628. (**Epub 2022 Sep 29 PMID: 36174113**).
98. https://www.mycancergenome.org/content/clinical_trials/NCT03395080/
99. Yu J, Liao PJ, Xu W, Jones JR, Everman DB, Flanagan-Steet H, et al. Structural model of human PORCN illuminates disease-associated variants and drug-binding sites. J Cell Sci. 2021;134(24):jcs259383. https://doi.org/10.1242/jcs.259383.
100. Drocaş I, Crăiţoiu Ş, Stepan AE, Simionescu CE, Marinescu D. VEGF immunoexpression in endometrioid endometrial carcinomas. Curr Health Sci J. 2022;48(2):155–61. https://doi.org/10.12865/CHSJ.48.02.03.
101. Zhu DL, Tuo XM, Rong Y, Zhang K, Guo Y. Fibroblast growth factor receptor signaling as therapeutic targets in female reproductive system cancers. J Cancer. 2020;11(24):7264–75. https://doi.org/10.7150/jca.44727.
102. Buza N. HER2 testing in endometrial serous carcinoma: time for standardized pathology practice to meet the clinical demand. Arch Pathol Lab Med. 2021;145(6):687–91. https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0207-RA.
103. Sideris M, Emin EI, Abdullah Z, Hanrahan J, Stefatou KM, Sevas V, et al. The role of KRAS in endometrial cancer: a mini-review. Anticancer Res. 2019;39(2):533–9. https://doi.org/10.21873/anticanres.13145.
104. Fennell DA, Porter C, Lester J, Danson S, Blackhall F, Nicolson M, et al. Olaparib maintenance versus placebo monotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (PIN): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. EClinicalMedicine. 2022;52:101595. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101595.
105. Banerjee S, Stewart J, Porta N, Toms C, Leary A, Lheureux S, et al. ATARI trial: ATR inhibitor in combination with olaparib in gynecological cancers with ARID1A loss or no loss (ENGOT/GYN1/NCRI). Int J Gynecol Cancer. 2021;31(11):1471–5. https://doi.org/10.1136/ijgc-2021-002973.
106. https://www.atcc.org/search#q=endometrium%20cancer%26sort=relevancy%26numberOfResults=24
107. Nishida M. Ishikawa cells: opening of *in vitro* hormone research on endometrial carcinoma. In: Kuramoto H, Nishida M, editors. Cell and molecular biology of endometrial carcinoma. Tokyo: Springer; 2003. https://doi.org/10.1007/978-4-431-53981-0_2.
108. Skok K, Maver U, Gradišnik L, Kozar N, Takač I, Arko D. Endometrial cancer and its cell lines. Mol Biol Rep. 2020;47(2):1399–411. https://doi.org/10.1007/s11033-019-05226-3. (**2019 Dec 17. PMID: 31848918**).
109. Van Nyen T, Moiola CP, Colas E, Annibali D, Amant F. Modeling endometrial cancer: past, present, and future. Int J Mol Sci. 2018;19(8):2348. https://doi.org/10.3390/ijms19082348.
110. Deerberg F, Rehm S, Pittermann W. Uncommon frequency of adenocarcinomas of the uterus in virgin Han: wistar rats. Vet Pathol. 1981;18(6):707–13. https://doi.org/10.1177/030098588101800601.
111. Osterman-Golkar S. Reaction kinetics of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Mutat Res. 1974;24(3):219–26. https://doi.org/10.1016/0027-5107(74)90170-5.
112. Cassier PA, Navaridas R, Bellina M, Rama N, Ducarouge B, Hernandez-Vargas H, et al. Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer. Nature. 2023;620(7973):409–16. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06367-z.
113. Reske JJ, Wilson MR, Holladay J, Siwicki RA, Skalski H, Harkins S, et al. Coexisting TP53 and ARID1A mutations promote aggressive endometrial tumorigenesis. PLoS Genet. 2021;17(12):e1009986. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009986.

114. Albertson TM, Ogawa M, Bugni JM, Hays LE, Chen Y, Wang Y, et al. DNA polymerase epsilon and delta proofreading suppress discrete mutator and cancer phenotypes in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(40):17101–4. https://doi.org/10.1073/pnas.0907147106.
115. Kim TH, Yoo JY, Jeong JW. Mig-6 mouse model of endometrial cancer. Adv Exp Med Biol. 2017;943:243–59. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43139-0_8. (**PMID: 27910070**).
116. Zhou JW, Tang JJ, Sun W, Wang H. PGK1 facilities cisplatin chemoresistance by triggering HSP90/ERK pathway mediated DNA repair and methylation in endometrial endometrioid adenocarcinoma. Mol Med. 2019;25(1):11. https://doi.org/10.1186/s10020-019-0079-0.
117. Bonazzi VF, Kondrashova O, Smith D, Nones K, Sengal AT, Ju R, et al. Patient-derived xenograft models capture genomic heterogeneity in endometrial cancer. Genome Med. 2022;14(1):3. https://doi.org/10.1186/s13073-021-00990-z.
118. Berg HF, Hjelmeland ME, Lien H, Espedal H, Fonnes T, Srivastava A, Stokowy T, Strand E, Bozickovic O, Stefansson IM, Bjørge L, Trovik J, Haldorsen IS, Hoivik EA, Krakstad C. Patient-derived organoids reflect the genetic profile of endometrial tumors and predict patient prognosis. Commun Med (Lond). 2021;1:20. Erratum in: Commun Med (Lond). 2021;1:22. https://doi.org/10.1038/s43856-021-00022-2. PMID: 35602206; PMCID: PMC9053236.
119. Yang Y, Liu PY, Bao W, Chen SJ, Wu FS, Zhu PY. Hydrogen inhibits endometrial cancer growth via a ROS/NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptotic pathway. BMC Cancer. 2020;20(1):28. https://doi.org/10.1186/s12885-019-6491-6.
120. Shen K, Shen D, Jin D, Zheng Y, Zhu Y, Zhao X, et al. High-fat diet promotes tumor growth in the patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model of ER positive endometrial cancer. Sci Rep. 2023;13(1):16537. https://doi.org/10.1038/s41598-023-43797-1.
121. Korytina GF, Akhmadishina LZ, Markelov VA, Aznabaeva YG, Kochetova OV, Nasibullin TR, et al. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and sirtuin genes in chronic obstructive pulmonary disease development. Vavilov J Genet Breed. 2023;27(5):512–21. https://doi.org/10.18699/VJGB-23-62.
122. Sisson SB, Krampe M, Anundson K, Castle S. Obesity prevention and obesogenic behavior interventions in child care: a systematic review. Prev Med. 2016;87:57–69. https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2016.02.016. (**2016 Feb 12. PMID: 26876631**).
123. Wang W, Li Y, Lin K, Wang X, Tu Y, Zhuo Z. Progress in building clinically relevant patient-derived tumor xenograft models for cancer research. Anim Models Exp Med. 2023;6(5):381–98. https://doi.org/10.1002/ame2.12349.
124. Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. Mol Cancer. 2023;22:138. https://doi.org/10.1186/s12943-023-01827-6.
125. Cheung AK, Ip JC, Chu AC, Cheng Y, Leong MM, Ko JM, et al. PTPRG suppresses tumor growth and invasion via inhibition of AKT signaling in nasopharyngeal carcinoma. Oncotarget. 2015;6(15):13434–47. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3876.
126. Zeng Z, Liang J, Wu L, Zhang H, Lv J, Chen N. Exercise-induced autophagy suppresses sarcopenia through AKT/mTOR and AKT/FoxO3a signal pathways and AMPK-mediated mitochondrial quality control. Front Physiol. 2020;11:583478. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.583478. (**Nov 2;**).
127. Zhang HL, Hu BX, Ye ZP, Li ZL, Liu S, Zhong WQ, et al. TRPML1 triggers ferroptosis defense and is a potential therapeutic target in AKT-hyperactivated cancer. Sci Transl Med. 2024;16(753):eadk0330. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adk0330.
128. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling in cancer. Front Oncol. 2014;4:64. https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064.
129. Shrestha Bhattarai T, Shamu T, Gorelick AN, Chang MT, Chakravarty D, Gavrila EI, et al. AKT mutant allele-specific activation dictates pharmacologic sensitivities. Nat Commun. 2022;13(1):2111. https://doi.org/10.1038/s41467-022-29638-1.
130. Wang J, Zhao W, Guo H, Fang Y, Stockman SE, Bai S, et al. AKT isoform-specific expression and activation across cancer lineages. BMC Cancer. 2018;18(1):742. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4654-5.
131. Álvarez-Garcia V, Tawil Y, Wise HM, Leslie NR. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. Semin Cancer Biol. 2019;59:66–79. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.02.001. (**2019 Feb 7. PMID: 30738865**).
132. Haddadi N, Lin Y, Travis G, Simpson AM, Nassif NT, McGowan EM. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. Mol Cancer. 2018;17(1):37. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0803-3.
133. Lin A, Hu Q, Li C, Xing Z, Ma G, Wang C, et al. The LINK-A lncRNA interacts with PtdIns(3,4,5)P_3 to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors. Nat Cell Biol. 2017;19(3):238–51. https://doi.org/10.1038/ncb3473.
134. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. Nature. 2007;448(7152):439–44. https://doi.org/10.1038/nature05933.
135. Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. Clin Cancer Res. 2012;18(21):5856–64. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0662. (**2012 Oct 18. PMID: 23082003**).
136. Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, Yap KCH, Jacot W, Jones RH, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. Mol Cancer. 2023;22(1):138. https://doi.org/10.1186/s12943-023-01827-6.
137. Cirone M. Cancer cells dysregulate PI3K/AKT/mTOR pathway activation to ensure their survival and proliferation: mimicking them is a smart strategy of gammaherpesviruses. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2021;56(5):500–9. https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1934811. (**2021 Jun 15. PMID: 34130564**).
138. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT–a major therapeutic target. Biochim Biophys Acta. 2004;1697(1–2):3–16. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009. (**Mar 11;**).
139. Chu N, Viennet T, Bae H, Salguero A, Boeszoermenyi A, Arthanari H, et al. The structural determinants of PH domain-mediated regulation of AKT revealed by segmental labeling. Elife. 2020;9:e59151. https://doi.org/10.7554/eLife.59151.
140. Iida M, Harari PM, Wheeler DL, Toulany M. Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. Mutat Res. 2020;819:111690. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111690.
141. Dutt A, Salvesen HB, Greulich H, Sellers WR, Beroukhim R, Meyerson M. Somatic mutations are present in all members of the AKT family in endometrial carcinoma. Br J Cancer. 2009;101(7):1218–9. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605301.
142. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. AKT signaling in health and disease. Cell Signal. 2011;23(10):1515–27. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004. (**Epub 2011 May 17 PMID: 21620960**).
143. St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, et al. Regulation of COX-2 protein expression by AKT in endometrial cancer cells is mediated through NF-κB/IκB pathway. Mol Cancer. 2004;3:7. https://doi.org/10.1186/1476-4598-3-7.

144. Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Moorehead R, Jücker M, Wootton SK, Petrik J. AKT isoform specific effects in ovarian cancer progression. Oncotarget. 2016;7:74820–33.
145. Grottke A, Ewald F, Lange T, Nörz D, Herzberger C, Bach J, et al. Downregulation of AKT3 increases migration and metastasis in triple negative breast cancer cells by upregulating S100A4. PLoS ONE. 2016;11(1):e0146370. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146370.
146. Hua H, Kong Q, Zhang H, et al. Targeting mTOR for cancer therapy. J Hematol Oncol. 2019;12:71. https://doi.org/10.1186/s13045-019-0754-1.
147. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. Cell. 2017;168(6):960–76. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004.
148. Oh WJ, Wu CC, Kim SJ, Facchinetti V, Julien LA, Finlan M, et al. mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent AKT polypeptide. EMBO J. 2010;29(23):3939–51. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.271.
149. Hashemi M, Taheriazam A, Daneii P, Hassanpour A, Kakavand A, Rezaei S, et al. Targeting PI3K/AKT signaling in prostate cancer therapy. J Cell Commun Signal. 2023;17(3):423–43. https://doi.org/10.1007/s12079-022-00702-1.
150. Damodaran S, Zhao F, Deming DA, Mitchell EP, Wright JJ, Gray RJ, et al. Phase II study of copanlisib in patients with tumors with *PIK3CA* mutations: results from the NCI-MATCH ECOG-ACRIN trial (EAY131) subprotocol Z1F. J Clin Oncol. 2022;40(14):1552–61. https://doi.org/10.1200/JCO.21.01648.
151. Buckingham L, Hao T, O'Donnell J, Zhao Z, Zhang X, Fan Y, et al. Ipatasertib, an oral AKT inhibitor, inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in serous endometrial cancer. Am J Cancer Res. 2022;12(6):2850–62.
152. Rimel BJ, et al. A randomized phase II study comparing single-agent olaparib, single-agent cediranib, and the combinations of cediranib/olaparib, olaparib/durvalumab (MEDI4736), cediranib/durvalumab (MEDI4736), and olaparib/AZD5363 (capivasertib) in women with recurrent, persistent, or metastatic endometrial cancer. JCO. 2023;41:TPS5629-TPS5629. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.TPS5629.
153. Slomovitz BM, Filiaci VL, Walker JL, Taub MC, Finkelstein KA, Moroney JW, et al. A randomized phase II trial of everolimus and letrozole or hormonal therapy in women with advanced, persistent or recurrent endometrial carcinoma: a GOG foundation study. Gynecol Oncol. 2022;164(3):481–91. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.12.031.
154. Oza AM, Elit L, Tsao MS, Kamel-Reid S, Biagi J, Provencher DM, et al. Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: a trial of the NCIC clinical trials group. J Clin Oncol. 2011;29(24):3278–85. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.1578.
155. Colombo N, McMeekin DS, Schwartz PE, Sessa C, Gehrig PA, Holloway R, et al. Ridaforolimus as a single agent in advanced endometrial cancer: results of a single-arm, phase 2 trial. Br J Cancer. 2013;108(5):1021–6. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.59. (**23403817**).
156. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, et al. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with *in vitro* and *in vivo* antitumor activity. Cancer Res. 2010;70(1):288–98. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1751.
157. Heudel P, Frenel JS, Dalban C, Bazan F, Joly F, Arnaud A, et al. Safety and efficacy of the mTOR inhibitor, Vistusertib, combined with Anastrozole in patients with hormone receptor-positive recurrent or metastatic endometrial cancer: the VICTORIA multicenter, open-label, phase 1/2 randomized clinical trial. JAMA Oncol. 2022;8(7):1001–9. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.1047.
158. Roncolato F, Lindemann K, Willson ML, Martyn J, Mileshkin L. PI3K/AKT/mTOR inhibitors for advanced or recurrent endometrial cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2019. https://doi.org/10.1002/14651858.CD012160.pub2.
159. Brown JR, Davids MS, Rodon J, Abrisqueta P, Kasar SN, Lager J, et al. Phase I trial of the pan-PI3K inhibitor pilaralisib (SAR245408/XL147) in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) or relapsed/refractory lymphoma. Clin Cancer Res. 2015;21(14):3160–9. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3262.
160. Oza AM, Pignata S, Poveda A, McCormack M, Clamp A, Schwartz B, et al. Randomized phase II trial of ridaforolimus in advanced endometrial carcinoma. J Clin Oncol. 2015;33(31):3576–82. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.8871.
161. Emons G, Kurzeder C, Schmalfeldt B, Neuser P, de Gregorio N, Pfisterer J, et al. Temsirolimus in women with platinum-refractory/resistant ovarian cancer or advanced/recurrent endometrial carcinoma. A phase II study of the AGO-study group (AGO-GYN8). Gynecol Oncol. 2016;140(3):450–6. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.12.025. (**2015 Dec 28**).
162. Sun H, Zeng X, Xu T, Peng G, Ma Y. Computer-aided diagnosis in histopathological images of the endometrium using a convolutional neural network and attention mechanisms. IEEE J Biomed Health Inform. 2020;24(6):1664–76. https://doi.org/10.1109/JBHI.2019.2944977.
163. Goyal M, Tafe LJ, Feng JX, Muller KE, Hondelink L, Bentz JL, et al. Deep learning for grading endometrial cancer. Am J Pathol. 2024;194(9):1701–11. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2024.05.003.
164. Alif Sheakh Md, Azam S, Sazia Tahosin M, Karim A, Montaha S, Uddin Fahim K, et al. ECgMLP: A novel gated MLP model for enhanced endometrial cancer diagnosis. Comput Methods Programs Biomed Update. 2025;7:100181. https://doi.org/10.1016/j.cmpbup.2025.100181.
165. Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2021;1876(1):188556. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556.
166. Toumpeki C, Liberis A, Tsirkas I, Tsirka T, Kalagasidou S, Inagamova L, et al. The role of ARID1A in endometrial cancer and the molecular pathways associated with pathogenesis and cancer progression. In Vivo. 2019;33(3):659–67. https://doi.org/10.21873/invivo.11524.
167. Konopka B, Janiec Jankowska A, Kwiatkowska E, Najmoła U, Bidziński M, Olszewski W, et al. PIK3CA mutations and amplification in endometrioid endometrial carcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors. Hum Pathol. 2011;42(11):1710–9. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.01.030.
168. Kim HJ, Lee HN, Jeong MS, Jang SB. Oncogenic KRAS: signaling and drug resistance. Cancers (Basel). 2021;13(22):5599. https://doi.org/10.3390/cancers13225599.
169. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/β-catenin signaling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):3. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6.
170. Dixit G, Gonzalez-Bosquet J, Skurski J, Devor EJ, Dickerson EB, Nothnick WB, et al. FGFR2 mutations promote endometrial cancer progression through dual engagement of EGFR and Notch signaling pathways. Clin Transl Med. 2023;13(5):e1223. https://doi.org/10.1002/ctm2.1223.

171. Liu Y, Wang D, Li Z, Li X, Jin M, Jia N, et al. Pancancer analysis on the role of PIK3R1 and PIK3R2 in human tumors. Sci Rep. 2022;12(1):5924. https://doi.org/10.1038/s41598-022-09889-0.
172. Haesen D, Abbasi Asbagh L, Derua R, Hubert A, Schrauwen S, Hoorne Y, et al. Recurrent PPP2R1A mutations in uterine cancer act through a dominant-negative mechanism to promote malignant cell growth. Cancer Res. 2016;76(19):5719–31. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3342. (**Epub 2016 Aug 2 PMID: 27485451**).
173. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Cmd=DetailsSearch%26Term=2064
174. Kurnit KC, Westin SN, Coleman RL. Microsatellite instability in endometrial cancer: new purpose for an old test. Cancer. 2019;125(13):2154–63. https://doi.org/10.1002/cncr.32058.
175. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/polycystic-ovary-syndrome
176. Houvenaeghel G, Cohen M, Bannier M, Buttarelli M, Jauffret C, Lambaudie E. Les micrométastases : entité biologique et réalité clinique? Bull Cancer. 2013;100(4):351–6. https://doi.org/10.1684/bdc.2013.1726. (**[Micrometastasis: biological entity and clinical impact?]**).
177. WHO Classification of Tumors Editorial Board. Female Genital Tumors, WHO Classification of Tumors. Vol 4. 5th ed. IARC Press. 2020, https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2021.09.003
178. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature. 2013;497(7447):67–73. https://doi.org/10.1038/nature12113.
179. Mirza MR, Chase DM, Slomovitz BM, dePont Christensen R, Novák Z, Black D, et al. Dostarlimab for primary advanced or recurrent endometrial cancer. N Engl J Med. 2023;388(Jun 8):2145–58. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2216334.
180. Raffone A, Travaglino A, Saccone G, Viggiani M, Giampaolino P, Insabato L, et al. PTEN expression in endometrial hyperplasia and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. Arch Gynecol Obstet. 2019;299(6):1511–24. https://doi.org/10.1007/s00404-019-05123-x. (**2019 Mar 26. PMID: 30915635**).
181. Chaudhry P, Asselin E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. Endocr Relat Cancer. 2009;16(2):363–80. https://doi.org/10.1677/ERC-08-0266.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.