

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
(ONCOLOGIE)

PAR
KEVIN BRASSEUR

CHIMIORÉSISTANCE ET NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES
AU NIVEAU DES CANCERS GYNÉCOLOGIQUES

JANVIER 2017

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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 ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

Cette thèse a été dirigée par :

Éric Asselin, Ph. D.	Université du Québec à Trois-Rivières
Directeur de recherche	Institution à laquelle se rattache l'évaluateur

Jury d'évaluation de la thèse :

Éric Asselin, Ph. D.	Université du Québec à Trois-Rivières
Prénom et nom, grade	Institution à laquelle se rattache l'évaluateur

Monique Cadrin, Ph. D.	Université du Québec à Trois-Rivières
Prénom et nom, grade	Institution à laquelle se rattache l'évaluateur

Carlos Reyes-Moreno Ph. D.	Université du Québec à Trois-Rivières
Prénom et nom, grade	Institution à laquelle se rattache l'évaluateur

André Tremblay, Ph. D.	Université de Montréal
Prénom et nom, grade	Institution à laquelle se rattache l'évaluateur

Thèse soutenue le 16 décembre 2016.

*Je dédie cette thèse à ma petite fille Constance
qui a découvert le monde pendant que
je rédigeais cet ouvrage.*

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier grandement et sincèrement mon directeur de recherche, Éric Asselin, qui m'a accepté dans son équipe dès ma deuxième année de baccalauréat. C'est avec un petit verre de Porto lors d'un congrès qu'il m'a fortement encouragé à effectuer un passage direct au doctorat au sein de son équipe. Je peux maintenant le remercier d'avoir cru en moi depuis le début de nos collaborations. Merci de m'avoir soutenu tout au long de mes recherches, de m'avoir poussé à me dépasser, de m'avoir donné de judicieux conseils, de m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès internationaux et d'avoir eu confiance aux idées, projets et hypothèses que j'ai présentés tout au long de mon parcours. Faire mon doctorat avec ce chercheur m'a permis de développer une autonomie intellectuelle, un savoir scientifique notable, une expérience professionnelle et de nombreux bons souvenirs; je suis reconnaissant de t'avoir eu comme directeur lors mon parcours, Éric.

Je tiens aussi à remercier Sophie Parent pour ses précieux conseils, son expertise et son aide – technique et morale – dans mes divers projets de recherche. En plus d'avoir été importante pour le complètement de mes recherches et la gestion du laboratoire, elle est une amie et sa présence a toujours permis d'apporter la bonne humeur au sein de l'équipe.

Je remercie ce cher François Fabi, toujours prêt à consacrer du temps pour aider ses collègues de laboratoire. Son opinion m'a toujours importé considérant sa grande passion pour la littérature scientifique et sa pensée intellectuelle qui amène à toujours vouloir comprendre l'impossible dans nos recherches. En plus d'être un collègue incroyable, il a été un ami que j'ai eu la chance de côtoyer dans de nombreux comités institutionnels ainsi que de nombreux événements sociaux; c'était – et ça restera – toujours un plaisir d'être en sa compagnie. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée, elle a été grandement utile pour l'accomplissement de mon doctorat.

Un remerciement spécial aux professeurs Gervais Bérubé et Marc Sirois ainsi qu'à leurs étudiants Caroline Descôteaux et Pascal Auger pour leur précieuse collaboration. Ils m'ont permis de faire avancer mes recherches et d'avoir la chance de participer à des projets d'envergure multidisciplinaire.

Je n'oublie surtout pas les nombreux collègues de recherche que j'ai eu la chance de connaître tout au long de mon parcours. Chacun a pu contribuer à l'avancement de mes recherches que ce soit par des conseils, des collaborations ou simplement des discussions motivationnelles. Plusieurs de ceux-ci sont aujourd'hui des amis importants.

Une personne des plus importantes que j'ai rencontrée durant mes études supérieures est Léonie Cinq-Mars, la femme que j'ai eu la chance d'épouser à la fin de l'été 2016, juste avant le dépôt final de cette thèse. En plus d'être disponible pour la correction de mes textes, Léonie m'a permis de garder ma confiance, elle m'a soutenu tout au long de mon parcours et elle m'encourage à poursuivre mes rêves pour mes projets futurs. Merci à toi d'être présente dans ma vie et de m'accompagner pour accomplir de nombreux défis à venir.

Un merci tout particulier à ma sœur Christelle Brasseur, mon père Jocelyn Brasseur et ma mère Rollande Marois pour leur soutien et leurs encouragements. Ils ont toujours été présents pour moi, peu importe mes décisions et la distance qui nous sépare. Je suis fier d'être membre de votre famille.

Merci aux nombreux organismes (Réseau Québécois en reproduction, les Fonds de recherche du Québec en santé, les Instituts de recherche en santé du Canada et l'Université du Québec à Trois-Rivières) qui, par l'octroi de bourses, m'ont soutenu financièrement tout au long de mes études supérieures.

Vous tous que j'ai côtoyés durant ces dernières années, vous m'avez permis, à votre façon, d'accomplir une étape importante dans ma vie. Merci beaucoup.

RÉSUMÉ

Le cancer cause plus de 30 % des décès annuellement au Canada, ce qui en fait la première cause de mortalité. Chez la femme, les cancers gynécologiques (cancers de l'ovaire et de l'endomètre) sont associés à un taux de mortalité élevé lorsque ceux-ci sont diagnostiqués tardivement. Un des obstacles majeurs provenant de ces cancers de stades avancés est qu'ils sont souvent associés à une absence de réponse à la thérapie conventionnelle, aussi nommée chimiorésistance, qui réduit drastiquement le taux de survie des patientes. En plus d'être inefficaces, ces traitements conventionnels provoquent de nombreux effets secondaires indésirables pour les patientes. Afin de contrer ces problématiques, une solution s'impose par le développement de nouveaux traitements sélectifs contre les cellules cancéreuses, traitements qui permettent de diminuer les effets secondaires et de contrer les mécanismes de chimiorésistance : la thérapie ciblée. Dans le cadre de cette thèse, trois cibles/méthodes d'intérêt ont été étudiées spécifiquement dans le contexte des cancers gynécologiques. Il s'agit d'un nouveau composé (le VP-128) ciblant spécifiquement le récepteur à l'estrogène (ER), de l'utilisation d'une toxine bactérienne (parasporine 2Aa1) sélective contre les cellules cancéreuses et d'une protéine (Par-4) ayant la caractéristique unique d'induire l'apoptose aux cellules cancéreuses seulement. L'étude de ces cibles/méthodes a comme objectif général de permettre l'avancement des connaissances concernant celles-ci dans le but de permettre, un jour, leur utilisation comme traitement de médecine personnalisée en clinique par la thérapie ciblée.

Dans le cadre du premier projet, l'activité antitumorale et le mécanisme d'action d'un hybride estradiol-platine ciblant le ER (le VP-128) ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus ont été des plus intéressants puisque le VP-128 a présenté une activité sélective à l'égard des tumeurs exprimant sa cible, le ER, et il a démontré une plus grande efficacité que le cisplatine pour inhiber la croissance tumorale. Au niveau mécanistique, il a été découvert que le VP-128 pouvait activer les mécanismes d'autophagie dans les cellules du cancer de l'ovaire. Considérant ce fait, l'inhibition de l'autophagie par l'utilisation de la chloroquine a permis d'augmenter l'efficacité du VP-128 et indique une possibilité de faire de la thérapie combinée dans une optique clinique.

Le deuxième projet a permis d'étudier l'activité antitumorale d'une toxine bactérienne sélective contre les cellules cancéreuses, la parasporine 2Aa1 (PS2Aa1), ainsi que les mécanismes d'action y étant associés. Les résultats ont démontré que la PS2Aa1 était spécifiquement cytotoxique contre les cellules cancéreuses de plusieurs cancers et, tel que désiré, n'avait aucune cytotoxicité contre des cellules humaines normales. Suite aux traitements avec la PS2Aa1, plusieurs expérimentations ont permis de confirmer que la mort cellulaire observée chez nos cellules était en partie due à des mécanismes de l'apoptose, un aspect qui était encore inconnu à ce jour. Diverses voies de survie (PI3K, MAPK et Par-4) régulées par la PS2Aa1 ont aussi été découvertes et l'utilisation

d'inhibiteurs associés à celles-ci a permis de sensibiliser davantage nos cellules à la toxine, encore une fois dans l'optique d'une utilisation de la thérapie combinée.

Le dernier projet de cette thèse a permis l'étude de la mécanistique du fragment clivé de Par-4 (cl.Par-4). Puisque cl.Par-4 semble jouer un rôle important au niveau de la chimiorésistance, des clones stables exprimant cette protéine ont été produits afin d'obtenir une meilleure compréhension de ses mécanismes. Lors d'un traitement au cisplatine, le niveau protéique de cl.Par-4 a augmenté jusqu'à 50 fois par rapport aux conditions contrôles suggérant l'implication de mécanismes de régulation post-traductionnelle. L'exposition au cisplatine a permis de découvrir que celui-ci permettait la protection de cl.Par-4 d'une dégradation dépendante du protéasome. Il a aussi été démontré que les voies de survie PI3K et MAPK étaient impliquées dans les mécanismes de régulation observés précédemment. Ces nouveaux résultats s'ajoutent aux mécanismes complexes régulant Par-4 et sont nécessaires afin de pouvoir utiliser le plein potentiel de cette protéine pouvant induire l'apoptose de façon sélective aux cellules cancéreuses.

Brièvement, chacun des projets a obtenu des résultats des plus prometteurs. Ils sont présentement à différents stades de la recherche préclinique et permettront sans doute un jour d'améliorer la qualité des traitements administrés contre les cancers gynécologiques.

Mots-clés : Cancers gynécologiques, chimiothérapie, thérapie ciblée, estrogène, Par-4, apoptose, PI3K, AKT, MAPK, toxine, bactérie, protéasome, post-traduction.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ.....	vi
LISTE DES FIGURES	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xviii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Les cancers gynécologiques.....	5
1.1.2 La progression tumorale	8
1.1.3 Thérapies anticancéreuses actuelles.....	14
1.1.3.1 Chirurgie	15
1.1.3.2 Radiothérapie	15
1.1.3.3 Thérapie anti-hormonale.....	16
1.1.3.4 Chimiothérapie	18
1.2 Le développement du cancer et de ses mécanismes de chimiorésistance	19
1.2.1 Voie de survie cellulaire PI3K/AKT	20
1.2.2 Voie de survie cellulaire MAPK.....	27
1.2.3 Estrogène et ses récepteurs	28
1.2.4 Le suppresseur de tumeur Par-4.....	30
1.2.5 Mécanisme de mort cellulaire, l'apoptose	31
1.2.6 Mécanisme de récupération et de mort cellulaire, l'autophagie	34
1.3 La thérapie ciblée.....	36
1.3.1 Cibler les voies de signalisation reliées à l'estrogène.....	38
1.3.2 Utiliser des toxines bactériennes.....	43
1.3.2.1 Les parasporines	47

1.3.3	Cibler le suppresseur de tumeur Par-4	51
1.3.3.1	Mécanisme d'apoptose de Par-4	54
1.3.3.2	Clivage de la protéine Par-4	58
1.4	Problématique et objectifs de recherche	59
1.4.1	Étudier l'activité antitumorale de deux nouveaux traitements sélectifs, différents de la chimiothérapie actuelle	61
1.4.1.1	Projet 1 : ciblage du récepteur à l'estrogène par une nouvelle molécule, le VP-128	61
1.4.1.2	Projet 2 : ciblage spécifique des cellules cancéreuses par une toxine bactérienne, parasporine 2Aa1	62
1.4.2	Étudier le mécanisme d'action d'une cible thérapeutique intracellulaire pour contrer la chimiorésistance	63
1.4.2.1	Projet 3: mécanisme d'une protéine proapoptotique spécifique aux cellules cancéreuses, Par-4	63

CHAPITRE II

ER α -TARGETED THERAPY IN OVARIAN CANCER CELLS BY A NOVEL ESTRADIOL-PLATINUM(II) HYBRID

66

2.1	Contribution des auteurs	66
2.2	Résumé de l'article (français)	67
2.3	Article complet (anglais) : ER α -targeted therapy in ovarian cancer cells by a novel estradiol-platinum(II) hybrid	69
	Abstract	69
	Introduction	70
	Materials and methods	71
	Cell culture	71
	Antibodies and reagents	72
	Drug treatments	72
	Measurement of annexin V/PI cells	73
	Transient transfection	73
	Lentiviral transfection	73
	Hoescht nuclear staining	74
	RNA extraction and RT-PCR	74
	Western blot	75
	Subcellular fractionation	75

Immunofluorescence.....	75
Acridine orange.....	76
In vivo experiments	76
Statistical analyses	77
Results	77
ER α enhances VP-128 activity in ovarian cancer cell line.....	77
Enhanced antitumor activity using VP-128 in vivo towards hormone-dependent ovarian cancer xenografts when compared with its basic compound, cisplatin	80
VP-128 induces apoptosis by activating caspase mechanisms	81
VP-128 activates caspase-independent apoptosis in ER α - A2780 cells.	83
VP-128 induces autophagy in ovarian cancer cells	84
AKT and mTor pathways are involved in VP-128 induced-autophagy .	87
Inhibition of autophagy improve VP-128 efficiency	89
Discussion.....	91
Acknowledgements.....	96
References.....	96

CHAPITRE III

PARASPORIN-2 FROM A NEW <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> 4R2 STRAIN INDUCES CASPASES ACTIVATION AND APOPTOSIS IN HUMAN CANCER CELLS	105
3.1 Contribution des auteurs	105
3.2 Résumé de l'article (français).....	106
3.3 Article complet (anglais) : Parasporin-2 from a New <i>Bacillus thuringiensis</i> 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells	107
Abstract.....	107
Introduction.....	107
Materials and methods.....	109
Bacterial strain and culture media	109
Cells and culture conditions.....	109
Total DNA isolation.....	111
PCR amplification.....	111

DNA sequencing.....	111
Preparation of activated parasporal proteins.....	112
Assay of cytotoxicity	112
Light microscopy observation	113
Antibodies and reagents.....	113
Western blot.....	114
Mesurement of Annexin V/PI cells	114
Caspase 3-7 assay	115
Statistical analyses	115
Results	116
Characterization of B. thuringiensis 4R2 cytotoxic crystal protein.....	116
Cytotoxicity of PS2Aa1 in cancer and normal cells.....	117
Morphological changes in cancer cells induced by PS2Aa1	120
PS2Aa1 induces cell death by apoptotic mechanisms.....	121
Regulation of different survival and death pathways in response to PS2Aa1	128
Inhibition of MAPK and Pi3K survival pathways in combination with PS2Aa1	129
Discussion.....	132
Acknowledgements.....	137
References.....	137

CHAPITRE IV

POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF THE CLEAVED FRAGMENT OF PAR-4 IN OVARIAN AND ENDOMETRIAL CANCER CELLS.....	145
4.1 Contribution des auteurs.....	145
4.2 Résumé de l'article (français).....	146
4.3 Article complet (anglais): Post-translational regulation of the cleaved fragment of Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells	147
Abstract.....	147
Introduction.....	147

Materials and methods	150
Cell culture.....	150
Lentiviral transfection.....	150
Antibodies and reagents.....	151
Western blot.....	151
Subcellular fractionation.....	152
Statistical analyses	152
Results	152
Par-4 is cleaved only in chemosensitive ovarian and endometrial cancer cells during cisplatin treatment.....	152
Cleaved-Par-4 is stabilized by post-translational mechanisms upon cisplatin treatment.....	155
Cleaved-Par-4 subcellular localization in ovarian and endometrial cancer cell lines.....	157
Cleaved-Par-4 protein level is decreased by the proteasome	158
PI3K and MAPK pathways are involved in the regulation of cleaved-Par-4 levels	163
Integrating the signaling pathways responsible for cleaved Par-4 regulation	168
Discussion.....	170
Acknowledgements.....	174
References.....	175
CHAPITRE V	
DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	184
5.1 Essais cliniques de thérapies ciblées contre les cancers gynécologiques	184
5.1.1 Essais cliniques ciblant mTOR.....	185
5.1.2 Essais cliniques ciblant PI3K/AKT	189
5.1.3 Essais cliniques ciblant la voie de signalisation des estrogènes	195
5.1.4 Recherches précliniques ciblant Par-4.....	199
5.2 Limitations de la thérapie ciblée.....	203
5.2.1 Le VP-128, la parasporine-2 et Par-4	208

5.3	Perspectives et futures expérimentations des divers projets.....	215
5.3.1	L'hybride estradiol-platine, le VP-128	215
5.3.2	La toxine bactérienne cancer-sélective, la parasporine-2Aa1	217
5.3.3	Le suppresseur de tumeur cancer-sélectif, Par-4	220
5.4	Conclusion générale.....	223
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		225
ANNEXE A		
TABLEAU RÉSUMÉ DES ESSAIS CLINIQUES DE THÉRAPIES CIBLÉES POUR LES CANCERS GYNÉCOLOGIQUES		260
ANNEXE B		
CHEMORESISTANCE AND TARGETED THERAPIES IN OVARIAN AND ENDOMETRIAL CANCERS		263

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Probabilité d'être atteint d'un cancer au cours de sa vie selon le sexe	1
1.2	Statistiques canadiennes du pourcentage de décès annuel, toutes causes confondues	2
1.3	Distribution actuelle et projetée de nouveaux cas de cancer, selon le sexe et l'âge au Canada	3
1.4	Comparaison des rapports de survie relative à cinq ans (%) selon les types de cancer et la période (2006-2008 et 1992-1994)	4
1.5	Schéma des différents tissus de l'appareil reproducteur féminin	5
1.6	Statistiques du cancer ovarien aux États-Unis	7
1.7	Statistiques du cancer de l'endomètre aux États-Unis	8
1.8	Hypothèse du « 2-coups » de Knudson.....	10
1.9	Schéma du développement d'un cancer et ses différents stades	11
1.10	Les dix caractéristiques d'un cancer	14
1.11	Mécanismes d'actions de divers composés chimiothérapeutiques	18
1.12	Altérations de la voie de survie PI3K dans les cancers gynécologiques	21
1.13	Voies de survie PI3K/AKT et MAPK et ses inhibiteurs associés	22
1.14	Altérations de la protéine PTEN dans tous les types de cancers	25
1.15	Schéma récapitulatif de la voie PI3K/AKT en lien avec XIAP, PTEN et p53.....	26
1.16	Schéma simplifié des cascades de kinases de la voie des MAPK	27
1.17	Concept général des mécanismes d'action de l'estrogène	29
1.18	Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	33
1.19	Schéma simplifié représentant le mécanisme de l'autophagie cellulaire.....	35

1.20	Représentation schématisée de la thérapie ciblée	37
1.21	Pourcentage de cancers féminins désignés comme étant hormone-dépendants.....	38
1.22	Concept classique de l'estrogène et surexpression de ses récepteurs dans les cancers féminins	40
1.23	Schématique des diverses utilisations de la bactérie pour la thérapie anticancéreuse	44
1.24	Classement selon la toxicité des protéines Cry provenant de différentes souches bactériennes.....	48
1.25	Association, sélectivité et oligomérisation de la parasporine-2.....	51
1.26	Altérations de la protéine Par-4 dans tous les types de cancers.....	53
1.27	Structure de la protéine Par-4	54
1.28	Schéma résumant divers mécanismes d'induction de l'apoptose par la protéine Par-4.....	55
1.29	Production d'un fragment clivé de Par-4 suite à un stimulus apoptotique dans les cellules cancéreuses	58
1.30	Propriété pro-apoptotique conservée du fragment clivé de Par-4.....	59
1.31	Structure moléculaire du VP-128.....	61
1.32	Différentes photos représentant la production de parasporines bactériennes.....	62
1.33	Schéma récapitulatif du clivage de Par-4 et sa structure associée	63
5.1	Schéma récapitulatif des essais cliniques ciblant mTOR, PI3K/AKT/MAPK et la voie de signalisation des estrogènes	185
5.2	Schéma récapitulatif des recherches précliniques ciblant Par-4	200
5.3	Implication de l'estrogène dans la régulation de Par-4.....	202
5.4	Schéma simplifié de l'utilisation de la technologie CRISPR	206
5.5	Absence de clivage additionnel de PARP en présence de cl-Par-4	211
5.6	Absence de régulation post-traductionnelle dans la lignée normale de l'endomètre HIESC.....	212

5.7	Par-4 est impliqué dans les mécanismes de la transition épithéliale-mésenchymale.....	214
5.8	Données préliminaires de la pharmacocinétique du VP-128.....	216
5.9	Schéma du système du double hybride (Yeast two-hybrid system).....	218
5.10	Schéma du système « phage display ».....	219
5.11	Principe d'induction de l'expression d'un gène d'intérêt par le système d'activation Tet-ON.....	222

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Classification des stades de la Figo pour le cancer de l’ovaire.....	12
1.2	Classification des stades de la Figo pour le cancer de l’endomètre.....	13
1.3	Études ayant démontré l’effet des isoformes d’AKT sur la résistance à la chimiothérapie des cancers de l’ovaire et de l’utérus	23
1.4	Cytotoxicité des parasporines dans diverses lignées cellulaires humaines cancéreuses ou normales.....	49
5.1	Abréviations et explications des termes utilisés pour l’analyse d’études cliniques	185

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Apoptosis-inducing factor
AKT	Protéine kinase B
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
AVO	Organites acides vésiculaires
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCL-2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BRCA	Gènes/protéines «breast cancer»
<i>Bt4R2</i>	<i>Bacillus Thuringiensis</i> 4R2
Casp	Caspase
CBR	Taux de bénéfice clinique (CR+PR+SD)
Cl.	Clivé
CR	Réponse complète
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
Cry	Crystal
Cyt	Cytolytique
DISC	Complexe de signalisation et d'induction de la mort
E ₂	17β-estradiol
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Transition épithéliale-mésenchymateuse

ErbB2	Human epidermal growth factor receptor 2
ERBF-1	Estrogen receptor promoter B factor 1
ERCC1	Excision repair cross-complementation-1
ERE	Élément de réponse aux estrogènes
ERF-1	Estrogen receptor factor 1
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases ½
Fbxo45	F-box protein 45
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FOXO3a	Forkhead box O3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPR30	G protein-coupled receptor 30
GRP78	Glucose-regulated protein-78
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
JNK	JUN N-terminal kinase
LC3B	Light Chain 3-B
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK1/2	Mitogen-activated protein kinase kinases ½
MKP3	MAP kinase phosphatase 3
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex
NER	Réparation par excision de nucléotide
NF-κB	Nuclear factor-kappa B

NLS	Séquence de localisation nucléaire
ORR	Taux de réponse objectif (CR+PR)
p	Phosphorylé
Par-4	Protéine prostate apoptosis response-4
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PAWR	Gène prostate apoptosis response-4
PBS	Tampon phosphate salin
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PFS	Survie sans progression
PI	Propidium iodide
PI-PLC	Phospholipase C Phosphatidylinositol-spécifique
PIP2	Phosphatidylinositol (4, 5)-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha
PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PgR	Récepteur à la progestérone
PR	Réponse partielle (au moins 30 % de réduction de la tumeur)
PS2Aa1	Parasporine 2Aa1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
p53	Tumor suppressor p53
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma

RISC	RNA-induced silencing complex
ER	Récepteur à l'estrogène
SAC	Selective for apoptosis induction in cancer cells
SAPK	Stress-activated protein kinase
SD	Maladie stable (entre 30 % de réduction et 25 % d'augmentation de la tumeur)
SERM	Modulateurs sélectifs des récepteurs à l'estrogène (Selective estrogen receptor modulators)
SGK	Serum/glucocorticoid regulated kinase
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
TMA	Micropuces tissulaires
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TGF- β	Transforming growth factor- β
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
XPF	Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein
XPG	Xeroderma pigmentosum group G-complementing protein

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

Le cancer est une maladie génétique se développant habituellement tardivement au cours du vécu. Environ deux personnes sur cinq seront atteintes d'un cancer au cours de leur vie et cette maladie est responsable du plus haut taux de décès (30 %) annuellement au Canada (Figure 1.1 et Figure 1.2).

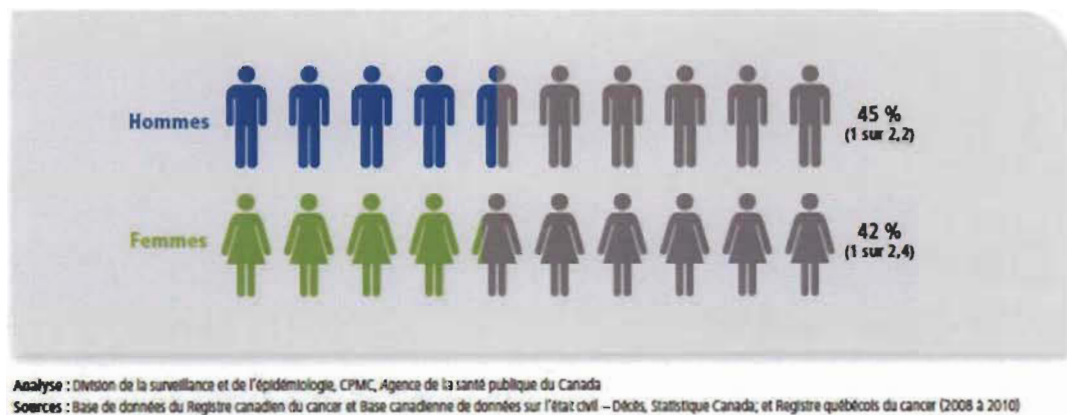
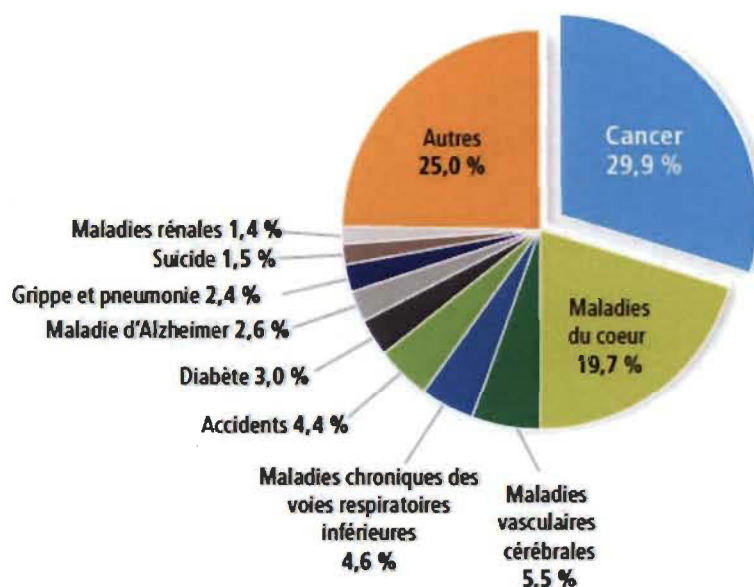


Figure 1.1 Probabilité d'être atteint d'un cancer au cours de sa vie selon le sexe.
(Tirée de Statistique Canada et de la société canadienne du cancer.)

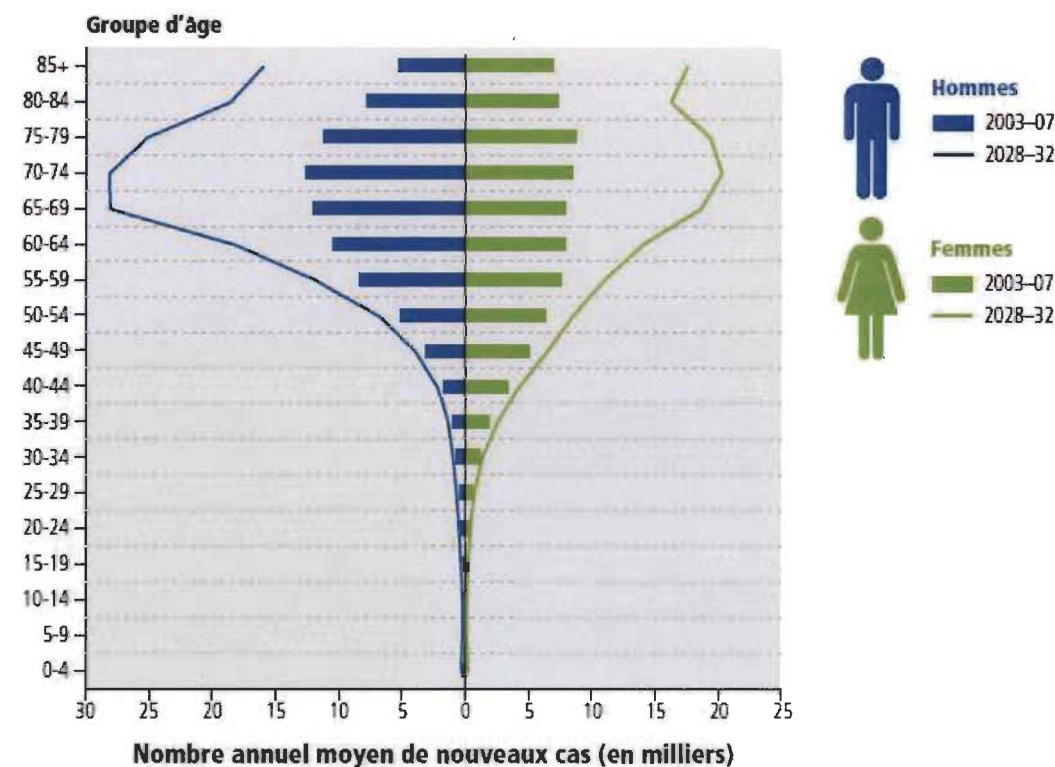


Nota : En 2011, le nombre total de décès toutes causes confondues au Canada était de 242 074.

Adapté de : Statistique Canada. Principales causes de décès au Canada, 2011, [tableau CANSIM 102-0522](#)

Figure 1.2 Statistiques canadiennes du pourcentage de décès annuel, toutes causes confondues. (Tirée de Statistique Canada.)

En matière de population, approximativement 200 000 Canadiens reçoivent un diagnostic de cancer chaque année. Puisque le cancer est une maladie associée à l'âge, il est estimé que ce nombre de nouveaux cas grimpera de 79 % d'ici 2028-2032 en raison de la population vieillissante du Canada principalement (Figure 1.3) (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015).



Analyse : Division de la surveillance et de l'épidémiologie, CPMC, Agence de la santé publique du Canada

Sources : Bases de données du Registre canadien du cancer et du Système national de déclaration des cas de cancer, Statistique Canada

Figure 1.3 Distribution actuelle et projetée de nouveaux cas de cancer, selon le sexe et l'âge au Canada. (Tirée de Statistique Canada.)

Malgré ces impressionnantes statistiques, plus de 63 % des gens qui auront un cancer seront diagnostiqués au bon moment et pourront survivre sur une période de plus de cinq ans. Malgré une amélioration du taux de survie moyen dans les dernières années, celui-ci peut grandement différer selon le type de cancer (Figure 1.4) (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015). En effet, certains types de cancer sont plus difficiles à diagnostiquer ou sont très agressifs à des stades avancés, diminuant considérablement les chances de survie du patient.

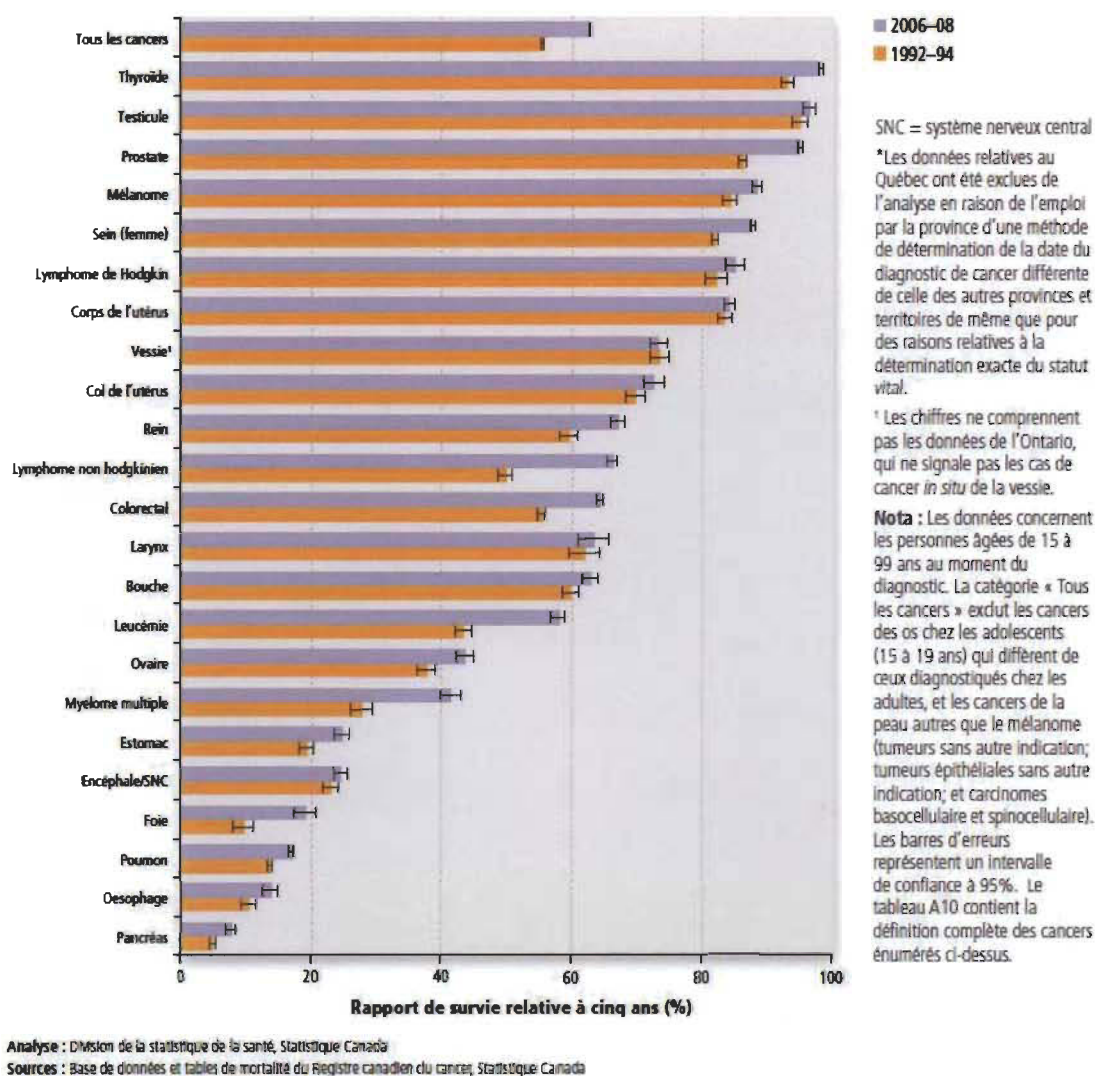


Figure 1.4 Comparaison des rapports de survie relative à cinq ans (%) selon les types de cancer et la période (2006-2008 et 1992-1994). (Tirée de Statistique Canada.)

Considérant que la solution pour combattre le cancer est encore loin d'être optimale et que le nombre d'incidents est en constante augmentation, il faut prévoir de nouvelles stratégies de prévention, de diagnostics et de traitements contre cette importante maladie génétique.

1.1.1 Les cancers gynécologiques

Les cancers gynécologiques sont des pathologies se formant dans les organes reproducteurs féminins, soit principalement l'utérus (le col et le corps) et les ovaires ainsi que plus rarement, la vulve et le vagin (Figure 1.5).

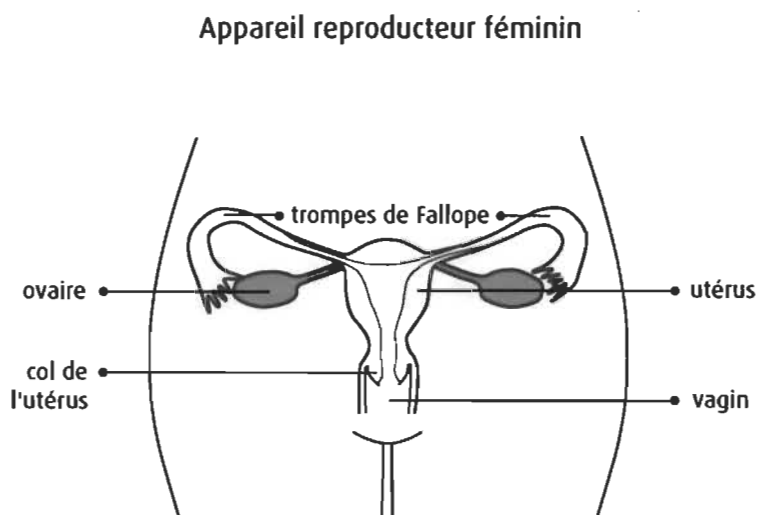


Figure 1.5 Schéma des différents tissus de l'appareil reproducteur féminin. (Tirée de www.cancer.ca)

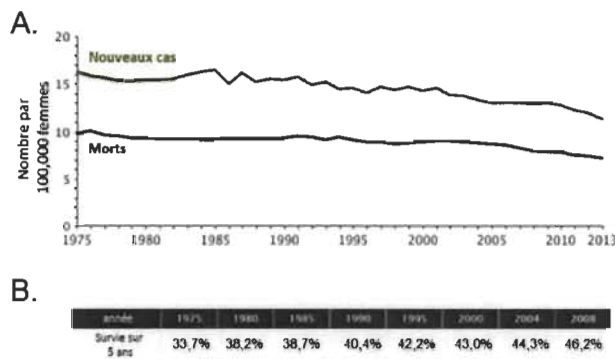
Dans l'ensemble, ces cancers représentent approximativement 10 % des décès et des nouveaux cas de cancer chez les femmes chaque année en Amérique du Nord et en Europe (Ferlay *et al.* 2013; American Cancer Society 2015; Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015; Siegel, Naishadham, and Jemal 2013; Casciato and Territo 2009; Howlader *et al.* 2016). Dans le cadre de cette thèse, les cancers de l'ovaire et du corps de l'utérus seront principalement abordés.

Le cancer ovarien est difficile à diagnostiquer en raison de la quasi-absence de symptômes au cours des premières étapes de son développement. Plus de 90 % des tumeurs ovariennes se développent au niveau de l'épithélium tandis que les autres se développent plutôt au niveau des cellules stromales ou des cellules germinales. Parmi les cancers ovariens provenant de l'épithélium, plusieurs sous-types ont été désignés. En grande majorité (approximativement 60 %), les cancers épithéliaux sont de sous-type séreux de haut grade, lesquels sembleraient plutôt provenir des trompes de Fallope que

de l'ovaire lui-même selon les dernières recherches (Auersperg 2011; McCluggage 2011). Le sous-type séreux de haut grade est présent tardivement chez les patientes, diagnostiqué à des stades avancés et répond habituellement bien aux traitements initiaux de chimiothérapie. Les autres sous-types de cancers ovariens épithéliaux (séreux de bas grade, mucineux, endométrioïde et cellules claires) sont plutôt présents à un plus jeune âge chez les patientes, donc diagnostiqués à des stades précoces, plus rares, ont une morphologie différente et leurs réponses initiales aux traitements de chimiothérapie varient selon le sous-type (Anglesio *et al.* 2013; McCluggage 2011).

Plus de 75 % des cas de cancer ovarien sont détectés à un stade avancé, le cancer ovarien a un taux élevé de mortalité et il est le cancer gynécologique avec le plus faible taux de survie sur cinq ans (46 %) (Figure 1.6) (Ferlay *et al.* 2013; American Cancer Society 2015; Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015; Lengyel; Siegel, Naishadham, and Jemal 2013; Casciato and Territo 2009; Howlader *et al.* 2016). Considérant que le cancer de l'ovaire épithélial de sous-type séreux est le plus fréquent et habituellement diagnostiqué tardivement, il sera principalement abordé dans le cadre de cette thèse. Un fait important à considérer au sujet du cancer ovarien et de son faible taux de survie est la faible efficacité des traitements actuels après seulement quelques cycles d'administration avec un risque de récurrence estimé à 80-85 % (Foley and Del Carmen 2013; Siegel, Naishadham, and Jemal 2013; McCluggage 2011).

Cancer ovarien



C. Survie sur 5 ans en lien avec le stade du cancer

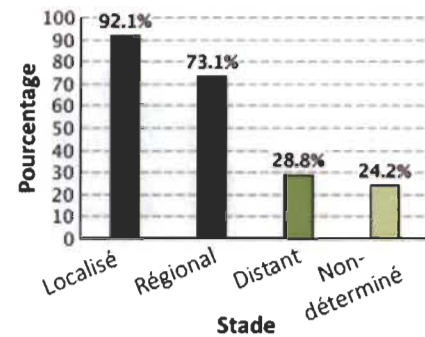


Figure 1.6 Statistiques du cancer ovarien aux États-Unis.

(A) Nombre de nouveaux cas et de morts par 100 000 femmes depuis 1975 jusqu'à 2013. (B) Taux de survie sur 5 ans depuis 1975 jusqu'à 2008. (C) Taux de survie sur 5 ans selon le stade du cancer. (Adaptée selon seer.cancer.gov)

Le cancer du corps de l'utérus est le cancer gynécologique le plus fréquent et il est souvent diagnostiqué tôt, ce qui conduit à de meilleurs résultats pour la patiente (Ferlay *et al.* 2013; American Cancer Society 2015; Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015; Siegel, Naishadham, and Jemal 2013; Smith *et al.* 2001; Casciato and Territo 2009). Malgré ces données positives, le taux d'incidence du cancer du corps de l'utérus continue d'augmenter et, en association, son taux de mortalité est lui aussi en hausse (augmentation de 2,8 % entre 2005 et 2010) (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015). La plupart des cancers qui se développent dans le corps de l'utérus commencent au niveau de l'endomètre et sont des adénocarcinomes (> 95 %) (Casciato and Territo 2009). Considérant ce fait, le cancer de l'endomètre sera le sous-type de cancer du corps de l'utérus principalement abordé dans le cadre de cette thèse. Bien que le pronostic du cancer de l'endomètre soit bon, plus de 25 % des patientes sont diagnostiquées à un stade avancé (stade > 1) avec une tumeur primaire invasive subséquemment accompagnée de métastases (Plataniotis, Castiglione, and Group 2010). Un obstacle considérable pour ces patientes diagnostiquées avec un cancer avancé/récurrent, même si elles sont traitées avec des thérapies agressives, est que le taux de survie est très faible (< 20 %) (Figure 1.7) (Casciato and Territo 2009).

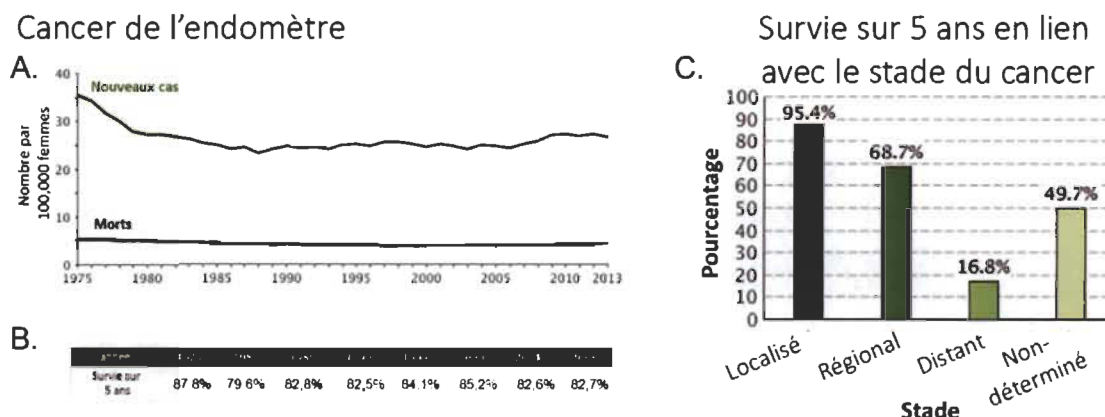


Figure 1.7 Statistiques du cancer de l'endomètre aux États-Unis.

(A) Nombre de nouveaux cas et de morts par 100 000 femmes depuis 1975 jusqu'à 2013. (B) Taux de survie sur 5 ans depuis 1975 jusqu'à 2008. (C) Taux de survie sur 5 ans selon le stade du cancer. (Adaptée selon seer.cancer.gov)

1.1.2 La progression tumorale

Avec les importantes statistiques relevées précédemment, il est possible de comprendre que plus le cancer se développe, plus il est difficile de le traiter. Mais avant tout, étudions comment le cancer apparaît en nous, plus particulièrement au niveau des organes gynécologiques. Tous les cancers débutent dans une cellule de notre corps. Plusieurs processus contrôlent l'état de prolifération de nos cellules dans divers tissus, ce qui permet d'avoir un équilibre de croissance et de conserver le nombre de cellules nécessaire à chaque tissu. Au cours de notre vie, nous serons exposés à divers facteurs de risque pouvant causer des altérations à nos cellules et la perte de cet équilibre, soit l'étape constituant l'initiation du futur développement d'une tumeur. Les facteurs de risque chez les femmes pouvant être responsables de cette première altération et causant donc les cancers gynécologiques sont nombreux. Pour le cancer ovarien, le facteur de risque le plus fréquent est la présence d'antécédents familiaux, soit la transmission d'altérations héréditaires dès la naissance (American Cancer Society 2016b; Casciato and Territo 2009). Les gènes BRCA1 et BRCA2, impliqués dans la réparation de cassures d'ADN double brin par la recombinaison homologe, sont connus pour avoir un impact sur l'incidence des cancers de l'ovaire et du sein (Miki *et al.* 1994; Brose *et al.* 2002; Petrucelli, Daly, and Feldman 2013; Pal *et al.* 2005; King *et al.* 2003).

Fait intéressant, BRCA1 et BRCA2 sont majoritairement mutés dans le sous-type séreux de haut grade du cancer de l'ovaire (Anglesio *et al.* 2013). L'environnement joue aussi un rôle important pour le développement des altérations sporadiques. En effet, la cigarette (agent cancérigène), l'obésité (augmentation du taux d'hormone), les traitements hormonaux (principalement l'utilisation d'œstrogène seule après la ménopause pouvant causer le cancer de l'endomètre), l'absence de grossesse (cycles menstruels) et le diabète sont tous des facteurs de risque associés aux cancers gynécologiques (Casciato and Territo 2009; American Cancer Society 2016a, 2016b; Rebbeck *et al.* 2005; Weiderpass *et al.* 1999). Le virus du papillome humain (VPH) est aussi un facteur de risque pour le cancer du col de l'utérus (Casciato and Territo 2009). Le système de division de la cellule peut aussi faire des erreurs sans les réparer, ce qui constitue un autre facteur de risque important (Clancy 2008).

Ces altérations génétiques peuvent avoir lieu au niveau de proto-oncogènes, gènes responsables de la croissance des cellules, ou de suppresseurs de tumeur, gènes responsables de freiner la croissance des cellules (Lodish *et al.* 2000)¹. Normalement, lors d'altérations génétiques, la cellule possède des mécanismes de contrôle permettant soit de corriger les erreurs ou d'éliminer la cellule altérée en question. Malgré tout, il arrive parfois que l'altération ne soit pas corrigée et que la cellule survive et fonctionne normalement grâce à ses diverses voies de régulations alternatives (Clancy 2008). La cellule se multipliera normalement, mais sera plus susceptible de devenir cancéreuse en raison de sa précédente altération.

Au fil du temps, de nouvelles altérations s'ajouteront à cette cellule précédemment altérée, menant donc à sa promotion et mutant des gènes critiques pour le développement tumoral. Cette promotion est causée par des agents qui normalement ne causent pas à eux seuls le cancer, mais plutôt promeuvent le développement d'une cellule ayant déjà subi cette initiation. Alfred G. Knudson a proposé en 1971 l'hypothèse

¹ Les diverses altérations génétiques jouant un rôle dans le développement des cancers de l'ovaire et de l'endomètre sont discutées plus en détail dans la sous-section 1.2.

du « 2-coups », hypothèse suggérant que l'ADN d'une cellule devait être endommagé plus d'une fois avant de se développer en cancer (Knudson 1971). Ce chercheur a amené l'hypothèse que certains gènes pouvaient empêcher le développement de cancer, gènes aujourd'hui nommés suppresseurs de tumeurs. Il a découvert ce type de gènes en comparant des cas de rétinoblastomes associés à l'hérédité versus des cas sans antécédents. Par les statistiques, les enfants avec des cas de rétinoblastomes héréditaires développaient le cancer plus rapidement que ceux n'ayant aucun antécédent familial. Cela mena à l'hypothèse que les cas héréditaires transmettaient un allèle muté à la naissance et que le deuxième était muté par l'environnement au cours du vécu pour permettre de développer le cancer. Les cas sans antécédents familiaux de rétinoblastomes, eux, nécessitaient deux mutations de l'environnement retardant le développement de cancer, le tout menant à la théorie du « 2-coups » de Knudson, théorie associée à l'initiation et la promotion des cancers (Figure 1.8) (Knudson 2001, 1971).

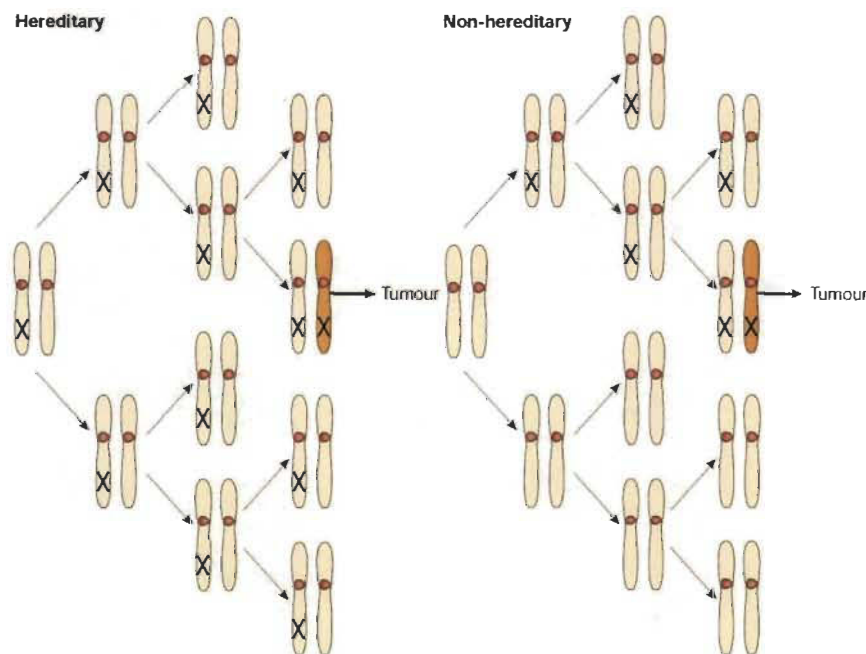


Figure 1.8 Hypothèse du « 2-coups » de Knudson. (Tirée de Knudson 2001.)

Suivant la promotion du cancer, lorsque la cellule perdra son état d'équilibre après plusieurs altérations, une croissance agressive aura lieu dans son tissu d'origine et aucun signal ne l'arrêtera, menant donc à la formation d'une masse tumorale non contrôlée.

Puisque ses mécanismes de contrôle sont défectueux, elle continuera d'acquérir des mutations, de se différencier et éventuellement d'acquérir des capacités invasives permettant de circuler dans les systèmes sanguin et lymphatique. Cette invasion des systèmes permet la création de petites tumeurs, nommées métastases, à divers endroits chez la patiente, caractéristiques d'un stade tumoral avancé (Figure 1.9) (American Cancer Society 2016c; Hanahan and Weinberg 2000).

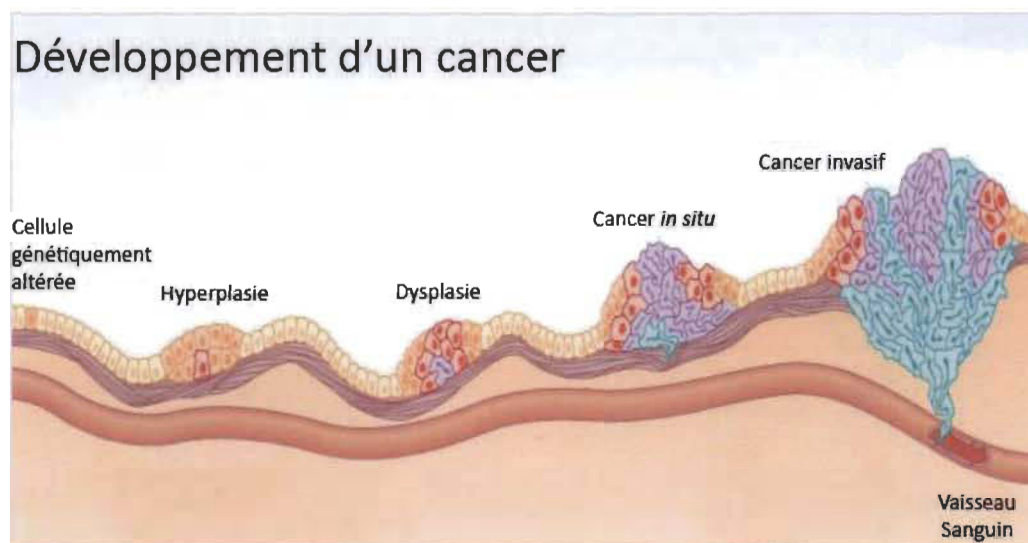


Figure 1.9 Schéma du développement d'un cancer et ses différents stades.

Une cellule reçoit une première mutation; l'hyperplasie est une prolifération anormale du tissu augmentant sa taille d'origine; la dysplasie correspond à des modifications cellulaires devenant anormales, caractéristiques des premières étapes de développement d'un cancer; le cancer *in situ* correspond à une forte augmentation de la taille de la tumeur, cependant la tumeur n'a pas franchi la lame basale; le cancer devient invasif lorsque la membrane basale est rompue et la tumeur est désignée comme étant maligne. Une fois la circulation sanguine et lymphatique atteinte, le cancer devient métastatique. (Adaptée de science.education.nih.gov)

Ces diverses étapes du développement d'un cancer sont représentatives des divers stades cliniques des cancers gynécologiques (Tableau 1.1 et Tableau 1.2). Plus le stade est avancé, plus la tumeur quitte son tissu d'origine, se propage et se différencie en raison du haut taux d'altérations.

Tableau 1.1

Classification des stades de la Figo pour le cancer de l'ovaire
(Simplifié et adapté du site www.cancer.ca)

Stade de la FIGO	Explication
Stade IA	La tumeur est limitée à un seul ovaire. La capsule de l'ovaire est intacte.
Stade IB	Les tumeurs sont limitées aux deux ovaires. La capsule de l'ovaire est intacte.
Stade IC	La tumeur est limitée à un seul ou aux deux ovaires. Elle peut avoir traversé la capsule ovarienne ou s'être propagée à la surface de l'ovaire. On peut observer des cellules cancéreuses dans l'ascite ou les lavages péritonéaux.
Stade IIA	La tumeur s'est propagée à l'utérus ou aux trompes de Fallope.
Stade IIB	La tumeur s'est propagée à d'autres organes du bassin (comme la vessie ou le rectum).
Stade IIC	La tumeur s'est propagée à tout autre organe du bassin. Il y a des cellules cancéreuses dans l'ascite ou les lavages péritonéaux.
Stade IIIA	On observe de très petites métastases (microscopiques) sur le péritoine, hors du bassin (métastases péritonéales).
Stade IIIB	Les métastases péritonéales hors du bassin mesurent 2 cm ou moins.
Stade IIIC	Les métastases péritonéales hors du bassin mesurent plus de 2 cm. Le cancer peut s'être propagé aux ganglions lymphatiques régionaux. Le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques régionaux. Nota : Si le cancer s'est propagé à la capsule externe du foie, on parle alors du stade III.
Stade IV	Le cancer s'est propagé à des organes éloignés (en excluant les métastases péritonéales, qui sont de stade III). Nota : Si le cancer s'est propagé aux tissus du foie, ou bien si on observe des cellules du cancer de l'ovaire dans l'épanchement pleural, on parle alors du stade IV.

Tableau 1.2

Classification des stades de la Figo pour le cancer de l'endomètre.
(Simplifié et adapté du site www.cancer.ca)

Stade de la FIGO	Explication
Stade I	La tumeur est confinée seulement au corps de l'utérus ou aux glandes endocervicales (elles forment le revêtement interne du col de l'utérus).
Stade IA	La tumeur se trouve seulement dans l'endomètre (revêtement de l'utérus) ou elle envahit moins de la moitié du myomètre (couche musculaire de l'utérus) en profondeur.
Stade IB	La tumeur envahit plus de la moitié du myomètre en profondeur.
Stade II	La tumeur envahit le col de l'utérus, mais ne s'étend pas au-delà de l'utérus.
Stade III	La tumeur s'est propagée localement ou régionalement ou bien les deux.
Stade IIIA	La tumeur envahit le périmétrium (enveloppe séreuse de l'utérus), les annexes (structures voisines, dont les trompes de Fallope, les ligaments et les ovaires) ou bien les deux.
Stade IIIB	La tumeur envahit le vagin, le tissu conjonctif entourant l'utérus ou bien les deux.
Stade IIIC	Le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques à l'intérieur du bassin ou qui entourent l'aorte (ganglions para-aortiques).
Stade IIIC1	Le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques du bassin.
Stade IIIC2	Le cancer s'est propagé aux ganglions para-aortiques et peut ou non s'être propagé aux ganglions du bassin.
Stade IV	Le cancer s'est propagé à la muqueuse de la vessie ou de l'intestin ou bien jusqu'à des emplacements éloignés.
Stade IVA	Le cancer s'est propagé à la muqueuse de la vessie ou de l'intestin.
Stade IVB	Le cancer s'est propagé jusqu'à des emplacements éloignés, dont les ganglions lymphatiques de l'abdomen ou de l'aîne.

Comme précédemment introduit, plus un cancer a un développement avancé, plus celui-ci est difficile à traiter de façon définitive, et ce, particulièrement pour les cancers gynécologiques. Ceci est dû à plusieurs facteurs incluant, entre autres, ses multiples localisations (métastases), un nombre très élevé de mutations variables entre chaque patient et l'acquisition d'une hétérogénéité de cellules dans une même tumeur répondant différemment aux divers traitements administrés. Ces différentes capacités acquises lors

du développement du cancer et permettant la croissance tumorale ont été séparées en dix groupes distincts selon le chercheur Weinberg en 2011 dans un article qui a été cité plus de 16 000 fois jusqu'à aujourd'hui (Figure 1.10) (Hanahan and Weinberg 2011, 2000). En dernier ressort, ce sont plusieurs de ces caractéristiques et problèmes qui font que les thérapies actuelles ne sont pas aussi efficaces que nous le désirons, et que le cancer est toujours, aujourd'hui en 2016, la première cause de mortalité au Canada.

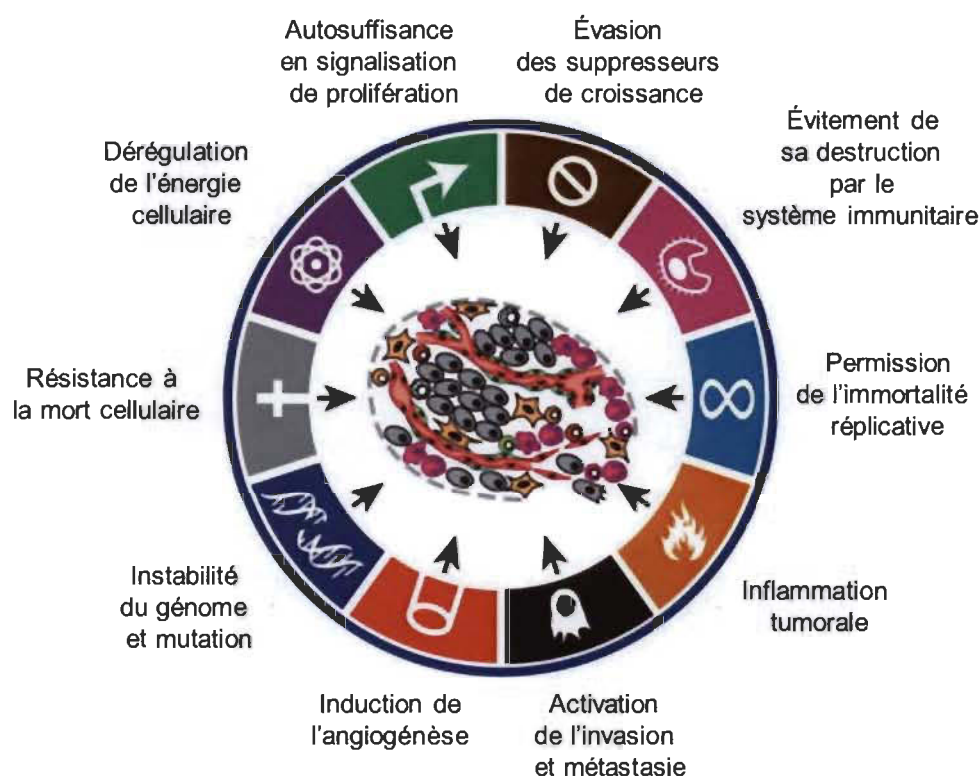


Figure 1.10 Les dix caractéristiques d'un cancer. (Adaptée de Weinberg 2011.)

1.1.3 Thérapies anticancéreuses actuelles

Au cours des dernières décennies, le développement de traitements pour les cancers gynécologiques n'a pas beaucoup progressé comparé à de nombreux autres types de cancer; le taux de survie et de guérison des patientes n'est guère plus positif (Figure 1.6 et Figure 1.7) (Patch *et al.* 2015; Casciato and Territo 2009; Howlader *et al.* 2016; Bast, Hennessey, and Mills 2009). En effet, comme tout type de cancer, la chirurgie reste la première ressource pour retirer la tumeur. Afin d'éliminer les cellules

cancéreuses restantes, en raison du stade de la tumeur ou simplement comme précaution suivant la chirurgie, divers traitements sont administrés à la patiente tels que la radiothérapie, la thérapie hormonale ou la chimiothérapie.

1.1.3.1 Chirurgie

Dans un premier temps, la chirurgie est appliquée afin d'éliminer la majeure partie de la tumeur localisée dans l'organe correspondant. En ce qui concerne les cancers avancés, la masse tumorale restante suivant la chirurgie initiale est un bon pronostic pour la survie à venir de la patiente (moins de 2 cm restants augmente le taux de survie). Le cas échéant, d'autres traitements doivent être administrés afin d'éliminer complètement la tumeur restante et ses métastases distantes en fonction du stade du cancer (Agarwal and Kaye 2003; Casciato and Territo 2009; American Cancer Society 2016a, 2016b).

1.1.3.2 Radiothérapie

Un des procédés d'élimination des cellules cancéreuses restantes est la radiothérapie, un procédé pouvant être utilisé pour les deux types de cancers gynécologiques. La radiothérapie consiste à exposer la surface du tissu contenant la tumeur à un faisceau de rayonnement ou de particules de radiation, détruisant ainsi les cellules cancéreuses par des dommages à l'ADN. Comme pour la chirurgie, la radiothérapie est utilisée principalement pour le traitement à un emplacement précis de la tumeur, normalement sa source d'émergence. La radiothérapie est souvent administrée en combinaison avec d'autres traitements, y compris la chirurgie, la thérapie hormonale et la chimiothérapie. Il convient de noter que la radiothérapie est rarement utilisée comme première option de traitement pour le cancer de l'ovaire, compte tenu de son diagnostic tardif fréquent, et est plutôt utilisée comme une option pour les cas récurrents, les patientes ayant un risque élevé de mortalité chirurgicale ou celles qui ne peuvent pas tolérer de composés chimiothérapeutiques. Dans le cas du cancer de l'endomètre, la radiation est plus fréquemment utilisée étant donné le diagnostic précoce

de la tumeur, cependant, elle n'est pas fréquemment utilisée pour les stades avancés de la progression tumorale (Casciato and Territo 2009; American Cancer Society 2016a, 2016b).

1.1.3.3 Thérapie anti-hormonale

Parmi les cancers gynécologiques, une vaste majorité exprime les récepteurs à l'estrogène (principalement le récepteur à l'estrogène α ; ER α) et le récepteur à la progestérone (PgR). Les cancers ayant besoin de ces hormones pour leur croissance peuvent ainsi être classés comme étant hormone-dépendants. Étant donné que les cancers gynécologiques expriment ces récepteurs d'hormones et utilisent aussi ces derniers pour leur croissance tumorale, cibler les hormones et leurs récepteurs afin d'inhiber leurs actions est une option considérable pour l'élimination de la progression agressive du cancer. À noter que l'hormonothérapie est utilisée principalement pour traiter les cancers du sein et que ses effets sont bien connus pour ce type de tissu, mais qu'elle est également prescrite pour les cancers gynécologiques malgré la variabilité de leurs taux de réponse (Sjoquist *et al.* 2011; Garrett and Quinn 2008). Comme c'est habituellement le cas pour le cancer du sein lors des derniers stades de développement, les cancers gynécologiques peuvent aussi acquérir des mutations/inactivations menant parfois à la perte de l'expression des récepteurs d'hormones ou tout simplement à une non-réponse des signaux hormonaux. Ces changements amènent donc les cancers à devenir hormone-indépendants et rendent la thérapie hormonale inefficace (Kreizman-Shefer *et al.* 2014; Issa *et al.* 2008; Cunat, Hoffmann, and Pujol 2004; Pujol *et al.* 1998; Sjoquist *et al.* 2011). Les différents traitements actuellement administrés pour la thérapie anti-hormonale se composent de progestatifs de synthèse, d'antagonistes des récepteurs de l'estrogène (tels que le tamoxifène), d'agonistes de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) et d'inhibiteurs de l'aromatase (American Cancer Society 2016a, 2016b; Casciato and Territo 2009). En bref, les progestatifs sont utilisés pour le traitement du cancer de l'endomètre et agissent comme de la progestérone synthétique, permettant d'inhiber la croissance dirigée par l'estrogène dans les tissus tumoraux (Kim and Chapman-Davis 2010; Song and Fraser 1995). Le taux de

réponse des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre traitées avec des progestatifs est situé entre 20-40 % et celles qui répondent au traitement voient leur espérance de survie doubler (Casciato and Territo 2009). Le tamoxifène est un antagoniste non stéroïdien des récepteurs de l'estrogène utilisé pour inhiber l'action des estrogènes en circulation. Le taux de réponse au tamoxifène est relativement faible lorsqu'utilisé pour le cancer ovarien, soit un taux de 10 à 20 %, ne faisant pas du tamoxifène un traitement de premier choix (Garrett and Quinn 2008; Sjoquist *et al.* 2011; Perez-Gracia and Carrasco 2002). Il est aussi important de noter que le tamoxifène agit plutôt comme un agoniste au niveau de l'utérus, jouant un rôle d'agent tumorigénique, et n'est donc pas recommandé pour le traitement du cancer de l'endomètre (Fisher *et al.* 1994). Le raloxifène est un autre antagoniste non stéroïdien des récepteurs de l'estrogène utilisé pour le cancer du sein. Contrairement au tamoxifène, celui-ci n'a pas un effet agoniste sur l'utérus et, conséquemment, n'augmente pas les risques de cancer de l'endomètre (Muchmore 2000). Les agonistes de la GnRH sont utilisés pour réduire la production d'estrogène provenant des ovaires; ils sont efficaces chez les patientes préménopausées. L'utilisation d'agonistes de la GnRH empêche ainsi la stimulation des récepteurs à l'estrogène et la croissance des tumeurs (Emons and Schally 1994). Finalement, les inhibiteurs de l'aromatase sont également utilisés pour bloquer l'enzyme responsable de la production d'estrogène. Considérant que ces inhibiteurs peuvent agir sur la production d'estrogène provenant à la fois des ovaires mais aussi d'une source extérieure (tissus gras en majorité), ils sont plutôt efficaces chez les femmes post-ménopausées. Malgré l'effet recherché, les inhibiteurs de l'aromatase ont démontré une réponse plutôt modérée au niveau des cancers gynécologiques. Dans le cadre du cancer du sein, les inhibiteurs de l'aromatase ont cependant un taux de succès amélioré comparativement au tamoxifène (Garrett and Quinn 2008; Sjoquist *et al.* 2011). Le taux de succès des traitements hormonaux pour les cancers gynécologiques doit être étudié plus en détail considérant que de nombreux facteurs (statut des récepteurs, tissu, stade du cancer, statut de la résistance aux traitements, l'hétérogénéité des patients ainsi que la combinaison de traitements) peuvent influencer sur l'efficacité de ce type de traitement, ce qui n'a pas toujours été considéré lorsque utilisé lors d'études antérieures (Garrett and Quinn 2008; Sjoquist *et al.* 2011).

1.1.3.4 Chimiothérapie

Enfin, la méthode la plus fréquemment utilisée pour éliminer les cellules cancéreuses gynécologiques restantes, répandues à plusieurs endroits chez la patiente (métastases), est la chimiothérapie. Le principe de cette méthode est d'utiliser des médicaments anticancéreux ciblant généralement les cellules en division rapide, une caractéristique commune des cellules cancéreuses. Les différents médicaments chimiothérapeutiques utilisés pour le traitement des cancers gynécologiques se composent principalement de composés à base de platine (cisplatine ou carboplatine), de taxanes (paclitaxel ou docétaxel) et de la doxorubicine (Lalwani *et al.* 2011; Plataniotis, Castiglione, and Group 2010; Casciato and Territo 2009). Le mécanisme des composés de platine consiste à endommager l'ADN par la formation d'adduits ADN-platine menant à l'inhibition de la réplication de l'ADN des cellules et par la suite conduisant à la mort cellulaire programmée par apoptose (Figure 1.11A) (Wang and Lippard 2005).

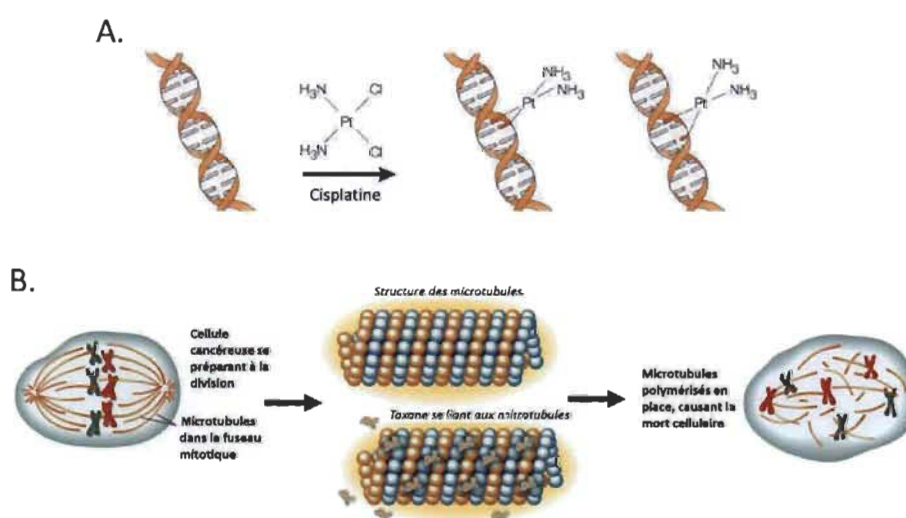


Figure 1.11 Mécanismes d'actions de divers composés chimiothérapeutiques.
 (A) Mécanisme du cisplatine. (Adaptée de Wang & Lippard 2005.)
 (B) Mécanisme des taxanes. (Adaptée de la revue Forbes 2001.)

Le mécanisme des taxanes est différent et cible quant à lui la polymérisation des microtubules, ce qui inhibe la mitose cellulaire induisant ainsi l'apoptose (Figure 1.11B) (Orr *et al.* 2003; Jordan and Wilson 2004). La doxorubicine est un composé de la famille

des anthracyclines qui s'intercale à l'ADN, inhibe la topoisomérase II et génère des radicaux libres conduisant à la mort cellulaire (Thorn *et al.* 2011). Ces agents sont principalement utilisés en combinaison et les combos platine-paclitaxel et platine-doxorubicine ont été désignés comme traitement de première ligne pour les cancers gynécologiques (Casciato and Territo 2009; Plataniotis, Castiglione, and Group 2010; A Boere and EL van der Burg 2012). Le taux de succès de ces combinaisons est très bon, soit d'environ 70 % pour le cancer de l'ovaire et de 45 % pour le cancer de l'endomètre (A Boere and EL van der Burg 2012; Casciato and Territo 2009). Une importante problématique, fréquente dans les cancers gynécologiques, est que la plupart des patientes rechutent et la tumeur qui revient est désormais résistante aux composés chimiothérapeutiques, conduisant à un faible taux de survie et conséquemment un faible taux de succès pour les traitements subséquents (Yap, Carden, and Kaye 2009; Moxley and McMeekin 2010). Il est aussi intéressant de noter que tous les traitements de chimiothérapie actuels ne sont pas sélectifs envers les cellules cancéreuses menant à de nombreux effets secondaires très dommageables (néphrotoxicité, neurotoxicité et hématotoxicité) chez la patiente, limitant donc l'utilisation des médicaments et comment ils sont administrés (Chirino and Pedraza-Chaverri 2009; Screnci and McKeage 1999; Khynriam and Prasad 2001).

Dans l'ensemble, la chimiothérapie est utilisée comme traitement additionnel lorsque les cancers atteignent un stade avancé et est très efficace. Les raisons expliquant le faible taux de survie des cancers gynécologiques diagnostiqués tardivement/récurrents sont principalement la résistance à la chimiothérapie acquise par les cellules cancéreuses et la non-sélectivité des traitements actuels. En raison de l'inefficacité des régimes chimiothérapeutiques actuels, plus de recherche et d'efforts pour améliorer les traitements sont nécessaires afin surmonter cette provocante menace.

1.2 Le développement du cancer et de ses mécanismes de chimiorésistance

Le cancer se développe via des altérations de gènes clés dans le contrôle de l'équilibre entre la survie cellulaire et la mort par apoptose. Ces altérations ont lieu

avant, pendant et après les traitements, incluant la chimiothérapie, menant à d'éventuelles populations de cellules cancéreuses qui ont survécu aux traitements et ayant acquis la caractéristique de chimiorésistance.

La chimiorésistance est vraisemblablement responsable d'un haut taux d'échec des traitements administrés et conséquemment du haut taux de mortalité associé pour plus de 90 % des patientes atteintes de cancer de stades avancés avec métastases (Agarwal and Kaye 2003). Cet obstacle majeur, ayant un impact sur l'espérance de survie des patientes, peut être acquis via diverses modifications génétiques menant, entre autres, à l'augmentation de l'efficacité des pompes à efflux, permettant de rejeter plus aisément les médicaments, et d'une diminution de la vitesse de division cellulaire, limitant l'effet des composés chimiothérapeutiques ciblant l'arrêt de la division mitotique. Au niveau moléculaire, des gènes peuvent être modifiés afin d'influencer l'efficacité des protéines de réparation à l'ADN, d'augmenter l'activité de diverses voies de survie cellulaire tout en diminuant celle de suppresseurs de tumeurs.

1.2.1 Voie de survie cellulaire PI3K/AKT

La voie de survie cellulaire PI3K/AKT est une cascade de signalisation majeure qui est fréquemment mutée/suractivée à différents niveaux dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre (Cheung *et al.* 2011; Urick *et al.* 2011; Rudd *et al.* 2011; Campbell *et al.* 2004; Bast, Hennessy, and Mills 2009; Oda *et al.* 2005). Via l'utilisation de la base de données publique TCGA (The Cancer Genome Atlas), il est possible d'observer que les principaux composants de la voie PI3K/AKT sont, en effet, fortement altérés dans les cancers gynécologiques (> 40 % dans les ovaires; > 90 % dans l'utérus) (Figure 1.12) (Cerami *et al.* 2012; Fabi and Asselin 2014).

Altérations de la voie de survie PI3K (PIK3CA;PIK3R1;PTEN;AKT1;AKT2;AKT3) dans les cancers gynécologiques (6 études)

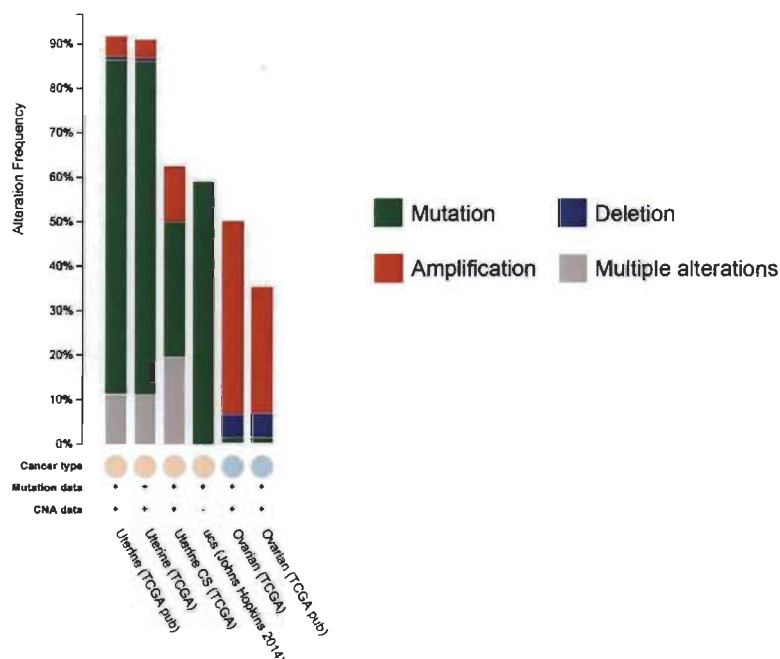


Figure 1.12 Altérations de la voie de survie PI3K dans les cancers gynécologiques. Altérations des gènes PIK3CA, PIK3R1, PTEN, AKT1, AKT2 et AKT3 provenant de six études avec des patientes atteintes de cancers gynécologiques. (Tirée de TCGA via cbiportal.org)

Ces altérations de la voie PI3K sont impliquées dans la tumorigenèse des tumeurs gynécologiques, mais jouent également un rôle pour leur profil de chimiorésistance. PI3K est une kinase située sur la membrane cellulaire, stimulée par les hormones de croissance et responsable de la phosphorylation de PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate), des phospholipides jouant le rôle de substrats nécessaires à l'activation de protéines en aval. En effet, une fois phosphorylé, PIP3 peut activer des cibles en aval de la voie PI3K telles que les kinases AKT et PDK1, kinases jouant un rôle dans la synthèse protéique et la croissance cellulaire (Figure 1.13). PI3K et ses sous-unités (principalement la sous-unité p110- α ; le gène PIK3CA) sont connus pour être très fréquemment mutés (expression accrue; amplification) et responsables de l'augmentation de la chimiorésistance de cancers de l'ovaire (Lee *et al.* 2005; Mitsuuchi *et al.* 2000; Astanehe *et al.* 2008).

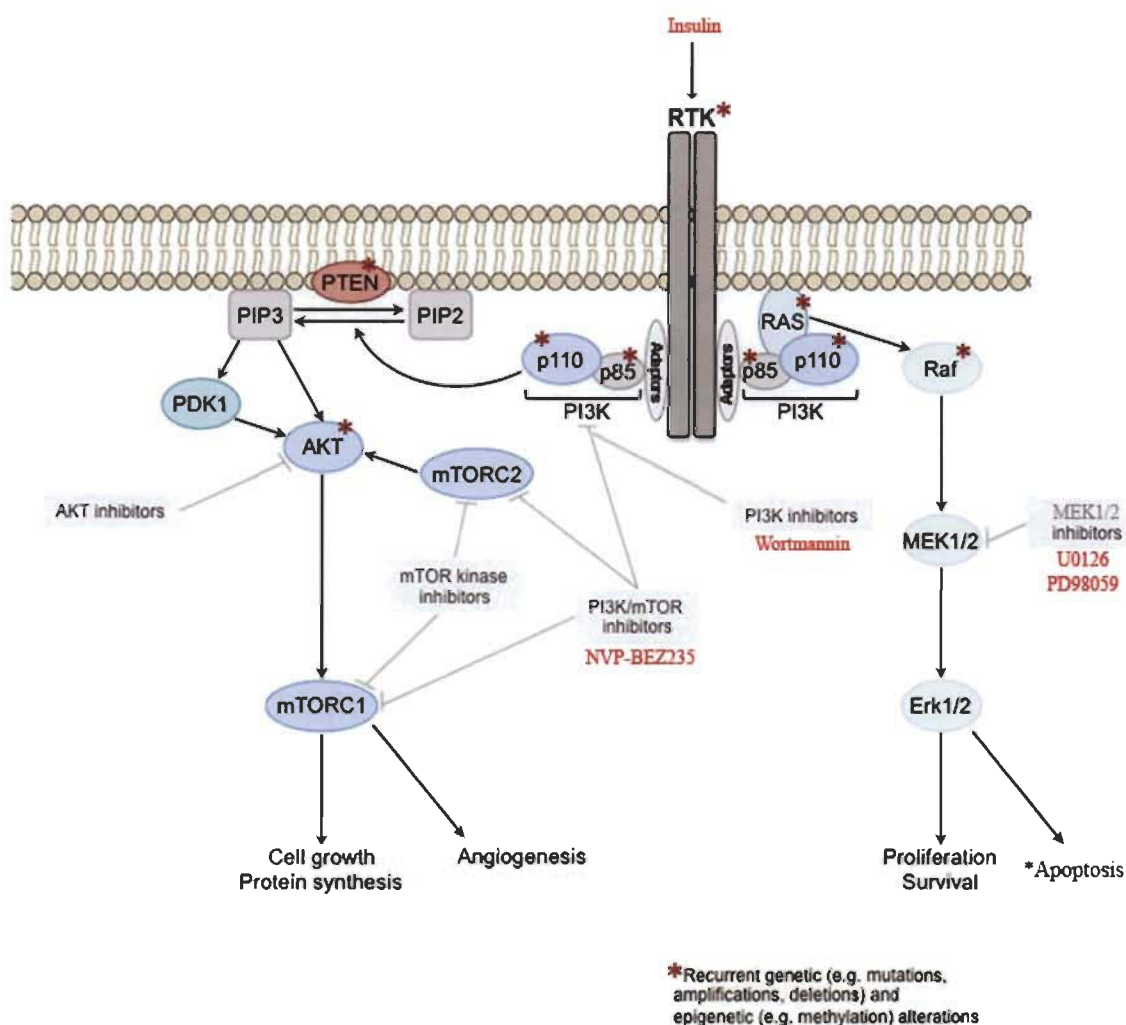


Figure 1.13 Voies de survie PI3K/AKT et MAPK et ses inhibiteurs associés.
 Les éléments en rouge sont des activateurs/inhibiteurs des voies PI3K et MAPK. La wortmannin est un inhibiteur de PI3K, le U0126 et PD98059 sont des inhibiteurs de MEK $\frac{1}{2}$, le NVP-BEZ235 est un inhibiteur double de PI3K et mTORC1 et l'insuline est une hormone protéique permettant l'activation de PI3K sur son récepteur. (Adaptée de Weigelt *et al.* 2014.)

En aval de PI3K, l'expression des isoformes de la kinase AKT (AKT1-2-3) a été rapportée d'augmenter également la chimiorésistance contre les composés à base de platine, les taxanes et la doxorubicine dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre (Tableau 1.3) (Gagnon *et al.* 2004; Gagnon *et al.* 2008; Girouard *et al.* 2013; Fraser *et al.* 2003; Asselin, Mills, and Tsang 2001; Yang *et al.* 2006; Abedini *et al.* 2010; Kim, Juhn, and Song 2007; Peng *et al.* 2010; Yuan *et al.* 2003; Yang *et al.* 2008). Ces isoformes d'AKT sont souvent surexprimées en raison des mutations en amont

(particulièrement PI3K et PTEN) rendant constitutive l'activité de la voie de signalisation PI3K/AKT. Il a été démontré que seuls les isoformes d'AKT1 et AKT2 sont responsables de l'acquisition de la résistance contre le cisplatine et le paclitaxel, tandis que les trois isoformes d'AKT augmentent la résistance à la doxorubicine dans des cellules du cancer de l'endomètre (Tableau 1.3) (Girouard *et al.* 2013). En ce qui concerne le cancer de l'ovaire, il a été démontré que l'expression de l'isoforme d'AKT2 augmente la résistance au cisplatine (Tableau 1.3) (Yuan *et al.* 2003; Fraser *et al.* 2003; Yang *et al.* 2006; Abedini *et al.* 2008; Yang *et al.* 2008).

Tableau 1.3

Études ayant démontré l'effet des isoformes d'AKT sur la résistance à la chimiothérapie des cancers de l'ovaire et de l'utérus

Tissu	Cellules	Résistances	Isoformes d'AKT	Notes	Référence
Utérus	KLE	Cisplatine	2 et 3		Gagnon 2004
Utérus	HeLa	Doxorubicine	2 et 3		Gagnon 2008
Utérus	HeLa	Taxol	1,2 et 3		Gagnon 2008
Utérus	KLE et Hec-1a	Cisplatine	1 et 2		Girouard 2013
Utérus	KLE	Taxol	1 et 2		Girouard 2013
Utérus	KLE	Doxorubicine	1,2 et 3		Girouard 2013
Ovaire	A2780	Cisplatine	2		Fraser 2003
Ovaire	A2780/CP	Cisplatine	2		Yuan 2003
Ovaire	A2780	Cisplatine	2		Yang 2006
Ovaire	C13*	Cisplatine	1 et 2		Yang 2006
Ovaire	A2780 et C13*	Cisplatine	2		Yang 2008
Ovaire	A2780 et OV2008	Cisplatine	1 et 2		Abedini 2010
Ovaire	HEY, OCC1, OVCA433 et OVCAR-3	Cisplatine	*	*Utilisation d'adénovirus dominant-négatif d'AKT, non-isoforme spécifique. p53 dépendant.	Abedini 2010
Ovaire	SKOV-3 et PA-1	Taxol	*	*Utilisation d'un inhibiteur de PI3K seulement, Wormanin.	Kim 2007

Tissu	Cellules	Résistances	Isoformes d'AKT	Notes	Référence
Ovaire	SKOV-3	Cisplatine	*	*Utilisation d'un inhibiteur de PI3K, LY294002. Utilisation d'un siRNA inhibant les 3 isoformes.	Peng 2010
Ovaire	A2780	Cisplatine	*	*Utilisation d'un inhibiteur de PI3K, LY294002.	Asselin 2001

La protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) est impliquée par ses complexes mTORC1/2 dans divers mécanismes. Ces deux complexes s'associent avec des protéines différentes, régulant ainsi différents substrats. Le complexe mTORC1 est le complexe jouant un rôle dans l'autophagie, la synthèse protéique, la croissance et les mécanismes de survie cellulaire. Le complexe mTORC2 est plutôt associé à la régulation du cytosquelette, mais permet aussi la phosphorylation sur la sérine 473 d'AKT. Il est important de noter qu'AKT, protéine impliquée dans la chimiorésistance, permet d'activer le complexe mTORC1 (Figure 1.13) (Ma and Blenis 2009).

PTEN est une protéine phosphatase et supresseuse de tumeur agissant négativement sur la voie de survie cellulaire PI3K/AKT par sa capacité à déphosphoryler PIP3 en PIP2, contrôlant ainsi l'activité des cibles en aval de PI3K (Figure 1.13). Un fait très intéressant concernant la protéine PTEN est son pourcentage élevé d'altérations observées dans les cancers de l'endomètre (> 65 %) qui est impressionnant, lorsque comparé à d'autres types de cancers (Figure 1.14) (Cerami *et al.* 2012).

doxorubicine (endomètre) pour les deux types de cancers étudiés (Gagnon *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2002; Asselin, Mills, and Tsang 2001; Dan *et al.* 2004; Mansouri, Zhang, *et al.* 2003; Ma, Chen, and Xin 2009; Sasaki *et al.* 2000; Li *et al.* 2000). p53 est un autre suppresseur de tumeur bien connu jouant le rôle de « gardien du génôme » et impliqué dans le développement de la résistance observée en lien avec la voie PI3K/AKT dans les cancers gynécologiques (Figure 1.15). En effet, il a été démontré dans le cancer de l’ovaire que p53 pouvait diminuer le niveau d’expression de la sous-unité p110- α de la protéine PI3K. Ils ont ensuite démontré que cette diminution de la sous-unité de PI3K menait à la diminution du niveau d’expression de la forme phosphorylée d’AKT. Cette diminution observée avec p53 se produit en se liant sur l’un des promoteurs du gène PIK3CA (gène de la sous-unité p110- α) inhibant ainsi sa transcription (Astaneche *et al.* 2008). AKT peut aussi, à l’inverse, inhiber l’activation de p53 et conséquemment son action p53-dépendante de l’apoptose au niveau de la mitochondrie (Abedini *et al.* 2010; Yang *et al.* 2006; Fraser, Bai, and Tsang 2008). La protéine p53 de type sauvage est impliquée dans la chimiorésistance attribuée à PI3K/AKT et XIAP dans le cancer de l’ovaire et sa présence semble être nécessaire pour lutter contre la chimiorésistance afin que l’utilisation d’inhibiteurs de la voie PI3K soit effectif (Fraser *et al.* 2003; Yang *et al.* 2006; Abedini *et al.* 2010; Fraser, Bai, and Tsang 2008; Li *et al.* 2000).

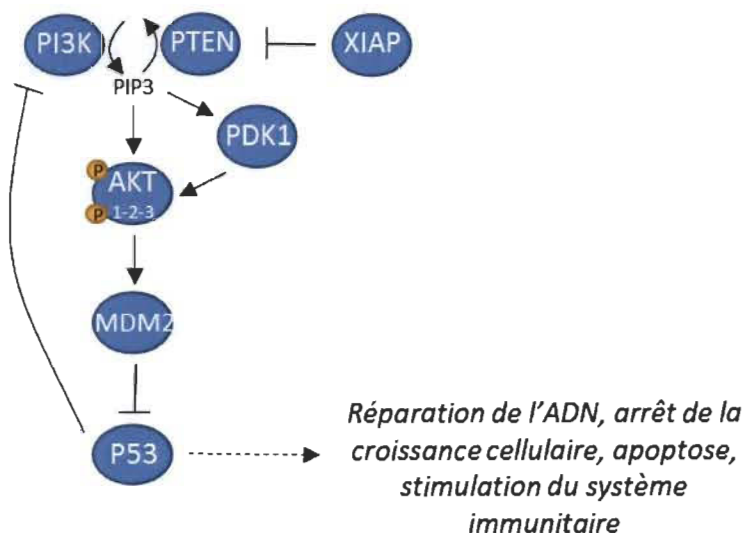


Figure 1.15 Schéma récapitulatif de la voie PI3K/AKT en lien avec XIAP, PTEN et p53. (Adaptée de Brasseur *et al.* 2016.)

1.2.2 Voie de survie cellulaire MAPK

Une autre voie de survie à considérer dans les cancers gynécologiques est la voie de survie cellulaire des MAPK. La voie des MAPK consiste en des cascades de protéines kinase pouvant être activées par divers stimuli, comprenant, entre autres, des facteurs de croissance ou un stress génotoxique. Après leur stimulation, les MAPK jouent un rôle majeur pour la croissance cellulaire, la survie cellulaire et/ou l'apoptose. Un aspect important de la voie MAPK est le fait qu'en amont de ces cascades se situent les oncogènes Ras (HRas, KRas, et NRas), une famille de GTPases souvent dérégulée et jouant un rôle dans la tumorigénèse de plusieurs cancers, y compris ceux provenant de tissus gynécologiques (Figure 1.13) (Roberts and Der 2007). Les MAPK comprennent différentes cascades de kinases, les principales étant les cascades ERK1/ERK2, JNK/SAPK et celle de p-38 MAPK (Figure 1.16) (Pearson *et al.* 2001; Roberts and Der 2007; Cowan and Storey 2003).

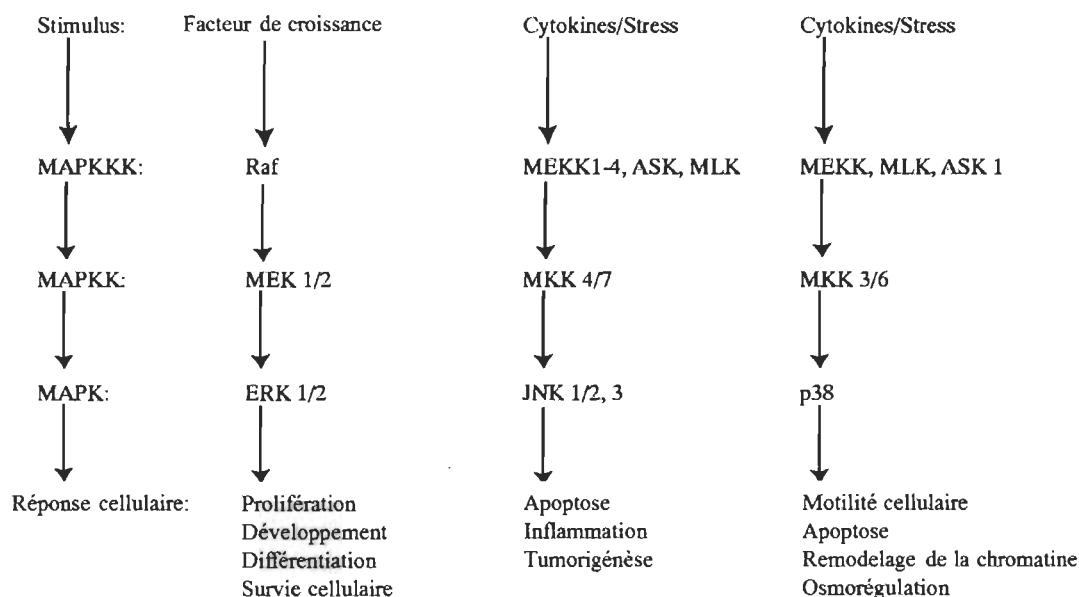


Figure 1.16 Schéma simplifié des cascades de kinases de la voie des MAPK. (Adaptée de Cowan et Storey 2003.)

Ras active les kinases RAF (ARAF, BRAF et CRAF) qui par la suite conduisent à la cascade des kinases ERK1/ERK2 qui est stimulée principalement par des facteurs mitogéniques et est associée à la division cellulaire et la survie (Figure 1.13 et

Figure 1.16). Les composés chimiothérapeutiques peuvent également stimuler et augmenter la phosphorylation de ERK1/ERK2, leur permettant ainsi de jouer un rôle d'équilibre entre l'apoptose et la survie cellulaire (Lu and Xu 2006; Cagnol and Chambard 2010). Les cascades JNK et p-38 MAPK sont stimulées différemment, soit par l'intermédiaire d'un stress génotoxique comprenant les composés chimiothérapeutiques, et jouent un rôle dans l'arrêt de croissance cellulaire, l'inflammation et l'apoptose (Figure 1.16) (Lu and Xu 2006; Pearson *et al.* 2001; Cowan and Storey 2003). Dans le cancer de l'ovaire, une diminution de l'activité des MAPK par les cascades JNK et p-38 MAPK a été associée à des modèles de cancers résistants au platine (Mansouri, Ridgway *et al.* 2003; Villedieu *et al.* 2006). Au contraire, l'inhibition de la cascade ERK1/ERK2 par la protéine MKP3, habituellement associée à la survie et à la croissance des cellules, a permis de sensibiliser des cellules cancéreuses de l'ovaire au cisplatine (Chan *et al.* 2008). Les voies de survie MAPK et PI3K sont interreliées et peuvent s'influer entre elles (Mendoza, Er, and Blenis 2011). En effet, la chimiorésistance associée à la protéine AKT2 dans le cancer des ovaires est liée à l'incapacité du cisplatine d'activer JNK et p-38 afin d'induire l'apoptose. Cette inhibition est associée au fait qu'AKT2 phosphoryle la protéine ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) inhibant ainsi son activité kinase. L'inhibition de l'activité kinase d'ASK1 empêche l'activation de JNK et p-38 (Yuan *et al.* 2003). En ce qui concerne le cancer de l'endomètre, les MAPK et la chimiorésistance, peu a été étudié jusqu'à présent, mais nous pouvons supposer que l'effet observé serait similaire à celui observé dans les modèles de cancer de l'ovaire.

1.2.3 Estrogène et ses récepteurs

Une importante caractéristique des cancers gynécologiques est la présence élevée d'estrogène et de ses récepteurs correspondants (ER α / β) comparativement à la majorité des autres tissus favorisant ainsi la prolifération cellulaire et la tumorigenèse (Pearce and Jordan 2004; Cunat, Hoffmann, and Pujol 2004; Uhlén *et al.* 2015). Le modèle classique de l'estrogène, premier modèle de régulation qui a été découvert, est représenté par une liaison à son récepteur permettant sa dimérisation, de se lier sur des éléments de réponse

aux estrogènes sur l'ADN (ERE) et ensuite d'agir comme un facteur de transcription (Figure 1.17) (Wray and Noble 2008; Dauvois, White, and Parker 1993; Cui, Shen, and Li 2013; Schiff *et al.* 2004).

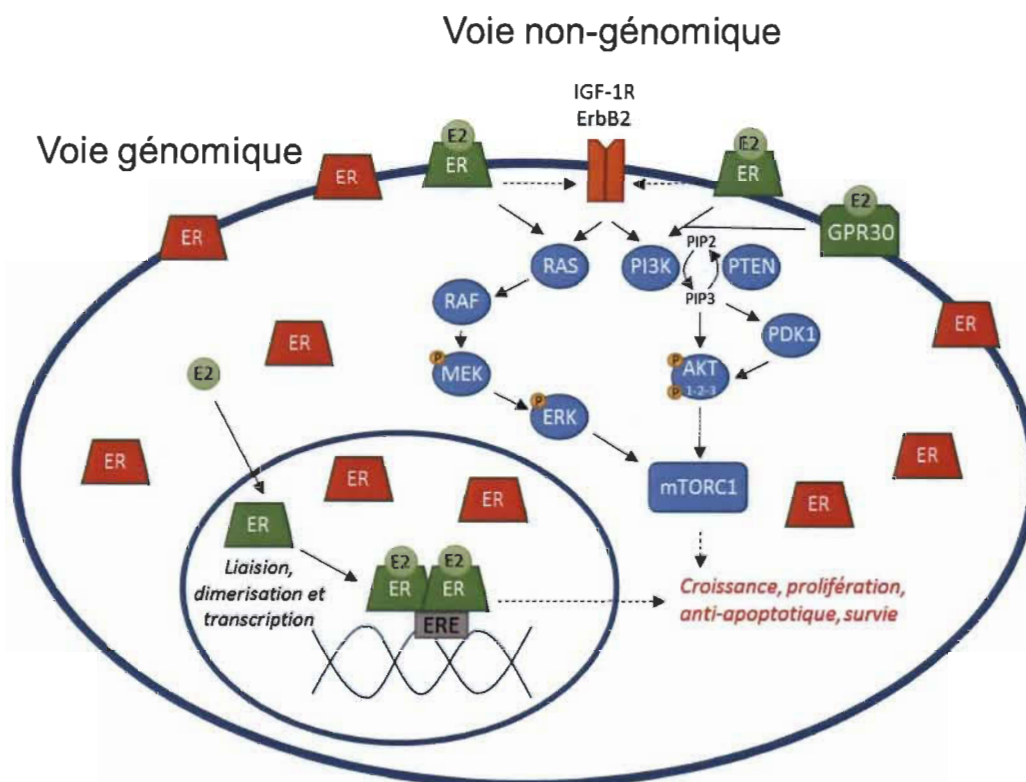


Figure 1.17 Concept général des mécanismes d'action de l'estrogène. (Inspirée de Wray and Noble 2008, Dauvois, White, and Parker 1993, Cui, Shen and Li 2013, Bjornstrom and Sjoberg 2005, Prossnitz, Arterburn and Sklar 2007 et Schiff *et al.* 2004 et adaptée de Brasseur *et al.* 2016.)

L'estrogène peut également agir de manière non-génomique par sa liaison aux récepteurs à l'estrogène lorsque ceux-ci sont situés sur la membrane plasmique, qui par la suite interagissent avec d'autres récepteurs, tels que IGF-1R et ErbB2 (Figure 1.17) (Bjornstrom and Sjoberg 2005; Prossnitz, Arterburn, and Sklar 2007; Cui, Shen, and Li 2013; Schiff *et al.* 2004). L'estrogène peut également se lier directement sur une protéine G couplée, le récepteur GPR30, indépendamment des récepteurs à l'estrogène (Figure 1.17) (Prossnitz, Arterburn, and Sklar 2007; Cui, Shen, and Li 2013). Ces interactions non-génomiques de l'estrogène induisent l'activité tant pour la voie de survie PI3K que pour la voie de survie MAPK, deux voies impliquées dans la

chimiorésistance des cancers gynécologiques (Prossnitz, Arterburn, and Sklar 2007; Bjornstrom and Sjoberg 2005). Il convient de noter que l'estrogène est également associé à des mécanismes de chimiorésistance à la fois pour les cancers de l'endomètre et de l'ovaire (Won *et al.* 2012; Luvsandagva *et al.* 2012; Mabuchi *et al.* 2004). Il a été démontré dans des cellules de cancer de l'endomètre que l'estrogène peut activer positivement GRP78, une chaperone moléculaire majoritairement localisée dans le réticulum endoplasmique et s'attachant aux protéines nouvellement synthétisées dans le but de, subséquemment, aider à leurs repliements et oligomérisation. GRP78 a aussi un rôle anti-apoptotique en protégeant contre la mort cellulaire associée au stress du réticulum endoplasmique. Cette régulation positive de GRP78 par l'estrogène a ainsi empêché l'apoptose et a permis l'acquisition d'une chimiorésistance à la fois contre le paclitaxel et le cisplatine (Luvsandagva *et al.* 2012). Une autre étude a démontré que les estrogènes peuvent apporter une chimiorésistance aux traitements de paclitaxel dans des cellules cancéreuses de l'ovaire par l'intermédiaire de la phosphorylation du complexe AKT-ASK1 (Mabuchi *et al.* 2004). ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) est une protéine pro-apoptotique membre de la famille des MAPK et qui permet d'activer JNK et p-38 MAPK. Considérant que la thérapie hormonale est plus fréquemment utilisée pour contrer le cancer du sein, plus de données sont disponibles avec ce modèle et démontrent aussi que des niveaux plus élevés de ER α sont corrélés avec un statut de chimiorésistance contre le cisplatine, le paclitaxel et la doxorubicine (Sui, Zhang, and Fan 2011).

1.2.4 Le suppresseur de tumeur Par-4

Jusqu'à présent, les voies de survie cellulaire ont été discutées en lien à la chimiorésistance des cancers gynécologiques, cependant, les suppresseurs de tumeurs jouent également un rôle important dans ces mécanismes. Un de ces suppresseurs de tumeur, aussi liés à la chimiorésistance, a récemment acquis un intérêt dans la communauté scientifique et est nommé prostate apoptosis response-4 (Par-4). Par-4 est une protéine pro-apoptotique (possédant les caractéristiques pour agir comme facteur de transcription) des plus intéressantes en raison de sa capacité unique d'induire l'apoptose

de manière sélective contre les cellules cancéreuses uniquement (El-Guendy *et al.* 2003; Shrestha-Bhattarai and Rangnekar 2010). En effet, ce mécanisme unique de sélectivité a été démontré dans divers modèles incluant, entre autres, des cancers du pancréas, des lymphomes, de la prostate, du sein et des gliomes. Une diminution du niveau d'expression de Par-4 semblait être impliquée dans la chimiorésistance (contre le tamoxifène, les taxanes et les agents de platine) et les mécanismes de tumorigenèse (Tan *et al.* 2014; Boehrer *et al.* 2002; Jagtap *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2013; Jagtap *et al.* 2015). Comme décrit précédemment, les tissus gynécologiques sont connus pour être hormone-dépendants et, de manière intéressante, il a été démontré que les estrogènes peuvent réguler négativement Par-4 et pourraient donc être impliquées dans des mécanismes associés de chimiorésistance (Casolari *et al.* 2011). Concernant cette chimiorésistance, une étude a démontré qu'une surexpression de Par-4 permettait l'augmentation de la réponse apoptotique au traitement de paclitaxel dans des cellules du cancer de l'ovaire (Meynier *et al.* 2015). Notre laboratoire a aussi publié un article scientifique démontrant que Par-4 possédait une forme clivée, présente seulement lorsque la cellule est en apoptose. La même étude a démontré que la forme clivée de Par-4 est fortement réduite/absente dans les cancers gynécologiques chimiorésistants, indiquant possiblement une nécessité d'être clivée pour être fonctionnelle (Chaudhry *et al.* 2012). Malgré le fort intérêt clinique de Par-4, en dehors de ces études, peu a été expérimenté dans les cancers gynécologiques concernant son effet sur le statut de la chimiorésistance.²

1.2.5 Mécanisme de mort cellulaire, l'apoptose

L'apoptose, la mort cellulaire programmée, est un procédé permettant d'enclencher le « suicide » de la cellule suite à la réception de signaux. Ce mécanisme est en constant équilibre avec celui de la prolifération cellulaire et un dérèglement de cet équilibre peut mener au développement d'un cancer (Elmore 2007).

² Par-4 sera discuté plus en détail dans la sous-sous-section 1.3.3 : Cibler le suppresseur de tumeur Par-4.

Brièvement, lorsqu'il y a de l'apoptose, des caractéristiques morphologiques bien distinctes sont visibles. Il s'agit principalement de condensation au niveau de la chromatine, de fragmentation du noyau, le tout accompagné d'une réduction du volume de la cellule (Elmore 2007). Biochimiquement, les caspases sont activées, l'ADN et les protéines sont clivés et la membrane se modifie afin de pouvoir être au final phagocytée. Une de ces modifications biochimiques au niveau de la membrane, l'exposition sur le feuillet externe de la phosphatidylserine, permet de détecter l'apoptose précoce efficacement via l'utilisation d'une protéine fluorescente ayant une forte affinité pour la phosphatidylserine (Annexine V) et de la cytométrie en flux.

Concernant les mécanismes de l'apoptose, les caspases sont centrales dans le fonctionnement et deux voies distinctes peuvent mener à leurs activations, soit les voies intrinsèque et extrinsèque (Figure 1.18). En premier lieu, il y a la voie extrinsèque qui est associée à des récepteurs membranaires de la mort cellulaire tels que TNFR, Fas ou TRAIL-R. Lorsque leurs ligands (TNF, FasL et TRAIL respectivement) s'associent avec leurs récepteurs, ceci résulte à la formation d'un site de liaison pour protéines adaptatrices et à un complexe final connu comme sous le nom de « death-inducing signalling complex » (DISC). DISC permet l'activation de la pro-caspase 8, une caspase initiatrice qui permettra de cliver par la suite les caspases effectrices incluant, entre autres, la caspase 3 (Wong 2011).

La voie intrinsèque, comme son nom l'indique, est quant à elle activée par des signaux internes de la cellule. Des dommages à l'ADN (incluant la chimiothérapie), l'hypoxie, un haut taux de Ca^{2+} ou un stress oxydatif sont des situations pouvant permettre l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Suite aux stimuli apoptotiques internes de la cellule, une augmentation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale a lieu relâchant divers facteurs dans le cytoplasme incluant le cytochrome C. À la suite de son relâchement par la mitochondrie, le cytochrome C peut s'associer avec la protéine Apaf-1 et recruter la pro-caspase 9 et ainsi former le complexe de l'apoptosome. La pro-caspase 9 est une caspase initiatrice associée à la voie intrinsèque et son implication avec le complexe de l'apoptosome permet d'activer des

caspases effectrices incluant, comme dans la voie extrinsèque, la caspase 3 (Wong 2011).

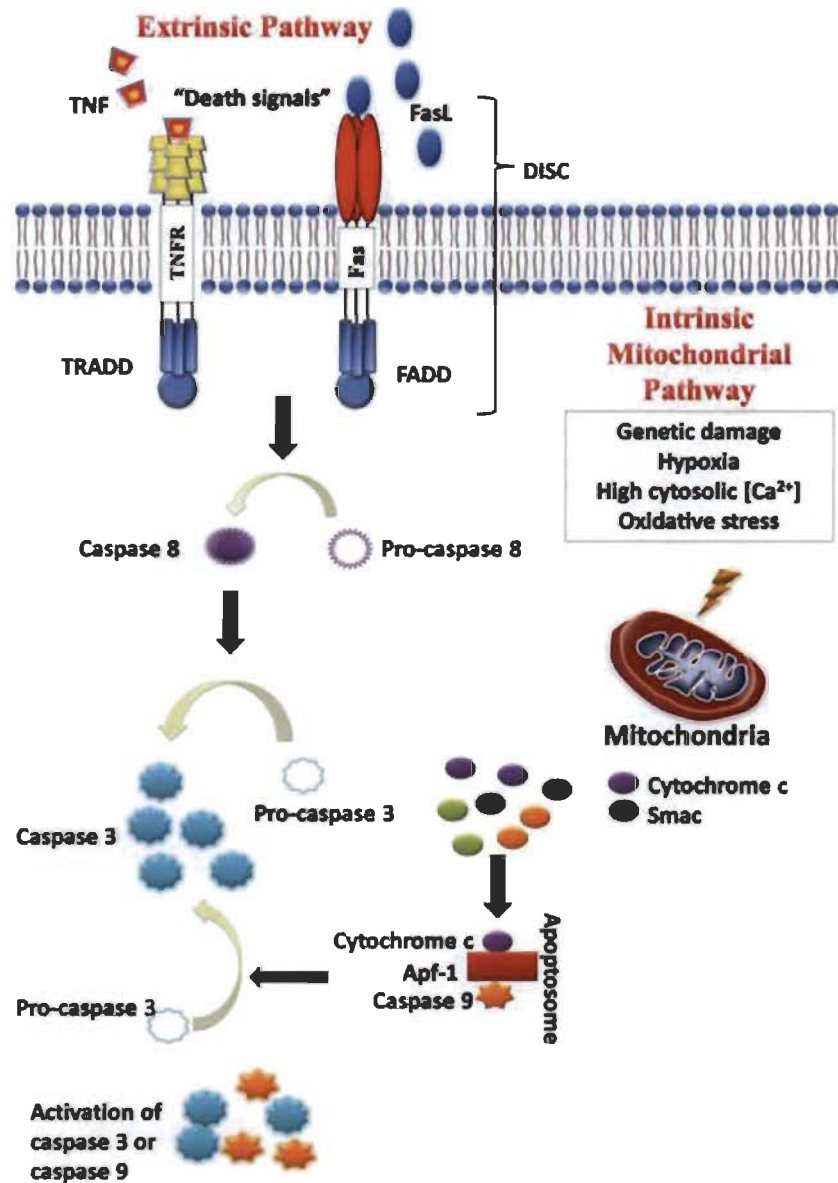


Figure 1.18 Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. (Adaptée de Wong 2011.)

Une fois les caspases effectrices activées, un clivage de plusieurs molécules a lieu menant à divers phénomènes se terminant par la destruction de la cellule qui sera au final phagocyté (Wong 2011).

Il existe aussi un mécanisme induisant l'apoptose indépendamment des caspases. Un de ces mécanismes est associé à la protéine AIF (Apoptosis inducing factor), une protéine pouvant déclencher la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN afin d'induire l'apoptose sans avoir besoin des caspases. AIF est une protéine localisée au niveau de la mitochondrie qui lorsque relâchée, enclenche le processus de l'apoptose (Daugas *et al.* 2000).

Plusieurs traitements de chimiothérapies induisent et dépendent de la mort programmée par apoptose (Kaufmann and Earnshaw 2000). Le dérèglement des mécanismes associés à l'équilibre entre l'apoptose et la survie cellulaire (surexpression de voies de survies/diminution de suppresseurs de tumeur) peut conséquemment amener à de la chimiorésistance, une problématique fréquente dans les cancers de stades avancés où la chimiothérapie est importante et nécessaire (Kaufmann and Earnshaw 2000; Elmore 2007).

1.2.6 Mécanisme de récupération et de mort cellulaire, l'autophagie

L'autophagie est un procédé qui joue normalement un rôle basal de dégradation de protéines, mais aussi de recyclage de divers composants cellulaires afin de conserver un métabolisme adéquat pour la survie suite à diverses situations de stress, entre autres la privation de nutriments (Codogno and Meijer 2005). L'autophagie peut également se produire lors de traitements chimiothérapeutiques tels que l'administration de composés de platine ou de tamoxifène (Kim *et al.* 2006; Qadir *et al.* 2008). Morphologiquement, l'autophagie est caractérisée par la présence de vacuoles dans le cytoplasme et par l'élargissement du Golgi et du réticulum endoplasmique. Son mécanisme consiste à la formation d'une membrane (l'autophagosome) autour d'organelles et de protéines endommagées, suivie d'une fusion avec le lysosome, conduisant à la dégradation de ces éléments pour un éventuel recyclage (Figure 1.19) (Guo *et al.* 2012). Plusieurs protéines sont impliquées dans la formation de la membrane de l'autophagosome, incluant entre autres les protéines Beclin-1 et Light-Chain 3-B (LC3B) servant de marqueurs protéiques des stades précoces de l'autophagie.

Concernant LC3B, celle-ci convertit sa forme LC3B-I en LC3B-II par lipidation, soit par une liaison covalente de la LC3 à de la phosphatidylethanolamine, lui permettant ainsi de s'associer à la membrane de l'autophagosome (Figure 1.19) (Oh *et al.* 2008).

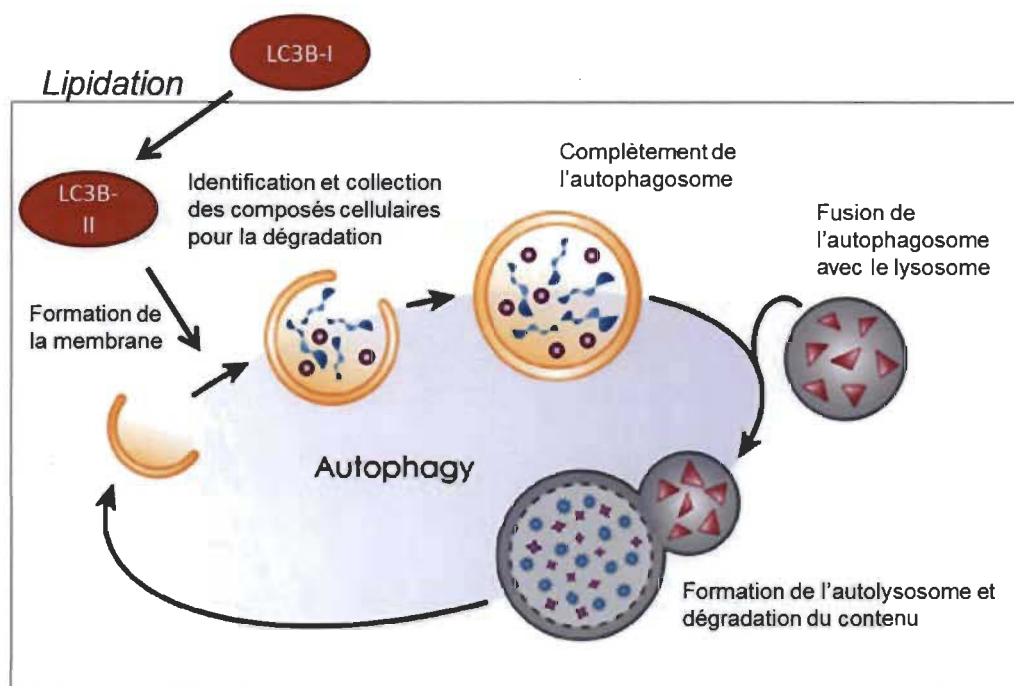


Figure 1.19 Schéma simplifié représentant le mécanisme de l'autophagie cellulaire. (Adaptée de www.nexcelom.com)

Dans le cadre de maladies comme le cancer, l'autophagie peut jouer un rôle à la fois de survie, mais aussi de mort cellulaire (Codogno and Meijer 2005). Ces différents rôles distincts de l'autophagie peuvent avoir un impact sur la chimiorésistance des cellules cancéreuses. En effet, l'autophagie induite par des médicaments chimiothérapeutiques est souvent considérée comme étant chimioprotectrice. En accord avec cette idée, l'inhibition de l'autophagie dans plusieurs types de cellules cancéreuses, incluant le cancer de l'ovaire, améliore l'efficacité du cisplatine pour induire la mort cellulaire par apoptose, démontrant son rôle chimioprotecteur (Guo *et al.* 2012; Abedin *et al.* 2006; Xu *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2011; Bao *et al.* 2015; Bao *et al.* 2014; Ying *et al.* 2015; Wang and Wu 2014). Un fait intéressant à noter est que le mécanisme de l'autophagie est régulé par plusieurs voies de survie cellulaire incluant PI3K/AKT, MAPK et mTOR précédemment mentionnées de

jouer un rôle dans la chimiorésistance (Codogno and Meijer 2005). Une étude a démontré, en utilisant des cellules du cancer de l'ovaire, que la résistance au platine était promue par l'activation d'ERK, protéine de la voie des MAPK. En utilisant soit des inhibiteurs de l'autophagie, des inhibiteurs de la voie des MAPK ou simplement en diminuant l'expression de ERK via des siRNA, une sensibilité accrue a été acquise face au cisplatine démontrant l'effet chimioprotecteur de l'autophagie dans le contexte de la chimiothérapie (Wang and Wu 2014). Considérant que les voies de survie cellulaire de PI3K/AKT, et conséquemment mTOR, sont fréquemment altérées dans les cancers gynécologiques (Figure 1.12), cela pourrait avoir un impact sur le mécanisme de l'autophagie et conséquemment la chimiorésistance. Une étude a découvert une corrélation significative entre les protéines PTEN et Beclin-1 sur des tissus de cancers ovariens provenant de 40 patientes séparées en groupes selon leur chimiosensibilité. Un niveau faible de PTEN et de Beclin-1 a révélé être associé avec une forte résistance à la chimiothérapie. Les auteurs présumant que PTEN et Beclin-1 pourraient jouer un rôle complémentaire dans la chimiorésistance observée et les modifications associées au niveau de l'autophagie (Ying *et al.* 2015). Considérant le fait que le mécanisme de l'autophagie est présent dans les cellules cancéreuses traitées, il est important de considérer ce mécanisme de survie suite à des traitements thérapeutiques afin de pouvoir obtenir une efficacité de traitement optimale.

1.3 La thérapie ciblée

La thérapie ciblée est une nouvelle approche dont la recherche et le développement sont très actifs dans le domaine biomédical. Le principe de la thérapie ciblée est de tirer avantage des modifications uniques acquises chez les cellules cancéreuses malignes (récepteurs, protéines, mécanismes). Ces modifications recherchées sont des cibles moléculaires d'intérêts et ont habituellement un rôle dans la croissance tumorale et la progression du cancer. Afin d'utiliser ces cibles moléculaires à profit, des composés ou petites molécules sont développés afin d'interagir avec celles-ci, permettant d'arrêter la croissance et la propagation du cancer, et ce de façon ciblée et sélective en limitant l'interaction avec les cellules saines de la patiente.

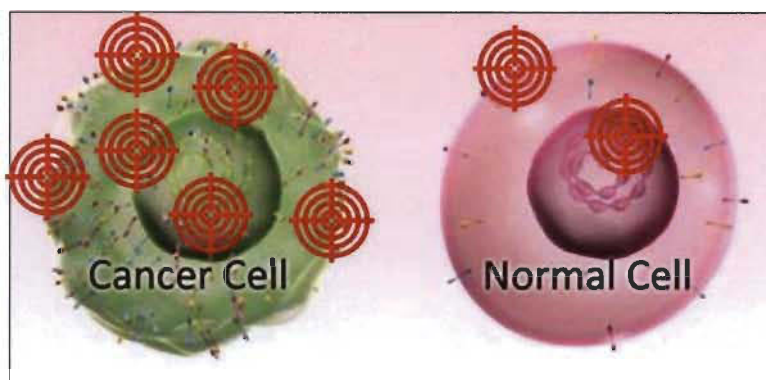


Figure 1.20 Représentation schématisée de la thérapie ciblée. (Adaptée de <http://speakingofresearch.com>)

Une cible moléculaire optimale pour la thérapie ciblée serait une cible présente/active seulement chez les cellules cancéreuses et absente chez les cellules saines permettant une activité du composé exclusivement au niveau des tumeurs. Une cible moléculaire acceptable serait une cible fortement présente/active dans la cellule cancéreuse, mais exprimée faiblement dans les cellules saines, limitant ainsi l'interaction du composé ailleurs qu'au niveau de la tumeur (Figure 1.20).

Les différences entre la chimiothérapie actuelle et la thérapie ciblée se situent au niveau de la sélectivité du traitement. En effet, dans la majorité des cas, la chimiothérapie agit sur les cellules à division rapide, peu importe si la cellule est cancéreuse ou saine. Dans le cas de la thérapie ciblée, elle sélectionne les cellules exprimant la cible moléculaire, fortement exprimée dans les cellules cancéreuses. Ces cibles sont délibérément choisies en fonction de la recherche scientifique qui a permis le développement des composés associés. La présence de ces cibles est parfois prémesurée avant l'administration de composés spécifiques dans le but d'optimiser l'efficacité du traitement. La chimiothérapie est habituellement cytotoxique, tuant les cellules interagissant avec le traitement tandis que la thérapie ciblée peut avoir divers effets tels qu'être cytostatique, empêchant simplement la croissance des tumeurs.

L'effet recherché avec cette médecine personnalisée est une sélectivité envers les cellules cancéreuses permettant d'augmenter l'efficacité des traitements, diminuer les effets secondaires et contrer la chimiorésistance.

1.3.1 Cibler les voies de signalisation reliées à l'estrogène

Une des premières cibles de thérapie ciblée étudiées dans le domaine de l'oncologie, et toujours d'actualité aujourd'hui, est l'estrogène et ses récepteurs. Les raisons pourquoi cette cible est des plus intéressantes sont multiples.

En premier lieu, une forte proportion des ER est localisée dans les tissus féminins soit le sein, l'ovaire et l'utérus (Uhlén *et al.* 2015; Diel 2002). Considérant ce fait, cibler ces récepteurs permet de prioriser et limiter l'interaction principalement avec les tissus d'intérêt, soit dans le cadre de nos recherches, au niveau des organes gynécologiques. Concernant les cancers gynécologiques, le ER α est exprimé dans 40-60 % des cancers de l'ovaire et plus de 80 % des cancers de l'endomètre; ces cancers sont désignés comme étant hormone-dépendants (Figure 1.21) (Pujol *et al.* 1998; Pearce and Jordan 2004; Cunat, Hoffmann, and Pujol 2004; Bender, Buekers, and Leslie 2011; Chon, Hu, and Kavanagh 2006).

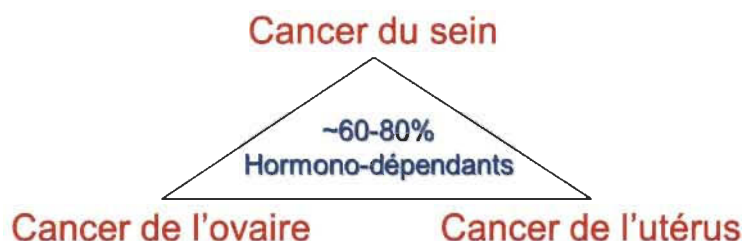


Figure 1.21 Pourcentage de cancers féminins désignés comme étant hormone-dépendants. (Inspirée de Pujol *et al.* 1998; Pearce and Jordan 2004; Cunat, Hoffmann, and Pujol 2004; Bender, Buekers, and Leslie 2011 et Chon, Hu, and Kavanagh 2006.)

Ensuite, dans plusieurs de ces cas, le ER α est fortement surexprimé comparativement aux tissus normaux (Pearce and Jordan 2004; Pujol *et al.* 1998; Cunat, Hoffmann, and Pujol 2004; Bender, Buekers, and Leslie 2011). Dans les cancers du sein, la surexpression est due en partie à l'amplification de son gène (ESR1) tel qu'observé dans plus de 20 % des cas (Holst *et al.* 2007). Le même groupe a effectué le même type d'expérimentation, mais a cependant déterminé que la situation était différente pour le

cancer de l'ovaire où seulement 2,1 % des cas de surexpression étaient dus à l'amplification d'ESR1 (Issa *et al.* 2009). Concernant la régulation du gène ESR1, deux promoteurs (promoteur A et promoteur B) sont connus pour réguler le niveau d'expression de ER α par l'utilisation de facteurs de transcription (ERF-1 et ERBF-1) (Piva *et al.* 1993; Pinzone *et al.* 2004). Il a été démontré que l'activité du promoteur B était associée au fort niveau d'expression d'ER α observé dans les cancers du sein via son facteur de transcription ERBF-1 (Hayashi *et al.* 1997; Hayashi *et al.* 2003; Tanimoto *et al.* 1999). D'autres mécanismes pourraient expliquer le fort niveau d'expression d'ER α tel que des modifications de la stabilité de son ARNm par des miARN (miR-206), la stabilité de la protéine ou une régulation altérée de son gène par d'autres facteurs de transcriptions encore inconnus à ce jour (Adams, Furneaux, and White 2007; Fowler and Alarid 2007). Les causes associées à la surexpression du récepteur à l'estrogène α sont encore mal caractérisées, plus particulièrement pour les cancers gynécologiques, et une attention devrait y être accordée pour mieux prédire le pronostic de la patiente suite à des thérapies hormonales.

Puisque l'estrogène possède des caractéristiques tumorigènes, la surexpression des récepteurs permet une croissance avantageuse et agressive des tumeurs (Pearce and Jordan 2004; Cuna, Hoffmann, and Pujol 2004; Diel 2002; Colditz 1993). D'un point de vue thérapeutique ciblé, les cancers gynécologiques exprimant en abondance ce récepteur sont des plus intéressants puisqu'ils pourraient permettre une sélectivité du composé en raison de la forte quantité de la cible (ER) chez les cellules cancéreuses versus les cellules saines (Figure 1.22).

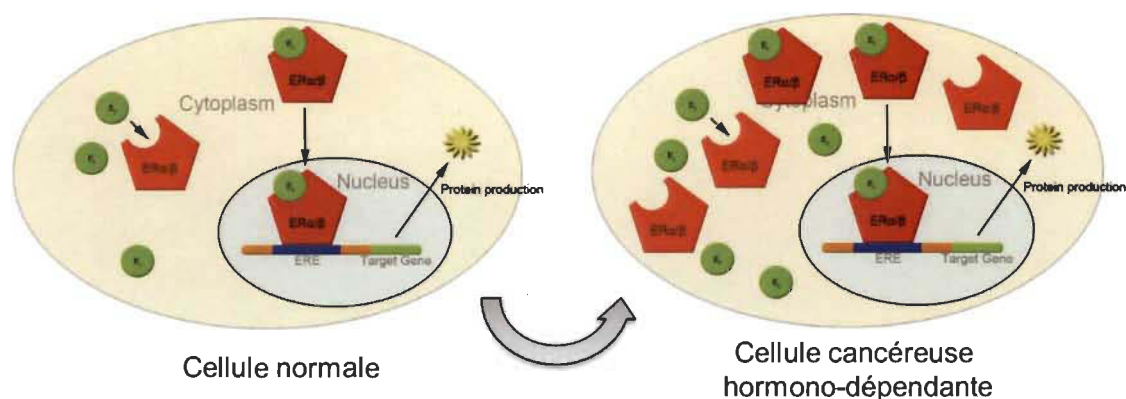


Figure 1.22 Concept classique de l'estrogène et surexpression de ses récepteurs dans les cancers féminins. (Inspirée de Wray and Noble 2008; Dauvois, White, and Parker 1993; Pearce and Jordan 2004; Pujol *et al.* 1998; Cunat, Hoffmann, and Pujol 2004 et Bender, Buekers, and Leslie 2011.)

Telle qu'introduite, la thérapie hormonale est déjà utilisée pour les cancers féminins. Dans le cas du cancer du sein, plus d'études ont été faites concernant ce tissu permettant une meilleure compréhension des mécanismes associés et des traitements des plus efficaces. Il faut cependant noter que malgré tout, environ 30 % des cancers du sein sont résistants à la thérapie hormonale (Osborne and Schiff 2011; Chlebowski 2014; Haldosén, Zhao, and Dahlman-Wright 2014). Dans le cas des cancers gynécologiques, la situation est différente où la mécanistique des modulateurs sélectifs des récepteurs à l'estrogène (SERMs) peut agir différemment selon le tissu (agoniste/antagoniste) et dont l'efficacité générale est encore limitée. En effet, selon le tissu, les SERMs peuvent interagir de façon sélective; soit en raison du ratio et de la présence des différents isoformes du récepteur (α ou β) ou de l'interaction du complexe ligand-récepteur avec différents cofacteurs selon le ligand donnant droit à la régulation de différents éléments de réponse à l'estrogène au niveau de l'ADN (Diel 2002; Pearce and Jordan 2004). Simplement à penser au tamoxifène, un composé anti-estrogénique qui possède une activité antagoniste au niveau du sein, mais au contraire agoniste dans l'utérus (Diel 2002; Jordan and Morrow 1994; Fisher *et al.* 1994). Cela est aussi observable par le taux de réponse du tamoxifène, minime pour le cancer ovarien, mais hautement efficace pour les cancers du sein (Garrett and Quinn 2008; Sjoquist *et al.* 2011; Perez-Gracia and Carrasco 2002; Robert 1997).

Malgré que le ER α soit le récepteur le plus connu et étudié, un autre récepteur, ER β , est aussi disponible et a son rôle à jouer dans la régulation des cellules en lien avec l'estrogène et les composés ciblant cette voie. Le ER β a été découvert plus tard (1996), et semble, contrairement au ER α , jouer un rôle plutôt protecteur et anti-prolifératif. Supportant l'idée du rôle anti-prolifératif de ER β , il est fréquemment observé que son niveau d'expression diminue en fonction de l'avancement de la progression tumorale, soutenant l'idée d'un rôle opposé à celui du ER α , récepteur qui au contraire est fréquemment surexprimé (Kuiper *et al.* 1996; Weihua *et al.* 2000; Leygue *et al.* 1998; Omoto *et al.* 2001; Roger *et al.* 2001; Pearce and Jordan 2004; Omoto and Iwase 2015). Il ne faut cependant pas éliminer le fait que malgré tout, le ER β peut aussi jouer un rôle positif dans la prolifération cellulaire (Sanchez *et al.* 2010). Un aspect important est la distribution différente du ratio ER α/β dans les différents tissus pouvant mener à différentes réponses suite à leur stimulation. (Diel 2002; Leygue *et al.* 1998). Cette différente distribution des ER, spécifique aux tissus, est une hypothèse plausible pour expliquer l'effet utéro-trophique du tamoxifène. Cette idée vient du fait que le tamoxifène a une affinité similaire pour les deux récepteurs (α et β) tandis que la raloxifène (autre SERM qui ne cause pas d'effets utéro-trophiques) possède une affinité significativement plus élevée pour l'ER α (Kuiper and Gustafsson 1997). Il a aussi été précédemment démontré qu'une forte présence de ER β pouvait prédire la sensibilité au traitement de tamoxifène dans le cancer du sein, et ce, indépendamment du ER α (Yan *et al.* 2013; Mann *et al.* 2001; Honma *et al.* 2008; Hopp *et al.* 2004; Iwase *et al.* 2003). Malgré les nombreuses recherches démontrant un lien avec le ER β et les paramètres cliniques du cancer du sein, le sujet est toujours controversé dans la littérature (Omoto and Iwase 2015).

Une autre raison de cibler la voie de l'estrogène concerne son implication dans la chimiorésistance. En effet, tel qu'introduit (sous-sous-section 1.2.3), l'estrogène et ses récepteurs jouent un rôle au niveau de la croissance tumorale, mais aussi au niveau de la résistance à la chimiothérapie. Considérant ce fait, bloquer ces cibles (ER) est une avenue considérable afin de contourner la résistance des cellules tumorales et d'augmenter l'efficacité en combinant avec de la chimiothérapie conventionnelle.

Actuellement en clinique, de nouveaux composés plus efficaces, ciblant les voies de régulation de l'estrogène, sont développés et étudiés. Brièvement, le fulvestrant, l'arzoxifène et le toremifène sont des antagonistes des récepteurs à l'estrogène en études cliniques dont les résultats sont prometteurs au niveau des cancers gynécologiques. En effet, ces inhibiteurs ont démontré une efficacité considérable pour stabiliser la progression des tumeurs gynécologiques (Covens *et al.* 2011; Argenta *et al.* 2009; Argenta *et al.* 2013; Burke and Walker 2003; McMeekin *et al.* 2003; Mäenpää *et al.* 1992). Un aspect intéressant de l'arzoxifène, contrairement au tamoxifène, est son absence d'effets utéro-trophiques, effets promouvant la croissance de l'utérus; une caractéristique importante pour le traitement des cancers endométriaux (Suh *et al.* 2001). D'autres composés, l'anastrozole, le letrozole et l'exemestane sont des inhibiteurs de l'aromatase aussi en études cliniques pour les cancers gynécologiques. Le principe des inhibiteurs de l'aromatase est d'inhiber cette dite enzyme, permettant la conversion de l'androgène en estrogène. Suite à l'administration de ces inhibiteurs, le niveau endogène de l'estrogène chez la patiente est diminué. Les inhibiteurs de l'aromatase sont administrés en clinique aux patientes postménopausées (un haut taux d'aromatase est présent dans les ovaires avant la ménopause) atteintes d'un cancer du sein et exprimant positivement le ER α (Fabian 2007). Les résultats obtenus concernant l'administration d'inhibiteurs de l'aromatase pour les cancers gynécologiques sont similaires à ceux des inhibiteurs du ER permettant une stabilisation de la progression des tumeurs (Rose *et al.* 2000; Del Carmen *et al.* 2003; Ma *et al.* 2004; Bowman *et al.* 2002; Papadimitriou *et al.* 2004; Smyth *et al.* 2007; Ramirez *et al.* 2008; Verma *et al.* 2006). Tout comme dans les cancers du sein, il a aussi été observé que la présence du ER avait fréquemment un effet direct sur l'efficacité clinique des traitements administrés pour les cancers gynécologiques (principalement ceux ciblant directement le ER) (Bowman *et al.* 2002; Covens *et al.* 2011; Argenta *et al.* 2009; Argenta *et al.* 2013). Il est donc pertinent de mesurer le niveau de notre cible d'intérêt, le ER, avant l'administration de traitements ciblant les voies de régulation de l'estrogène afin d'obtenir une efficacité optimale. Globalement, l'avantage de ces composés dans le traitement des cancers gynécologiques est leur sélectivité, leur faible toxicité, leur caractéristique de stabiliser les tumeurs et

donc la possibilité de les combiner avec un traitement chimiothérapeutique afin d'éliminer efficacement la tumeur.

1.3.2 Utiliser des toxines bactériennes

De nouvelles thérapies, avec une mécanistique complètement différente de la chimiothérapie traditionnelle, peuvent être développées avec l'idée de contrer plusieurs mécanismes de chimiorésistance des cancers. Si le mécanisme d'action du nouveau traitement est complètement différent de la chimiothérapie précédemment administrée, la résistance créée par les cellules cancéreuses pourrait être contournée, permettant d'éliminer efficacement la population chimiorésistante.

Une idée de thérapie avec une mécanistique différente, découverte il y a de cela très longtemps, est l'utilisation de bactéries comme agent anticancéreux. En effet, à la fin des années 1800, le médecin américain William Coley a remarqué que le cancer d'une de ses patientes diminuait suite à une infection bactérienne. Le physicien développa par la suite un vaccin composé de deux souches bactériennes atténuées pour simuler une infection tout en diminuant les risques d'effets secondaires. Le vaccin a été utilisé pour plusieurs types de cas et des résultats positifs (régression complète et partielle de cancers en stade avancé) ont été observés (Cann, Van Netten, and Van Netten 2003). Ces résultats, probablement associés à l'activation du système immunitaire des patientes, ont permis le début de la recherche de thérapies anticancéreuses utilisant comme source les bactéries.

Les bactéries peuvent être utilisées de différentes manières afin d'éliminer les tumeurs ou, du moins, d'en arrêter la croissance. Elles peuvent être utilisées sous leur forme d'origine (atténuée ou modifiée génétiquement) comme agent tumoricide, comme vecteur pour transporter des agents/enzymes bactériennes ou comme agent immunothérapeutique. Les bactéries produisent aussi des toxines et des spores, qui peuvent, eux aussi, être utilisés dans le cadre de thérapies anticancéreuses (Figure 1.23) (Patyar *et al.* 2010).

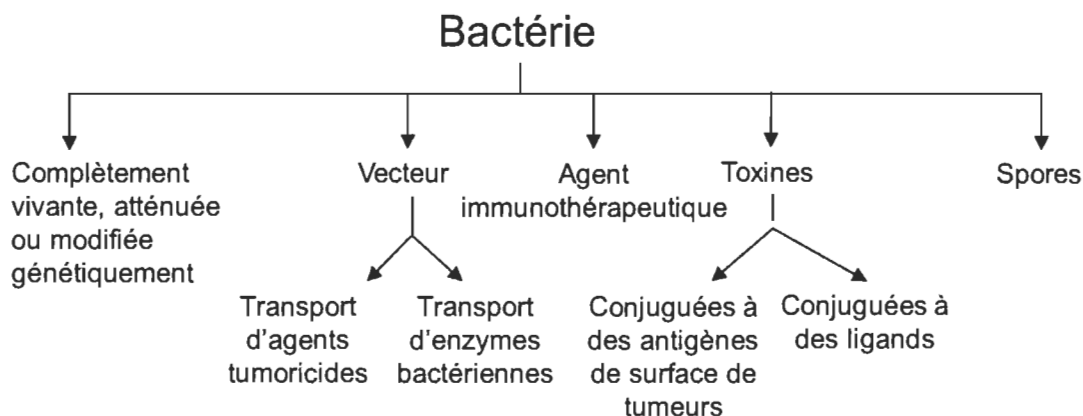


Figure 1.23 Schématique des diverses utilisations de la bactérie pour la thérapie anticancéreuse. (Adaptée de Patyar *et al.* 2010.)

Concernant l'utilisation de bactéries dans leur état d'origine, il a été découvert que certaines bactéries anaérobiques (majoritairement du genre *Clostridium*) pouvaient se développer dans la région nécrotique des tumeurs, lieu pauvre en oxygène, et réduire de façon considérable la taille de celles-ci. Lorsque ces mêmes bactéries étaient mises en contact avec la zone oxygénée de la tumeur, celles-ci mourraient permettant donc d'être inoffensives pour les tissus sains. L'effet obtenu était des plus intéressants et sa combinaison avec la chimiothérapie conventionnelle aurait été des plus bénéfiques, malheureusement, l'utilisation de ces souches bactériennes rendait la majorité des animaux malades les menant même jusqu'à la mort (Malmgren and Flanigan 1955; Carey *et al.* 1967). Malgré l'ajout de modifications ou d'atténuations aux souches bactériennes, la même problématique survenait, soit une forte toxicité pouvant mener jusqu'à la mort. Avec l'avancement des recherches, de nouvelles souches bactériennes ont été développées pour le traitement du cancer et ont permis l'obtention de résultats beaucoup plus prometteurs que les précédents, entre autres, les souches *Salmonella typhimurium* (VNP20009) et le bacille Calmette-Guérin (BCG). Le bacille Calmette-Guérin a été une souche bactérienne préalablement atténuée pour contrer la tuberculose. Suite à l'intérêt d'utiliser des bactéries pour combattre le cancer, le BCG a, à son tour, été testé contre plusieurs types de cancers. Un type de cancer, le cancer de la vessie, a obtenu des réponses exceptionnelles avec le BCG (élimination de la tumeur et prévention d'une récurrence) et l'utilisation de celui-ci est encore recommandée comme

traitement dans les cancers invasifs de haut grade (Herr and Morales 2008). L'autre souche, le VNP20009, est atténuée de deux gènes la rendant moins susceptible de provoquer des chocs septiques chez l'hôte, et dépendante de sources externes de purine lui permettant de croître principalement dans les tissus cancéreux, limitant ainsi son effet sur les tissus sains (ratio approximatif 1000 :1). L'hypothèse de cette forte sélectivité tumorale est associée à l'idée que les bactéries pourraient croître plus rapidement en raison des nutriments fournis par les cellules à division rapide tumorale. La souche est également sensible aux antibiotiques ce qui permet de pouvoir éliminer celle-ci efficacement lorsque nécessaire. Contrairement aux bactéries provenant du genre *Clostridium*, *Salmonella typhimurium* peut croître dans les milieux aérobiques et anaérobiques des tumeurs, utile contre les tumeurs de petite taille incluant les métastases (Clairmont *et al.* 2000; Low *et al.* 1999; Luo *et al.* 1999). Cette souche a été testée en phase I clinique avec des résultats prometteurs (Toso *et al.* 2002). En bref, l'utilisation de bactéries entières peut permettre d'éliminer des cellules cancéreuses, mais sera aussi généralement, sauf exception, très toxique pour l'hôte. Il est donc important de modifier génétiquement ces bactéries afin d'éviter une surcroissance de celles-ci et de limiter leurs effets toxiques sur les tissus sains.

Puisque les bactéries sont très toxiques, les modifier et les utiliser seulement comme véhicules transportant des agents anticancéreux menant à l'élimination de tumeurs pourrait être une avenue intéressante considérant leur possibilité de croître sélectivement au niveau des tumeurs. Ces bactéries peuvent servir de vecteurs exprimant divers agents tels que l'interleukine-2 et le TNF α , mais aussi des enzymes permettant la conversion d'un composé thérapeutique inactif vers sa forme active, le tout localement au niveau de la tumeur où les bactéries peuvent croître (Saltzman *et al.* 1997; Lin *et al.* 1999; Zheng *et al.* 2001; Theys *et al.* 2001; Liu *et al.* 2002).

L'immunothérapie est très en vogue dans le domaine de l'oncologie. En effet, les cellules cancéreuses étant immunogéniques, le système immunitaire de la patiente est utilisé afin de combattre les tumeurs et éliminer celles-ci. Une problématique derrière ce mécanisme de défense est que la tumeur développe, avec le temps, une certaine

tolérance au système immunitaire lui permettant jusqu'à éviter d'interagir complètement avec celui-ci dans les stades avancés de la progression tumorale. Afin de permettre un retour d'activité, le système immunitaire doit être stimulé de différentes manières et l'utilisation de bactéries afin d'augmenter l'antigénicité des tumeurs est une option envisageable. L'utilisation de souches bactériennes est une méthode permettant l'activation du système immunitaire. Les souches bactériennes infectent les tumeurs, mènent à une exposition d'antigènes et stimulent ainsi le système immunitaire localement au niveau de la tumeur. Ces souches de bactéries peuvent aussi stimuler l'inflammation, permettant de restreindre la croissance bactérienne (Avogadri *et al.* 2005; Xu *et al.* 2009). Une autre option est d'utiliser des souches bactériennes modifiées génétiquement exprimant des cytokines ou des séquences ADN d'antigènes de tumeur (Al-Ramadi *et al.* 2008; Ruan *et al.* 2009; Loeffler *et al.* 2007; Saltzman *et al.* 1997). En bref, lorsqu'administrées, les bactéries peuvent jouer un rôle important au niveau du système immunitaire, une caractéristique d'intérêt pour l'élimination de tumeurs.

Plusieurs des bactéries anaérobiques étudiées dans le cadre de la thérapie anticancéreuse peuvent former des spores. Les spores bactériens ont comme utilité de permettre à la bactérie de survivre dans des conditions extrêmes et de reprendre croissance lorsque les conditions sont plus favorables. Dans le cadre de la thérapie, les spores, provenant de souches d'intérêt, peuvent survivre à des lieux riches en oxygène, sans croître, pour éventuellement atteindre les zones d'hypoxie (faible taux d'oxygène) de la tumeur, un lieu favorable à leur croissance. Suivant la croissance, la bactérie agit localement et peut effectuer ses actions thérapeutiques au niveau de la tumeur pour éliminer celle-ci (Patyar *et al.* 2010). Il faut cependant que la souche bactérienne soit atténuée adéquatement afin d'éviter des effets toxiques potentiellement mortels tels que décrits précédemment avec l'utilisation de bactéries.

Un dernier aspect d'intérêt clinique concernant les bactéries est la production de toxines. Certaines souches de bactéries peuvent produire des endotoxines (restent dans la bactérie et sont rejetées lorsque la bactérie meurt) et des exotoxines (secrétées par la bactérie). Ces toxines ont l'habileté d'éliminer efficacement des cellules ou simplement

d'avoir différents effets sur les mécanismes cellulaires tels que la croissance, la différenciation et l'apoptose (Patyar *et al.* 2010). Considérant que plusieurs de ces mécanismes cellulaires sont associés à des caractéristiques de cellules cancéreuses et que l'élimination des tumeurs est recherchée, les toxines sont d'un intérêt pour la thérapie. Afin d'augmenter la sélectivité des traitements, plusieurs toxines ont été étudiées et certaines ont la caractéristique de se lier à des antigènes de surface spécifiques aux tumeurs (Kominsky *et al.* 2004; Michl *et al.* 2001; Baudalet *et al.* 2006). D'autres toxines ayant des caractéristiques hautement intéressantes pour la thérapie anticancéreuse, mais sans spécificité peuvent aussi être modifiées génétiquement afin d'ajouter une portion sélective comme un anticorps monoclonal, un facteur de croissance ou une protéine se liant aux antigènes de surface tumoraux, encore une fois, tous spécifiques aux cellules cancéreuses (Frankel *et al.* 2002; Fan *et al.* 2002; Puri 1998). L'utilisation des toxines est d'un intérêt considérant qu'elles peuvent mener à une toxicité moins élevée chez la patiente, lorsque comparées à l'utilisation de bactéries entières.

Une certaine toxine a suscité un intérêt particulier pour la recherche médicale considérant sa haute sélectivité naturelle envers les cellules de divers cancers et sa forte activité cytotoxique : la toxine PS2Aa1, provenant de la famille des parasporines.

1.3.2.1 Les parasporines

Bacillus thuringiensis est une bactérie aérobique gram-positive pouvant produire des inclusions lors de sa sporulation. Ces inclusions sont composées, entre autres, de protéines Cry (δ -endotoxines), une famille de protéines connue pour avoir une activité toxique contre divers insectes et fréquemment utilisée dans l'industrie agroalimentaire et la foresterie (Roh *et al.* 2007; Schnepf *et al.* 1998). Un avantage de cet insecticide naturel est sa non-toxicité pour l'humain et, conséquemment, sa haute sélectivité envers les insectes permettant donc une excellente alternative aux insecticides chimiques (Roh *et al.* 2007; Schnepf *et al.* 1998). Le mode de fonctionnement de cette toxine consiste à être ingérée par l'insecte, celle-ci est ensuite solubilisée dans la région alcaline du

mésentéron (section de l'appareil digestif) de l'insecte. Une fois solubilisée, la toxine est active et se lie sur des récepteurs spécifiques (uniques aux insectes) localisés sur la membrane plasmique des cellules épithéliales du mésentéron, menant à la formation de pores et, conséquemment, à la mort de l'insecte (Bravo, Gill, and Soberón 2007; Schnepf *et al.* 1998).

En raison de son fort potentiel insecticide, des centaines de protéines Cry ont aujourd'hui été caractérisées, dont une majorité ont été reportées n'avoir aucune activité toxique contre les insectes (Crickmore *et al.* 1998). Considérant le fait que certaines toxines ne soient pas actives sur les insectes, les auteurs Mizuki *et al.* ont fait une large étude de toxicité de diverses protéines Cry (1744 souches différentes de *Bacillus thuringiensis*) sur des lymphocytes T provenant d'une leucémie humaine (cellules MOLT-4) et des érythrocytes sains de mouton. La plupart des protéines Cry provenant de souches bactériennes n'ont eu aucun effet sur les érythrocytes, cependant, 42 d'entre elles ont démontré un effet cytotoxique exclusivement sur les lymphocytes T de leucémie. Ces nouvelles protéines Cry non-toxiques pour les insectes, non-toxiques pour les cellules saines de mammifère, mais toxiques spécifiquement pour les cellules de cancer (leucémie dans le cadre de cette étude) ont été classées dans un sous-groupe nommé les parasporines (Figure 1.24) (Mizuki *et al.* 1999; Mizuki *et al.* 2000).

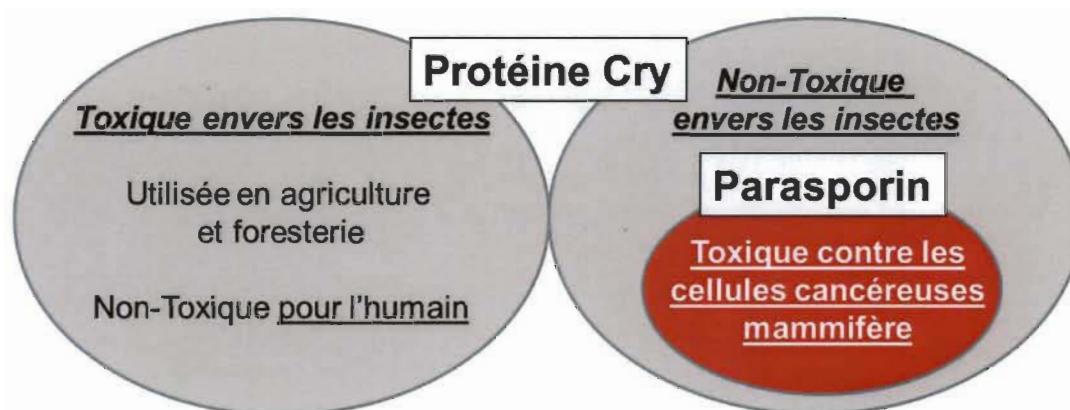


Figure 1.24 Classement selon la toxicité des protéines Cry provenant de différentes souches bactériennes. (Inspirée de Kitada *et al.* 2005; Mizuki *et al.* 1999 et Mizuki *et al.* 2000.)

Les parasporines ont été classées en six familles (PS1-PS6) ayant démontré, pour la plupart, un mécanisme d'action sélectif envers les cellules cancéreuses humaines (Okumura 2010; Okassov *et al.* 2015). La parasporine-2 est d'un intérêt clinique considérant sa faible concentration requise et sa rapidité (≈ 1 h) pour induire la mort de plusieurs cellules cancéreuses, lorsque comparée avec les autres protéines de la même famille (Tableau 1.4) (Okassov *et al.* 2015; Ito *et al.* 2004).

Tableau 1.4

Cytotoxicité des parasporines dans diverses lignées cellulaires humaines cancéreuses ou normales (Okassov *et al.* 2015)

Cells	Characteristics of cells	LC ₅₀ (µg/ml)			
		PS-1	PS-2	PS-3	PS-4
MOLT-4	Leukemic T cell	2.2	0.022	>10	0.472
Jurkat	Leukemic T cell	>10	0.018	>10	>2
HL-60	Leukemic T cell	0.32	0.019	1.32	0.725
T cell	Normal T cell	>10	- ^a	>10	>2
HepG2	Hepatocellular cancer	3.0	0.019	2.8	1.90
HC	Normal hepatocyte	>10	1.1	>10	>2
HeLa	Uterus (cervix) cancer	0.12	2.5	>10	>2
Sawano	Uterus cancer	>10	0.0017	>10	0.245
TCS	Uterus (cervix) cancer	-	7.8	>10	0.719
UtSMC	Normal uterus	>10	2.5	>10	>2
Caco-2	Colon cancer	>10	0.013	>10	0.124

^a not studied; the most effective concentrations are shown in bold

La parasporine-2Aa1 (PS2Aa1, aussi classifiée Cry46Aa1) est un polypeptide de 338 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 37 446 Da. Comme les autres protéines de la famille Cry, PS2Aa1 a besoin d'être clivée afin d'être active. La protéinase K clive PS2Aa1 permettant l'obtention d'un polypeptide d'environ 30 000 Da pouvant agir de manière toxique et sélective sur les cellules cancéreuses humaines (Ito *et al.* 2004; Kitada *et al.* 2005). PS2Aa1 a été grandement étudiée pour sa fonction anticancéreuse sélective et plusieurs études rapportent une efficacité surprenante provenant de cette toxine lorsque comparée avec des lignées cellulaires normales (Kitada *et al.* 2006; Ito *et al.* 2004).

Le mécanisme d'action de PS2Aa1 est cependant encore méconnu à ce jour. Ce qui est connu de PS2Aa1 est que la monotoxine se lie sur les radeaux lipidiques, des microdomaines riches en cholestérols et en sphingolipides, de la membrane plasmique. Une fois liée, la toxine forme un oligomère permettant de perméabiliser la membrane plasmique, ce qui a un effet létal pour la cellule (Figure 1.25) (Abe, Shimada, and Kitada 2008; Kitada *et al.* 2005; Kitada *et al.* 2009). Pour interagir avec la membrane plasmique au niveau du radeau lipidique, il a été observé que PS2Aa1 ne nécessitait ni le cholestérol, ni les sphingolipides, mais plutôt des protéines d'ancrage de glycosylphosphatidylinositol (GPI). Cela a été démontré par l'utilisation de phospholipase C Phosphatidylinositol-spécifique (PI-PLC) qui permet de cliver les protéines GPI de la membrane, diminuant grandement la liaison de la toxine PS2Aa1 avec la membrane ainsi qu'une forte diminution de son effet toxique sur les cellules cancéreuses (Abe, Shimada, and Kitada 2008). Cependant, malgré un niveau d'expression égal de protéines d'ancrage GPI dans quatre lignées cellulaires différentes, la toxicité de PS2Aa1 était largement différente démontrant que la protéine d'ancrage GPI est probablement requise pour induire la mort des cellules cancéreuses, mais ne serait pas le récepteur clé (Kitada *et al.* 2009). Le même groupe a démontré plus tard que la région glycanne de la protéine d'ancrage GPI était en effet nécessaire à la toxicité et l'oligomérisation de la toxine, mais fonctionnerait plutôt comme un corécepteur considérant que des lignées non sensibles à la toxine ont aussi des protéines GPI (Abe *et al.* 2016). Le récepteur spécifique aux cellules cancéreuses de PS2Aa1, probablement localisé dans le radeau lipidique de la membrane, est donc toujours inconnu et son mode d'action pour tuer les cellules cancéreuses semble principalement être dû à la formation des pores au niveau de la membrane en association avec des protéines GPI, mais peu a été étudié à ce sujet (Figure 1.25).

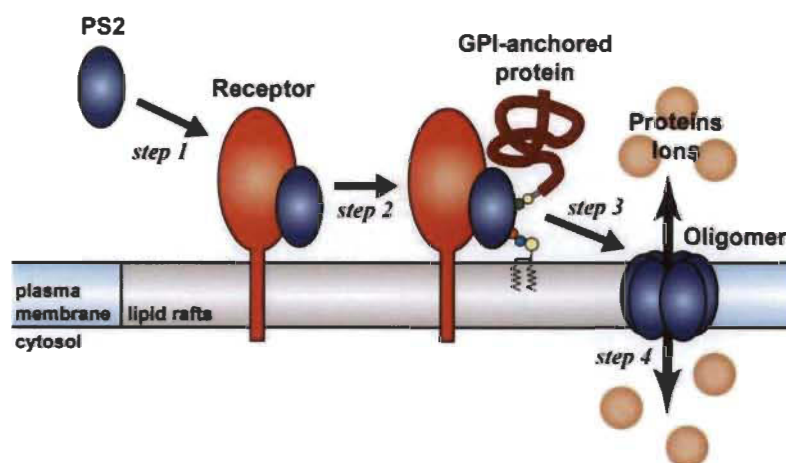


Figure 1.25 Association, sélectivité et oligomérisation de la parasporine-2 (Abe *et al.* 2016).

Un fait intéressant concernant la toxine PS2Aa1 et les cancers gynécologiques est que celle-ci a été extrêmement efficace lorsque testée contre une lignée cellulaire cancéreuse de l'endomètre (cellules Sawano) avec une concentration létale médiane (LC50) de seulement 0,002µg/ml, ce qui est très minime lorsque comparé avec les lignées cellulaires normales nécessitant plus de 2,5 µg/ml (dose 1250 fois plus élevée) (Tableau 1.4) (Okassov *et al.* 2015; Ito *et al.* 2004). Considérant que la toxine est hautement efficace, tout en étant très sélective envers les cellules cancéreuses, il est d'un grand intérêt clinique d'étudier plus en détail cette toxine dans le but d'une thérapie ciblée et d'éliminer les cellules ayant précédemment acquis une chimiorésistance, puisqu'il s'agit ici d'un potentiel traitement avec une mécanistique complètement différente de la chimiothérapie conventionnelle.

1.3.3 Cibler le suppresseur de tumeur Par-4

L'objectif idéal de la thérapie ciblée est d'éliminer complètement et seulement les cellules cancéreuses. En limitant l'action de la thérapie exclusivement sur les cellules cancéreuses, les effets secondaires seront beaucoup moins présents, ne limitant donc pas l'atteinte d'une efficacité maximale du traitement. Une protéine possède des caractéristiques répondant à cette demande, celle-ci se nomme prostate apoptosis response-4 (Par-4).

Par-4 est une protéine suppresseuse de tumeur ayant la capacité unique d'induire l'apoptose de façon sélective envers les cellules du cancer (El-Guendy *et al.* 2003; Shrestha-Bhattarai and Rangnekar 2010). La protéine a été initialement découverte dans des cellules cancéreuses de la prostate en apoptose, origine de son nom (Sells *et al.* 1994). Par la suite, il a été découvert que la protéine Par-4 est exprimée de façon ubiquitaire dans tout type de cellules, incluant les tissus gynécologiques (Uhlén *et al.* 2015).

Concernant l'implication de Par-4 dans le cancer, une étude a démontré que des souris knock-out de Par-4, n'exprimant plus le gène, ont une espérance de vie réduite et que plus de 36 % des animaux ont développé des cancers de l'endomètre après moins d'un an suivant la naissance (García-Cao *et al.* 2005). Cette étude est d'un intérêt considérant l'impact observé par l'absence de la protéine Par-4, particulièrement au niveau de l'utérus. Un faible niveau/absence de Par-4 dans divers types de cancers est souvent signe d'un mauvais pronostic, soit un cancer agressif et fréquemment résistant à la thérapie conventionnelle (Tan *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2013; Jagtap *et al.* 2015; Nagai *et al.* 2010; Ahmed *et al.* 2008; Alvarez, Pan, *et al.* 2013; Heath and Rosalyn Bryson 2011; Chendil *et al.* 2002; Kline *et al.* 2009). Cependant, l'inverse est aussi vrai, rétablir Par-4 permet d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie et de la chimiothérapie (Heath and Rosalyn Bryson 2011; Chendil *et al.* 2002; Kline *et al.* 2009; Tan *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2013; Jagtap *et al.* 2015). Dans le cas de Par-4, le faible niveau d'expression observé dans les cancers est rarement dû à une suppression ou à une mutation de son gène. En effet, moins de 2,5 % de tous les types de cancers, excluant le mélanome, ont des altérations du gène de Par-4. Ce taux d'altération de Par-4 est encore plus faible dans les cancers gynécologiques (Figure 1.26) (Cerami *et al.* 2012).

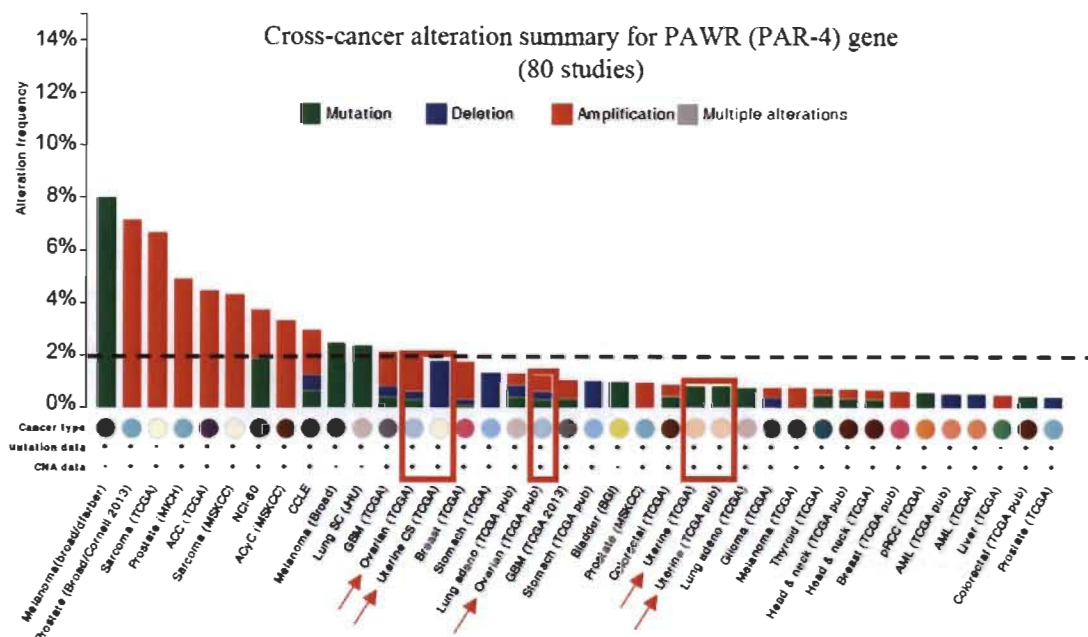


Figure 1.26 Altérations de la protéine Par-4 dans tous les types de cancers. Altérations du gène de Par-4 provenant de 80 études avec des patients atteints de tous types de cancers. Moins de 2 % d'altérations sont présentes dans les cancers gynécologiques, représentés par une flèche rouge. (Tirée de TCGA et cbiportal.org)

Une des causes de cette diminution de Par-4 dans les cancers est l'hyperméthylation de son promoteur, empêchant ainsi l'expression de la protéine (Moreno-Bueno *et al.* 2007; Pruitt *et al.* 2005; Fernandez-Marcos *et al.* 2009). L'oncogène Ras, en amont de la voie des MAPK, est un des responsables de l'hyperméthylation du promoteur de Par-4. Cette hyperméthylation s'effectue en partie par l'activation de la voie RAF/MEK menant à l'augmentation d'expression des méthyltransférases d'ADN (Dnmt1 et Dnmt3). L'activation de la voie RAF/MEK seulement n'est cependant pas suffisante pour méthyler le promoteur de Par-4 suggérant l'implication de voies additionnelles encore inconnues. (Pruitt *et al.* 2005). Bien sûr, les quelques mutations/délétions sur le gène de Par-4 vont aussi avoir un impact sur l'expression de la protéine; heureusement, le nombre de cas est rare. Le fait que Par-4 soit toujours intact et non altéré dans la majorité des cellules cancéreuses est une caractéristique bénéfique pour la thérapie ciblée. En effet, l'absence d'altérations permet d'avoir comme objectif de réexprimer la protéine afin qu'elle soit réactivée et puisse éliminer les cellules cancéreuses via sa capacité d'induire l'apoptose.

1.3.3.1 Mécanisme d'apoptose de Par-4

Le mécanisme d'action de Par-4 lui permettant d'induire la mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses est complexe. Son activité pro-apoptotique est principalement régulée par son activation via phosphorylation sur la Thr163 par la protéine kinase A (PKA) (Gurumurthy *et al.* 2005) (Figure 1.27).

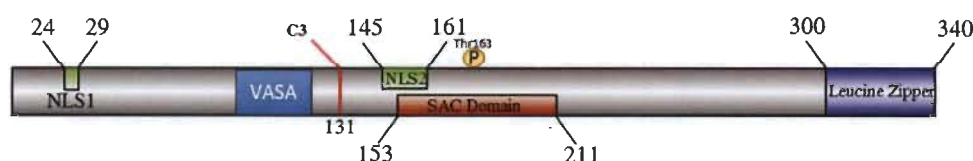


Figure 1.27 Structure de la protéine Par-4.

Par-4 possède deux domaines NLS (Nuclear Localization Sequence), un domaine VASA sur lequel il y a un site d'ubiquitination, un site de clivage par la caspase-3, un domaine SAC (Selective for Apoptosis induction in Cancer cells) ainsi qu'une leucine zipper permettant sa liaison avec l'ADN ou d'autres protéines d'intérêts. (Créée par François Fabi et inspirée de Gurumurthy *et al.* 2005; Nalca *et al.* 1999; El-Guendy *et al.* 2003; Goswami *et al.* 2008; Goswami *et al.* 2005 et Chen *et al.* 2014.)

L'hypothèse de la sélectivité apoptotique pour les cellules cancéreuses est basée sur le niveau d'activité de PKA, fréquemment surélevé dans les cellules cancéreuses et n'étant donc pas suffisant pour activer Par-4 dans les cellules normales (Gurumurthy *et al.* 2005). Cette phosphorylation sur la Thr163 permettant à Par-4 de s'activer est nécessaire pour ensuite effectuer une translocation vers le noyau, suivie de l'induction de l'apoptose (Gurumurthy *et al.* 2005). La translocation vers le noyau joue un rôle important dans les mécanismes d'apoptose de la protéine. En effet, la translocation de Par-4 vers le noyau, via son domaine NLS2, lui permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Figure 1.27 et Figure 1.28) (Nalca *et al.* 1999).

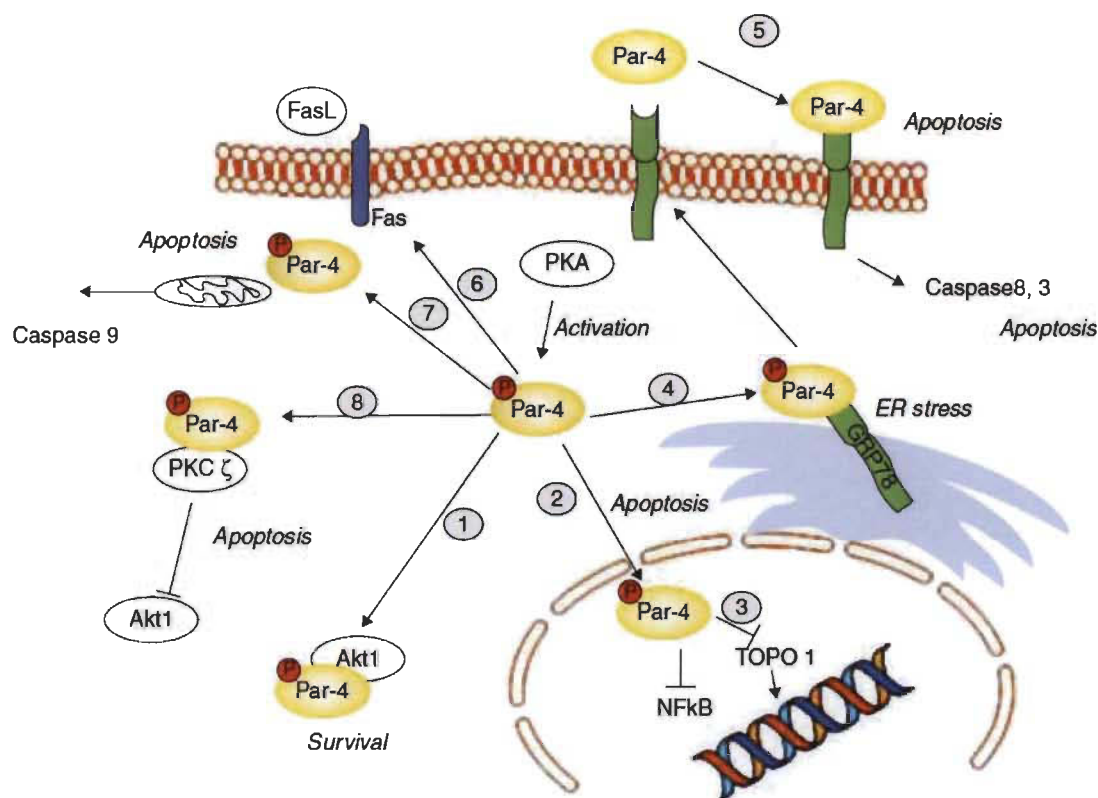


Figure 1.28 Schéma résumant divers mécanismes d'induction de l'apoptose par la protéine Par-4.

PKA phosphoryle Par-4 et active celle-ci. (1) Par-4 peut se lier à AKT1 l'empêchant de se déplacer vers le noyau et donc d'inhiber son activité antitumorale. (2) Par-4 peut se déplacer vers le noyau pour induire l'apoptose en inhibant l'activité de NF-κB ainsi que (3) la topoisomérase-I. (4-5) Par-4, en relation avec le réticulum endoplasmique et la protéine GRP78, peut être sécrété et interagir à la surface des cellules de façon autocrine ou paracrine afin d'activer la voie extrinsèque de l'apoptose. (6) Par-4 peut mobiliser la protéine réceptrice Fas vers la membrane afin d'activer la voie extrinsèque de l'apoptose. (7) Par-4 peut activer la voie intrinsèque de l'apoptose par la mitochondrie. (8) Par-4 peut se lier à la protéine PKC ζ, régulant négativement AKT et NF-κB. (Irby *et al.* 2012).

NF-κB est un facteur de transcription responsable de la régulation de plusieurs gènes associés à des mécanismes de survie cellulaire, incluant, entre autres, XIAP, Bcl-2 et Bcl-xL, des protéines inhibitrices de l'apoptose (Barkett and Gilmore 1999). La localisation au noyau permet aussi à Par-4, via le domaine du leucine zipper, d'inhiber l'activité de la topoisomérase-I et donc de bloquer la relaxation de l'ADN, la transcription de gènes et la progression du cycle cellulaire (Figure 1.27 et Figure 1.28)

(Goswami *et al.* 2008). Dans le cas des cellules normales, celles-ci expriment un niveau modéré/élevé de Par-4, mais la majorité des protéines sont localisées dans le cytoplasme évitant donc les mécanismes précédemment décrits (Uhlén *et al.* 2015; Boghaert *et al.* 1997; Azmi *et al.* 2010).

Par-4 possède également un deuxième site de phosphorylation sur la Ser249 (chez le rat), phosphorylée par la protéine AKT1, protéine de la voie de survie PI3K/AKT (Goswami *et al.* 2005). AKT1 peut se lier et phosphoryler Par-4 chez l'humain, toutefois, le site exact de la phosphorylation sur la séquence humaine de Par-4 n'a pas encore été confirmé expérimentalement. AKT1 se lie directement sur le domaine leucine zipper de Par-4 pour ensuite phosphoryler Par-4 afin de maintenir la protéine dans le cytoplasme, conduisant à la survie des cellules cancéreuses et à l'inhibition de son activité pro-apoptotique (Figure 1.27 et Figure 1.28) (Goswami *et al.* 2005). Inversement, Par-4 peut se lier à la protéine PKC ζ , inactivant celle-ci, et permettant en partie de diminuer AKT et l'activité de NF- κ B (Irby and Kline 2013; Chang, Kim, and Shin 2002; Joshi *et al.* 2008).

Brièvement, Par-4 peut induire la mort cellulaire de façons additionnelles incluant les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose (Figure 1.28) (Irby and Kline 2013). En premier lieu, Par-4 peut promouvoir la voie mitochondriale, permettant le clivage de la protéine BID et menant ainsi au relâchement du cytochrome C et de la protéine AIF. Ces relâchements activent la voie intrinsèque de l'apoptose et mènent donc au clivage des caspases-9 et -3 (Bergmann *et al.* 2004). Par-4 peut aussi activer la voie extrinsèque de l'apoptose en mobilisant le récepteur FAS (CD95) à la membrane cellulaire (Chakraborty *et al.* 2001). Lorsque le récepteur FAS est mobilisé à la surface, un complexe de signalisation et d'induction de la mort (death-inducing signaling complex; DISC) est formé menant par la suite à l'activation de la voie extrinsèque et au clivage des caspases initiateurs associées, soit les caspases-10 et -8 (Peter and Krammer 2003). En plus de mobiliser le récepteur FAS, Par-4 peut être sécrété dans le milieu extracellulaire par les cellules normales et cancéreuses. Une fois sécrété, Par-4 peut se lier (de façon autocrine ou paracrine) à la protéine de stress « glucose-regulated

protein-78 » (GRP78), exprimée à la surface des cellules cancéreuses. Une fois que la protéine extracellulaire Par-4 se lie à son récepteur, une cascade apoptotique a lieu impliquant le stress du réticulum endoplasmique et l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose via le clivage des caspases-8 et -3 (Burikhanov *et al.* 2009).

Il a été démontré que la protéine par-4 possède un domaine bien précis, responsable de l'apoptose induite aux cellules cancéreuses, nommé « Selective for Apoptosis induction in Cancer cells » (SAC) (Figure 1.27). Il a été démontré que l'expression seule du domaine SAC par l'utilisation d'un plasmide était suffisante pour induire la mort de cellules cancéreuses sans atteindre les cellules normales (El-Guendy *et al.* 2003). Il est aussi intéressant de noter que l'acide aminé sur Par-4 et ciblé par AKT1, empêchant la protéine de fonctionner normalement, est situé à l'extérieur du domaine SAC. De ce fait, lorsque le domaine SAC est exprimé seul, celui-ci ne peut être inhibé par AKT1 en raison de l'absence de son site. Il s'agit d'un atout considérable pour la clinique dans l'optique d'éliminer les cellules cancéreuses de façon sélective et sans être limité par l'inhibition de son activité.

Concernant la voie PI3K/AKT/PTEN, celle-ci est fortement altérée dans les cancers gynécologiques (Figure 1.12) et cela pourrait causer une potentielle problématique sur l'activité anticancéreuse de Par-4 en raison de la régulation négative exécutée par AKT1 (Goswami *et al.* 2005). La voie PI3K/AKT/PTEN est une des voies majeures impliquées dans les mécanismes de chimiorésistance des cancers gynécologiques telles qu'introduites précédemment (Girouard *et al.* 2013; Ali *et al.* 2012; Chaudhry and Asselin 2009; Gagnon *et al.* 2004; Vara *et al.* 2004). Une étude a aussi noté qu'une diminution de Par-4 peut aussi augmenter certains composants de la voie de survie PI3K/AKT, conférant ainsi une résistance au cisplatine dans des cellules de cancer du pancréas (Tan *et al.* 2014). Considérant que Par-4 et la voie PI3K/AKT/PTEN sont interreliés et impliqués chacun dans la chimiorésistance, il est d'un intérêt de cibler Par-4 tout en considérant les diverses voies de survies associées afin de rétablir la sensibilité des cellules.

1.3.3.2 Clivage de la protéine Par-4

Notre équipe a découvert que Par-4 est clivé par la caspase-3 (D131) lors de l'apoptose dans plusieurs types de cellules cancéreuses. Ce clivage observé génère un fragment de 25 kDa contenant la séquence de localisation nucléaire (NLS2), le domaine sélectif pour l'apoptose des cellules cancéreuses (SAC) et le leucine zipper (Figure 1.12) (Chaudhry *et al.* 2012). Ce fragment clivé de Par-4 (cl.Par-4) s'accumulait seulement dans les cellules sensibles à la chimiothérapie et était absent dans les cellules résistantes, suggérant ainsi un rôle dans la chimiosensibilité des cellules (Figure 1.29) (Chaudhry *et al.* 2012).

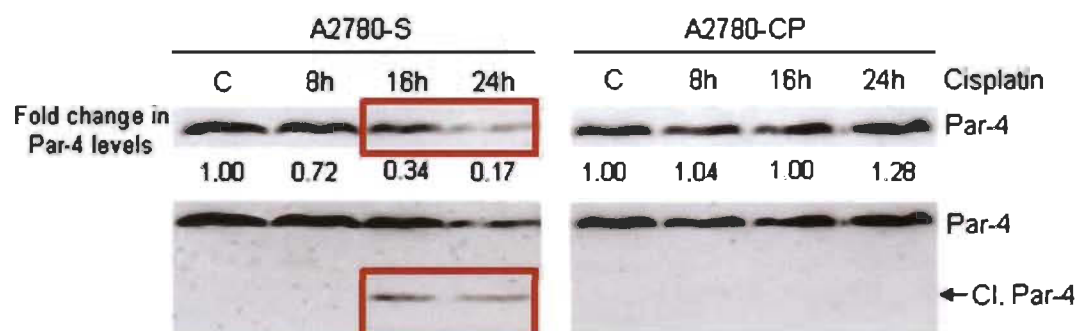


Figure 1.29 Production d'un fragment clivé de Par-4 suite à un stimulus apoptotique dans les cellules cancéreuses.

Suite à un traitement avec 10 μ M de cisplatine pendant divers temps (8-16-24 h), un fragment clivé de la protéine Par-4 a été détecté exclusivement dans les cellules cancéreuses de l'ovaire sensibles au cisplatine (A2780S=sensibles au cisplatine; A2780CP=résistantes au cisplatine). Aucun fragment clivé de Par-4 n'a été détecté dans le modèle résistant (Chaudhry *et al.* 2011).

Des expérimentations additionnelles ont permis de confirmer que cl.Par-4 effectuait une translocation vers le noyau et conservait ses propriétés pro-apoptotiques, permettant d'induire à lui seul l'apoptose dans les cellules du col de l'utérus HeLa (Figure 1.30) (Chaudhry *et al.* 2012).

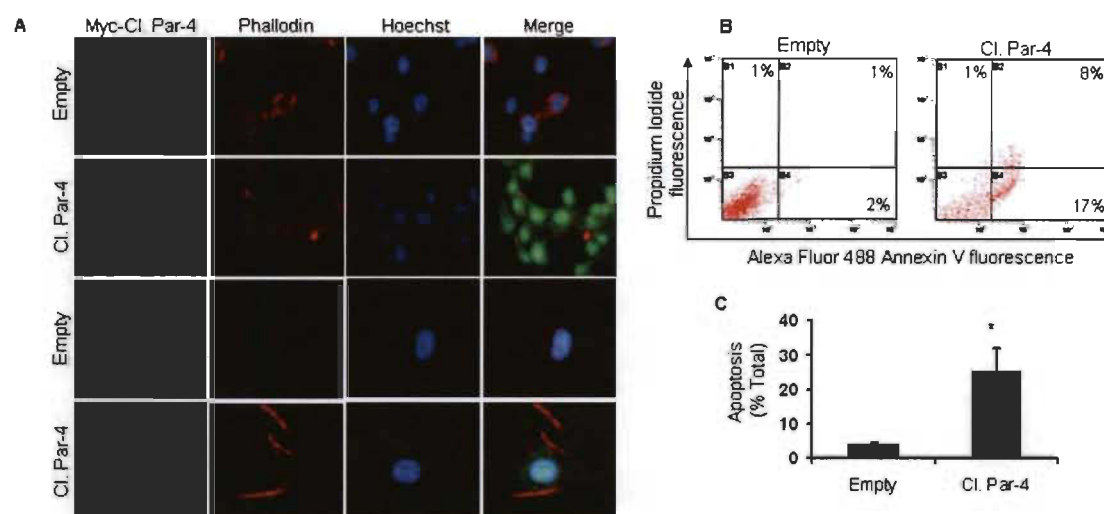


Figure 1.30 Propriété pro-apoptotique conservée du fragment clivé de Par-4.

Le fragment clivé de Par-4 a été transfecté transitoirement dans les cellules du col de l'utérus HeLa. (A) Immunofluorescence du fragment clivé de par-4, fortement localisé au noyau. L'immunofluorescence a été effectuée par microscopie confocale. La magnification est de 63X pour les deux rangées du haut et 100X pour les deux rangées du bas. (B-C) L'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux avec un marquage à l'Annexin V/Pi. Le fragment clivé de Par-4 seul était suffisant pour induire la mort cellulaire aux cellules (Chaudhry *et al.* 2011).

À ce jour, de nouveaux mécanismes d'actions sont encore découverts concernant Par-4 et sa capacité unique d'induire l'apoptose. Excepté quelques manuscrits dans la littérature, peu est connu concernant le fragment clivé de Par-4 (Thayyullathil *et al.* 2013; Treude *et al.* 2014). Considérant l'intérêt clinique de Par-4 et de son fragment clivé, plus d'exploration devrait être faite afin de bien saisir ses divers fonctions et mécanismes dans le but de rétablir son expression et d'utiliser de façon optimale cette cible thérapeutique.

1.4 Problématique et objectifs de recherche

Malgré l'importance accordée à la recherche sur le cancer, cette maladie génétique est toujours aujourd'hui la première cause de décès en Amérique (Ferlay *et al.* 2013; American Cancer Society 2015; Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015; Siegel, Naishadham, and Jemal 2013; Casciato and Territo 2009;

Howlader *et al.* 2016). Dans le cadre des cancers gynécologiques, lorsque ceux-ci sont diagnostiqués tardivement, le taux de survie des patientes est extrêmement faible (Ferlay *et al.* 2013; American Cancer Society 2015; Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015; Lengyel; Siegel, Naishadham, and Jemal 2013; Casciato and Territo 2009; Howlader *et al.* 2016; Plataniotis, Castiglione, and Group 2010). Ce faible taux de survie est dû, en majeure partie, à l'acquisition d'une résistance aux traitements anticancéreux lors de la progression du cancer, menant ainsi à une inefficacité des traitements et empêchant l'élimination complète des tumeurs (Agarwal and Kaye 2003). En plus d'être inefficaces, les traitements chimiothérapeutiques agissent partout dans le corps de la patiente amenant conséquemment de nombreux effets secondaires douloureux et indésirables (Chirino and Pedraza-Chaverri 2009; Screnci and McKeage 1999; Khynriam and Prasad 2001). Une solution s'impose afin de contrecarrer cette problématique et la thérapie ciblée semble être une solution envisageable pouvant permettre une sélectivité contre les cancers gynécologiques, tout en augmentant l'efficacité des traitements; diminuant les effets secondaires et contrant la chimiorésistance.

Dans le cadre de cette thèse, trois cibles/méthodes d'intérêt ont été étudiées spécifiquement dans le contexte des cancers gynécologiques. Il s'agit ici du récepteur à l'estrogène, de l'utilisation de toxines bactériennes sélectives et de la protéine aux caractéristiques uniques, Par-4. L'étude de ces cibles/méthodes a comme objectif général de permettre l'avancement des connaissances concernant celles-ci, et un jour, de permettre leur utilisation comme traitements de médecine personnalisée en clinique par la thérapie ciblée.

Plus spécifiquement, les objectifs de cette thèse sont les suivants :

1.4.1 Étudier l'activité antitumorale de deux nouveaux traitements sélectifs, différents de la chimiothérapie actuelle

1.4.1.1 Projet 1 : ciblage du récepteur à l'estrogène par une nouvelle molécule, le VP-128

Ce premier projet consiste à l'étude d'une nouvelle molécule chimiothérapeutique, le VP-128, développée en collaboration avec les chimistes provenant de l'équipe du Dr Gervais Bérubé, professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières (Figure 1.31).

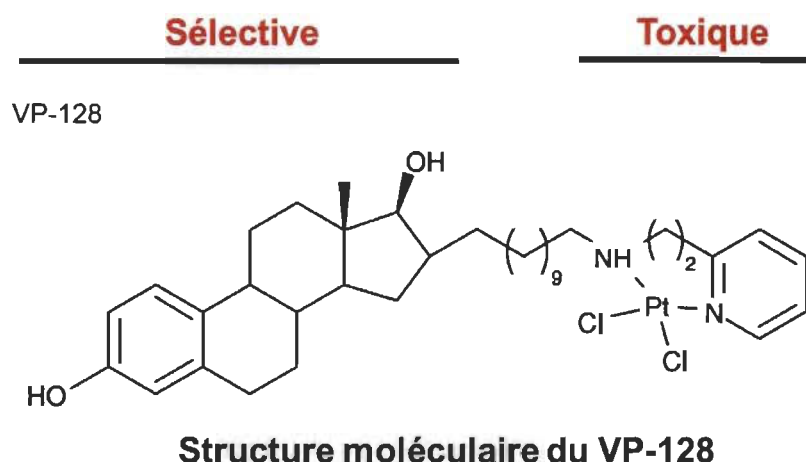


Figure 1.31 Structure moléculaire du VP-128.

Le 17 β -estradiol correspond à la portion sélective du composé tandis que le platine correspond à la portion toxique. (Adaptée de Descôteaux *et al.* 2003 et Van Themsche *et al.* 2009.)

L'idée de ce nouveau composé, le VP-128, est d'utiliser en premier lieu le 17 β -estradiol comme molécule de transport sélectif envers les cancers gynécologiques puisque ceux-ci expriment en majeure partie le récepteur associé, le récepteur à l'estrogène α . Attachée au 17 β -estradiol se trouve une molécule modifiée de platine, couramment utilisée dans la chimiothérapie traditionnelle, ayant comme objectif d'éliminer les cellules cancéreuses. La combinaison de ces deux molécules, le VP-128, aura comme objectif d'augmenter la sélectivité et l'efficacité des traitements contre les cancers féminins (sein, utérus et ovaires).

Dans cette étude préclinique, l'activité antitumorale de la molécule a été étudiée *in vitro* et *in vivo* pour le cancer de l'ovaire spécifiquement. Le mode d'action du VP-128 a aussi été étudié de plus près afin de bien saisir son fonctionnement pour l'utiliser de façon optimale en clinique.

1.4.1.2 Projet 2 : ciblage spécifique des cellules cancéreuses par une toxine bactérienne, parasporine 2Aa1

Ce deuxième projet consiste à l'étude d'un type de thérapie différent des traitements administrés actuellement, soit l'utilisation d'une toxine bactérienne induisant la mort sélectivement des cellules cancéreuses. Ce projet a été effectué en collaboration avec l'équipe de microbiologistes du Dr Marc Sirois, professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières. Son équipe a découvert une nouvelle souche bactérienne de *B. thuringiensis* nommée *Bt 4R2* contenant le gène codant pour la parasporine 2Aa1 (PS2Aa1) (Figure 1.32).

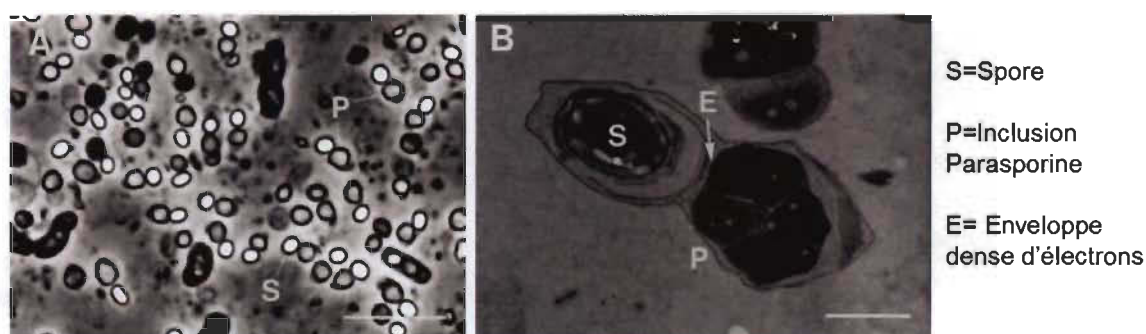


Figure 1.32 Différentes photos représentant la production de parasporines bactériennes.

(A) Microscopie à contraste de phases représentant des bactéries et spores. (B) Microscopie électronique en transmission représentant une spore mature et une inclusion de parasporine. L'échelle représentée est de (A) 10 μm et (B) 1 μm (Mizuki *et al.* 2000).

Les parasporines sont connues pour leur capacité de détruire sélectivement les cellules cancéreuses tout en évitant les cellules saines. En plus de cette sélectivité, il est d'un intérêt clinique de trouver de nouveaux types de traitements, différents de la

thérapie conventionnelle, afin de pouvoir contrer la chimiorésistance acquise par les cellules cancéreuses.

Dans cette étude, l'activité antitumorale de la parasporine 2Aa1 a été étudiée *in vitro* sur un vaste nombre de modèles cellulaires cancéreux (incluant les cancers de l'ovaire et de l'endomètre) et de cellules saines. Puisque le mode d'action de la parasporine 2Aa1 est peu connu, celui-ci a été étudié plus en détail afin de bien saisir son fonctionnement pour l'utiliser de façon optimale en clinique.

1.4.2 Étudier le mécanisme d'action d'une cible thérapeutique intracellulaire pour contrer la chimiorésistance

1.4.2.1 Projet 3: mécanisme d'une protéine proapoptotique spécifique aux cellules cancéreuses, Par-4

Ce troisième et dernier projet de thèse est d'étudier la mécanistique d'une protéine prometteuse pour la clinique en raison de son mécanisme proapoptotique et de sa sélectivité envers les cellules cancéreuses, Par-4. Comme introduit, nous avons découvert que Par-4 était clivé par la caspase-3 en situation d'apoptose et que ce fragment semblait jouer un rôle important dans la chimiorésistance et l'activité antitumorale de Par-4 (Figure 1.33).

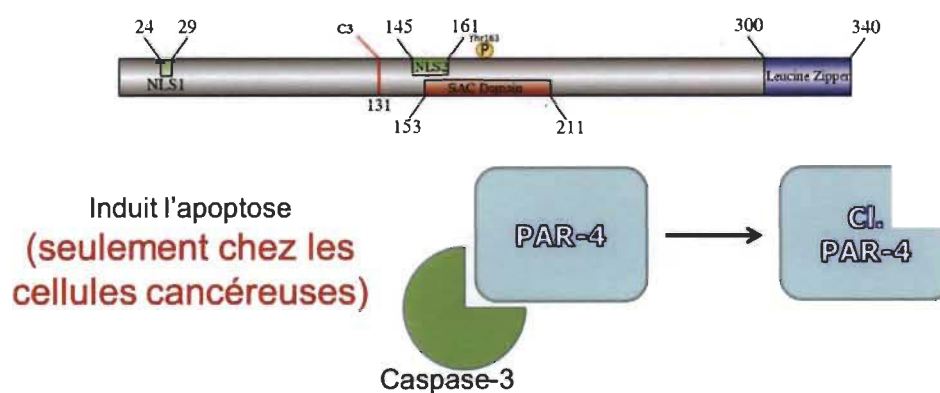


Figure 1.33 Schéma récapitulatif du clivage de Par-4 et sa structure associée. (Inspirée de Gurumurthy *et al.* 2005; Nalca *et al.* 1999; El-Guendy *et al.* 2003; Goswami *et al.* 2008; Goswami *et al.* 2005 et Chaudhry *et al.* 2012.)

Considérant la complexité de la mécanistique de Par-4, le peu d'information concernant son fragment clivé (cl.Par-4) et sa capacité unique d'induire l'apoptose, il est d'un intérêt de mieux comprendre le rôle de cl.Par-4.

Dans cette étude, la mécanistique de cl.Par-4 a été étudiée au niveau des cancers gynécologiques (cancers de l'ovaire et de l'endomètre). De nouveaux mécanismes de régulations post-traductionnelles ont été découverts dans le cadre de ce projet pour la protéine cl.Par-4. Mieux comprendre le mécanisme de Par-4 et de cl.Par-4 pourrait permettre de resensibiliser les cellules cancéreuses gynécologiques aux traitements chimiothérapeutiques et potentiellement induire la mort de celles-ci de façon sélective.

Le chapitre II contient une étude démontrant l'efficacité antitumorale d'un nouveau composé chimiothérapeutique ciblant sélectivement le récepteur à l'estrogène contre le cancer de l'ovaire.

CHAPITRE II

ER α -TARGETED THERAPY IN OVARIAN CANCER CELLS BY A NOVEL ESTRADIOL-PLATINUM(II) HYBRID

Brasseur K, Leblanc V, Fabi F, Parent S, Descôteaux C, Bérubé G, Asselin E.
ER α -Targeted Therapy in Ovarian Cancer Cells by a Novel Estradiol-Platinum (II)
Hybrid. *Endocrinology*. 2013 May 15;154(7):2281-95.

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Endocrinology* le 15 mai 2013. Il s'agit d'une revue cotée avec un facteur d'impact de 4,622 (5-ans 2014) utilisant un processus d'examen par les pairs.

2.1 Contribution des auteurs

Kevin Brasseur a effectué, en majorité, la conception de l'étude, la réalisation des expérimentations ainsi que la totalité de l'écriture du manuscrit. Valérie Leblanc et Sophie Parent, assistantes de recherche de l'équipe de laboratoire, ont fait quelques manipulations et aidé à la mise au point de protocoles. François Fabi, étudiant au Ph. D, a effectué quelques expérimentations pour le manuscrit lors de son stage en biologie médicale. Caroline Descôteaux a effectué la production chimique de la nouvelle molécule anticancéreuse VP-128. Gervais Bérubé est le directeur de recherche de Caroline Descôteaux, responsable de la production du VP-128 et superviseur de ce manuscrit. Éric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et superviseur de ce manuscrit.

2.2 Résumé de l'article (français)

Une nouvelle famille d'hybrides estradiol-platine a été synthétisée dans un but de thérapie anticancéreuse contre les cancers féminins. Des études antérieures avaient révélé que l'hybride VP-128 démontrait une efficacité élevée par rapport au cisplatine envers les cellules hormone-dépendantes du cancer du sein.

Dans la présente étude, nous avons étudié l'activité antitumorale du VP-128 *in vitro* et *in vivo* contre le cancer de l'ovaire. Avec des souris nues avec xénogreffes de cancer ovarien, le VP-128 présentait une activité sélective à l'égard des tumeurs hormone-dépendantes et a démontré une plus grande efficacité que le cisplatine à inhiber la croissance tumorale. De même, *in vitro*, la transfection transitoire du récepteur des estrogènes- α (ER α) dans des cellules A2780 ER α -négatives a permis d'augmenter leur sensibilité à l'apoptose induite par le VP-128, ce qui confirme la sélectivité du VP-128 envers les cellules tumorales hormone-dépendantes. En accord avec ces résultats, une analyse par immunobuvardage de type Western a révélé que le VP-128 a induit une quantité supérieure de clivage de la caspase-9, caspase-3, et de poly (ADP-ribose) polymérase, des marqueurs biochimiques de l'apoptose, lorsque comparé avec le cisplatine. L'activation d'un mécanisme d'apoptose caspase-indépendante a également été observée dans des cellules A2780 ER α -négatives, lesquelles le VP-128 induit rapidement la translocation de la protéine « apoptosis-inducing factor » vers le noyau. À l'inverse, la localisation subcellulaire de la protéine « apoptosis-inducing factor » n'a pas été modifiée dans les cellules OVCAR-3 ER α -positives. Nous avons aussi découvert que le VP-128 induit l'autophagie dans les cellules du cancer de l'ovaire en raison de la formation d'organites acides vésiculaires (AVOs) et d'une augmentation du niveau de la protéine Light Chain 3B-II, responsable de la formation des autophagosomes. Les voies de signalisation liées à l'autophagie (AKT et mTOR) ont également été régulées à la baisse, soutenant ainsi la présence de ce mécanisme. Considérant ce fait, l'inhibition de l'autophagie par l'utilisation de la chloroquine a permis d'augmenter l'efficacité du VP-128 et indique une possibilité de faire de la thérapie combinée dans une optique clinique.

Ensemble, ces résultats mettent en évidence la valeur bénéfique du VP-128 pour le traitement des cancers de l'ovaire hormone-dépendants et fournissent une preuve préliminaire de concept pour un ciblage efficace du ER α par notre hybride estradiol-platine contre ce type de tumeurs féminines.

2.3 Article complet (anglais) : ER α -targeted therapy in ovarian cancer cells by a novel estradiol-platinum(II) hybrid

Abstract

As we previously showed, we have synthesized a new family of 17 β -estradiol-platinum(II) hybrids. Earlier studies revealed the VP-128 hybrid to show high efficiency compared with cisplatin toward hormone-dependent breast cancer cells. In the present research, we have studied the antitumor activity of VP-128 in vitro and in vivo against ovarian cancer. In nude mice with ovarian xenografts, VP-128 displayed selective activity toward hormone-dependent tumors and showed higher efficiency than cisplatin to inhibit tumor growth. Similarly, in vitro, transient transfection of estrogen receptor (ER)- α in ER α -negative A2780 cells increased their sensitivity to VP-128-induced apoptosis, confirming the selectivity of VP-128 toward hormone-dependent tumor cells. In agreement, Western blot analysis revealed that VP-128 induced higher caspase-9, caspase-3, and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage compared with cisplatin. The activation of caspase-independent apoptosis was also observed in ER α -negative A2780 cells, in which VP-128 rapidly induced the translocation of apoptosis-inducing factor to the nucleus. Conversely, subcellular localization of apoptosis-inducing factor was not modified in ER α -positive Ovar-3 cells. We also discovered that VP-128 induces autophagy in ovarian cancer cells because of the formation of acidic vesicular organelles (AVOs) and increase of Light Chain 3B-II protein responsible for the formation of autophagosomes; pathways related to autophagy (AKT and mammalian target of rapamycin) were also down-regulated, supporting this mechanism. Finally, the inhibition of autophagy using chloroquine increased VP-128 efficiency, indicating a possible combination therapy. Altogether these results highlight the beneficial value of VP-128 for the treatment of hormone-dependent ovarian cancers and provide preliminary proof of concept for the efficient targeting of ER α - by 17 β -estradiol-Pt(II)-linked chemotherapeutic hybrids in these tumors.

Introduction

In North America, ovarian cancer accounts for one fifth of gynecological cancer and is the fifth leading cause of cancer death among women (1–4). Among gynecological cancers, the majority overexpress the estrogen receptors (ER; mainly ER α) as compared with normal tissues (4–7) and many can be classified as hormone dependent. Estrogen binds to its receptor, ER α/β , which then translocates from the cytoplasm to the nucleus to act as a transcription factor (8–10). Estrogen in ovarian cancer has high probabilities to promote cellular proliferation, malignancy, and neoplastic transformation (7, 11). Thus, using ERs as a biological target may provide a useful tool for the development of endocrine therapies and has already been validated with drugs such as tamoxifen (3, 12).

During the last decades, the most active chemotherapeutic drugs used in ovarian cancer have been platinum drugs, cisplatin, and carboplatin (13). Cisplatin [cis-diamminedichloroplatinum(II)] acts on fast-growing cells, a common characteristic of cancer cells, by intercalating into DNA, stopping cell division, and then ultimately leading to cell death (14). It is well known that platinum drugs are potent apoptosis inducers (15). Apoptosis is characterized by morphological changes such as cytoplasmic condensation and fragmentation of DNA at specific sites forming apoptotic bodies (16). However, it has been recently shown that cisplatin can also trigger autophagy (17). Autophagy is characterized by the presence of autophagic vacuoles in cytoplasm and the enlargement of Golgi and endoplasmic reticulum. Autophagy normally occurs during nutrient starvation for recycling but can also occur without needing starvation upon treatment of platinum compounds (16). Its mechanism consists of formation of membrane of the autophagosome around damaged organelles and proteins after fusion with lysosome, leading to the degradation of the items for recycling (18). In cancer cells, autophagy induced by chemotherapeutic drugs is often considered as chemoprotective, suggesting it could be implicated in chemoresistance. In agreement, inhibition of autophagy in several of these cancer cells improves efficiency of cisplatin for the induction of apoptosis (18–21).

The presence of severe side effects such as nephrotoxicity and hematotoxicity is the main drawback of platinum analogues due to the absence of selectivity toward cancer cells (22–25). Because the estrogen receptor (ER α) is highly expressed in hormone-dependent ovarian cancer, 17 β -estradiol (E2) used as a carrier molecule of cisplatin could increase selectivity and efficiency of the drug. We have recently reported the synthesis of a new family of E2-platinum(II) hybrids (26, 27). Previous studies revealed that one of these hybrids, VP-128, showed high efficiency compared with cisplatin toward breast cancer cells and was also selective toward ER α + breast cancer xenografts in nude mice (28). In the present study, we have investigated for the first time, in vitro and in vivo, the antitumor activity of VP-128 using human ER α -positive (Ovar-3, Skov-3) and ER α -negative (A2780 and A2780CP-cisplatin resistant variant) ovarian cancer cells. We have also investigated the mode of action of VP-128 in ovarian cancer cells to induce apoptosis and autophagy.

Materials and methods

Cell culture

Human ovarian cancer cell lines Skov-3 (HTB-77) (ER α positive) and NIH:Ovar-3 (HTB-161) (ER α positive) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, Virginia); A2780 (ER α negative) and A2780CP (ER α negative/cisplatin resistant) were kindly provided by Dr G. Peter Raaphorst (Ottawa Regional Cancer Center, Ottawa, Canada). TOV-21G (ER α negative) and TOV-112D (ER α negative) were kindly provided by Dr Anne-Marie Mes-Masson (Centre de Recherche du Center Hospitalier de L'Université de Montréal, Montréal, Canada). The Skov-3 cell line was maintained in McCoy's medium containing 10% fetal growth serum and 50 μ g/mL gentamycin; Ovar-3 was maintained in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum and 50 μ g/mL gentamycin; A2780 and A2780CP cell lines were maintained in DMEM-F12 medium containing 2% bovine growth serum and 50 μ g/mL gentamycin; TOV-21G and TOV-112D were maintained in ovarian surface

epithelial medium containing 10% fetal growth serum, 50 µg/mL gentamycin, and 0.5 µg/mL amphotericin B. The cells were maintained at 37°C with 5% CO₂.

Antibodies and reagents

All primary antibodies (see Supplemental Table 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>) were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, Massachusetts) except for ERα (Ab-16 from Neomarkers, Thermo Fisher Scientific, Fremont, California) and loading control glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Abcam, Cambridge, Massachusetts) and β-actin (Sigma, St Louis, Missouri). Secondary antibodies and horseradish peroxidase-conjugated goat antirabbit was from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada) and horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, Pennsylvania). Cisplatin and acridine orange were purchased from Sigma, the annexin V/PI apoptosis kit was purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada), chloroquine diphosphate salt was purchased from Sigma, and the 17β-estradiol-platinum(II) hybrid VP-128 was synthesized using our most recent methodology and purified by chromatography [Descoteaux et al (26)].

Drug treatments

Skov-3, Ovc3, A2780, and A2780CP cells were seeded in 100-mm³ petri dishes (5 × 10⁵ Skov-3 cells, 5 × 10⁵ Ovc3 cells, 3 × 10⁵ TOV-21G cells, 4 × 10⁵ TOV-112D cells, and 4.5 × 10⁵ A2780/A2780CP cells per dish). The following day, cells were pretreated or not with chloroquine diphosphate salt for 1 hour, followed by treatment with increasing concentrations of cisplatin or VP-128 (0, 1, 5 or 10 µM) for the indicated time periods (8 or 12 hours). Treatments were done in full estrogenic medium including phenol red and complete fetal bovine serum/bovine growth serum. Adherent and floating cells were collected.

Measurement of annexin V/PI cells

Fluorescein isothiocyanate annexin V/dead cell apoptosis kit (Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, the treated cells were collected, washed with PBS, and then diluted in 1× annexin binding buffer (100 µL). For each sample, 5 µL of annexin V and 1 µL of propidium iodide were added to the cell suspension and then incubated 15 minutes at room temperature. After incubation time, an additional 100 µL of the annexin binding buffer was added to each sample for a total of 200 µL. Samples were analyzed (6000–10 000 events) using a Beckman Coulter flow cytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Mississauga, Ontario, Canada). Analyses were performed using Kaluza software (version 1.1; Beckman Coulter).

Transient transfection

A2780 ovarian cancer cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and 4 µg of selected plasmids. pVP16-ERα (Addgene plasmid 11351) was kindly provided by Dr Donald P. McDonnell (29). Briefly, cells were transiently transfected with pVP-empty or pVP-ERα plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) for 6 hours, and the media were then replaced and cells were let to recover for 18 hours before harvesting.

Lentiviral transfection

Lentiviral particles were produced using the lenti-X HTX packaging system and human embryonic kidney-293T cells from CLONTECH Laboratories (Mountain View, California). MISSION pLKO.1-puro nontarget short hairpin RNA (shRNA) control plasmid and 5 different MISSION shRNA constructs targeting ERα from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri) were used for the production of the lentiviral particles. Skov-3 ovarian cancer cells were then stably transfected with supernatant containing lentiviral particles of various shRNA constructs for 24 hours, and the media were then replaced

and the cells were let to recover for 24 hours. The selection of the cells was then made using puromycin at 0.75 µg/mL for 5 days.

Hoescht nuclear staining

The treated cells were collected, washed twice in PBS, resuspended at an approximate density of 2×10^5 cells/mL in PBS containing Hoechst 33258 (Sigma), and incubated for 24 hours at 4°C before fluorescence microscopy analysis of the apoptotic cells. At least 200 cells were counted for each sample, and a percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells (with characteristic apoptotic morphology such as nuclear shrinkage and condensation) to total cell count.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated from cells using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 0.4 µg RNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Primers for PCR amplification were as follows: 5'-GTGCCTGGCTAGAGATCCTG-3' (sense) and 5'-AGAGACTTCAGGGTGCTGGA-3' (antisense) for ERα; 5'-GAGGATCTTCATGAGGTAGTCTGTCAGGTC-3' (sense) and 5'-CAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCA-3' (antisense) for β-actin. PCRs were conducted in a MJ Research (Waltham, Massachusetts) thermal cycler (model PTC-100) using the following parameters: 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 66°C, and 1 minute at 72°C for 40 cycles (ERα) and 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 58°C, and 1 minute at 72°C for 25 cycles (β-actin). The reaction mixture was size separated on an agarose gel and visualized using SYBR-Safe (Invitrogen) staining upon UV transillumination.

Western blot

Treated cells were washed with PBS and submitted to lysis in cold radioimmunoprecipitation assay buffer containing protease inhibitors (Complete; Roche Applied Science, Laval, Québec, Canada) followed by 3 freeze-thaw cycles. Equal amounts of cell lysates, determined using a Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories), were separated onto polyacrylamide gels (8%–15%) and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked in 5% milk, PBS 1×, 0.06% Tween 20 for 1 hour at room temperature, probed with a primary antibody, washed in PBS 1×, 0.06% Tween 20, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad Laboratories). Detection was performed using a SuperSignal West Femto substrate (Thermo Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada), as described by the manufacturer using UVP bioimaging systems. Densitometry was done using Quantity One software, version 4.6.9 (Bio-Rad Laboratories).

Subcellular fractionation

NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent (Thermo Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada) was used according to the manufacturer's instructions. The cytoplasmic proteins were collected using CERI and II reagents, whereas proteins from the nucleus were collected using the NER reagent. GAPDH was used as a loading/purity control for cytoplasmic proteins, whereas poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) was used for nuclear proteins.

Immunofluorescence

Treated cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature, rinsed in PBS, and then processed for immunostaining. Cells were blocked with protein block solution from Dako (Burlington, Ontario, Canada). Cells were then rinsed in PBS, incubated with a polyclonal antirabbit apoptosis-inducing factor (AIF) or negative control IgG (Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada)

for 1 hour, rinsed in PBS, and then incubated with the secondary antibody, donkey antirabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen) for 30 minutes. Cells were then incubated with rhodamine-phalloidin (Molecular Probes) for 20 minutes to stain actin microfilaments. The slides were washed once in PBS and counterstained with Hoechst nuclear dye for 5 minutes followed by 2 rinses in water. The sections were mounted in 0.1% P-phenylene diamine in 50% glycerol, and photomicrographs were taken with a Zeiss Axio Observer microscope (Carl Zeiss, Toronto, Canada).

Acridine orange

The treated cells were stained with 0.5 µg/mL acridine orange (Sigma) in complete medium at 37°C for 15 minutes. After the incubation, samples were collected and then analyzed (6000–10 000 events) using a Beckman Coulter flow cytometer Cytomics FC500. Analyses were performed using CXP software (Beckman Coulter).

In vivo experiments

All animal protocols were approved by the Université du Québec à Trois-Rivières Animal Care Committee. Subcutaneous tumor xenografts of human cancer cells were established in 6-week-old female CD-1 nude mice (Charles River Laboratories, Lasalle, Québec, Canada) by injection of 10×10^6 cells in 100 µL of 2 mg/mL Matrigel (VWR, Mississauga, Ontario, Canada) at both flanks near the posterior legs. The mice used were not ovariectomized for these experiments. Starting on the day of xenografts, mice inoculated with hormone-dependent Ovar-3 tumor cells received a sc injection of E2 (0.15 mg/animal) at 3-day intervals to prime tumor growth. These injections of E2 were continued once the treatments with anticancer drugs were initiated. For each animal, the tumor size was measured twice a week using calipers. The tumor volume was calculated using the following formula: $0.5 \times \text{length} \times (\text{width})^2$ (75).

Treatments with anticancer drugs were initiated when the tumors derived from a given cell line reached a mean volume of 100 mm^3 (day 0). Mice received ip injections of either VP-128 or cisplatin (0.00615 mmol/kg) or control (vehicle) solution (5% Cremophor (Sigma), 5% ethanol diluted in 0.9% sodium chloride), at 3-day interval starting at day 0. Animals were also weighed twice a week, starting at day 0. Mice were killed after 21 days; at that time, tumor size had not grown greater than 2500 mm^3 . Mice were subjected to macroscopic examination at the time of necropsy, but no detectable abnormality was noted.

Statistical analyses

The data were subjected to 1-way ANOVA (PRISM software, version 5.00; GraphPad, San Diego, California). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when $P < .05$.

Results

ER α enhances VP-128 activity in ovarian cancer cell line

A2780 (ER α -) were transiently transfected with pVP16-ER α to overexpress the estrogen receptor alpha (ER α). Skov-3 (ER α +) were stably transfected with lentiviral particles containing shRNA of Estrogen Receptor- α to knockdown the estrogen receptor alpha. Expression of ER α mRNA and protein compared with A2780 and Skov-3 wild type and empty vector confirm the presence or absence of the estrogen receptor post-transfection (Figure 2.1A-B). Analyses of Hoescht staining were performed to observe morphological changes of apoptotic cells induced by E₂-Pt(II) hybrid (VP-128) and cisplatin in empty A2780 (ER α -) or Skov-3 (ER α +) and transfected A2780 (ER α +) or Skov-3 (ER α -) (Figure 2.1A-B). We observed that VP-128 dramatically induced more apoptosis (more than 2 fold) in transfected A2780 (ER α +) than in empty A2780 (ER α -) showing a selectivity and improved efficiency towards cells possessing its target (ER α). Similar results happens in shRNA ER α #4-5 Skov-3 (ER α -) where VP-128 induced

significantly less apoptosis (more than 2 fold) than in non-target shRNA Skov-3 (ER α +) Cisplatin showed no significant increase of apoptosis in presence or absence of ER α showing no selectivity using this drug. VP-128 is also more efficient than cisplatin to induce apoptosis in presence/absence of its target (ER α). This is shown by the drug concentration required for VP-128 (1 μ M) compared to cisplatin (5 μ M) to induce more efficiently cell death in chemosensitive A2780 (ER α -/+) ovarian cancer cells (Figure 2.1A). The same situation can be observed in chemoresistant Skov-3 (ER α -/+) ovarian cancer cells where 10 μ M is used with VP-128 when compared with 20 μ M used for cisplatin. Altogether, these results suggest that VP-128 is more efficient against ovarian cancer cells possessing its target, ER α , but also effective against ER α -negative cancer cells suggesting it may use different mechanisms of action than its base compound, cisplatin.

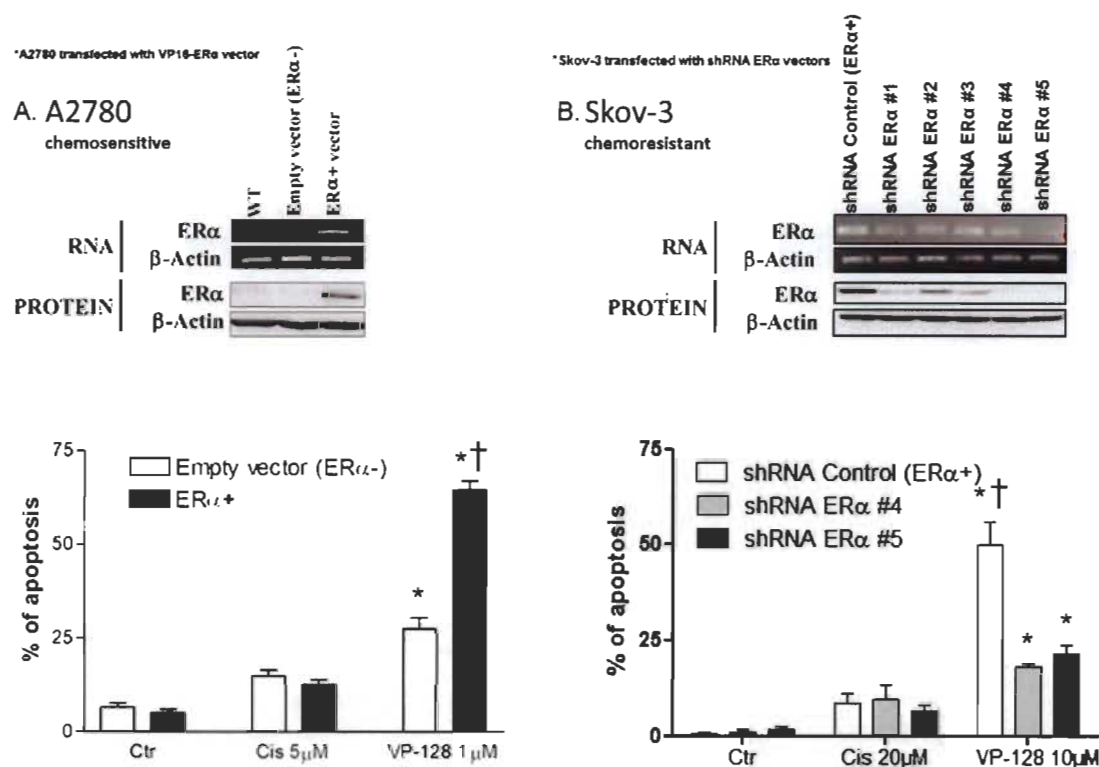


Figure 2.1 Enhanced action of VP-128 following overexpression of ERα in ovarian cancer cell line A2780 in vitro.

(A) A2780 cells were transiently transfected with pVP-empty or pVP-ERα plasmids using Lipofectamine 2000 for 6 h, media was then replaced and cells were let to recover for 18 h. Expression of Estrogen Receptor-α, as evaluated by RT-PCR and western blot analysis, on total RNA and protein collected 24 h post-transfection. Transfected cells were seeded in 6-well plates, treated with VP-128 (1 μM) or Cisplatin (5 μM) for 12 h. (B) Skov-3 cells were stably transfected with lentiviral particles containing shRNA of Estrogen Receptor-α. Expression of Estrogen Receptor-α, as evaluated by RT-PCR and western blot analysis, on total RNA and protein collected. Transfected cells were seeded in 6-well plates, treated with VP-128 (10 μM) or Cisplatin (20 μM) for 24 h. After corresponding treatment, cells were collected and stained with Hoescht 33258 for evaluation of apoptosis induction by nuclear staining. Results are mean ± S.E.M. of three independent experiments. *P < 0.05 compared with corresponding mock-treated cells. †P < 0.0001 compared with corresponding empty vector cells.

Enhanced antitumor activity using VP-128 in vivo towards hormone-dependent ovarian cancer xenografts when compared with its basic compound, cisplatin

Nude mice bearing hormone-dependant Ovar-3 (ER α +) (30) or hormone-independent A2780 and A2780CP (ER α -) subcutaneous ovarian cancer cells xenografts were used to evaluate the efficacy of VP-128 to reduce tumour size in vivo. VP-128 administered to mice effectively suppressed the progression of hormone-dependent resistant derived from Ovar-3 cells (Figure 2.2A), -independent sensitive derived from A2780 cells (Figure 2.2B) as well as -independent resistant derived from A2780CP (Figure 2.2C) tumours in vivo, indicating that VP-128 can apply anti-tumour activity over the three types of ovarian cancer cells in vivo. Interestingly, VP-128 suppressed the progression of cisplatin-resistant tumours derived from Ovar-3 (Figure 2.2A) and A2780CP cells (Figure 2.2C) more efficiently than cisplatin indicating its competence against platinum resistant tumours. It is also very interesting to notice that VP-128 efficiently reduced tumour size when compared to cisplatin only in the case of ER α + cells (Ovar-3, Figure 2.2A), demonstrating the increased efficacy and selectivity of the estradiol-platinum complex compared with cisplatin to treat hormone-dependent tumours. At the concentrations used, animals treated with VP-128 or cisplatin did not suffer any weight loss (Figure 2.2A-B-C). No visible sign of toxic side effects were apparent, both during the administration of drug and upon examination of all organs at the time of necropsy. Treatment on nude mice bearing A2780CP cells (Figure 2.2C) was stopped at 14th day because of the tumor size which was too big for the mice. We also carried out a complete histological examination on brain, heart, liver, lung, spleen, stomach, uterus and ovary tissues that were processed by a pathologist of the Institute for research in immunology and cancer (Montreal, Canada) according to standard procedures (i.e. fixation, embedding, sectioning at 2-3 microns and regular H&E staining) (Data not shown). The only significant lesions that were found were a malignant lymphoma arising in the spleen with dissemination of lymphoma cells to the liver in animal no. 2 (normal control) and a mild to moderate renal tubule regeneration in animal 3 & 4 (Cisplatin treated group). As for VP128, no significant tissue alteration could be observed. The finding of a spleen lymphoma in mice is not an unusual event since it is observed every so often (31-33). Renal tubular regeneration is sometimes

associated with aging but presuming the mice were all the same age it points to a role of Cisplatin in the development of these lesions.

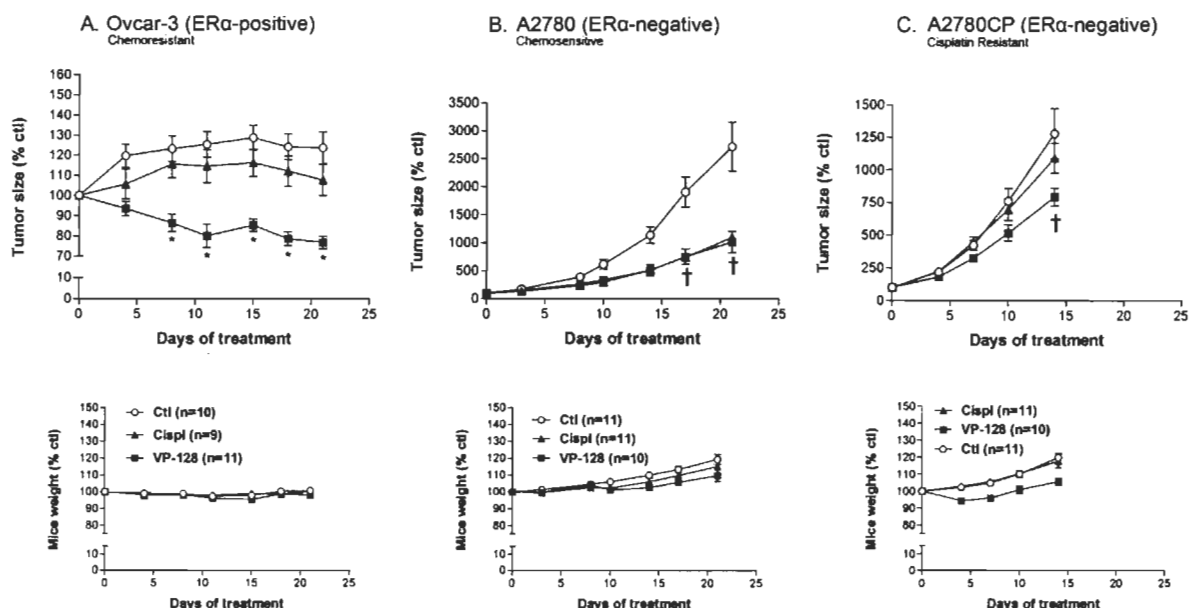


Figure 2.2 Improvement of antitumor activity using VP-128 compared with its basic compound cisplatin towards ER α -positive chemoresistant ovarian cancer cells in vivo.

(A) ER α -positive chemoresistant ovarian cancer cell line Ovarcar-3, (B) ER α -negative chemosensitive ovarian cancer cell line A2780 and (C) ER α -negative cisplatin resistant ovarian cancer cell line A2780CP were inoculated subcutaneously in the flanks of CD-1 nude mice. When tumours reached a mean volume of 100 mm³ (day 0), mice received i.p. injections of either VP-128 or Cisplatin (0.00615 mmol/kg) or control (mock treatment), at 3-days interval. Tumour volume was measured routinely using callipers; tumour size at day 0 of treatment corresponds to 100%. Mice weight was determined twice a week; weight at day 0 corresponds to 100%. Results are mean $\pm$ S.E.M. of the indicated number of mice per group. *P < 0.01 VP-128 compared with control-treated and cisplatin-treated tumours. †P < 0.0001 VP-128 compared with control-treated tumours only.

VP-128 induces apoptosis by activating caspase mechanisms

Cisplatin is known for activating caspase mechanisms to induce apoptosis in ovarian cancer cells (34). Our results showed that after only 12 h treatment, VP-128 induced caspase-3 and -9 cleavage/activation in all six model cell lines (Figure 2.3A-F).

TOV-21G and TOV-112D are ER α - ovarian cancer cells (Data not shown) and we considered them chemosensitive because of the low dose required to induce caspases cleavage with chemotherapeutic drugs. VP-128 also induced poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage/degradation in all cell lines (Figure 2.3A-F). These are all markers of caspase-dependent apoptosis. Cisplatin showed significant increase of cleaved caspase-3 and -9 and PARP levels only in chemosensitive A2780 cells (Figure 2.3C), which are sensitive to cisplatin drug (35). Cisplatin did not significantly induce caspase cleavage in the other resistant cell lines (Figure 2.3A-B-D), probably because of the short treatment time (12 h). Chemoresistant ovarian cancer cells Ovar-3 (Figure 2.3A) only had a low level of cleaved caspase-9 while Skov-3 (Figure 2.3B) shows low level of cleaved parp when treated with 10 μ M cisplatin. VP-128 was also efficient at 1 μ M of VP-128 only in ovarian cancer cells A2780, TOV-21G and TOV-112D (Figure 2.3C-E-F) because of their chemosensitivity to platinum compound when compared to the chemoresistant ovarian cancer cell lines. Parp cleavage is a direct action of cleaved caspases required for apoptosis (36, 37) and these results suggest that VP-128 induces apoptosis in a caspase-dependent manner and is more efficient than cisplatin to induce apoptotic cell death.

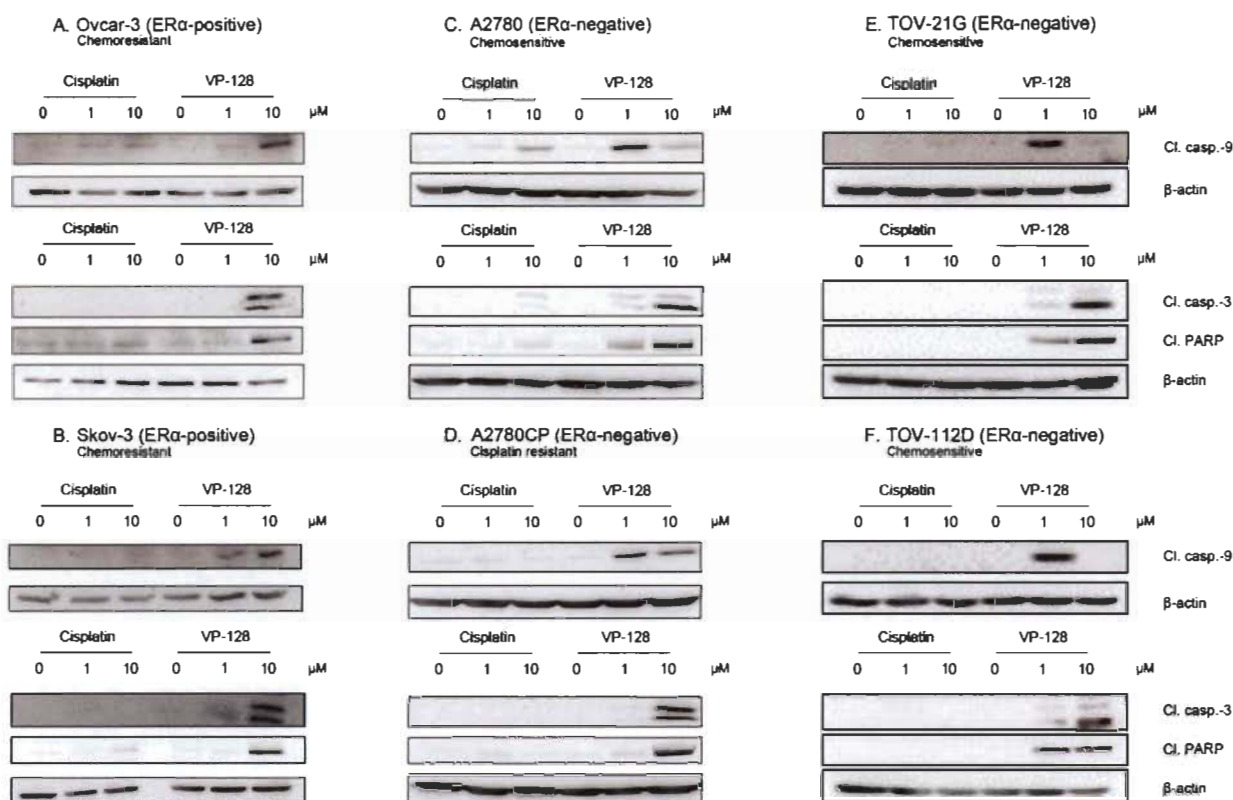


Figure 2.3 VP-128 and Cisplatin activate caspase-dependant mechanisms in ovarian cancer cells in vitro.

Ovarian cancer cell lines (A) Ovcar-3 (ER α -positive), (B) Skov-3 (ER α -positive), (C)(D) A2780/CP (ER α -negative), (E) TOV-21G (ER α -negative) and (F) TOV112-D (ER α -negative) were treated with increasing concentrations of VP-128 or Cisplatin (0, 1 or 10 μM) for 12 h. The levels of apoptotic markers cleaved caspase-9 and -3, and cleaved PARP were determined in treated cells using western blot analysis. β -Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

VP-128 activates caspase-independent apoptosis in ER α - A2780 cells

Cisplatin can also induce apoptosis in ovarian cancer cells by activating a caspase-independent pathway involving apoptosis-inducing factor (AIF) (38). AIF induces apoptosis by its translocation from the mitochondria to the nucleus where it induces chromatin condensation and DNA fragmentation (39). Only VP-128 induced an increase of total AIF levels in both Ovcar-3 (ER α +) (Figure 2.4A) and A2780 (ER α -) (Figure 2.4B) cells after 8 h treatment. However, VP-128 induced AIF translocation to

the nucleus only in A2780 (ER α -) (Figure 2.4B) suggesting that VP-128 triggers AIF translocation in ER α - ovarian cell lines to induce apoptosis using a complementary pathway. We also have verified by treating our cells up to 12 hrs and no translocation occurred in Ovarcar-3 (ER α +) (Data not shown). It is also important to consider that PARP is also cleaved with VP-128 in A2780 (ER α -).

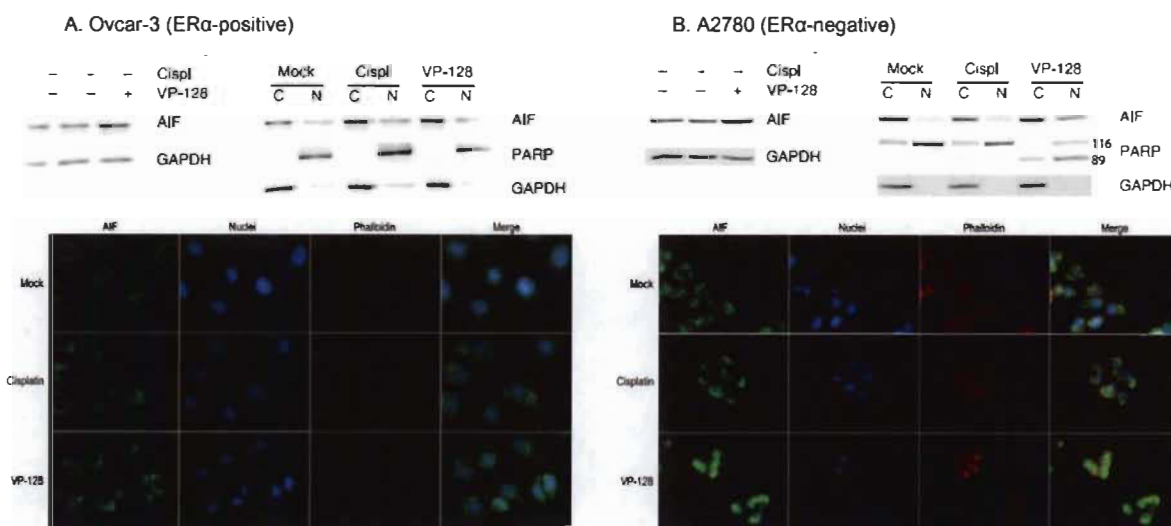


Figure 2.4 VP-128 activate caspase-independent apoptosis in ER α -negative A2780 cells.

(A) Ovarcar-3 (ER α -positive) and (B) A2780 (ER α -negative) cells were treated with 10 μ M Cisplatin or VP-128 for 8 h. Total levels of AIF were determined using western blot analysis. Subcellular localization of AIF was determined using fractionation followed by western blot analysis. GAPDH and PARP were used as controls for purity and loading of cytosolic and nuclear fractions respectively. Localization of AIF in treated cells was visualized using immunofluorescence analysis. Actin was stained using phalloidin rhodamin dye. Nuclei were counterstained using Hoechst dye. Low level of PARP is due to high level of apoptosis and difficulty to obtain high level of protein from the nucleus. Magnification: 630X. Results shown are representative of three independent experiments.

VP-128 induces autophagy in ovarian cancer cells

Autophagy occurs by the formation of autophagosome and then by the fusion with lysosome leading to acidic vesicular organelles (AVOs) called autophagolysosomes which is a common characteristic of autophagic cell (40). We used acridine orange, a

lysosomotropic agent capable of staining AVOs, to rapidly quantify induction of autophagy (41). We stained ovarian cancer cells treated with VP-128 and cisplatin and analysed the expression of red fluorescence, quantifying AVOs, by flow cytometry. Results showed that red fluorescence (FL3) increased in Ovar-3 and Skov-3 (ER α +) (Figure 2.5A-B) after 12 h treatment. Red fluorescence also increased after 8 h in A2780 and A2780CP (ER α -) (Figure 2.5C-D) indicating increase of AVOs, meaning induction of autophagy. No significant increase of red fluorescence was observed after 12 h in A2780 and A2780CP (ER α -) (Data not shown) because of the high level of apoptosis present at this time of the treatment compared with resistant cell lines Ovar-3 and Skov-3 (ER α +) (Figure 2.5A-B).

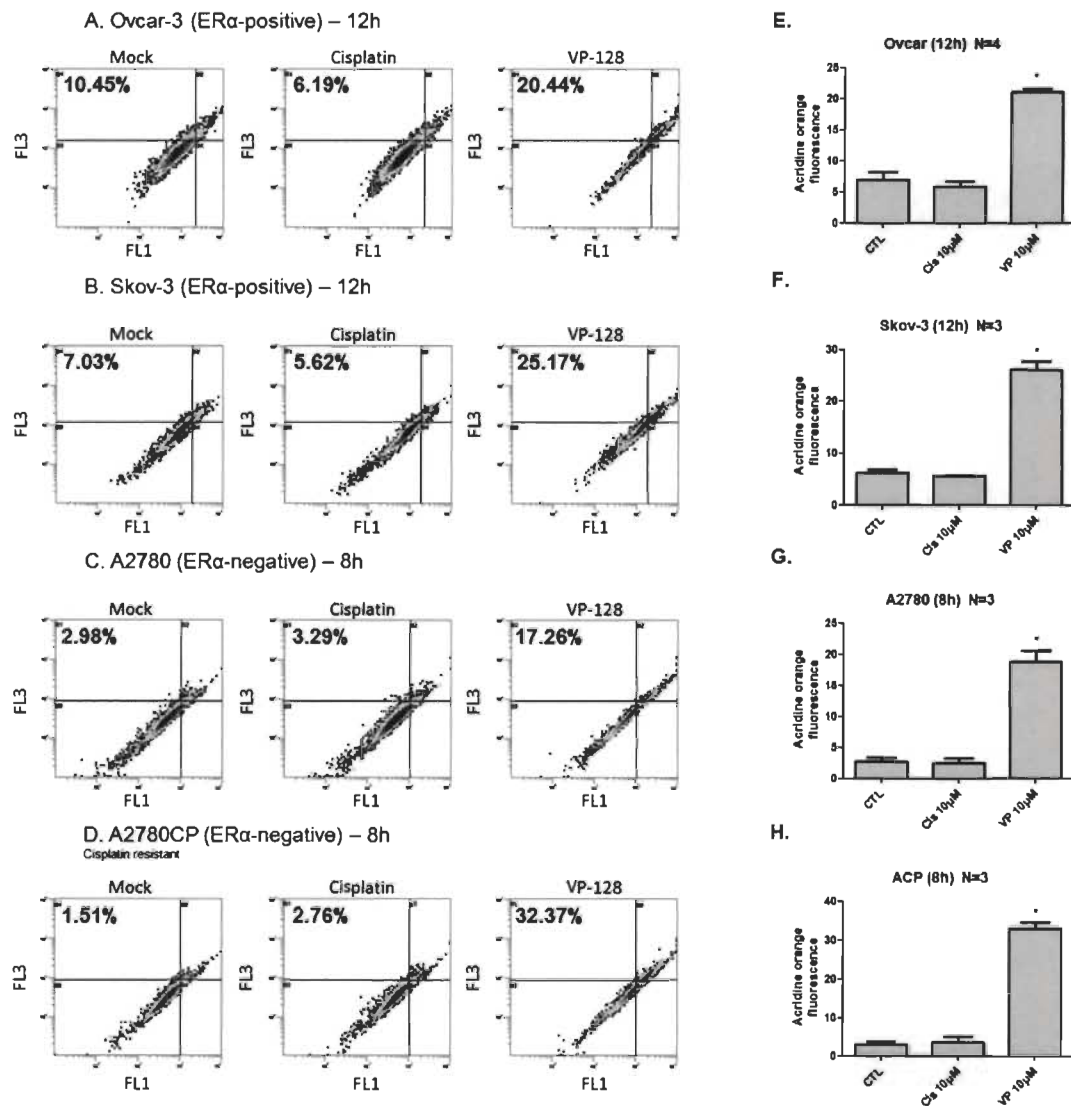


Figure 2.5 Formation of AVOs in VP-128 treated ovarian cancer cells. Ovarian cancer cell lines (A) Ovar-3, (B) Skov-3 (ER α -positive) and (C)(D) A2780/CP (ER α -negative) were treated with 10 μ M Cisplatin or VP-128 for 12 h (A)(B) or 8 h (C)(D). Green(FL1) and red(FL3) fluorescence from acridine orange staining was detected by FACS analysis. Results shown are representative of three independent experiments.

Following this analysis, we observed the expression of Beclin-1 and LC3B. Beclin-1 and LC3B are proteins related to formation of autophagosome leading eventually to autophagy (42). LC3B I is related to the formation of the autophagosome by converting its LC3B-I form to LC3B-II through lipidation of the protein. Our results showed that Beclin-1 protein level decreased lightly after VP-128 treatment in some cell

lines, but not significantly (Figure 2.6A-B-C-D). Nonetheless, VP-128 highly increased the level of LC3B-II for all cell lines (4-25x) (Figure 2.6A-B-C-D) indicating formation of autophagosome leading to autophagy. LC3B-II increase correlated with decrease of LC3B-I form in all ovarian cancer cells treated with VP-128 (Figure 2.6A-B-C-D). Conversion of LC3B-I to LC3B-II after treatment with VP-128 suggests that autophagy is induced in these ovarian cancer cells treated with VP-128 and is in agreement with the formation of AVOs (Figure 2.5).

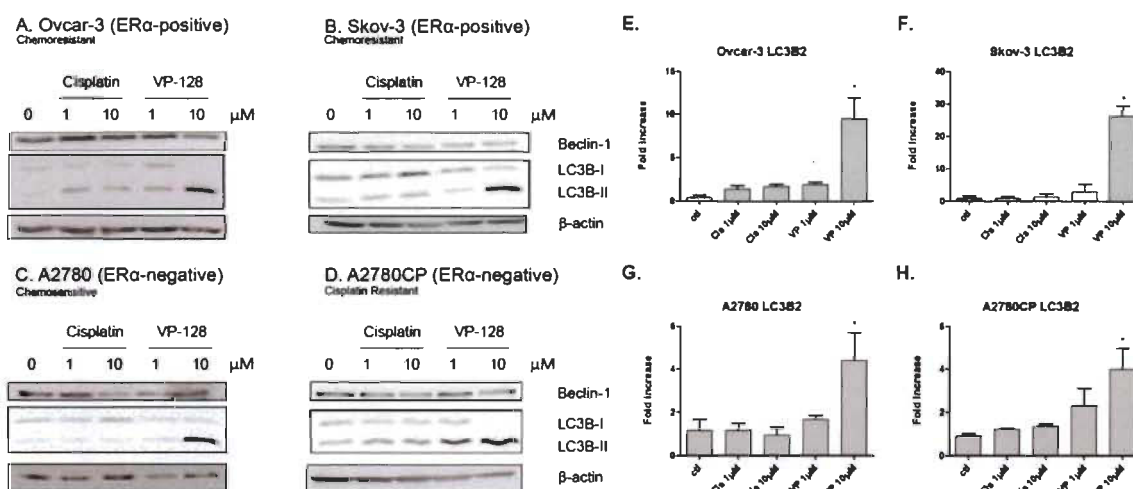


Figure 2.6 VP-128 activates autophagosome mechanisms in ovarian cancer cells in vitro.

Ovarian cancer cell lines (A) Ovarcar-3, (B) Skov-3 (ER α -positive) and (C)(D) A2780/CP (ER α -negative) were treated with increasing concentrations of VP-128 or Cisplatin (0, 1 or 10 μ M) for 12 h. The levels of autophagosome –specific proteins Beclin -1 and LC3B-I/II were determined in treated cells using western blot analysis. β -Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. (E-H) Densitometry of LC3B-II normalized with β -Actin on ovarian cancer cell lines. Results are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments. *P < 0.05 compared with corresponding mock-treated cells.

AKT and mTor pathways are involved in VP-128 induced-autophagy

It has been reported previously that AKT and mTor pathways regulate negatively autophagy (43). mTor regulates it directly while PI3K/AKT pathway is an upstream

regulator of mTor (44). We decided to analyse these regulators of autophagy by Western blot (Figure 2.7). All ovarian cancer cell lines treated with VP-128 showed decrease of phosphorylated (active) AKT and mTor (Figure 2.7A-B-C-D). Ovar-3 and Skov-3 cancer cells did not showed a significant decrease of p-AKT (Figure 2.7E-F) probably because of their resistance to chemotherapy on a short time period. Total AKT level is also decreased suggesting that it consequently decrease p-AKT level (Figure 2.7A-B-C-D). Total mTor decreased in Skov-3, A2780 and A2780CP (Figure 2.7B-C-D) suggesting again its relation with decrease of p-mTor. Downregulation of these pathways correlated with induction of autophagy by VP-128 in ovarian cancer cells. Cisplatin did not decrease level of AKT and mTor proteins also suggesting that VP-128 may acts faster than cisplatin (45, 46).

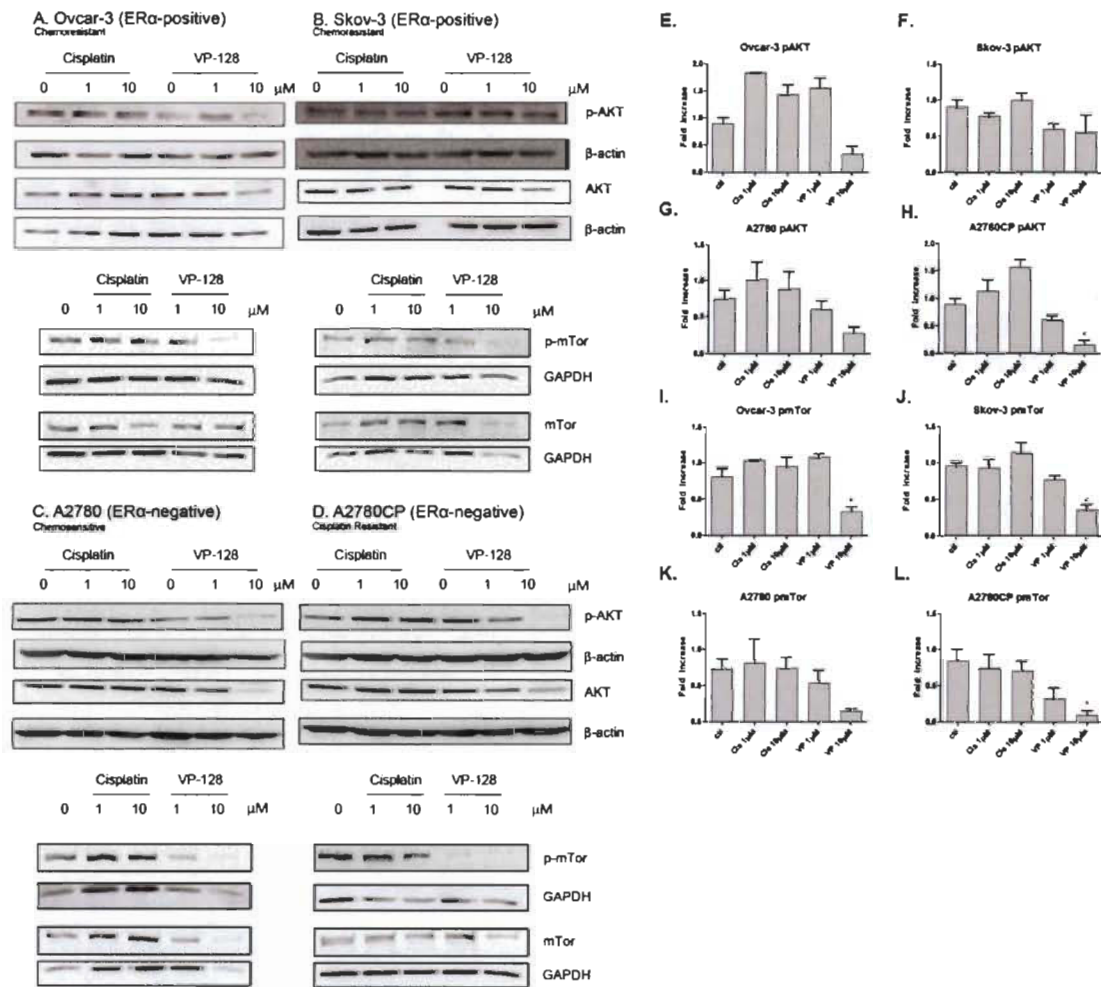


Figure 2.7 VP-128 inhibits Akt/mTor pathways to induce apoptosis and autophagy mechanisms.

Ovarian cancer cell lines (A) Ovarcar-3, (B) Skov-3 (ERα-positive) and (C)(D) A2780/CP (ERα-negative) were treated with increasing concentrations of VP-128 or Cisplatin (0, 1 or 10 μM) for 12 h. The levels of phosphorylation/activity of AKT and mTor were determined in treated cells using Western blot analysis. β-Actin and GAPDH were used as loading controls. Results shown are representative of three independent experiments. (E-L) Densitometry of p-AKT (normalized with β-Actin) and p-mTor (normalized with GAPDH) on ovarian cancer cell lines. Results are mean ± S.E.M. of three independent experiments. *P < 0.05 compared with corresponding mock-treated cells.

Inhibition of autophagy improve VP-128 efficiency

Autophagy occurring in cancer cells may either induce cytoprotection or cell death depending on various factors (47). Our results showed that autophagy is induced in

ovarian cancer cells treated with VP-128 (Figure 2.5-Figure 2.6-Figure 2.7) and we wanted to know if the autophagy induced by our hybrid is either promoting cell survival or cell death. We decided to use chloroquine diphosphate salt, a lysosomotropic agent capable of inhibiting autophagy of cancer cells. By inhibiting autophagy via pre-treatment of cells with chloroquine, we observed an increase of 10-20% apoptosis induced to Skov-3 cells treated for 12 h (Figure 2.8A) or A2780 cells treated for 8 h (Figure 2.8B). This increase of apoptosis after inhibition of autophagy indicates a chemoprotective effect of autophagy induced by VP-128. To further investigate, we also looked at markers of apoptosis, cleaved caspase 3;9 and cleaved PARP, by western blot analysis (Figure 2.8C-D). We can observe a light increase of these markers when we pre-treated cancer cells with chloroquine in combination with VP-128. To confirm induction of autophagy by VP-128 and its inhibition by chloroquine, we analysed LC3B-II by western blot analysis (Figure 2.8C-D). Without using chloroquine, only cells treated with VP-128 showed an increase of LC3B-II. By doing pre-treatment with chloroquine, accumulation of LC3B-II is observable in mock, cisplatin and VP-128 treated ovarian cancer cells indicating its incapacity to degrade autophagosomes thus confirming the inhibition. Chloroquine inhibits autophagy at his late phase after the formation of autophagosomes by targeting lysosomal degradation explaining the accumulation of LC3B-II in the western blotting experiment (48-50).

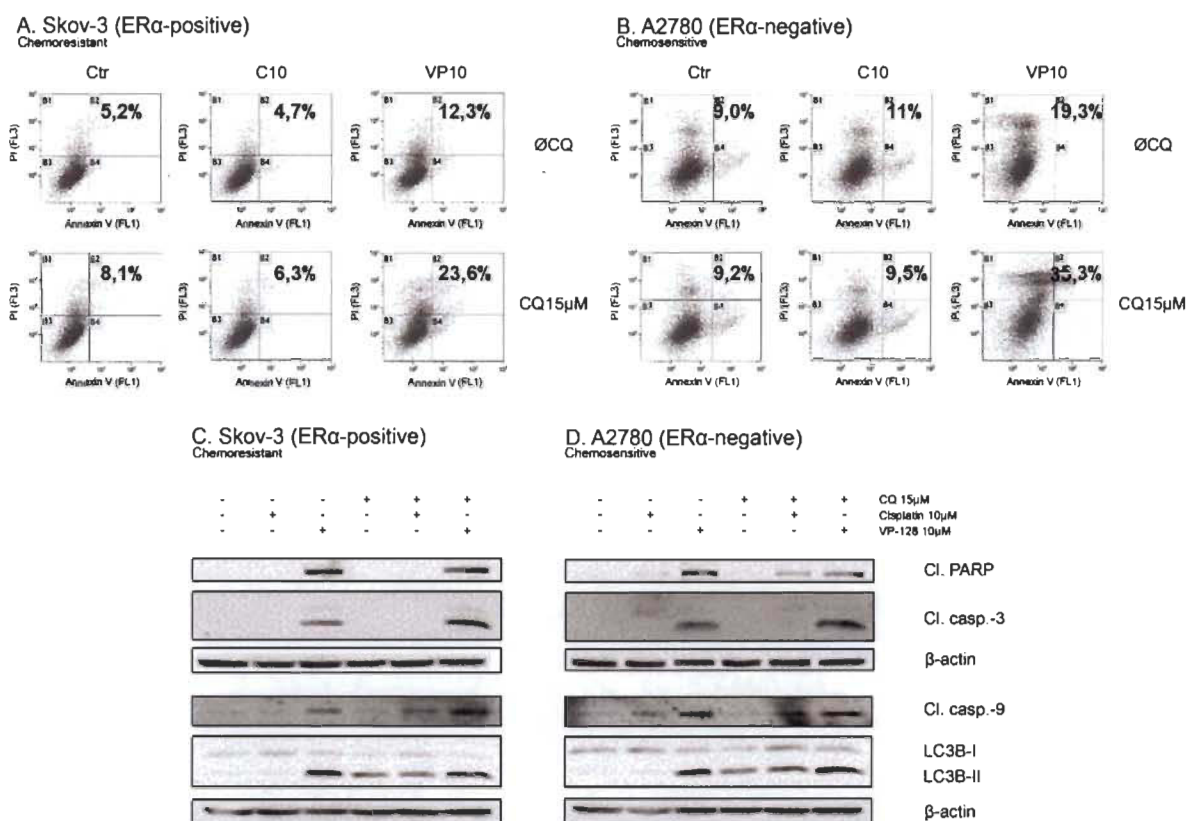


Figure 2.8 Inhibition of autophagy enhances VP-128 toxicity.

Ovarian cancer cell lines (A)(C) Skov-3 (ER α -positive) and (B)(D) A2780 (ER α -negative) were treated with VP-128 or Cisplatin (0 or 10 μ M) for 12 h (A)(C) or 8 h (B)(D). (A-B) Annexin V and PI staining was detected by FACS analysis. (C-D) The levels of proteins were determined in treated cells using western blot analysis. β -Actin was used as loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

Discussion

Our previous study revealed that VP-128 has selectivity toward hormone-dependent breast cancer cell lines and higher antitumor activity in vitro and in vivo than its reference compound, cisplatin (28, 51). In this study, we have investigated if VP-128 was also efficient and more potent than cisplatin against another potential hormone-dependent cancer, ovarian cancer. We chose to use 10 μ M of cisplatin based on previous publications from our laboratory (28, 52, 53). To better compare the effect of VP-128 with its base compound, cisplatin, we decided to use the same molar concentration during treatments considering the presence of a single coordinated platinum molecule in

both compounds. We have verified the antitumor activity of VP-128 *in vitro* and our hybrid was once again more efficient than cisplatin to induce apoptosis in ER α + but also in ER α - ovarian cancer cell lines. We have previously shown that VP-128 has more affinity for ER α than cisplatin (26) leading to selectivity toward hormone dependent cancer cells such as breast cancer cells (28). Indeed, transiently transfected ER α + ovarian cancer cell line A2780 has shown an increase in apoptotic index in response to VP-128 compared to cisplatin. The same event happens in the SKOV-3 shRNA ER α (ER α -) ovarian cancer cell line where VP-128 apoptotic activity decreases more than 2 fold when its target (ER α) is knocked down. This high efficiency in presence of our drug target (ER α) might be explained by the use of ER α which translocate to the nucleus once linked with E₂-ligand (9, 10). Transportation of the drug to the nucleus using E₂-ligand improves VP-128 ability to bind to DNA and also activate proliferation mechanisms then leading to apoptosis because of the platinum portion (14, 28). However, in absence of its target (ER α) in empty ER α - ovarian cancer cells lines A2780 and SKOV-3 shRNA ER α , VP-128 is less efficient but still active and this may be a consequence of an easier diffusion of VP-128 through the cell membrane due to the presence of a steroid moiety (54, 55). By passing through the membrane, the VP-128 acts just like cisplatin as a normal platinum compound without binding to the estrogen receptor alpha. Another possible explanation is the presence of ER β in A2780 ovarian cancer cells (56). Indeed, the estrogen ligand part of our hybrid also has attraction for the receptor sites on ER β (26). However, it is important to consider that hormone-dependent cancer mainly overexpress ER α which is our primary target (4, 6, 7). Overall, VP-128 was more potent than cisplatin to induce apoptosis in ovarian cancer cells *in vitro* and presence of our target (ER α) greatly improved its efficiency.

We have also tested VP-128 antitumour activity *in vivo* using xenografts from ovarian cancer cells (Ovcar-3 ER α +, A2780 ER α - and A2780CP ER α -). 5 mg/kg is a typical dose of cisplatin used for treating tumors in nude mice (57-59) and we decided to convert it into mmol/kg because of the different molecular weight that cisplatin (300,06 g/mol) and VP-128 (812,33 g/mol) does have to better compare their efficiency *in vivo*. The concentration of 0,00615 mmol/kg was also the dose used in our previous

publication of VP-128 on breast cancer (28). VP-128 and cisplatin were able to similarly stop the growth of xenografts from sensitive ER α - ovarian cancer cells, A2780. Growth of xenografts from resistant ER α - ovarian cancer cells A2780CP were stopped more efficiently with VP-128 when compared with cisplatin. Again, VP-128 was effective against cisplatin resistance, even *in vivo*. More interestingly, contrary to cisplatin, VP-128 was strong enough to significantly lower tumor size of ER α + ovarian cancer cells Ovar-3. No additional side effect, when compared with cisplatin at the same concentration, was observed following the idea of lowering side effects of chemotherapy via targeting toward cancer cells. This improved antitumor activity toward ER α + xenografts with VP-128, compared with cisplatin, supports the idea of an ER α -dependent mode of action which is effective against hormone-dependent tumours as it was previously demonstrated for hormone-dependent breast cancer xenografts (28). High selectivity toward ER α + cancer cells *in vivo* and less selectivity *in vitro* might be associated to E₂-induced proliferation mechanisms from endogenous E₂ in ER α + xenografts (60, 61). ER α + xenografts are estrogen-dependent and VP-128 might compete for its receptor because of the 17 β -estradiol portion of the drug. Contrary to ER α + xenografts, ER α - xenografts do not require E₂-induced proliferation and then, VP-128 does not compete with E₂ for the receptor. It is also important to take into consideration cancer cells resistance to cisplatin where A2780 (ER α -) is chemosensitive and A2780CP (ER α -), Ovar-3 (ER α +) are chemoresistant. VP-128 was still capable to reduce tumour size of cisplatin-resistant Ovar-3 (ER α +) xenografts, stop tumour growth of cisplatin-resistant A2780CP (ER α -) more efficiently than cisplatin and stop the growth of the cisplatin-sensitive A2780 (ER α -) similarly than cisplatin suggesting again selectivity toward hormone-dependent ovarian cancer and capacity to overcome cisplatin resistance. Nonetheless, the antitumor activity of VP-128 was improved in ER α + ovarian cancer cells *in vivo*.

Noteworthy, VP-128 seemed to be able to overcome cisplatin resistance in the three resistant cancer cell lines studied (Ovar-3, Skov-3 and A2780CP) *in vitro* by inducing high level of cleaved caspase-3, -9 and PARP long before cisplatin. Same thing occurs *in vivo* by reducing tumor size efficiently in hormone-dependent Ovar-3

xenografts (ER α +) and being more efficient than cisplatin with A2780CP xenografts (ER α -). In the literature, it has been shown that cisplatin resistance might be related to exportation of the drug outside the cells via efflux pumps and membrane transporters (62, 63). Resistant ovarian cancer cell line A2780CP have an increased efflux rate of cisplatin related to the increased protein concentration of ATPase transporter (ATP7A and ATP7B) (62). The addition of a steroid portion (E₂) on our hybrid, VP-128, makes our drug larger and this may interfere with the efflux pumps mechanism by being unable to be exported outside of the resistant ovarian cancer cells.

We have studied previously if estradiol-platinum(II) hybrids family interacts with DNA similarly to cisplatin. We confirmed that the hybrid could bind DNA duplex by H-bonding network and guanine N7 sites similarly to cisplatin (64). We also made preliminary pharmacokinetics experiment in vivo in our laboratory and results showed that VP-128 seemed to be stable and was cleared similarly to cisplatin drug after analysing blood samples at different time (0-6 h) after the administration of cisplatin/VP-128 to nude mice (Data not shown). To further examine VP-128 mechanism of action, we decided to study its ability to induce caspase-dependent apoptosis. After only 12 h of treatment, VP-128 could already activate caspase pathways (Cl.Casp 3, Cl.Casp 9 and Cl.Parp) whereas cisplatin only induce slight increase of these apoptotic markers (65). This indicates that VP-128 had a faster rate of apoptosis induction than cisplatin using the same concentration for both drugs. VP-128 acts differently than cisplatin by inducing caspase-independent apoptosis in ER α - breast cancer cells by releasing AIF from the mitochondria and then translocating it to the nucleus (28). Again, in ovarian cancer cells, releases of AIF and accumulation to the nucleus have only occurred in ER α - cell line, A2780, after treatment with VP-128 whereas cisplatin did not. Since our hybrid can bind ER β with good affinity (26) and that ER α - cancer cell lines (A2780) have a high ratio of ER β over ER α , the estradiol portion of our hybrid might contribute to the release of AIF (66, 67) to induce caspase-independent apoptosis. This shows that VP-128 acts via different apoptosis mechanisms in presence and absence of ER α .

Our present study indicates that VP-128 also induced autophagy in ovarian cancer cells. An increase in autophagic vesicular organelles (AVOs) and LC3B-II form occurred after treating cancer cells with VP-128 indicating the formation of autophagosome which lead to autophagy (42). We have also investigated another marker of autophagy, Beclin-1, which seemed to be slightly downregulated after treatment with VP-128. Beclin-1 is a protein responsible for the initiation of autophagosome formation involved earlier than LC3B in the process of autophagy (68). It has been previously shown that autophagy is one of the initial responses of cancer cells under survival condition. Severe stress induced to the cells will then inhibit autophagy by cleaving proteins such as Beclin-1 leading to apoptosis (69, 70). The results obtained suggest that Beclin-1 might be cleaved by caspases such as caspase-3 (71) after 12 h of treatment on cancer cells. Caspase-3 was cleaved after 12 h of treatment following this hypothesis suggesting that VP-128 induces autophagy followed by apoptotic cell death in ovarian cancer cells. We finally explored pathways related to autophagy directly (mTor) and indirectly (AKT) in order to verify if these were regulated negatively to induce autophagy (43). Our results showed that these pathways were inhibited in almost all ovarian cancer cell lines favouring autophagy induction. Including our hybrid VP-128, several pharmaceuticals drugs induce high amount of autophagy in cancer cells *in vitro*, including ER α antagonist Tamoxifen (72) and our base compound cisplatin (17). Autophagy induced by these antitumor compounds thus favor chemoresistance in cancer cells (73). We confirmed that this theory correlates with VP-128 actions because we found out by inhibiting autophagy that VP-128 cytotoxicity was improved indicating the chemoprotective effect of autophagy. Autophagy inhibition sensitizes cancer cells and many publications are showing improvement of drug efficiency when combined with an inhibitor of autophagy such as chloroquine (20, 74). Apoptosis and autophagy mechanisms can be both activated by similar stressor such as chemotherapeutics drugs. By activating both these processes, some kind of inhibitory crosstalk occurs against each other and one of these two mechanisms will dominate (47). Thus, using an autophagy inhibitor in combination with VP-128 could be used at our advantage to sensitize ovarian cancer cells and increase apoptosis.

In conclusion, the ability of the VP-128 to overcome chemoresistance and to surpass cisplatin for the treatment of hormone-dependent (ER α +) ovarian cancer cells in vivo and in vitro demonstrates the interesting potential of our E₂-platinum(II) hybrid as an anticancer agent. The fact that VP-128 does not increase cytotoxicity in vivo when compared with its reference compound cisplatin also highlights the therapeutic value of our hybrid. We have also shown that VP-128 does not only induce apoptosis but also autophagy. Combining VP-128 with an autophagy inhibitor could increase the benefit of this new and selective chemotherapeutic hybrid. This study demonstrates the potential of VP-128 to be used with many hormone-dependent feminine cancers (28).

Acknowledgements

K Brasseur was holder of master scholarship from Réseau Québécois en Reproduction (RQR), Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR). C Descoteaux Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) scholarship is also gratefully acknowledged. We would like to thank Gabriel Chateaufneuf for technical assistance.

References

1. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA 2000 Cancer statistics, 2000. CA: A Cancer Journal for Clinicians 50:7-33.
2. Lazennec G 2006 Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. Cancer Letters 231:151-157.
3. Ahmad N, Kumar R 2011 Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics. Cancer Letters 300:1-9.
4. Issa RM, Lebeau A, Grob T, Holst F, Moch H, Terracciano L, Choschzick M, Sauter G, Simon R 2008 Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer. Mod Pathol 22:191-196.
5. Sommer S, Fuqua SAW 2001 Estrogen receptor and breast cancer. Seminars in Cancer Biology 11:339-352.

6. Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T 1998 Differential expression of estrogen receptor- α and - β messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 58:5367-5373.
7. Cunat S, Hoffmann P, Pujol P 2004 Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 94:25-32.
8. Wray S, Noble K 2008 Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones. *J Neuroendocrinol* 20:451-461.
9. Dauvois S, White R, Parker MG 1993 The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106 (Pt 4):1377-1388.
10. Lee H, Bai W 2002 Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* 22:5835-5845.
11. Pearce ST, Jordan VC 2004 The biological role of estrogen receptors [α] and [β] in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 50:3-22.
12. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, Bevers TB, Kavanah MT, Atkins JN, Margolese RG, Runowicz CD, James JM, Ford LG, Wolmark N 2005 Tamoxifen for the Prevention of Breast Cancer: Current Status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute* 97:1652-1662.
13. Helm CW, States JC 2009 Enhancing the efficacy of cisplatin in ovarian cancer treatment - could arsenic have a role. *Journal of Ovarian Research* 2:2.
14. Wang D, Lippard SJ 2005 Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307-320.
15. Ahmad S 2010 Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 7:543-566.
16. Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y, Arihiro K 2006 The role of apoptotic or nonapoptotic cell death in determining cellular response to anticancer treatment. *European Journal of Surgical Oncology* 32:269-277.
17. Fanzani A, Zanola A, Rovetta F, Rossi S, Aleo MF 2011 Cisplatin triggers atrophy of skeletal C2C12 myotubes via impairment of Akt signalling pathway and subsequent increment activity of proteasome and autophagy systems. *Toxicology and Applied Pharmacology* 250:312-321.

18. Guo X-l, Li D, Hu F, Song J-r, Zhang S-s, Deng W-j, Sun K, Zhao Q-d, Xie X-q, Song Y-j, Wu M-c, Wei L-x 2012 Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Letters* 320:171-179.
19. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A 2006 Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ* 14:500-510.
20. Xu Y, Yu H, Qin H, Kang J, Yu C, Zhong J, Su J, Li H, Sun L 2012 Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. *Cancer Letters* 314:232-243.
21. Zhang Y, Cheng Y, Ren X, Zhang L, Yap KL, Wu H, Patel R, Liu D, Qin Z-H, Shih I-M, Yang J-M 2011 NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response.
22. Chirino YI, Pedraza-Chaverri J 2009 Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 61:223-242.
23. Piccart MJ, Lamb H, Vermorken JB 2001 Current and future potential roles of the platinum drugs in the treatment of ovarian cancer. *Ann Oncol* 12:1195-1203.
24. Screnci D, McKeage MJ 1999 Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches. *J Inorg Biochem* 77:105-110.
25. Khynriam D, Prasad SB 2001 Hematotoxicity and blood glutathione levels after cisplatin treatment of tumor-bearing mice. *Cell Biol Toxicol* 17:357-370.
26. Descoteaux C, Leblanc V, Belanger G, Parent S, Asselin E, Berube G 2008 Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum(II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta. *Steroids* 73:1077-1089.
27. Perron V, Rabouin D, Asselin E, Parent S, R CG, Berube G 2005 Synthesis of 17beta-estradiol-linked platinum(II) complexes and their cytotoxic activity on estrogen-dependent and -independent breast tumor cells. *Bioorg Chem* 33:1-15.
28. Van Themsche C, Parent S, Leblanc V, Descoteaux C, Simard AM, Berube G, Asselin E 2009 VP-128, a novel oestradiol-platinum(II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo. *Endocr Relat Cancer* 16:1185-1195.

29. Chang C-y, Norris JD, Grøn H, Paige LA, Hamilton PT, Kenan DJ, Fowlkes D, McDonnell DP 1999 Dissection of the LXXLL Nuclear Receptor-Coactivator Interaction Motif Using Combinatorial Peptide Libraries: Discovery of Peptide Antagonists of Estrogen Receptors α and β . *Molecular and Cellular Biology* 19:8226-8239.
30. Day JM, Purohit A, Tutill HJ, Foster PA, Woo LWL, Potter BVL, Reed MJ 2009 The Development of Steroid Sulfatase Inhibitors for Hormone-Dependent Cancer Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1155:80-87.
31. Brayton C 2009 Spontaneous Diseases in Commonly Used Mouse Strains/Stocks. Available at: <http://www.hopkinsmedicine.org/mcp/PHENOCORE/CoursePDFs/09s1BraytonMouseDzOutline75p.pdf>; Accessed March 2013.
32. Giovanella BC, Fogh J 1985 The nude mouse in cancer research. *Advances in cancer research* 44:69-120.
33. Sharkey FE, Fogh J 1979 Incidence and Pathological Features of Spontaneous Tumors in Athymic Nude Mice. *Cancer Research* 39:833-839.
34. Pak JH, Choi WH, Lee HM, Joo W-D, Kim J-H, Kim Y-T, Kim Y-M, Nam J-H 2011 Peroxiredoxin 6 Overexpression Attenuates Cisplatin-Induced Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells. *Cancer Investigation* 29:21-28.
35. Asselin E, Mills GB, Tsang BK 2001 XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-dependent Cleavage during Cisplatin-induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells. *Cancer Research* 61:1862-1868.
36. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M 1999 Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in apoptosis: caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *Journal of Biological Chemistry* 274:22932-22940.
37. Yang Y, Zhao S, Song J 2004 Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor β 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36:223-234.
38. Yang X, Fraser M, Abedini MR, Bai T, Tsang BK 2008 Regulation of apoptosis-inducing factor-mediated, cisplatin-induced apoptosis by Akt. *Br J Cancer* 98:803-808.

39. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G 2000 Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters* 476:118-123.
40. Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP 2008 Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 294:F777-F787.
41. Le X-F, Mao W, Lu Z, Carter BZ, Bast RC 2010 Dasatinib induces autophagic cell death in human ovarian cancer. *Cancer* 116:4980-4990.
42. Oh S-Y, Choi S-J, Kyung Hee Kim, Cho E, Kim J-H, Roh C-R 2008 Autophagy-Related Proteins, LC3 and Beclin-1, in Placentas From Pregnancies Complicated by Preeclampsia. *Reproductive Sciences* 15:912-920.
43. Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y 2007 Evidence That Curcumin Suppresses the Growth of Malignant Gliomas in Vitro and in Vivo through Induction of Autophagy: Role of Akt and Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathways. *Molecular Pharmacology* 72:29-39.
44. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen C-C, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N 2005 Akt Activates the Mammalian Target of Rapamycin by Regulating Cellular ATP Level and AMPK Activity. *Journal of Biological Chemistry* 280:32081-32089.
45. Kaushal GP, Kaushal V, Herzog C, Yang C 2008 Autophagy delays apoptosis in renal tubular epithelial cells in cisplatin cytotoxicity. *Autophagy* 4:710-712.
46. Claerhout, Sofie, Verschooten, Lien, Kelst V, Vos D, Rita, Proby, Charlotte, Agostinis, Patrizia, Garmyn, Marjan 2010 Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma. Hoboken, NJ, Etats-Unis: Wiley-Blackwell.
47. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G 2007 Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:741-752.
48. Sasaki K, Tsuno N, Sunami E, Tsurita G, Kawai K, Okaji Y, Nishikawa T, Shuno Y, Hongo K, Hiyoshi M, Kaneko M, Kitayama J, Takahashi K, Nagawa H 2010 Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer* 10:370.

49. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB 2007 Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation* 117:326-336.
50. Maclean KH, Dorsey FC, Cleveland JL, Kastan MB 2008 Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 118:79-88.
51. Descoteaux C, Provencher-Mandeville J, Mathieu I, Perron V, Mandal SK, Asselin E, Berube G 2003 Synthesis of 17 β -estradiol platinum(II) complexes: biological evaluation on breast cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett* 13:3927-3931.
52. Gagnon V, Mathieu I, Sexton E, Leblanc K, Asselin E 2004 AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol* 94:785-795.
53. Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E 2008 Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 13:259-271.
54. Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B 1998 Rapid insulintropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. *The FASEB Journal* 12:1341-1348.
55. Oren I, Fleishman SJ, Kessel A, Ben-Tal N 2004 Free diffusion of steroid hormones across biomembranes: a simplex search with implicit solvent model calculations. *Biophysical journal* 87:768-779.
56. O'Donnell AJM, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP 2005 Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-Related Cancer* 12:851-866.
57. Li D, Williams JI, Pietras RJ 2002 Squalamine and cisplatin block angiogenesis and growth of human ovarian cancer cells with or without HER-2 gene overexpression. *Oncogene* 21:2805-2814.
58. Johnsson A, Wennerberg J 1999 Amifostine as a Protector against Cisplatin-induced Toxicity in Nude Mice. *Acta Oncologica* 38:247-253.

59. Anderson K, Lawson KA, Simmons-Menchaca M, Sun L, Sanders BG, Kline K 2004 α -TEA Plus Cisplatin Reduces Human Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cell Tumor Burden and Metastasis. *Experimental Biology and Medicine* 229:1169-1176.
60. Dubik D, Dembinski TC, Shiu RPC 1987 Stimulation of c-myc Oncogene Expression Associated with Estrogen-induced Proliferation of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 47:6517-6521.
61. Spillman MA, Manning NG, Dye WW, Sartorius CA, Post MD, Harrell JC, Jacobsen BM, Horwitz KB 2010 Tissue-specific pathways for estrogen regulation of ovarian cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 70:8927-8936.
62. Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, Kuo Y-M, Rochdi M, Howell SB 2002 Acquisition of Resistance to Cisplatin Is Accompanied by Changes in the Cellular Pharmacology of Copper. *Cancer Research* 62:6559-6565.
63. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen Z-S, Terada K, Furukawa T, Yang X-L, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S-i 2000 Copper-transporting P-Type Adenosine Triphosphatase (ATP7B) Is Associated with Cisplatin Resistance. *Cancer Research* 60:1312-1316.
64. N'Soukpoe-Kossi CN, Descoteaux C, Asselin E, Tajmir-Riahi HA, Berube G 2008 DNA interaction with novel antitumor estradiol-platinum(II) hybrid molecule: a comparative study with cisplatin drug. *DNA Cell Biol* 27:101-107.
65. Henkels KM, Turchi JJ 1999 Cisplatin-induced Apoptosis Proceeds by Caspase-3-dependent and -independent Pathways in Cisplatin-resistant and -sensitive Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Research* 59:3077-3083.
66. Soldati R, Wargon V, Cerliani J, Giulianelli S, Vanzulli S, Gorostiaga M, Bolado J, do Campo P, Molinolo A, Vollmer G, Lanari C 2010 Inhibition of mammary tumor growth by estrogens: is there a specific role for estrogen receptors alpha and beta? *Breast Cancer Research and Treatment* 123:709-724.
67. Zeng Q, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, van Hasselt CA 2008 The contributions of oestrogen receptor isoforms to the development of papillary and anaplastic thyroid carcinomas. *The Journal of Pathology* 214:425-433.
68. Gao P, Bauvy C, Souquère S, Tonelli G, Liu L, Zhu Y, Qiao Z, Bakula D, Proikas-Cezanne T, Pierron G, Codogno P, Chen Q, Mehrpour M 2010 The Bcl-2 Homology Domain 3 Mimetic Gossypol Induces Both Beclin 1-dependent and Beclin 1-independent Cytoprotective Autophagy in Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 285:25570-25581.

69. Cho D-H, Jo YK, Hwang JJ, Lee YM, Roh SA, Kim JC 2009 Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Letters* 274:95-100.
70. Zhu Y, Zhao L, Liu L, Gao P, Tian W, Wang X, Jin H, Xu H, Chen Q 2010 Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein Cell* 1:468-477.
71. Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De Rycke R, Verspurten J, Declercq W, Agostinis P, Vanden Berghe T, Lippens S, Vandenabeele P 2010 Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death and Dis* 1:e18.
72. Qadir M, Kwok B, Dragowska W, To K, Le D, Bally M, Gorski S 2008 Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Research and Treatment* 112:389-403.
73. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio J-M, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G 2009 Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793:1524-1532.
74. Sotelo J, Briceño E, López-González M 2006 Adding Chloroquine to Conventional Chemotherapy and Radiotherapy for Glioblastoma Multiforme. *Annals of Internal Medicine* 144:1-31.

Le chapitre III contient une étude démontrant l'efficacité antitumorale d'une toxine bactérienne pouvant être cytotoxique seulement contre des cellules cancéreuses, et ce, par des mécanismes d'apoptose.

CHAPITRE III

PARASPORIN-2 FROM A NEW *BACILLUS THURINGIENSIS* 4R2 STRAIN INDUCES CASPASES ACTIVATION AND APOPTOSIS IN HUMAN CANCER CELLS

Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté JC, Sirois M.

Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. PloS one. 2015 Aug 11;10(8):e0135106.

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue PLOS ONE le 11 août 2015. Il s'agit d'une revue cotée avec un facteur d'impact de 3,70 (5-ans) utilisant un processus d'examen par les pairs.

3.1 Contribution des auteurs

Kevin Brasseur est co-premier auteur de l'article avec l'étudiant à la maîtrise Pascal Auger. Kevin Brasseur a effectué la forte majorité des expérimentations, plus particulièrement au niveau de l'oncologie, ainsi que la rédaction du manuscrit qui y est relié. Pascal Auger a fait les expérimentations du domaine de la microbiologie ainsi que la rédaction du manuscrit qui y est relié. Sophie Parent, assistante de recherche de l'équipe de laboratoire, a fait quelques manipulations et aidé à la mise au point de protocoles. Jean-Charles Côté est un chercheur collaborateur pour la souche bactérienne utilisée. Marc Sirois est le directeur de recherche de Pascal Auger, superviseur de ce manuscrit et responsable de la production de la toxine bactérienne parasporine-2. Éric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et superviseur de ce manuscrit.

3.2 Résumé de l'article (français)

Des études antérieures ont démontré que la toxine bactérienne parasporine-2Aa1, isolée à l'origine de la souche *Bacillus thuringiensis* A1547, était cytotoxique spécifiquement contre des cellules cancéreuses humaines.

Dans la présente étude, nous avons constaté que l'activation par la protéinase K de la protéine parasporine-2Aa1, isolée à partir d'une nouvelle souche de *B. thuringiensis* 4R2, était spécifiquement cytotoxique pour les cellules cancéreuses de l'endomètre, du côlon, du foie, du col utérin, du sein et de la prostate. Aucune cytotoxicité n'a été observée contre des cellules humaines normales. Lors du traitement de la parasporine-2Aa1 activée par la protéinase K, des modifications morphologiques associées à la mort par apoptose ont été observées. Suite aux traitements avec la parasporine-2Aa1, des analyses par immunobuvardage de type Western ont révélé le clivage de la poly (ADP-ribose) polymérase, la caspase-3 et de la caspase-9 exclusivement dans des lignées de cellules cancéreuses, marqueurs biochimiques de l'apoptose. Des analyses par cytométrie en flux, utilisant de l'iodure de propidium et de l'annexin V, ainsi qu'un dosage de l'activation des caspases 3/7 ont confirmés que la mort cellulaire observée était en partie due aux mécanismes de l'apoptose, un aspect qui était encore inconnu à ce jour. D'autres analyses ont été réalisées pour étudier des voies de survie cellulaires, incluant les protéines AKT, XIAP, ERK1/2 et Par-4, une protéine connue pour induire l'apoptose. Des inhibiteurs associés aux voies de survies ont ensuite été utilisés et ont permis de sensibiliser davantage nos cellules à la toxine dans l'optique d'une utilisation pour la thérapie combinée.

Ces résultats indiquent que la parasporine-2Aa1 est une protéine cytotoxique sélective qui induit l'apoptose dans différentes lignées cancéreuses humaines provenant de divers tissus. Les résultats obtenus sont prometteurs pour une éventuelle utilisation en clinique.

3.3 Article complet (anglais) : Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells

Abstract

In previous studies, parasporin-2Aa1, originally isolated from *Bacillus thuringiensis* strain A1547, was shown to be cytotoxic against specific human cancer cells but the mechanisms of action were not studied. In the present study, we found that proteinase K activated parasporin-2Aa1 protein isolated from a novel *B. thuringiensis* strain, 4R2, was specifically cytotoxic to endometrial, colon, liver, cervix, breast and prostate cancer. It showed no toxicity against normal cells. Upon treatment with proteinase K-activated parasporin-2Aa1, morphological changes were observed and western blot analysis revealed the cleavage of poly (ADP-Ribose) polymerase, caspase-3 and caspase-9 in cancer cell lines exclusively, indicative of programmed cell death, apoptosis. Flow cytometry analyses, using propidium iodide and annexin V, as well as a caspases 3/7 assay confirmed apoptosis induction. Further analyses were performed to study survival pathways, including AKT, XIAP, ERK1/2 and PAR-4, a known inducer of apoptosis. These results indicate that parasporin-2Aa1 is a selective cytotoxic protein that induces apoptosis in various human cancer cell lines from diverse tissues.

Introduction

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacterium that produces crystalline parasporal inclusions during sporulation. These inclusions are made of proteins, the δ -endotoxins. They are classified into two families, the crystal (Cry) and the cytolytic (Cyt) proteins encoded by the *cry* and *sit* genes, respectively [1, 2]. The Cry proteins have been extensively studied since 1970's owing to their specific insecticidal activities against lepidoptera, dipteran and coleopteran [3]. Upon ingestion by a susceptible insect, the parasporal inclusions are solubilized in the alkaline insect midgut, the Cry protoxins are released and then processed by midgut proteases to yield activated toxin proteins.

These bind to specific receptors located on the membrane of epithelial gut cells, leading to pore formation and ultimately to insect death [1, 4].

The successful development and use of *B. thuringiensis*-based formulations for the control of insect pests has led to the isolation of thousands of novel strains and hundreds of Cry proteins have now been characterized to various extents [5]. Several studies have shown that non insecticidal Cry proteins are more widely distributed than the insecticidal Cry proteins [6]. This led to the research of potentially novel biological activities from the non-insecticidal Cry proteins. Following a large screening, some non-insecticidal and non-hemolytic Cry proteins showed cytotoxic activity against human cancer cells and these new *B. thuringiensis* toxins were called parasporins [7, 8]. So far, six families of parasporins, PS1 – PS6, have been identified [9]. Each parasporin family exhibits specific spectrum and mechanism of action against human cancer cells.

Parasporin-2Aa1 (PS2Aa1, also classified Cry46Aa1) produced by *B. thuringiensis* serovar *dakota* strain A1547 has been intensively investigated for its toxic action in cancer cells [9-11]. When activated by proteinase K, PS2Aa1 is at least 400- fold more toxic for the human cancer cell line HepG2 (human hepatocyte cancer) than for the normal human cell line HC (human normal hepatocyte) and human cancer cell line HeLa (human uterine cervical cancer) [12]. In HepG2 cells, the monomeric toxin appears to bind to an unknown receptor protein located in the lipid raft [13]. Once linked to the receptor, PS2Aa1 oligomerizes to permeabilize the membrane leading to pore formation [11, 12]. A Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein appears to be involved for the efficient cytotoxic action of PS2Aa1 [13]. Pore formation results in alterations of the cytoskeletal structures, fragmentation of organelles, alterations of cell morphology such as cell swelling and finally cell lysis [11]. The mode of cell death appears to be non-apoptotic but this hypothesis was not confirmed [11-13]. Thus, additional characterisation of the intracellular events involved during induced- PS2Aa1 cell death was mandatory to confirm whether or not apoptosis was involved.

In this present study, an additional *B. thuringiensis* strain called *Bt* 4R2 which contain the gene encoding the Cry46Aa1 protein (PS2Aa1) has been studied to identify the mechanisms involved in cytotoxic-dependent cell death induction. We found that PS2Aa1 was very cytotoxic to many cancer cells *in vitro*. To further explore the mechanism using selected cancer cells from different tissue (HepG2-hepatocyte cancer, PC-3-prostate cancer and MCF-7-breast cancer) we found that apoptosis cell death was occurring via caspases and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage. We also found that PS2Aa1 shows very low toxicity to normal cell lines (IOSE-144, HIESC, HIEEC and MCF-10A).

We further support the hypothesis of apoptosis induction with identification of various survival pathway inhibition including AKT, XIAP, ERK1/2 and induction of the tumor suppressor p53 following treatment with PS2Aa1. We also found out that inhibiting the PI3K/AKT pathway in combination with the toxin increases, in a synergistic manner, the efficiency of PS2Aa1 to induce apoptosis in cancer cells. Thus, PS2Aa1 appears to be a cell-killing discriminating toxin regulating apoptosis in different human cancer cells.

Materials and methods

Bacterial strain and culture media

B. thuringiensis serovar *dakota* strain 4R2 was used in this study. It was obtained from the *Bacillus* Genetic Stock Center (Ohio State University, Columbus, OH, USA). Bacterial cells were grown at 30°C on nutrient agar from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA) at pH 7.1.

Cells and culture conditions

Human hepatocyte cancer cell line HepG2 (HB-8065), human prostate cancer cell line PC-3 (CRL-1435), human epithelial colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2

(HTB-37), human epithelial cervix adenocarcinoma cell line HeLa (CCL-2), human uterus endometrium adenocarcinoma cell line Hec-1A (HTB-112), human uterus endometrium adenocarcinoma cell line KLE (CRL-1622), human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB231(HTB-26), human breast cancer cell line MCF-7 (HTB-22), human non-tumorigenic epithelial cells MCF-10A (CRL-10317), human epithelial ovary adenocarcinoma cell line OVCAR-3 (HTB-161) and human epithelial ovary adenocarcinoma cell line SKOV-3 (HTB-77) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Human immortal non-tumorigenic ovarian surface epithelial cell line IOSE-144 was kindly provided by Dr. David Hunstman (British Columbia Cancer Research Center, Vancouver, BC, Canada). Human immortal endometrial stromal cells HIESC and Human immortal endometrial epithelial cells HIEEC were a kind gift and produced by Dr. Michel Fortier (Centre Hospitalier de l'Université Laval, Quebec City, QC, Canada) [14]. Human ovarian carcinoma cells A2780 were kindly provided by Dr. G. Peter Raaphorst (Ottawa Regional Cancer Center, Ottawa, ON, Canada). Human endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa was kindly provided by Dr. Samuel Chogran (Université de Montréal, Montreal, QC, Canada). HepG2, PC-3, HIEEC and HIESC cells lines were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% foetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. MCF-7 and OVCAR-3 cell lines were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. MDA-MB-231 cell line was maintained in RPMI 1640 medium containing 5% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. Hec-1A cell line was maintained in McCoy's medium containing 5% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. SKOV-3 cell line was maintained in McCoy's medium containing 10% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. HeLa, Ishikawa and A2780 cell lines were maintained in DMEM-F12 medium containing 2% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. MCF-10A cell line was maintained in DMEM-F12 medium containing 5% foetal growth serum, 20 ng/ml EGF, 0.5 mg/ml hydrocortisone, 100 ng/ml cholera toxin, 10 µg/ml insulin and 1X Penicillin-Streptomycin. KLE cell line was maintained in DMEM-F12 medium without HEPES containing 10% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. Caco-2 cell line was maintained in DMEM-F12 medium containing 10% foetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. IOSE-144 cell

line was maintained in MCDB105 medium containing 10% foetal bovine serum and 50 µg/ml gentamycin. All cells were maintained at 37°C with 5% CO₂.

Total DNA isolation

Total DNA from *B. thuringiensis* 4R2 was isolated from a 5mL overnight culture using QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions for bacterial DNA extraction.

PCR amplification

The primers used in this study were designed in our laboratory from the *cry46Aa1* gene nucleotide sequence. Primers for PCR amplification were as follows: *Bt4R2-2F*: 5'- TAACCGGAGGGCTTCAAG -3' (sense) and *Bt4R2-1R*: 5'- TAATTCCTCCCATTTTGGG -3' (antisense). PCR were conducted in an Applied Biosystems 2720 thermal cycler (Life Technologies, Ottawa, ON, Canada). The PCR reactions were performed in a 50 µL volume containing 200 µM each of deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 1X PCR buffer, 0,5 µM of each primers, 100 ng of DNA and 1,25 units of Taq DNA polymerase. All PCR reagents were from New England Biolabs (Ottawa, ON, Canada). PCR was performed by an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 45 s, 50°C for 30 s, 72°C for 2 min and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were size separated on a 1% agarose gel and visualized using SYBR-Safe (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) staining upon UV transillumination.

DNA sequencing

Amplicons were purified using the Mini Elute PCR Purification Kit from Qiagen. The purified PCR reactions were resolved on a 3130XL Genetics Analyser (Applied Biosystems) at IBIS Plate-forme d'Analyses Génomiques (PAG) de l'Université Laval (Quebec City, QC, Canada). Both strands of the DNA sequence were sequenced:

The 940pb sequence was compared using the Blast-N tool (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Preparation of activated parasporal proteins

Bacillus thuringiensis strain 4R2 was cultivated on nutrient agar plates, incubated for 4 days at 30°C until cell lysis. The cells were harvested from the plates and washed twice with sterile distilled water. The pellet containing the spores -crystal proteins- was solubilized in 500µL of solubilisation buffer containing 56mM Na₂CO₃ (pH:11,4) and 11mM dithiothreitol (DTT) for 1 h at 37°C. Insoluble material was pelleted by centrifugation at 13 200 rpm for 2 minutes and the supernatant was passed through a 0, 22 µm membrane filter. 250 µL of the filtrate was transferred to a sterile 1,5 mL centrifuge tube and the pH adjusted to 8 with 1M Tris-HCl (pH 4,98).

The solubilised proteins were digested with either proteinase K (final concentration at 185 µg/mL) or trypsin (final concentration at 300 µg/mL) for 1 h at 37°C. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) was added (final concentration 1 mM) to stop proteolytic processing. To confirm the presence of the parasporal proteins, SDS-PAGE analysis was performed as described elsewhere [15] using 4% stacking gel and 12% separating gel. After electrophoresis, the gel was stained with 0, 1% Coomassie blue R-250 (Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada).

Assay of cytotoxicity

The antiproliferative activity of *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins was assessed using the MTT assay [16, 17]. Briefly, plates were seeded with 180 µL of normal and cancer cells in suspension (for HIESC, 14 000; IOSE-144, 12 000; HIEEC, 15 000; Ishikawa, 16 000; HeLa, 16 000; KLE, 14 000; Hec-1A, 12 000; Caco-2, 20 000; PC-3, 16 000; HepG2, 20 000; A2780, 16 000; OVCAR-3, 20 000; SKOV-3, 14 000; MCF-7, 16 000; MDA-MB231, 12 000 and MCF-10A, 8000) in medium using 96-wells plates.

Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. Freshly solubilized and activated *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins (with proteinase K or trypsin) in solubilisation buffer were diluted in fresh medium, and 100 µL aliquots containing escalating concentrations of the toxin proteins (0 µg/mL to 20 µg/mL) were added and the plates were incubated for another 24 h. The final concentration of the solubilisation buffer (56 mM Na₂CO₃, 11 mM DTT, 100 µg/mL proteinase K (or 30 mg/mL trypsin) and 1 mM PMSF) in the culture media was 8% and was kept constant in all experiment. After 24 h, 10 µL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5 mg/mL in PBS) were added to the wells. Four hours later, 100 µL of the solubilisation solution (10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0,01 M HCl) were added and the plates incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The optical density was read using a Fluostar optima BMG (BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA) at 565 nm. Readings obtained from treated cells were compared with measurements from control cell plates fixed on the treatment day; and the percentage of cell growth inhibition was calculated for each toxin protein (proteinase K activated or trypsin activated). The experiments were performed in triplicate. The assays were considered valid when the coefficient of variation for a given set of conditions and within the same experiment was < 10%.

Light microscopy observation

For observation of the morphological changes, normal (HIESC) and cancer cells (PC-3, MCF-7 and HepG2) were observed after 24 h treatment with proteinase K activated toxin proteins at 1 µg/mL (MCF-7) or 2 µg/mL (HIESC, PC-3 and HepG2). 10X and 20X magnifications were used with an Olympus (model BX60) light microscope (Carsen Group, Markham, ON, Canada).

Antibodies and reagents

The Na₂CO₃, DTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, HCl, SDS, PMSF, Tris-HCl and proteinase K were all obtained from Sigma-Aldrich. All primary antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)

except for β -actin (Sigma-Aldrich). Secondary antibody, HRP-conjugated goat anti-rabbit were purchase from Bio-Rad Laboratories. Annexin V/PI apoptosis kit was purchased from Invitrogen. MEK $\frac{1}{2}$ inhibitor, U0126, was obtained from Cell Signaling Technology and PI3K inhibitor, Wortmannin, was obtained from Sigma-Aldrich.

Western blot

PS2Aa1 treated cells were washed with PBS and submitted to lysis in cold RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete™ from Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) and phosphatase inhibitor (PhosSTOP™ from Roche Applied Science) followed by three freeze-thaw cycles. Equal amounts of cell lysates, determined using Bio-Rad DC protein assay, were separated on polyacrylamide gels (10-14%) and transferred on nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked in 5% milk, PBS 1X, 0.06% Tween 20 for 1 h at room temperature, probed with primary antibody, washed in PBS 1X, 0.06% Tween 20, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad). Detection was performed using SuperSignal West Femto™ substrate (Thermo Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada), as described by the manufacturer using UVP bioimaging systems.

Measurement of Annexin V/PI cells

FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, the treated cells were collected, washed with PBS and diluted in 1X Annexin Binding buffer (100 μ l). For each sample, 5 μ L of Annexin V and 2 μ l of Propidium Iodide (PI) were added to the cell suspension and incubated for 15min at room temperature. An additional 100 μ l volume of Annexin binding buffer was added to each sample for a total of 200 μ l. Samples were analyzed (10 000 events) using a Beckman Coulter flow cytometer Cytomics FC500. Analyses were performed using CXP Analysis software (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada).

Caspase 3-7 assay

To measure the specific activity of caspase 3 and 7, a luminescent assay kit named Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, Madison, WI, USA)) was used. This assay provides a proluminescent caspase-3/7 substrate containing a sequence (DEVD) specific to caspase 3 and 7. If caspases 3 and/or 7 are active, the substrate is cleaved and aminoluciferin will be emitted. Briefly, plates were seeded with 180 μ L of normal and cancer cells in suspension (for HIESC, 14 000; PC-3, 16 000; HepG2, 20 000 and MCF-7, 16 000) in medium. Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 h. Freshly solubilized and activated *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins (with proteinase K) in solubilisation buffer were diluted in fresh medium. Then, 100 μ L aliquots containing the toxin, with or without inhibitors, were added and the plates were incubated for another 24 h. The final concentration of the solubilisation buffer (56 mM Na₂CO₃, 11 mM DTT, 100 μ g/mL proteinase K and 1mM PMSF) in the culture media was 8% and was kept constant in all experiment. After 24 h, 100 μ L of Caspase-Glo 3/7 reagent was added to the wells. One hour later, the optical density was read using a Fluostar optima BMG (BMG Labtech Inc., Durham, NC, USA). Readings obtained from treated cells were compared with measurements from control cells using fold increases. Each experiments were performed in duplicate.

Statistical analyses

The data were subjected to either one-way analysis of variance or Student's t-test (PRISM software version 5.00; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups, when using one-way analysis of variance, were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when $p < 0.05$.

Results

Characterization of B. thuringiensis 4R2 cytotoxic crystal protein

SDS-PAGE analysis of the solubilized crystal proteins revealed a major band estimated at 37 kDa, corresponding to the native form of the Cry46Aa1 protein (Figure 3.1). In PCR experiments with Cry46Aa1 specific primers, a 940 bp amplification product was obtained. Analyses of the nucleotide sequence using BLAST tools revealed that the nucleotide sequence was 100% homologous with the proteinase K activated Cry46Aa1 nucleotide sequence (NCBI accession number AB099515.1). Owing to this nucleotide sequence identity, the 37 kDa crystal proteins from *B. thuringiensis* 4R2 was named PS2Aa1.

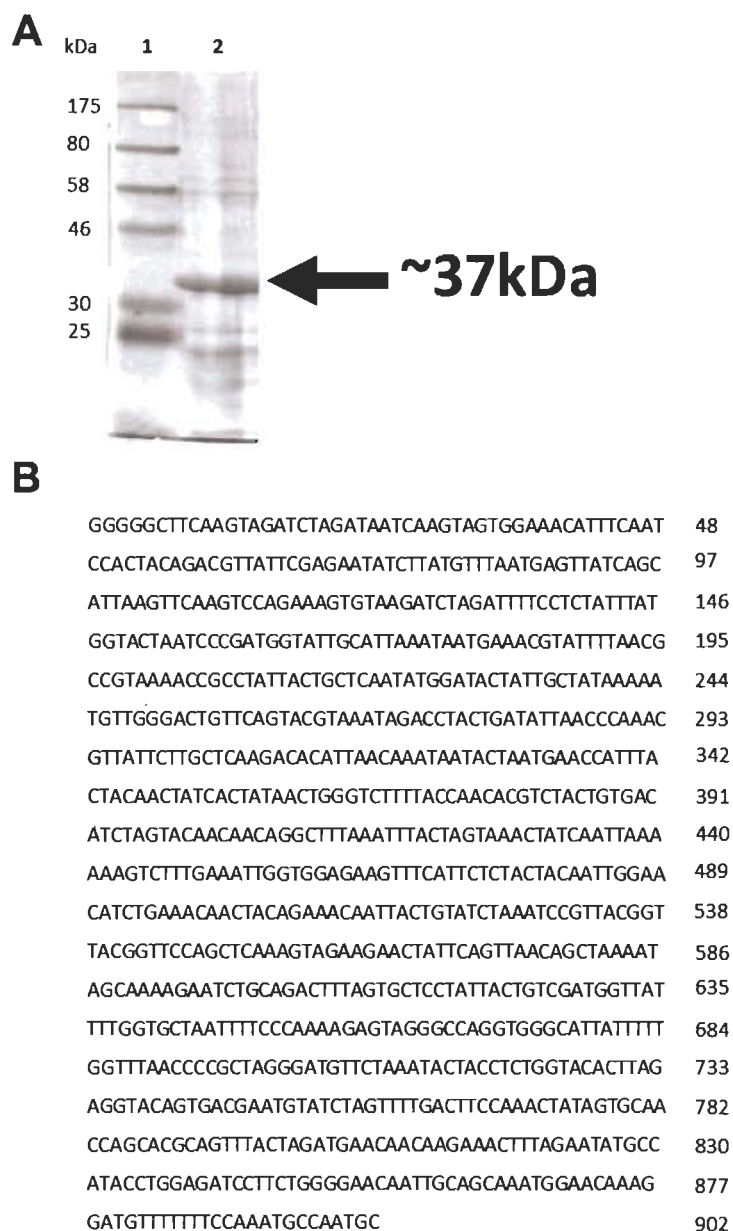


Figure 3.1 SDS-PAGE analysis of the 37kDa crystal protein of *Bacillus thuringiensis* 4R2 after Coomassie blue staining.

(A) Lane 1: Molecular weight marker; lane 2: solubilized pro-PS2Aa1.
 (B) Nucleotides sequence of the *cry46Aa1* gene fragment obtained following amplification with the Bt4R2-2F and Bt4R2-1R primer pair.

Cytotoxicity of PS2Aa1 in cancer and normal cells

Trypsin (used as control treatment) and proteinase K activated crystal proteins from *B. thuringiensis* 4R2 (PS2Aa1) were examined for cytotoxicity against normal and

cancer human cells using MTT Assay for a 24 h treatment (Figure 3.2). No cytotoxic activity was observed after trypsin treatment of solubilized crystal proteins for any of the cells lines. Among the cells tested, proteinase K activated crystal proteins were highly cytotoxic to HepG2, MCF-7, KLE, Hec-1A, MDA-MB231 and PC-3 cells while being moderately cytotoxic to Caco-2 cells. No significant cytotoxic activity was observed in A2780, OVCAR-3, SKOV-3 and HeLa cancer cell lines. None of the normal cell lines (IOSE-144, HIEEC, HIESC and MCF-10A) showed cytotoxic effects. The cytotoxicity of the crystal proteins was dose-dependent and was examined using serial proteins dilutions. Based on their high sensitivity to PS2Aa1, HepG2, PC-3 and MCF-7 cancer cell lines were selected for further experimentations. HIESC cells were used as a normal cell line model to further explore the effects of PS2Aa1 on non-cancer cells.

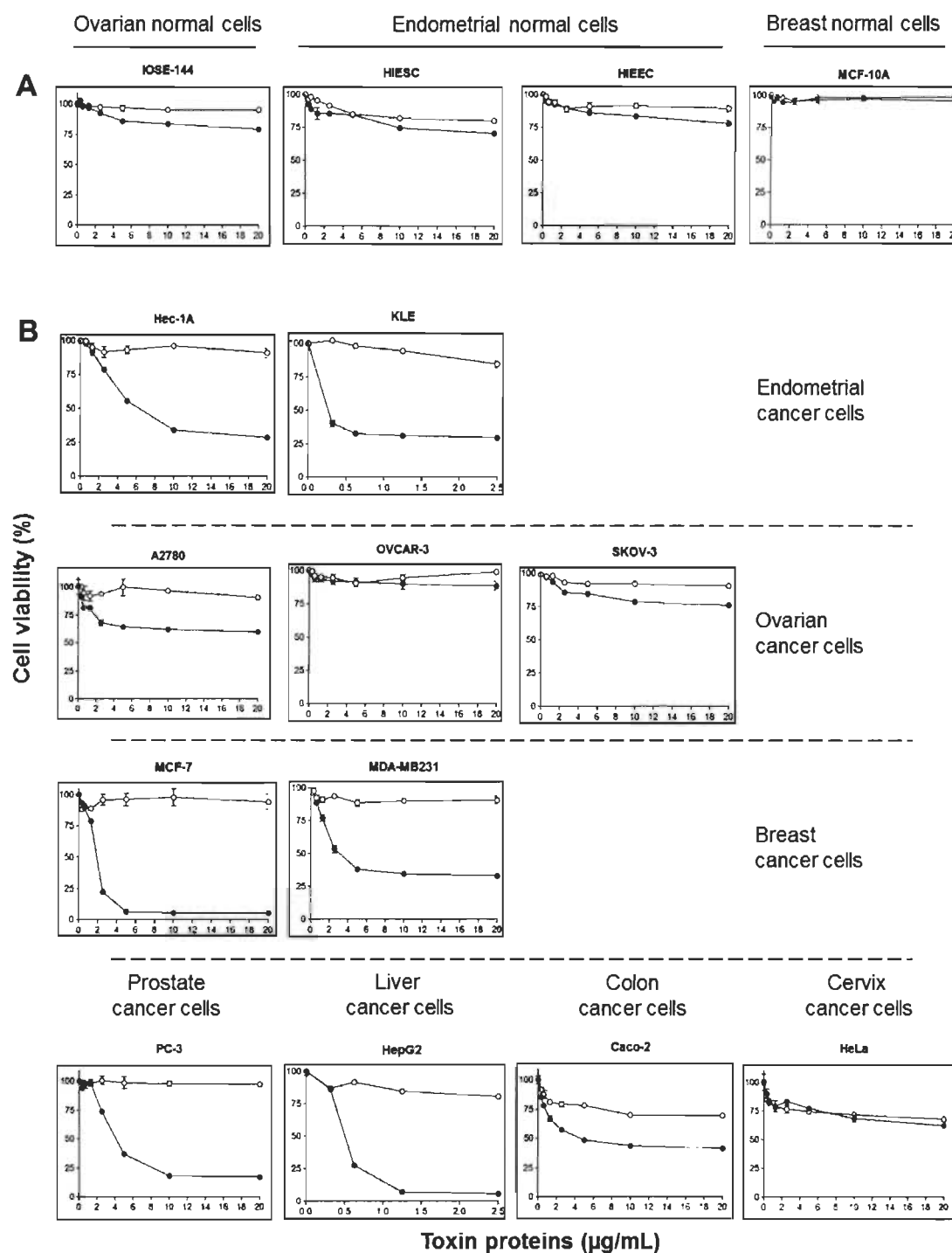


Figure 3.2 Cytocidal activities of *Bacillus thuringiensis* 4R2 toxin proteins. Normal cultured human cells (A) and cancer cultured human cells (B) (2×10^4 cells) were preincubated at 37°C for 20 h; the toxin treated with trypsin (○) or proteinase K (●) was added (final concentrations, 0.3 µg/mL to 20 µg/mL) further incubated for 24 h. Cell proliferation was assayed using MTT.

Morphological changes in cancer cells induced by PS2Aa1

To further study the effect of PS2Aa1, concentrations from 1 µg/mL to 2 µg/mL were used based on the previous cell viability experiment. Following treatment by PS2Aa1 proteinase K activated proteins in HepG2 (2 µg/mL), PC-3 (2 µg/mL) and MCF-7 (1 µg/mL) cells, morphological characteristics of the treated cells were observed under light microscopy (Figure 3.3). Cell shrinkage, characteristic of apoptotic cell death [18], was observed only in HepG2, MCF-7 and PC-3 cancer cells. However, no morphological changes were observed on HIESC; confirming the non-cytotoxicity of PS2Aa1 on normal cells as previously observed with the MTT experiment. No necrosis morphological changes like cell swelling or blebbing were observed [18].

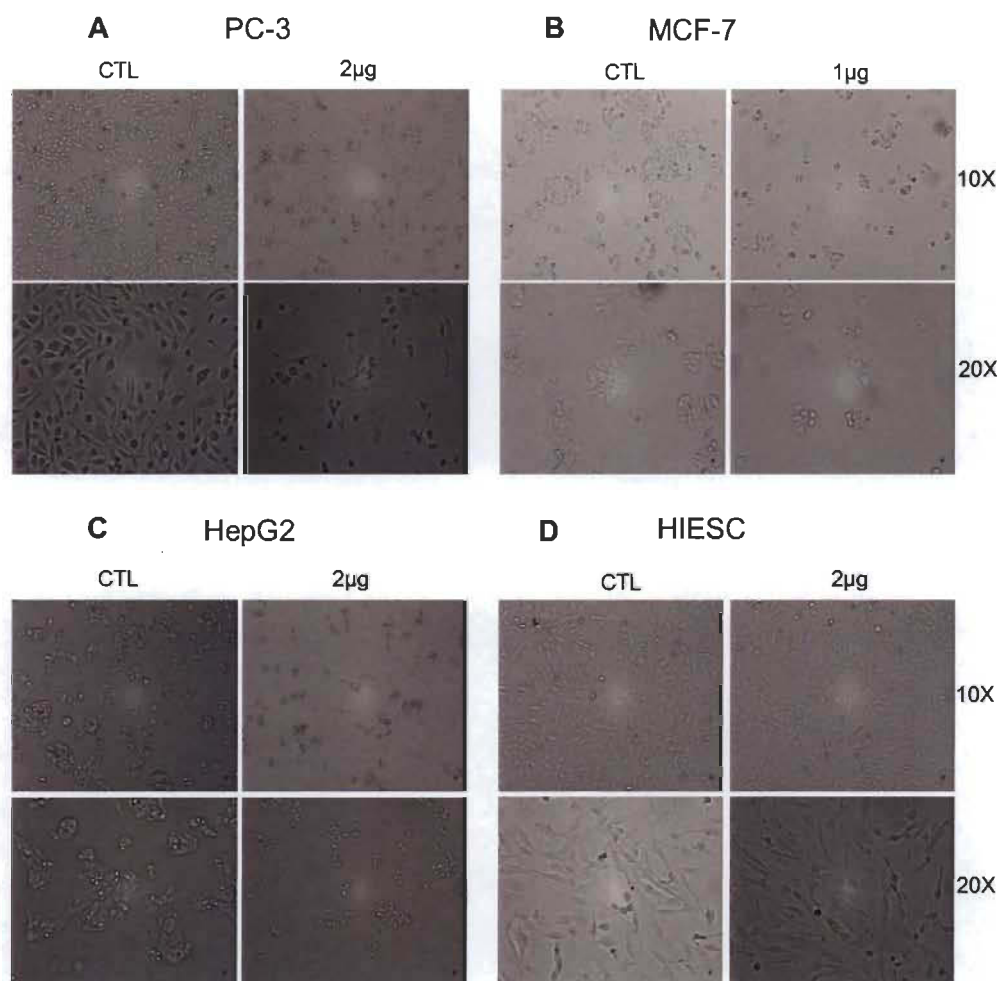


Figure 3.3 Morphological characteristics of cells following *Bacillus thuringiensis* 4R2 toxin proteins treatment. PC-3 (A), MCF-7 (B), HepG2 (C) and HIESC (D) cells were treated with 1 µg/mL or 2 µg/mL *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins for 24 h. After 24 h, the cells were observed by light microscopy at a magnification of 10X and 20X. Results shown are representative of three independent experiments.

PS2Aa1 induces cell death by apoptotic mechanisms

To confirm our previous observations concerning the morphological changes related to apoptosis occurring in cancer cells, we performed annexin V/ propidium iodide (PI) staining analysis on the treated cells. Annexin V has the ability to stain phosphatidyl serine on the outer leaflet of the plasma membrane and its presence on the outer leaflet instead of the inner leaflet is a unique characteristic of apoptosis [19].

Results showed that 6 h and 24 h after treatment, PS2Aa1 induced high level of apoptosis in all three cancer cell lines (Figure 3.4A-C) and very little in the normal endometrial cancer cell line HIESC (Figure 3.4D) This is in direct correlation with the MTT assay results (Figure 3.2). Most cancer cells showed high level of apoptosis after 6 h of treatment indicating the high efficiency of PS2Aa1 in inducing apoptosis.

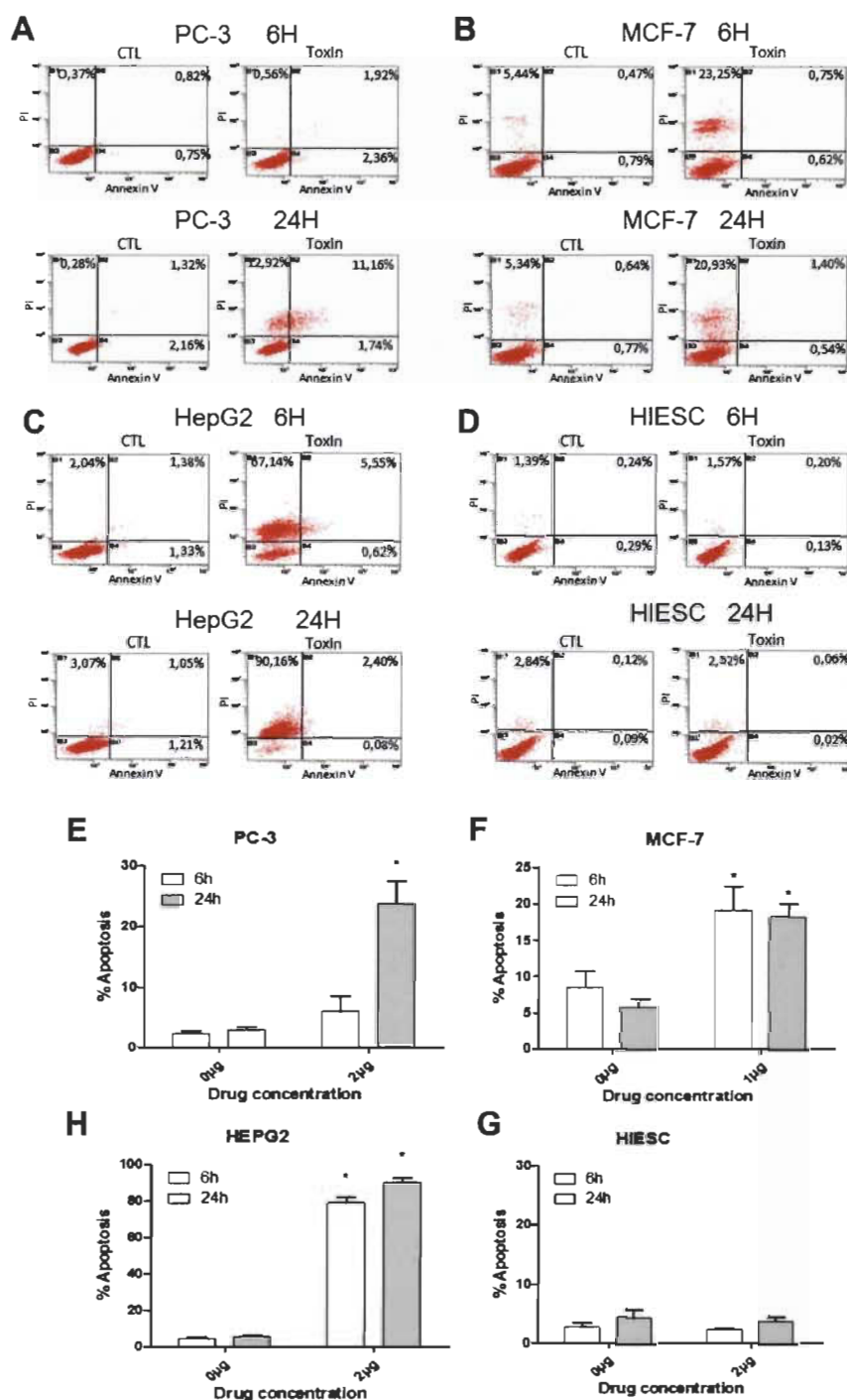


Figure 3.4 *Bacillus thuringiensis* 4R2 toxin proteins induce apoptosis in human cancer cells.

PC-3 (A), MCF-7 (B), HepG2 (C) and HIESC (D) cells were treated with *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins (1 μ g/mL (B) or 2 μ g/mL (A,C,D)) for 24 h. Annexin V and PI staining was detected by FACS analysis. Results are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments. *P < 0.05 compared with corresponding mock-treated cells.

Because PS2Aa1 induces high toxicity and lot of cells are PI positive only after 24 h, we decided to do a caspase-3/7 assay to check if PS2Aa1 specifically activates caspases -3 and -7 to induce apoptosis (Figure 3.5). After 24 h treatment, PS2Aa1 increased significantly the activity of both caspases -3 and -7 in PC-3 and HEPG2 cancer cell lines (Figure 3.5A&C). MCF-7 cancer cell line is caspase-3 deficient and considering this deficiency, only caspase-7 can be measured by this assay in this cell line [20]. A significant increase of caspase activity can be observed in MCF-7 cancer cell line which indicates that the apoptosis induced is compensated by caspase-7, implicated in the mechanism of action of PS2Aa1 (Figure 3.5B). Low level of cell death was previously observed in normal cell line HIESC by Annexin V/PI flow cytometry and consequently, no significant increase of caspase-3/7 activity could be measured by the caspase assay in HIESC (Figure 3.5D).

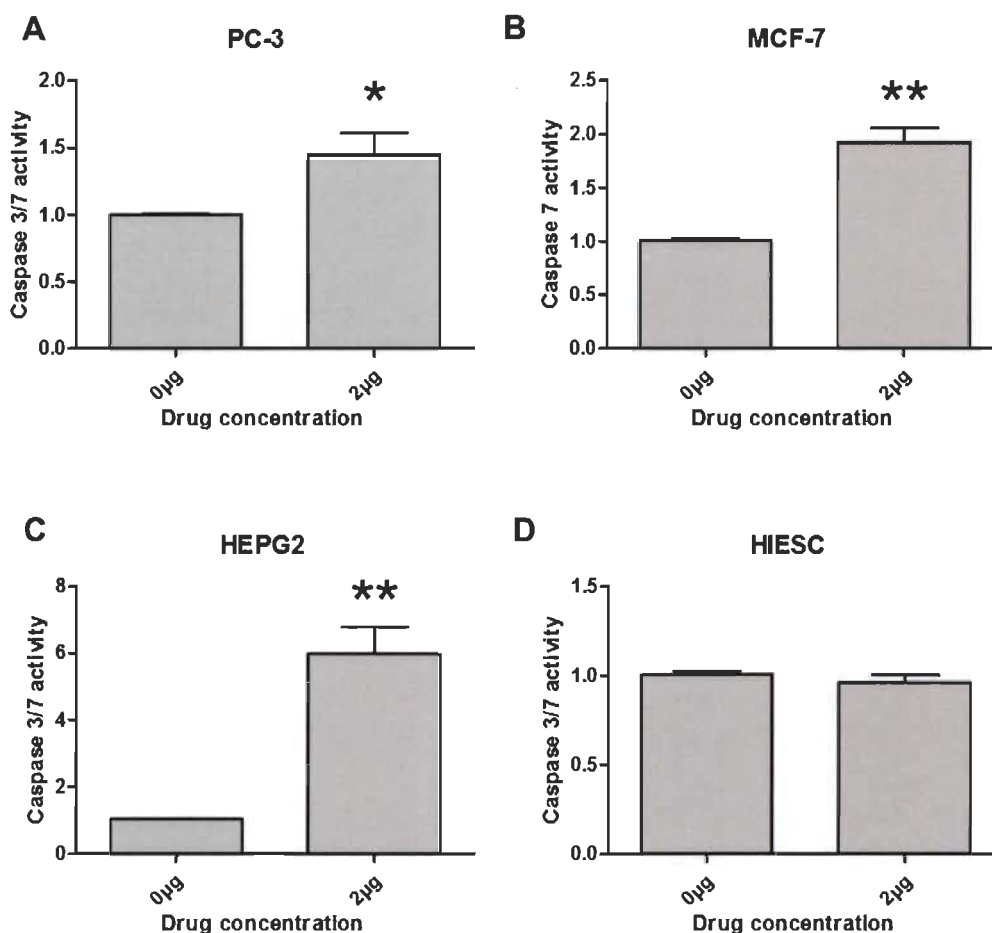


Figure 3.5 *Bacillus thuringiensis* 4R2 toxin proteins activate and increase caspases-3/7 activity in human cancer cells.

PC-3 (A), MCF-7 (B), HepG2 (C) and HIESC (D) cells were treated with *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins (2µg/mL) for 24 h. The level of caspases-3/7 was measured using Caspase-Glo 3/7 assay. The MCF-7 (B) cells are Caspase-3 deficient and only Caspase-7 can be measured. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with corresponding mock-treated cells.

To further investigate apoptosis induction, we also measured different apoptosis markers by western blot analysis such as cleaved caspase-3, -8, -9 and cleaved PARP. Our results showed that, as early as 6 h of treatment with PS2Aa1, caspase-3 cleavage/activation was observed in both PC-3 and HEPG2 cancer cells (Figure 3.6A&C; MCF-7 being caspase-3 negative). Once activated, caspase-3 is an effector caspase and can do proteolytic cleavage on various proteins, such as the repair protein PARP, then leading to apoptotic cell death. However, caspase-3 requires initiator

caspsases from either the intrinsic or extrinsic pathway to be cleaved/activated [21, 22]. By western blot analysis, we measured cleaved caspase-8 (extrinsic pathway) and cleaved caspase-9 (intrinsic pathway) and found out that only caspase-9 cleavage/activation was present in all three cancer cell lines (Figure 3.6A-C) while caspase-8 cleavage/activation was not observed (Data not shown). In correlation with caspsases cleavage, PS2Aa1 also induced PARP cleavage/degradation in all three cancer cell lines (Figure 3.6A-C). Cleaved PARP and cleaved caspase-3 protein levels are low after 24 h treatment of the toxin in HEPG2 cancer cell line (Figure 3.6C). This is probably because most of the cells were dead since 6 h (> 75%). After 24 h treatment, almost all the HEPG2 cells were floating and dead (> 92%). Proteins were probably all degraded because of proteases implicated in late apoptosis leading to massive protein destruction and the cells are now in debris [23]. This is further supported with the MTT data (Figure 3.2B) and Annexin V/PI flow cytometry (Figure 3.4C&H) which indicate that almost 100% of the cells are dead at this concentration after 24 h of treatment explaining the situation observed. It is also notable that none of these markers of apoptosis were observed in the normal cell line HIESC (Figure 3.6D) indicating that no apoptosis was occurring using the maximum dose of PS2Aa1 (2 μ g/ml) previously used on cancer cell lines. The Western blot bands visible in the normal cell line HIESC are the basal level of the different markers, observable only after high exposition to reveal the appropriate protein bands (Figure 3.6D). This is in concordance with the absence of apoptosis and caspsases-3/7 activity observed in previous experiments for the normal cell line HIESC (Figure 3.4-Figure 3.5)

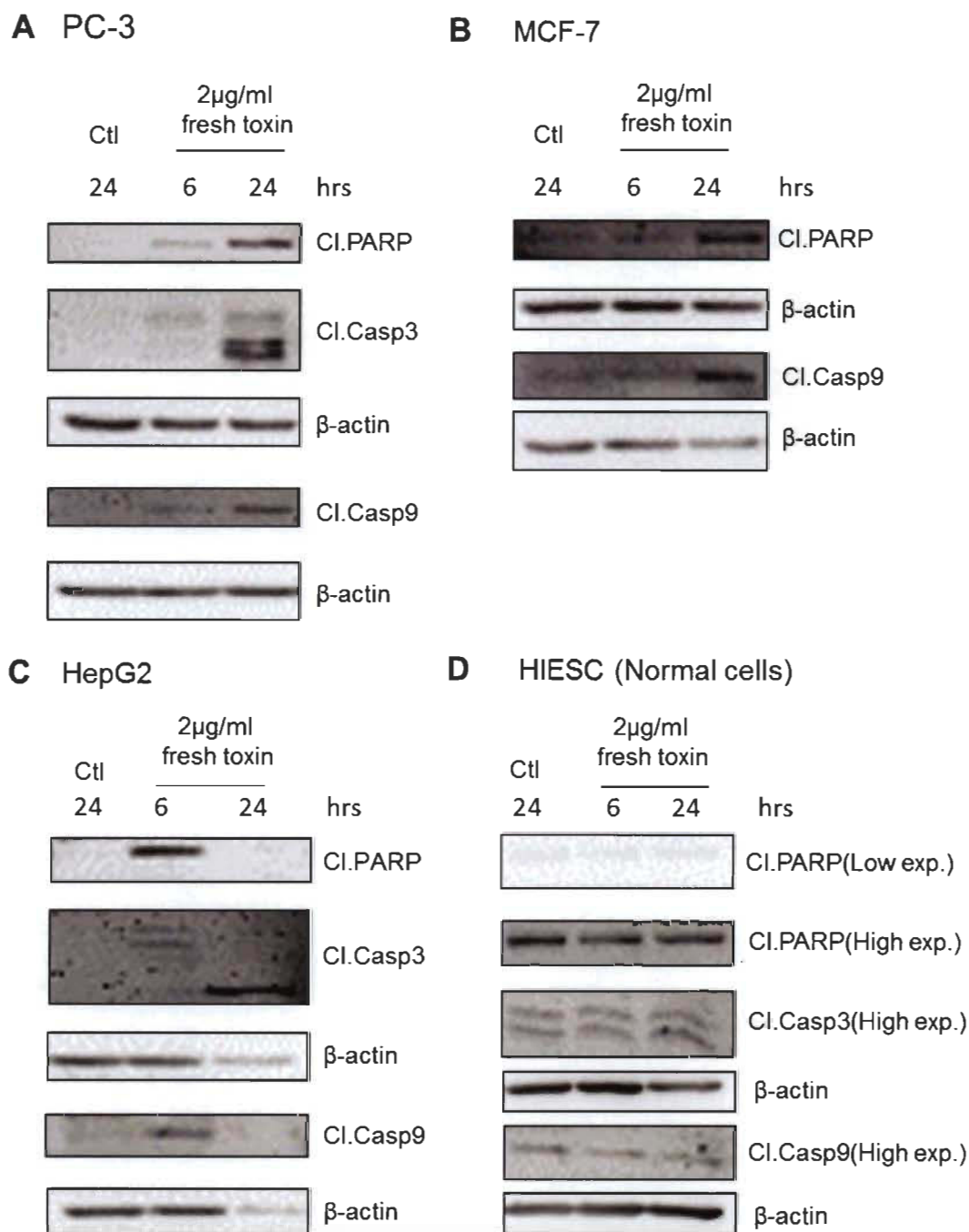


Figure 3.6 *Bacillus thuringiensis* 4R2 toxin proteins activate apoptosis mechanisms in human cancer cells.

PC-3 (A), MCF-7 (B), HepG2 (C) and HIESC (D) cells were treated with *B. thuringiensis* 4R2 toxin proteins (1-2 μ g/mL) for 6 h and 24 h. The levels of apoptosis-specific cleaved proteins Caspase-3, Caspase-9 and PARP were determined in treated cells using western blot analysis. The MCF-7 (B) cells are Caspase-3 deficient. β -Actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

Regulation of different survival and death pathways in response to PS2Aa1

All the previous experiments demonstrate that PS2Aa1 toxin can induce cell death in cancer cells through apoptosis induction. In order to investigate the possible involvement of other survival/death pathways, we performed additional experiments on PC3 prostate cancer cells using western blot analysis. We first investigated the AKT survival pathway known for being an important survival mechanism for cancer cells. Proteins from the AKT pathway are often altered in cancer and the high survival signal from these mutations are often responsible for the resistance of cancer cells to therapeutics treatments and the impossibility to induce apoptosis [24-28]. Our results showed a high decrease of phosphorylated (the active form) AKT at serine 473. Total AKT level was also decreased suggesting that it is also in part responsible for the decrease of p-AKT level. XIAP, an inhibitor of caspase and an ubiquitin ligase for PTEN (a negative regulator of AKT phosphorylation) was also decreased (Figure 3.7A) [29]. ERK1/2, proteins of the MAPK pathway, requires activation/phosphorylation to induce apoptosis in cancer cells following treatment with cisplatin or other apoptosis stimuli [30-32]. As observed in cisplatin treatments, PS2Aa1 induced an increase of ERK1/2 phosphorylation at 24 h following treatment while total ERK level was staying stable (Figure 3.7B). This suggests that ERK activation is required for the induction of apoptosis. Finally, we recently discovered a new mechanism related to the tumour suppressor PAR-4 which is cleaved by caspase-3 upon apoptosis stimuli and is able to induce apoptosis once cleaved [33, 34]. Because of PS2Aa1 capacity to activate apoptosis mechanisms, we questioned whether PAR-4 cleavage could be involved in apoptosis induction upon treatment with the toxin. Interestingly, a cleaved fragment of approximately 25 kDa appeared as soon as 6h after treatment with PS2Aa1 in full correlation with our hypothesis (Figure 3.7C). The presence of the cleaved PAR-4 fragment, normally present only in cancer cells undergoing apoptosis, reinforces the idea that PS2Aa1 is an inducer of apoptosis in cancer cells.

PC-3 cancer cells

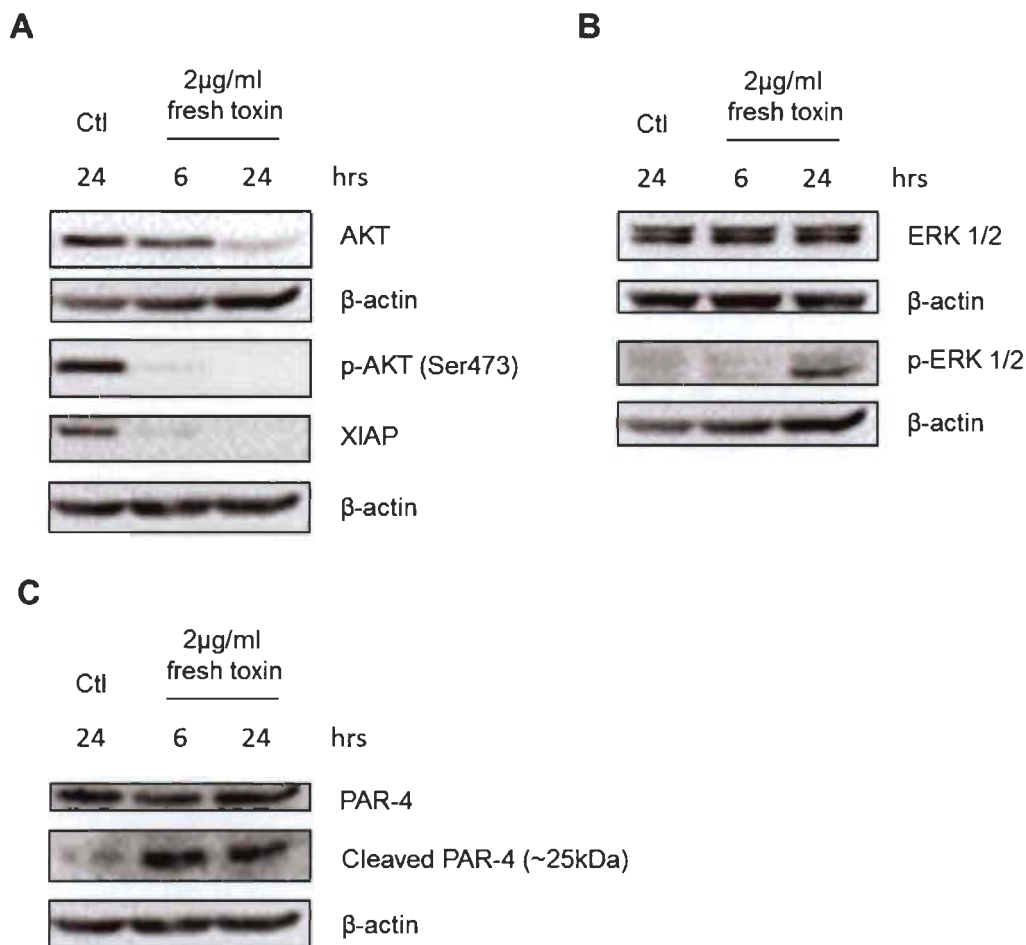


Figure 3.7 *Bacillus thuringiensis* 4R2 toxin proteins regulate various survival pathways in PC-3 cancer cells.

PC-3 cancer cells were treated with Bt 4R2 toxin proteins (2 µg/mL) for 6 h and 24 h. (A) PI3K/AKT pathway proteins (B) ERK and (C) PAR-4 protein levels were determined in treated cells using western blot analysis. β-actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

Inhibition of MAPK and Pi3K survival pathways in combination with PS2Aa1

Considering the previous results obtained, indicating that the toxin PS2Aa1 regulates positively ERK1/2 phosphorylation (MAPK pathway) and negatively AKT phosphorylation at serine 473 (AKT pathway), we decided to use inhibitors of both pathways in combination with PS2Aa1 to see if it has an influence on the apoptosis induced and caspases activity on the PC3 cancer cell line. We used U0126 as an

inhibitor of the MAPK pathway (ERK1/2) and wortmannin as an inhibitor of the Pi3K pathway (AKT), each one, alone or in combination with PS2Aa1. To see the impact of the inhibitors in combination with PS2Aa1 in PC3 cancer cells, we did a caspase 3/7 assay to measure caspases activity and western blots to again measure apoptosis markers and the proteins inhibited (Figure 3.8). Interestingly, when using Pi3K inhibitor wortmannin in combination with PS2Aa1, we observed a synergetic increase of caspase 3/7 activity (Figure 3.8A). This observation is also correlated in the western blots where we can observe an increase of cleaved caspase-3 protein level (Figure 3.8B). Indeed, in relation with the observed increase of active caspase-3, PS2Aa1 in combination with wortmannin also increased the level of PARP cleavage/degradation (Figure 3.8B). No significant changes were observed in both experiments when using the MAPK inhibitor U0126 in combination with PS2Aa1 (Figure 3.8). ERK1/2 and AKT protein levels (total and phosphorylated) were measured to confirm the efficiency of both inhibitors after 24 h treatment.

PC-3 cancer cells

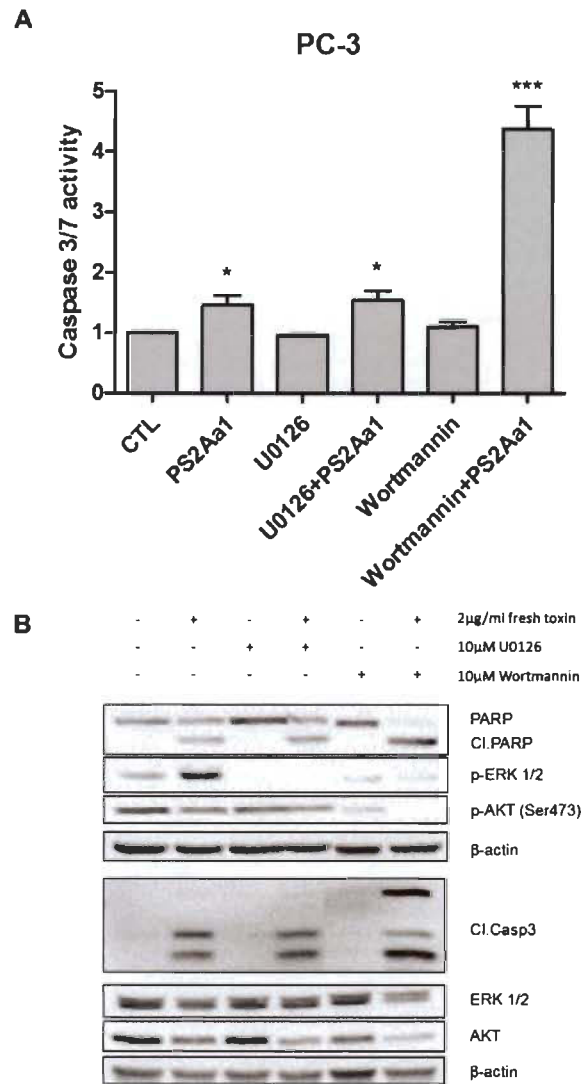


Figure 3.8 *Bacillus thuringiensis* 4R2 toxin proteins in combination with MAPK and PI3k survival pathways inhibitors.

PC-3 cancer cells were pre-treated with MAPK inhibitor U0126 (10 µM) or PI3k inhibitor Wortmannin (10µM) for 1 h and then Bt 4R2 toxin proteins (2 µg/mL) was added for 24 h. (A) The level of caspases-3/7 was measured using Caspase-Glo 3/7 assay. *P < 0.05 and ***P < 0.001 compared with corresponding mock-treated cells. (B) The levels of AKT (total and phosphorylated), ERK1/2 (total and phosphorylated), cleaved Caspase-3 and cleaved PARP were determined in treated cells using western blot analysis. β-actin was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

Discussion

Parasporin-2Aa1 is a 37kDa crystal protein, originally isolated from *B. thuringiensis* A1547, known to be a pore forming toxin active against human cancer cells [35]. The previous studies suggest that this toxin protein mode of action is non-apoptotic but these studies lack in-depth molecular analysis of cancer cell death pathways [11, 12]. In the present study, a new *B. thuringiensis* strain, 4R2, was shown to produce the PS2Aa1 (Cry46Aa1) crystal protein. We first observed that the proteinase K treated PS2Aa1 crystal proteins caused morphological changes in the highly sensitive HepG2, MCF-7 and PC-3 cancer cell lines while, on the other hand, the normal cell line HIESC morphology was unchanged. In previous studies, cell lysis, swelling and blebbing were observed in sensitive cell lines including HepG2 [11, 12]. In this study, none of these morphological changes were observed; instead, cells shrinkage was observed in the sensitive cells lines, supporting the hypothesis that PS2Aa1 could induce apoptosis in cancer cells line [18].

The *B. thuringiensis* cry genes encoding the Cry proteins are located on plasmids. The latter can be transferred between *B. thuringiensis* strains [2]. Such plasmid transfers may explain why the gene encoding the protein PS2Aa1 (Cry46Aa1) can be found in two different *B. thuringiensis* strains. As shown in a previous study, cry genes coding for the same parasporin protein can be geographically dispersed [36]. This supports the fact that the *B. thuringiensis* 4R2 strain contains the same parasporin gene as *B. thuringiensis* A1547. The 1017 nucleotide sequence (338 amino acids) of cry46Aa1 from *B. thuringiensis* A1547 strain (Genbank accession number: AB099515.1) encodes the full length Cry46Aa1 protoxin, the precursor of the activated toxin. When activated by proteinase K, the protoxin is cleaved at residues 52 and 306 of the amino acids sequence to yield an active form [11]. The nucleotide sequence from *B. thuringiensis* 4R2 obtained with our primers by PCR amplification is 100% homologous with the sequence of proteinase K activated protein described above (amino acids residues 52 to 306). The Cry46Aa1 protein expression was confirmed by SDS-PAGE analysis and the 37kDa major band observed indicates that the crystal proteins solubilisation was efficient.

Dose-response studies of proteinase K and trypsin activated PS2Aa1 crystal protein were conducted using the MTT assay. When activated by proteinase K, PS2Aa1 had high cytotoxicity against HepG2 cells as previously reported [12]. The normal cell lines HIESC, IOSE-144, HIEEC and MCF-10A were not sensitive to the proteinase K activated proteins PS2Aa1. Moreover, several new cancer cells lines were screened and new sensitive cancer cell lines, MCF-7, MDA-MB231, KLE, Hec-1A and PC-3, were found. In susceptible insect models, activated Cry proteins bind to specific receptors at the surface of the epithelial membrane midgut cells [37]. In many case, Cry proteins bind to multiple receptors sequentially leading to pore formation in the midgut cells [38]. The selective cytotoxicity of PS2Aa1 toward cancer cells and the absence of cytotoxicity in the normal cells suggest that either different receptors are present on the surface of cancer and normal cell membranes or only absent on the normal cells. Alternatively, normal cells may not express GPI anchor protein to enhance cytotoxicity of PS2Aa1.

When activated by trypsin, the PS2Aa1 crystal protein did not show cytotoxicity against the different cell lines. PS2Aa1 protoxin had to be cleaved by proteinase K to be cytotoxic against human cancer cells [12]. Presumably, the trypsin and proteinase K cleavage sites are different. Toxin proteins without protease activation were tested at high concentration (20 μ g/mL) against all cells lines and no toxicity was observed in all the cells treated (data not shown). In insect models, specific protease activation is essential and can determine the toxin specificity [39]. Digestion of Cry proteins with some proteases can also generate inactive products and contribute to insect resistance [40]. It is reasonable to hypothesize that without proper protease activation, the PS2Aa1 protoxin could not be recognized by the normal cells receptors. Conversely, when cleaved with proteinase K, specific regions of the activated PS2Aa1 can bind to a receptor. When cleaved by trypsin, theses specific regions can only be partially exposed or not at all, preventing binding.

The parasporins are not the only bacterial toxins able to induce apoptosis in host cells [41]. Mitochondria pathway apoptosis can also be activated by bacterial pathogens

[42]. PS2Aa1 shows structural homology with the *Aeromonas hydrophila* aerolysin and *Clostridium perfringens* alpha-toxin [35]. These pore forming toxins require GPI-anchored proteins for efficient cytolysis and binding [43]. These structural similarities strengthen the indications that PS2Aa1 is a pore forming protein [35]. In the PS2Aa1, the GPI-anchored proteins seem to be implicated in toxin cytotoxicity but not in binding specificity as opposed to aerolysin and alpha-toxin [13]. The lack of information on the binding events is a hurdle in gaining a better understanding of the molecular pathways involved at this level. One hypothesis is that PS2Aa1 forms small pores in the plasma membrane enabling the passage of ion molecules in cells and thus inducing apoptosis. This is the mode of action displayed by the *Staphylococcus aureus* alpha toxin which also induces apoptosis in host cells [44].

So far, some other parasporins have been shown to induce apoptosis in mammalian cancer cells [45, 46]. However, we are the first to demonstrate the apoptotic effects of parasporin-2Aa1 (PS2Aa1). The parasporin-1Aa1 is cytotoxic against HeLa and MOLT-4 cells and cause an increase of intracellular level of calcium via heterotrimeric G-protein or G-protein-coupled receptors [46]. This parasporin, however, is not considered a pore forming toxin, contrary to PS2Aa1. Another 29 kDa parasporin from the *B. thuringiensis* A1519 strain induces mitochondrial apoptosis pathway in the Jurkat cells via caspase-3 and -9 cleavage and the release of cytochrome c from the mitochondria [45]. In a previous study, it was reported that HepG2 cells, treated with PS2Aa1, have shown a leakage of cytochrome C from mitochondria who was not consider at that time as an apoptotic event [11]. The cytochrome C leakage from the fragmented mitochondria is hallmark of apoptosis induction through the mitochondria pathway [47]. In our current study, caspase-9 cleavage is observed in the three PS2Aa1 selected sensitive cells lines (HepG2, MCF-7 and PC-3) supporting the hypothesis of the mitochondria pathway activation. Identification of the receptor implicated in PS2Aa1 binding will contribute to a better understanding of the exact molecular events involved in apoptosis induced cell death.

The regulation of the various survival pathway observed supports the hypothesis of the induction of apoptosis by PS2Aa1 (Figure 3.7). AKT pathway is well known for its survival and proliferative functions [24, 48]. Survival aspect of the AKT pathway involves the inactivation of proapoptotic factors such as Bad and caspase-9 but also the promotion of the cell cycle via the activation of mTor/p70S6k cascade [24, 29]. XIAP is a protein responsible for being an inhibitor of caspase-3, -7 and -9 by directly binding these proteins and then inhibiting their functions [49]. By inhibiting caspase-9, XIAP can also interfere with cytochrome C pathway. It has been shown that XIAP anti-apoptotic functions are mediated in part by the regulation of the AKT pathway [29]. Upon apoptosis stimuli, AKT, its active form p-AKT and XIAP are very often downregulated to block proliferation and enhance apoptotic mechanisms as observed upon treatment with PS2Aa1 on various cancer cells [28, 50]. This is further supported by the cleavage/activation of caspase-3, -7 and -9. Currently, in cancer clinical trials, many PI3k inhibitors are under study and some of these are very promising. Using pathway inhibitors in combination with conventional chemotherapy is often very valuable by increasing the efficiency of the treatment and also counter chemoresistance by decreasing the activity of these survival pathways [51-53]. Following this idea of combination, we observed for the first time the synergetic effect of PS2Aa1 toxin in combination with Wortmannin (PI3k inhibitor). Indeed, by treating prostate cancer cells PC-3 with this combination, apoptosis was increased by more than three time when compared with the toxin alone. This synergetic effect of PS2Aa1 with Wortmannin would probably be even higher in PTEN mutant cancer, very frequent in the endometrium [54]. This is valuable information for future experiments and pre-clinical trial involving the PS2Aa1 toxin considering the arrival of many PI3k inhibitors in clinical and the more common use of combination therapy for the treatment of cancer patient.

ERK1/2 are proteins from the MAPK pathway and known for various regulation such as proliferation, cell migration, differentiation and cell death depending on the condition exposed [31, 32]. Cell death has been frequently associated with p-ERK1/2 upon diverse apoptotic stimuli [30-32]. The reason why p-ERK1/2 is increased and

implicated when apoptosis occurs is not well known. However, some papers indicate that P53 activity can be upregulated by the ERK1/2 during apoptosis. Also, it has been shown that using MEK inhibitors reduce apoptosis and decrease the level of many apoptotic factors such as TNF- α and cleaved-Caspase-3 [32, 55-57]. Similar results were obtained upon treatment with PS2Aa1 (Figure 3.7) with the increase of the active form of ERK1/2 (p-ERK1/2) support the implication of the MAPK pathway in enhancing apoptosis activity as observed with cisplatin and other apoptotic inducers [30-32]. However, when using a MAPK inhibitor, U0126, in combination with PS2Aa1, no change in apoptosis was observed when compared with the toxin alone. This indicates that the MAPK is not critical for the mechanism of the toxin.

Prostate apoptosis response-4 (PAR-4) is a tumour suppressor known for inducing selectively apoptosis in cancer cells using a unique domain (SAC) [58]. PAR-4 can induce apoptosis by both the intrinsic and extrinsic pathways involving various regulation of these different pathways. However, the selectivity of PAR-4 to induce apoptosis only in cancer cells is attributed to the PKA level required to activate PAR-4 which is not sufficient in normal cells compared to most cancer cells [59, 60]. More recently, we discovered that PAR-4 is cleaved by caspase-3 upon apoptotic stimuli and that its cleaved fragment plays a role in the apoptotic mechanism of PAR-4 in cancer cells [33]. Upon treatment with PS2Aa1, a cleaved fragment of PAR-4 was observed in the PC-3 cancer cell line further supporting the hypothesis of the induction of apoptosis by the toxin and its selectivity for cancer cells.

In conclusion, the results obtained in this study clearly indicate that PS2Aa1, synthesized by *B. thuringiensis* 4R2, induces apoptosis in human cancer cells but not in normal cells. Caspase activation and the regulation of the tested survival/death pathways involved in apoptosis confirm that the PS2Aa1 induces cell death by apoptosis and can now better explain PS2Aa1 mechanism of action. The PS2Aa1 toxin is a very promising molecule for future studies on its selectivity on cancer cells. However, further experiments on the mechanism implicated in cell specificity and the mechanism related to the induction of apoptosis will be needed in order to clarify its mode of action.

Acknowledgements

K Brasseur was the holder of a doctoral scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

References

1. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(3): 775-806. Epub 1998/09/08. PubMed PMID: 9729609; PubMed Central PMCID: PMC98934
2. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 2001; 7(4): 193-9. Epub 2001/03/29. PubMed PMID: 11275324
3. Hofte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 1989; 53(2): 242-55. Epub 1989/06/01. PubMed PMID: 2666844; PubMed Central PMCID: PMC372730
4. Bravo A, Gill SS, Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 2007; 49(4): 423-35. Epub 2007/01/03. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022. PubMed PMID: 17198720; PubMed Central. PMCID: PMC1857359
5. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(3): 807-13. Epub 1998/09/08. PubMed PMID: 9729610; PubMed Central PMCID: PMC98935
6. Ohba M. *Bacillus thuringiensis* populations naturally occurring on mulberry leaves: A possible source of the populations associated with silkworm-rearing insectaries. *J Appl Bacteriol.* 1996; 80(1): 56-64. doi: DOI 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03190.x. PubMed PMID: ISI:A1996TP22000010
7. Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. *J Appl Microbiol.* 1999; 86(3): 477-86. Epub 1999/04/10. PubMed PMID: 10196753

8. Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, et al. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7(4): 625-34. Epub 2000/07/07. PubMed PMID: 10882663; PubMed Central PMCID: PMC95925
9. Okumura S, Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. and Shin, T. Parasporin nomenclature. Available: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>; Accessed: 16th march 2015 2010.
10. Crickmore N, Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available: <http://www.btnomenclature.info/>; Accessed: 27th may 2014 2014.
11. Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H, et al. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem*. 2006; 281(36): 26350-60. Epub 2006/07/01. doi: 10.1074/jbc.M602589200. PubMed PMID: 16809341
12. Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, Masutomi K, et al. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal action to human cells. *J Biol Chem*. 2004; 279(20): 21282-6. Epub 2004/03/18. doi: 10.1074/jbc.M401881200. PubMed PMID: 15026424
13. Kitada S, Abe Y, Maeda T, Shimada H. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytocidal action to human hepatoma cells. *Toxicology*. 2009; 264(1-2):80-8. Epub 2009/08/04. doi: 10.1016/j.tox.2009.07.016. PubMed PMID: 19646502
14. Chapdelaine P, Kang J, Boucher-Kovalik S, Caron N, Tremblay JP, Fortier MA. Decidualization and maintenance of a functional prostaglandin system in human endometrial cell lines following transformation with SV40 large T antigen. *Molecular Human Reproduction*. 2006; 12(5): 309-19. doi: 10.1093/molehr/gal034
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5. Epub 1970/08/15. PubMed PMID: 5432063
16. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res*. 1987; 47(4): 943-6. Epub 1987/02/15. PubMed PMID: 3802101

17. Ford CH, Richardson VJ, Tsaltas G. Comparison of tetrazolium colorimetric and [3H]-uridine assays for in vitro chemosensitivity testing. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 24(5): 295-301. Epub 1989/01/01. PubMed PMID: 2788039
18. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology.* 2007; 35(4): 495-516.
19. Koopman G, Reutelingsperger C, Kuijten G, Keehnen R, Pals S, van Oers M. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994; 84(5): 1415-20.
20. Liang Y, Yan C, Schor NF. Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene.* 2001; 20(45): 6570-8.
21. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(11): 897-907.
22. Yang Y, Zhao S, Song J. Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor β 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2004; 36(2): 223-34. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00215-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00215-2)
23. Sukharev SA, Pleshakova OV, Sadovnikov VB. Role of proteases in activation of apoptosis. *Cell death and differentiation.* 1997; 4(6): 457-62.
24. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews.* 2004; 30(2):193-204. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007>
25. Girouard J, Lafleur M-J, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology.* 2013; 128(2): 335-43. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.11.016>
26. Rouette A, Parent S, Girouard J, Leblanc V, Asselin E. Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells. *International Journal of Cancer.* 2012; 130(8): 1755-67. doi: 10.1002/ijc.26183
27. Chaudhry P, Asselin E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16(2): 363-80. Epub 2009/02/05. doi: ERC-08-0266 [pii] 10.1677/ERC-08-0266. PubMed PMID: 19190080

28. Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis*. 2008; 13(2): 259-71. Epub 2007/12/12. doi: 10.1007/s10495-007-0165-6. PubMed PMID: 18071906
29. Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-dependent Cleavage during Cisplatin-induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells. *Cancer Research*. 2001; 61(5): 1862-8.
30. Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. Requirement for ERK Activation in Cisplatin-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(50): 39435-43.
31. Cagnol S, Chambard J-C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal*. 2010; 277(1): 2-21. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x
32. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB life*. 2006; 58(11): 621-31. doi: 10.1080/15216540600957438
33. Chaudhry P, Singh M, Parent S, Asselin E. Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. *Molecular and Cellular Biology*. 2012; 32(4): 826-39. doi: 10.1128/mcb.06321-11
34. Chaudhry P, Fabi F, Singh M, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Prostate apoptosis response-4 mediates TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1044. doi: 10.1038/cddis.2014.7
35. Akiba T, Abe Y, Kitada S, Kusaka Y, Ito A, Ichimatsu T, et al. Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. *J Mol Biol*. 2009; 386(1): 121-33. Epub 2008/12/20. doi: 10.1016/j.jmb.2008.12.002. PubMed PMID: 19094993
36. Gonzalez E, Granados JC, Short JD, Ammons DR, Rampersad J. Parasporins from a Caribbean Island: evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. *Curr Microbiol*. 2011; 62(5): 1643-8. Epub 2011/03/08. doi: 10.1007/s00284-011-9905-5. PubMed PMID: 21380719
37. Van Rie J, Jansens S, Hofte H, Degheele D, Van Mellaert H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl Environ Microbiol*. 1990; 56(5): 1378-85. Epub 1990/05/01. PubMed PMID: 2339890; PubMed Central PMCID: PMC184414

38. Gomez I, Pardo-Lopez L, Munoz-Garay C, Fernandez LE, Perez C, Sanchez J, et al. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*. 2007; 28(1): 169-73. Epub 2006/12/06. doi: 10.1016/j.peptides.2006.06.013. PubMed PMID: 17145116
39. Haider MZ, Knowles BH, Ellar DJ. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1986; 156(3): 531-40. Epub 1986/05/02. PubMed PMID: 3009187
40. Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J Biol Chem*. 1997; 272(38): 23473-6. Epub 1997/09/20. PubMed PMID: 9295279
41. Gao L, Abu Kwaik Y. Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes Infect*. 2000; 2(14): 1705-19. Epub 2001/01/04. PubMed PMID: 11137044
42. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2005; 7(8): 1127-38. Epub 2005/07/13. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x. PubMed PMID: 16008580
43. Diep DB, Nelson KL, Raja SM, Pleshak EN, Buckley JT. Glycosylphosphatidylinositol anchors of membrane glycoproteins are binding determinants for the channel-forming toxin aerolysin. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(4): 2355-60. doi: 10.1074/jbc.273.4.2355. PubMed PMID: ISI:000071595200070
44. Jonas D, Walev I, Berger T, Liebetrau M, Palmer M, Bhakdi S. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun*. 1994; 62(4): 1304-12. Epub 1994/04/01. PubMed PMID: 8132337; PubMed Central PMCID: PMC186275
45. Amano H, Yamagiwa M, Akao T, Mizuki E, Ohba M, Sakai H. A novel 29-kDa crystal protein from *Bacillus thuringiensis* induces caspase activation and cell death of jurkat T cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005; 69(11): 2063-72. Epub 2005/11/25. PubMed PMID: 16306686

46. Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, et al. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca^{2+} influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration in toxin-sensitive cells. *J Biol Chem*. 2007; 282(10): 7742-52. Epub 2007/01/06. doi: 10.1074/jbc.M611382200. PubMed PMID: 17204466
47. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73: 87-106. Epub 2004/06/11. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706. PubMed PMID: 15189137
48. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development*. 1999; 13(22): 2905-27.
49. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes & development*. 1999; 13(3): 239-52.
50. Tong Q-S, Zheng L-D, Wang L, Zeng F-Q, Chen F-M, Dong J-H, et al. Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Ther*. 2005; 12(5): 509-14.
51. Fruman DA, Rommel C. PI3K and Cancer: Lessons, Challenges and Opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2014; 13(2): 140-56. doi: 10.1038/nrd4204. PubMed PMID: PMC3994981
52. West KA, Sianna Castillo S, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resistance Updates*. 2002; 5(6): 234-48. doi: 10.1016/S1368-7646(02)00120-6
53. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates*. 2008; 11(1-2): 32-50. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2007.11.003>
54. Mutter GL, Lin M-C, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JPA, Lees JA, et al. Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92(11): 924-30. doi: 10.1093/jnci/92.11.924
55. Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of Extracellular Signal-regulated Kinase on p53 Accumulation in Response to Cisplatin. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(46): 35778-85. doi: 10.1074/jbc.M004267200

56. Yeh PY, Chuang S-E, Yeh K-H, Song YC, Ea C-K, Cheng A-L. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF κ B activation. *Biochemical Pharmacology*. 2002; 63(8): 1423-30. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)00908-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(02)00908-5)
57. Jo S-K, Cho WY, Sung SA, Kim HK, Won NH. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int*. 2005; 67(2): 458-66.
58. El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM. Identification of a Unique Core Domain of Par-4 Sufficient for Selective Apoptosis Induction in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23(16): 5516-25. doi: 10.1128/mcb.23.16.5516-5525.2003
59. Hebbar N, Wang C, Rangnekar VM. Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor Par-4. *Journal of Cellular Physiology*. 2012; 227(12): 3715-21. doi: 10.1002/jcp.24098
60. Irby RB, Kline CL. Par-4 as a potential target for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013; 17(1): 77-87. doi: 10.1517/14728222.2013.731047. PubMed PMID: 23062118

Le chapitre IV contient une étude démontrant les mécanismes de régulation post-traductionnelle du fragment clivé de Par-4 dans des cellules de l'endomètre et de l'ovaire.

CHAPITRE IV

POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF THE CLEAVED FRAGMENT OF PAR-4 IN OVARIAN AND ENDOMETRIAL CANCER CELLS

Brasseur K, Fabi F, Adam P, Parent S, Lessard L, Asselin E.

Post-translational regulation of the cleaved fragment of Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):36971-36987.

doi: 10.18632/oncotarget.9235.

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Oncotarget* le 14 juin 2016. Il s'agit d'une revue cotée avec un facteur d'impact de 6,368 (5-ans) utilisant un processus d'examen par les pairs.

4.1 Contribution des auteurs

Kevin Brasseur a effectué en majorité la conception de l'étude, la réalisation des expérimentations ainsi que la totalité de l'écriture du manuscrit. François Fabi, étudiant au Ph. D, a effectué quelques expérimentations pour le manuscrit et aidé à la révision avec l'aide de Pascal Adam, étudiant à la maîtrise du laboratoire. Sophie Parent, assistante de recherche de l'équipe de laboratoire, a fait quelques manipulations et aidé à la mise au point de protocoles. Laurent Lessard, professeur associé à l'UQTR, a aidé à la révision du manuscrit. Éric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire et superviseur de ce manuscrit.

4.2 Résumé de l'article (français)

Nous avons récemment rapporté un clivage caspase-3-dépendant de Par-4 résultant de l'accumulation d'un fragment clivé de Par-4 de 25 kDa (cl.Par-4). Dans la présente étude, nous avons étudié les mécanismes de régulation de ce fragment en utilisant des clones stables exprimant cl.Par-4, dérivés de lignées cellulaires des cancers de l'ovaire et de l'endomètre.

La protéine cl.Par-4 était initialement faiblement exprimée dans tous les clones stables en dépit de l'expression constitutive de son gène. Cependant, lors d'un traitement au cisplatine, le niveau protéique de cl.Par-4 a augmenté jusqu'à 50 fois par rapport aux conditions contrôles. Le traitement des clones stables avec des inhibiteurs du protéasome et de la traduction a révélé que l'exposition au cisplatine pourrait en fait permettre la protection de la protéine cl.Par-4 d'une dégradation dépendante du protéasome. Les voies de survies PI3K et MAPK sont également impliqués comme en témoigne une augmentation de cl.Par-4 en présence d'inhibiteurs de PI3K et une diminution de cl.Par-4 avec l'utilisation des inhibiteurs de MAPK. Enfin, via l'utilisation de ressources bio-informatiques, nous avons découvert divers ensembles de données démontrant des résultats semblables à ceux que nous avons observés avec le protéasome et la protéine cl.Par-4 soutenant davantage nos données.

Ces nouveaux résultats s'ajoutent aux mécanismes complexes régulant l'expression et l'activité de la protéine Par-4, et justifient d'autres études portant sur la signification biologique de ce phénomène dans les cellules cancéreuses gynécologiques.

4.3 Article complet (anglais): Post-translational regulation of the cleaved fragment of Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells

Abstract

We recently reported the caspase3-dependent cleavage of Par-4 resulting in the accumulation of a 25kDa cleaved-Par-4 (cl-Par-4) fragment and we investigated in the present study the mechanisms regulating this fragment using cl-Par-4-expressing stable clones derived from ovarian and endometrial cancer cell lines.

Cl-Par-4 protein was weakly express in all stable clones despite constitutive expression. However, upon cisplatin treatment, cl-Par-4 levels increased up to 50-fold relative to baseline conditions. Treatment of stable clones with proteasome and translation inhibitors revealed that cisplatin exposure might in fact protect cl-Par-4 from proteasome-dependent degradation. PI3K and MAPK pathways were also implicated as evidenced by an increase of cl-Par-4 in the presence of PI3K inhibitors and a decrease using MAPK inhibitors. Finally using bioinformatics resources, we found diverse datasets showing similar results to those we observed with the proteasome and cl-Par-4 further supporting our data.

These new findings add to the complex mechanisms regulating Par-4 expression and activity, and justify further studies addressing the biological significance of this phenomenon in gynaecological cancer cells.

Introduction

In North America and Europe, gynaecological cancer accounts for more than 1/10th of cancer deaths and new cases among women [1–3]. Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer death among women and is the gynaecological cancer causing the highest mortality rate [1–5]. Endometrial cancer is the most common gynaecological cancer with the highest rate of new cases each year [1-3, 6]. One major hurdle among feminine cancers is that advanced and recurrent cases often come with acquired

chemoresistance that drastically reduces patient survival rates [5, 6]. New molecular targets are thus required to eliminate recurrence and overcome chemoresistant cancers.

Prostate apoptosis response-4 (Par-4) is one potential therapeutic protein because of its unique ability to induce apoptosis only in cancer cells in a selective manner [7, 8]. Par-4 unique apoptotic ability is activated by numerous complex mechanisms including the intrinsic and extrinsic caspase pathways [8–10]. Based on the human protein atlas, a considerably high level of Par-4 mRNA and protein can be found in both endometrium and ovary tissue relative to other tissue types [11]. It has been shown that Par-4 knock-out mice have a reduced lifespan and more than 36% of the studied animals developed endometrial cancer after only one year of living [12]. Nevertheless, except for a few studies, very little is known about Par-4 in ovarian and endometrial tissues [13–21]; it is also interesting to note that half of the studies were conducted in normal instead of cancer tissues [18–21]. The role and regulation of Par-4 in ovarian and endometrial malignancies thus warrants further investigation.

The functions and subcellular localization of Par-4 is regulated by various mechanisms. First, Par-4 is phosphorylated at Thr163 (Thr155 in rat) by PKA allowing the protein to translocate to the nucleus and induce apoptosis in cancer cells [22]. Localization plays a critical role in Par-4 ability to induce apoptosis. Indeed, Par-4 needs to translocate to the nucleus, via its NLS2 domain, to activate the apoptotic cascade and phosphorylation by PKA at Thr163 is a pre-requisite for this nuclear entry [8]. In the case of normal cells, they express a moderate to high level of Par-4, however most of the protein is located in the cytoplasm [11, 21, 23]. Par-4 also has a second site of phosphorylation at Ser249 in rats which is phosphorylated by AKT1 [24]. AKT1 can also bind and phosphorylates Par-4 in human cells, however, the exact site of phosphorylation in the human sequence of Par-4 has yet to be experimentally confirmed. AKT1 binds directly on Par-4's leucine zipper domain and then phosphorylates Par-4 to maintain the protein in the cytoplasm leading to cancer cells survival and inhibition of Par-4 apoptotic activity [24]. In turn, Par-4 is also known to negatively regulate the level/activity of AKT downstream targets such as NF κ B and XIAP [25–27]. Data from

cbioportal.org indicates that PI3K/AKT/PTEN pathway is more than often mutated or amplified in endometrial (> 90%) and ovarian cancers (> 55%), offering an advantage for cancer cell survival [28, 29]. These high levels of alteration in the PI3K/AKT/PTEN pathway indicate a potential issue for Par-4 activity, because of AKT1 negative regulation, in endometrial and ovarian cancers and are also known for being important key protein related to the chemoresistance of the feminine cancers [5, 6, 30–32]. Par-4 downregulation can also increase the components of the PI3K/AKT pathway, conferring resistance to chemotherapy to pancreatic cancer cells [33]. While previous publications have hinted at the crosstalk between the PI3K pathway and Par-4 dynamics, very little mechanistic work has been made toward the clarification of this relationship [24, 34].

In addition to phosphorylation, Par-4 is also regulated by other post-translational mechanisms. Indeed, a recent paper has shown that Par-4 can be ubiquitinated via binding with Fbxo45 protein on its VASA domain to decrease its protein level [35]. We also recently discovered that Par-4 is cleaved by caspase-3 at D131 during apoptosis in many different cancer cells. This cleavage consistently generates a 25 kDa cleaved fragment (cl-Par-4) that contains the nuclear localization sequence (NLS2), the selective for apoptosis induction in cancer cells domain (SAC) and the leucine zipper domains [14]. Most importantly, the accumulation of cl-Par-4 under various apoptotic stimuli seems to be an important factor related to the chemosensitivity of cancer cells and the level of apoptosis observed. Nevertheless, beside a few incidental reports in the literature [36–38], not much is known about this cleaved fragment. Considering the potential importance of this modification, further exploration of the mechanisms related to this fragment are required to better understand Par-4 functions. In this study, we report for the first time that cl-Par-4 is regulated by diverse post-translational mechanisms including the proteasome and the PI3K/MAPK survival pathways in both ovarian and endometrial cancer.

Materials and methods

Cell culture

Human endometrial cancer cell lines Ishikawa and Hec-1a were kindly provided by Dr. Sylvie Mader (Université de Montréal, Montréal, Canada); A2780 and A2780CP (Cisplatin resistant) were kindly provided by Dr. G. Peter Raaphorst (Ottawa regional cancer center, Ottawa, Canada). Hec-1a cell line was maintained in McCoy's 5A Medium containing 5% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin; Ishikawa, A2780 and A2780CP cell lines were maintained in DMEM-F12 medium containing 2% bovine growth serum and 50 µg/ml gentamycin. The cells were maintained at 37°C with 5% CO₂.

Lentiviral transfection

Lentiviral particles were produced using the lenti-X HTX packaging system and HEK-293T cells from Clontech laboratories (Mountain View, CA, USA). The cl-Par-4-myc-DDK plasmid was constructed from a pLVX-puro backbone plasmid (Clontech laboratories, Mountain View, CA, USA). The cl-Par-4 portion of the plasmid was added using the InFusion cloning system from Clontech (Mountain View, CA, USA). The cl-Par-4 fragment also contains a myc-tag sequence as well as a DDK (Flag) sequence at 3' -end. Ovarian cancer cells (A2780 and A2780CP) and endometrial cancer cells (Ishikawa and Hec-1a) were then infected with supernatant containing lentiviral particles of either empty pLVX-puro or pLVX-cl-Par-4-myc-DDK plasmid for 24 h. Media was then replaced and cells were let to recover for 24 h. Antibiotic selection of transduced cells were then done using puromycin (0,75 µg/ml for Hec-1a and 0,5 µg/ml for A2780, A2780CP and Ishikawa) for five days. The whole pool containing the resistant cells were then used for further experimentations.

Antibodies and reagents

All primary antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) except for the loading controls GAPDH (Abcam, Cambridge, MA, USA) and β -actin (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA). Secondary antibodies, HRP-conjugated goat anti-rabbit was from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Cisplatin, 17 β -estradiol, Cycloheximide, Wortmannin, Insulin and MG-132 were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA), NVP-BEZ235 was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), MK-2206, Perifosine and AZD5364 were purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA), U0126 and PD98059 were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).

Western blot

Treated cells were washed with PBS and submitted to lysis in cold RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) followed by three freeze-thaw cycles. Equal amounts of cell lysates, determined using Bio-Rad DC protein assay (Mississauga, ON, Canada), were separated by SDS-Page polyacrylamide gels (8-15%) and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Membranes were blocked in 5% milk, PBS 1X, 0.06% Tween 20 for 1 h at room temperature, probed with primary antibody, washed in PBS 1X, 0.06% Tween 20, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Detection was performed using SuperSignal West Femto™ substrate (Thermo Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada), as described by the manufacturer using UVP bioimaging systems. Densitometry was done using either Quantity One software version 4.6.9 (Bio-rad, Mississauga, ON, Canada) or ImageJ software 1.50B [83].

Subcellular fractionation

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) was used according to the manufacturer's instructions. Cytoplasmic proteins were collected using CERI&II reagents while proteins from the nucleus were collected using NER reagent. GAPDH was used as a loading/purity control for cytoplasmic proteins while PARP was used for nuclear proteins.

Statistical analyses

The data were subjected to one-way or two-way analysis of variance (One-way/Two-way ANOVA) using PRISM software (version 6.00; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when $p < 0.05$.

Results

Par-4 is cleaved only in chemosensitive ovarian and endometrial cancer cells during cisplatin treatment

Par-4 possesses various domain including the nuclear localization sequence (NLS1&2), the VASA domain for ubiquitination by Fbxo45, the selective for apoptosis in cancer cells domain (SAC) and a leucine zipper domain (Figure 4.1A).

A characteristic to consider for cancer therapy is the level of alteration the protein of interest possesses. In the case of Par-4, the protein is scarcely ever suppressed, nor mutated. Literature and data from cbiportal.org indicates that less than 2.5% of all cancer cases have a mutation or suppression of the Par-4 gene, excluding melanoma. This rate is even lower (< 1%) in ovarian and endometrial cancers (Figure 4.1B) [28]. This low alteration rate combined with the tumour suppressor characteristic of Par-4 are favourable for consideration as a molecular target for cancer therapy.

We have previously demonstrated that upon cisplatin treatment, Par-4 is cleaved by caspase-3 at D132 and subsequently generates a 25kDa fragment, probed with Par-4 antibody, that we named cl-Par-4 (Figure 4.1A) [14]. We hence decided to evaluate if the same effect would be observed in different ovarian (A2780, A2780CP) and endometrial (Ishikawa, Hec-1a) cancer cells. Interestingly, cl-Par-4 was present in a dose-dependent manner only in chemosensitive cell lines (Ishikawa and A2780) treated with cisplatin (Figure 4.1C). Indeed, no additional band representing cl-Par-4 was visible at approximately 25kDa in the chemoresistant cell lines (Hec-1a and A2780CP) after cisplatin treatment (Figure 4.1C). These findings indicate that cancer cells from both ovarian and endometrial tissues can also cleave Par-4 and that the chemoresistance status of the cell line plays a role in the presence of cl-Par-4 upon cisplatin treatment.

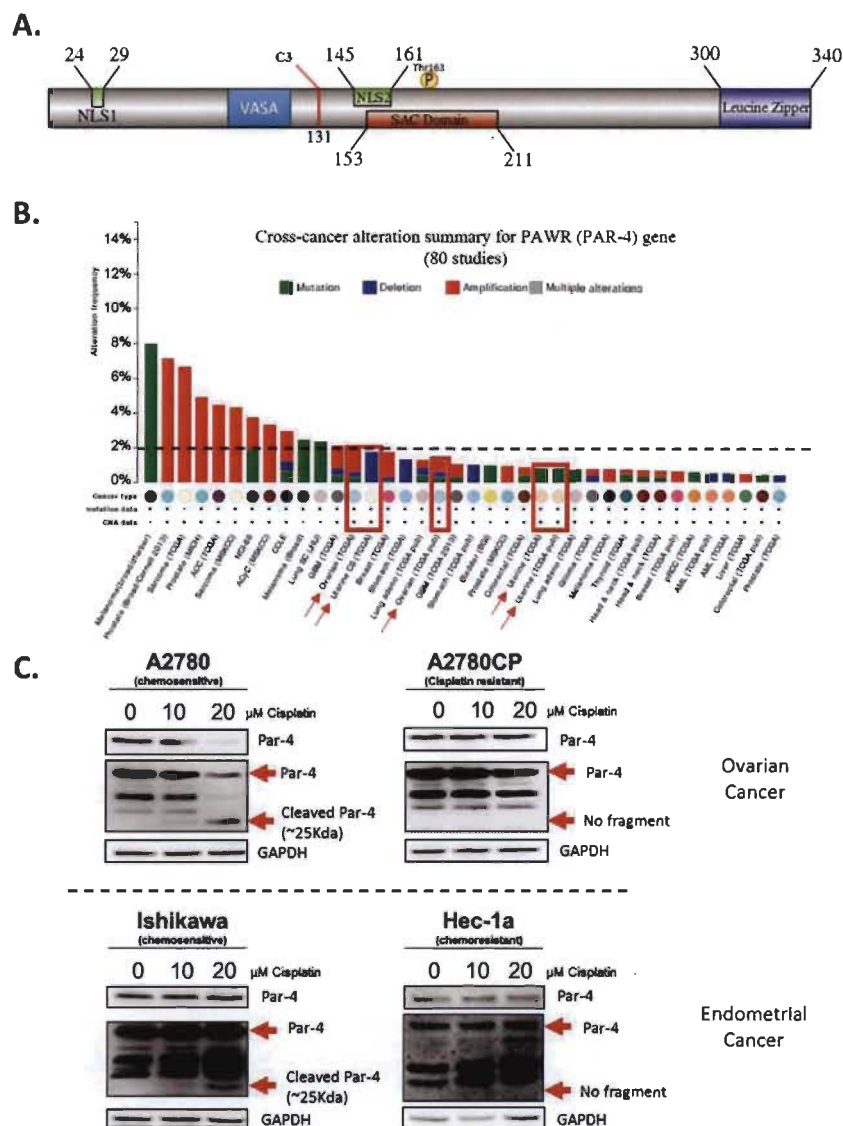


Figure 4.1 Summary of Par-4 protein and its cleavage in ovarian and endometrial cancer cells upon cisplatin treatment.

A. Schematic of Par-4 domains including the caspase-3 cleavage site location. B. Histogram presenting the low level of alteration of Par-4 gene (PAWR) occurring in various cancer cell lines. C. Ovarian cancer cell lines (A2780-A2780CP) and endometrial cancer cell lines (Ishikawa and Hec-1a) were treated with 10-20 μ M Cisplatin for 24 h. The level of Par-4 and its cleaved fragment were determined in treated cells using western blot analysis. GAPDH was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

Cleaved-Par-4 is stabilized by post-translational mechanisms upon cisplatin treatment

To better explore the regulation of cl-Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells, we used a lentiviral plasmid containing the cl-Par-4 sequence with the addition of myc-tag and FLAG (DDK) at the 3'-end (Figure 4.2A). Using this newly constructed lentiviral plasmid, we infected both ovarian (A2780, A2780CP) and endometrial (Ishikawa, Hec-1a) cancer cells, followed by a five-day antibiotic selection to obtain stables clones exhibiting constitutive cl-Par-4 expression (Figure 4.2B). Intriguingly, a very high exposition was required to see the protein levels of cl-Par-4 by Western blot indicating the levels were relatively low considering the constitutive expression of the transgene. This weak expression was observed in all four ovarian and endometrial cancer cell lines, which indicated a potential negative regulatory mechanism targeting the cl-Par-4 protein (Figure 4.2B). We then treated all four cell lines expressing cl-Par-4 with incremental doses of cisplatin (10-20 μ M) and witnessed an unequivocal dose-dependent increase in cl-Par-4 levels (Figure 4.2C). The effect was also related to the chemoresistance status of cell lines: chemosensitive cancer cells exhibited a dramatic 50 fold increase in cl-Par-4 levels relative to baseline conditions, while chemoresistant cancer cells showed a modest increase, with values for fold change ranging from 2 to 5 (Figure 4.2C-D). These results are similar to those observed for endogenous cl-Par-4 with regards to the chemoresistance status of cell lines (Figure 4.1), but also reveal that cl-Par-4 accumulation is not only the result of a caspase-3-dependent cleavage and may also involve other regulatory mechanisms.

Finally, we treated Ishikawa with cisplatin at different time points (2 h, 6 h and 24 h) to determine if cl-Par-4 accumulation was detectable before 24 h. The results clearly show that cl-Par-4 levels are increased as soon as 2 h after treatment with 20 μ M cisplatin indicating that this regulation is rapid and likely mediated by post-translational mechanisms (Figure 4.2E).

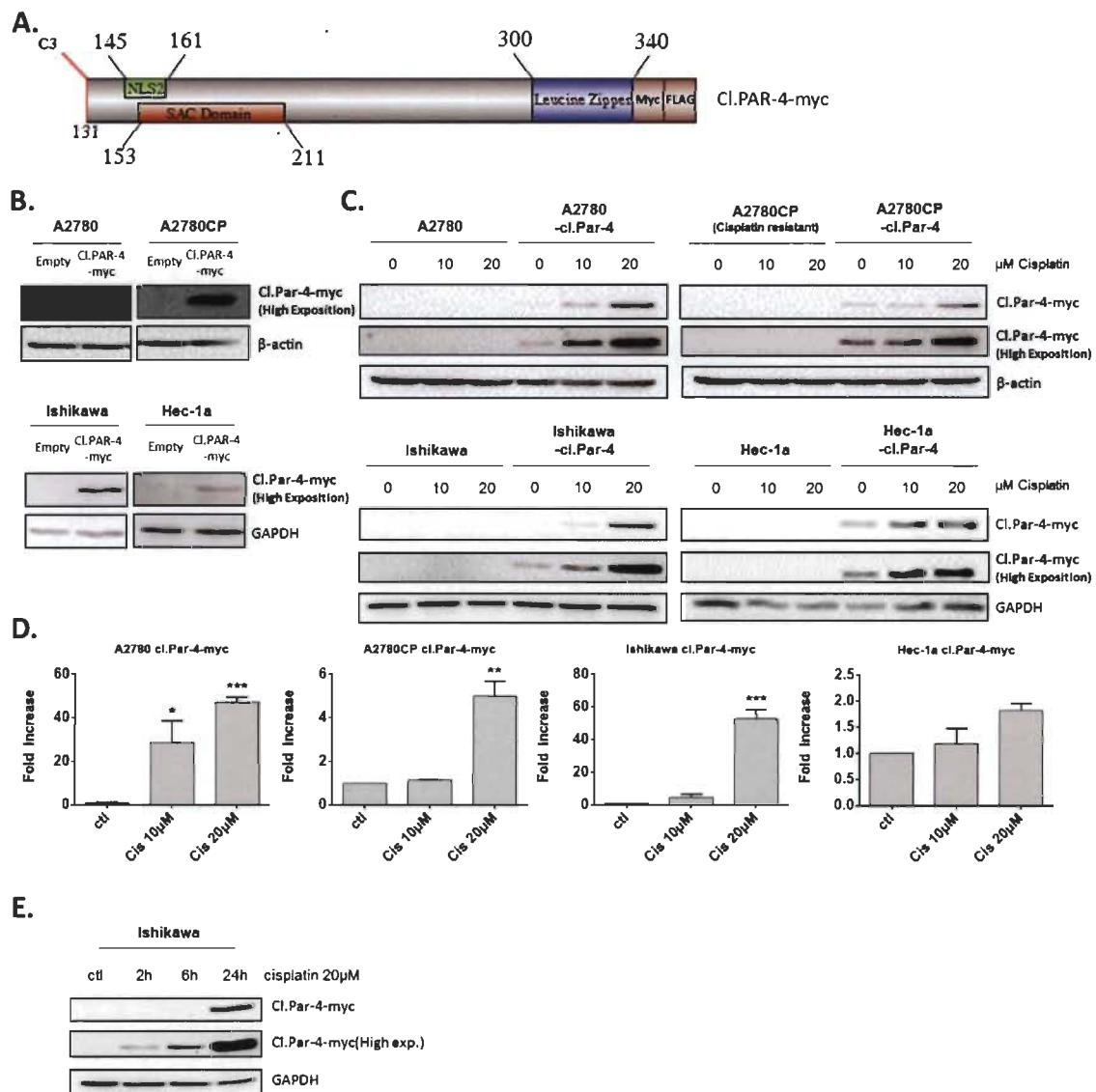


Figure 4.2 Cleaved-Par-4 protein is stabilized upon cisplatin treatment.

A. Schematic of cl-Par-4 transgene and its domains for the production of stable clones, used throughout the manuscript. B. Ovarian and endometrial cancer cells were stably transduced with cl-Par-4-myc plasmid using lentiviral particles. C-D. Cl-Par-4 cancer cell lines were treated with 10-20 μ M Cisplatin for 24 h. E. Ishikawa Cl-Par-4 cancer cell lines were treated with 20 μ M Cisplatin for 2 h, 6 h or 24 h. The protein level of cl-Par-4-myc was determined in treated cells using western blot analysis. β -Actin or GAPDH were used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. Results are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments. *= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$ and ***= $P < 0.001$ when compared with corresponding mock-treated cells.

Cleaved-Par-4 subcellular localization in ovarian and endometrial cancer cell lines

Since full-length Par-4 can be found in both the cytoplasm and nucleus of cancer cells, we questioned if cl-Par-4 was also localized in both compartments and if a translocation would occur upon cisplatin treatment to increase the level of cl-Par-4 as previously observed. Using subcellular fractionation and western blot, we observed a pattern where cl-Par-4 was localized in both the cytoplasm and nucleus in ovarian and endometrial cancer cell lines in presence or absence of cisplatin (Figure 4.3A). No apparent nuclear translocation occurred upon cisplatin treatment. These results indicated that the localization of cl-Par-4 was not implicated in the post-translational regulation observed when using cisplatin.

A.

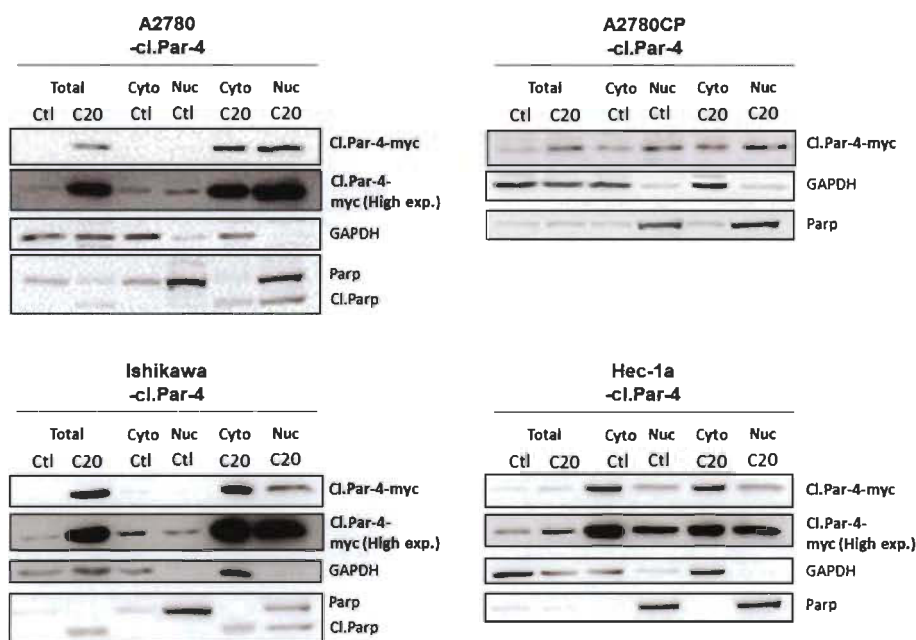


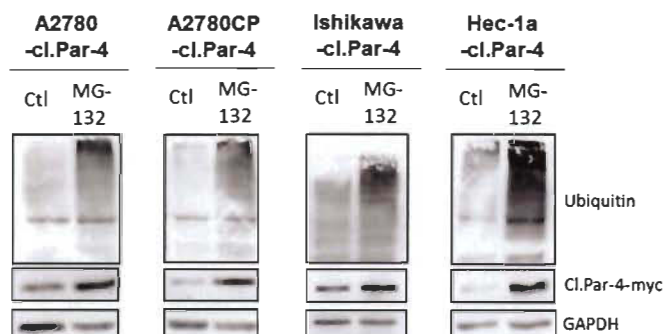
Figure 4.3 Cleaved-Par-4 localization in ovarian and endometrial cancer cell lines.

Cl-Par-4 cancer cell lines were treated with 20 μ M Cisplatin for 24 h. A. Cytosolic/nuclear cell fractionation was done and the protein level of cl-Par-4-myc was determined in treated cells using western blot analysis. GAPDH and PARP were used as cytosolic and nucleus loading control respectively. Results shown are representative of three independent experiments.

Cleaved-Par-4 protein level is decreased by the proteasome

Considering that full-length Par-4 is regulated by various post-translational mechanisms including ubiquitination and proteasome-dependent degradation, we assessed whether cl-Par-4 could be regulated in a similar manner by treating ovarian and endometrial cancer cells with a proteasome inhibitor, MG-132 (Figure 4.4A-B). MG-132 inhibits the degradation of ubiquitinated proteins but is also known to be able to induce apoptosis [39, 40]. To prevent this undesired effect, we first used a standard 10 μ M dose of MG-132, but for a short period (2 h) and a considerable increase in cl-Par-4 levels was observed (Figure 4.4A). An even more significant increase was detected using a lower dose (2 μ M) for 24 h (Figure 4.4B).

A. 10 μ M MG-132, 2h



B. 2 μ M MG-132, 24h

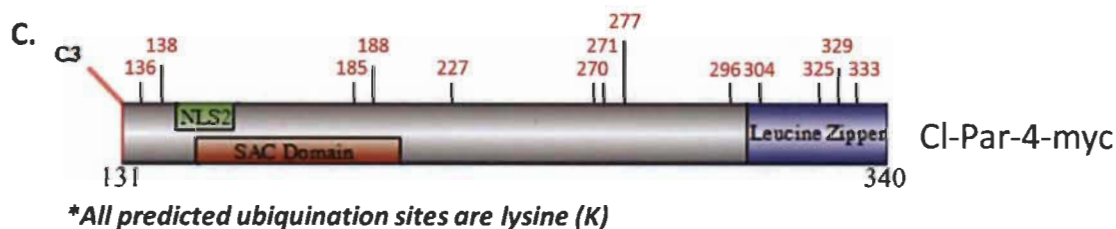
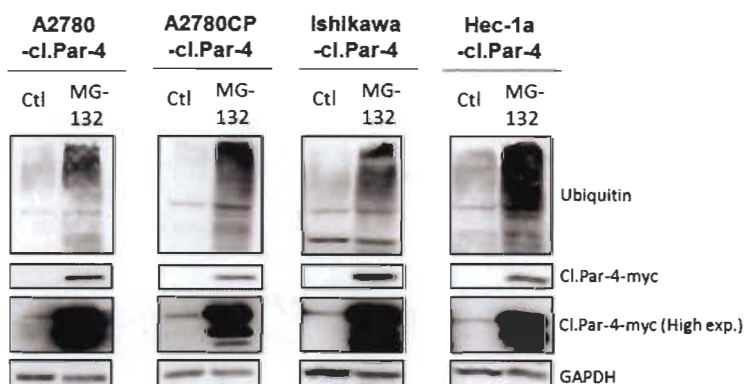


Figure 4.4 Proteasome negative regulation of cleaved-Par-4.

A-B. Cl-Par-4 cancer cells were treated with either 10 μ M MG-132 for 2 h or 2 μ M MG-132 for 24 h. C. Schematic of cl-Par-4 transgene and the predicted ubiquitination sites from bioinformatic analysis.

Subsequently, we performed bioinformatics analyses using online databases to verify if algorithms could predict any potential ubiquitination sites (Figure 4.4C). First, we used the phosphosite plus database and found a potential site at K333 located on leucine zipper domain [41, 42]. Phosphosite plus supports this prediction with six different manuscripts which predicted the K333 site using proteomic discovery-mode mass spectrometry, thus strengthening the likelihood of a true ubiquitination site

[41, 42]. In parallel, we used three additional bioinformatics tools (Ubiprober, Ubpred, BDM-PUB) and identified 13 candidate ubiquitination sites, including the K333 site previously predicted by discovery-mode mass spectrometry (Tableau 4.1) [43–45]. By looking at the position of each predicted site, we found that K185 and K188 are located within the SAC domain while K305, K325, K329 and K333 are located within the leucine zipper domain (Tableau 4.1) (Figure 4.4C). Altogether, these results suggest that cl-Par-4 is ubiquitinated.

Tableau 4.1

Prediction of ubiquitination sites for cleaved-PAR-4

Position*	Sequence	Database ressource
136	EPDGVPE- K -GKSSGPS	BDM-PUB; Ubpred; Ubiprober
138	DGVPEKG- K -SSGPSAR	BDM-PUB; Ubpred; Ubiprober
185	EDDEAGQ- K -ERKREDA	BDM-PUB; Ubpred
188	EAGQKER- K -REDAITQ	BDM-PUB; Ubpred
227	RTVSGRY- K -STTSVSE	BDM-PUB; Ubpred
270	VSSSTLE- K -KIEDLEK	BDM-PUB; Ubpred
271	SSSTLEK- K -IEDLEKE	BDM-PUB; Ubpred
277	KKIEDLE- K -EVVRERQ	Ubpred; Ubiprober
296	LVRLMQD- K -EEMIGKL	Ubpred; Ubiprober
304	EEMIGKL- K -EEIDLLN	Ubpred; Ubiprober
325	EDENEQL- K -QENKTLL	Ubpred; Ubiprober
329	EQLKQEN- K -TLLKVVG	Ubpred; Ubiprober
333	QENKTLL- K -VVGQLTR	BDM-PUB; Ubiprober; Phosphosite plus

*Position is based on full length Par-4 sequence.

Ubiquitination sites were predicted using four bioinformatics database (BDM-Pub; Ubpred; Ubiprober and Phosphosite plus). 13 potential sites of ubiquitination were predicted considering they were provided by at least two bioinformatics tools. The position indicated in the table is based on the full length of Par-4 sequence (NP_002574.2). All sites are located on a Lysine (K).

Ubiquitination and proteasome degradation often plays a critical role in protein stability. Considering the previous observations with the different compounds, we wanted to know if they were related to the protein stability of cl-Par-4. To determine

whether cisplatin-induced cl-Par-4 accumulation was solely the result of increased protein stability or also the result of increased translation, we treated ovarian and endometrial cancers cells with cycloheximide, an inhibitor of protein biosynthesis, at various time points alone or in combination with cisplatin or MG-132 as a positive control (Figure 4.5). Firstly, cl-Par-4 protein half-life was measured under normal condition in both Ishikawa and Hec-1a cells and 1h30 was approximately the time required after cycloheximide addition to obtain 50% of remaining protein (Figure 4.5). Combining cycloheximide with MG-132 abrogate cl-Par-4 accumulation supporting the post-translational stabilization of cl-Par-4 by the proteasome (Figure 4.5A-B). In the presence of MG-132, half-life of cl-Par-4 significantly increased in Ishikawa cells (approximately 3h15) and not yet attained in Hec-1a cells after 8h treatment with cycloheximide (Figure 4.5B). Combining cycloheximide with cisplatin did abrogate cl-Par-4 accumulation in a similar manner as observed with MG-132 (Figure 4.5C). In both Ishikawa and Hec-1a cells, the half-life of cl-Par-4 was similarly increased with MG-132, as with cisplatin, hence supporting the post-translational stabilization of cl-Par-4 upon cisplatin treatment (Figure 4.5A&C).

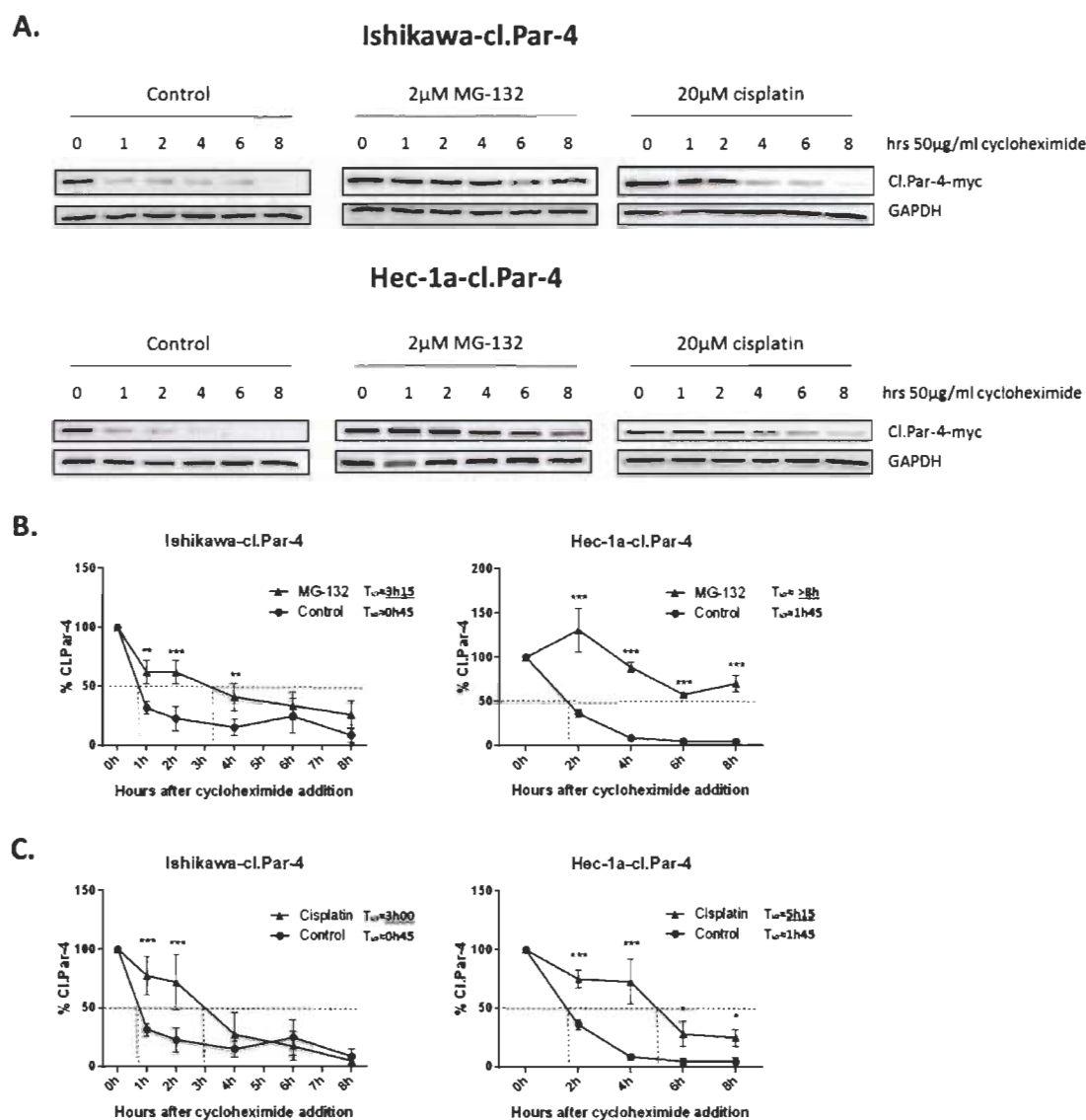


Figure 4.5 Cleaved-Par-4 protein stability.

A. Endometrial cl-Par-4 cancer cells were treated or not with either 2 μ M MG-132 or 20 μ M for 24 h and 50 μ g/ml cycloheximide was added 1-8 h before the end of treatment. The protein level of cl-Par-4-myc was determined in treated cells using western blot analysis. GAPDH was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. B. Graph representing cl-Par-4 protein stability when using cycloheximide in combination or not with MG-132. C. Graph representing cl-Par-4 protein stability when using cycloheximide in combination or not with cisplatin. Results are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments. *= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$ and ***= $P < 0.001$ when compared with corresponding mock-treated cells.

PI3K and MAPK pathways are involved in the regulation of cleaved-Par-4 levels

We next investigated whether well-established pro-survival PI3K and MAPK pathways in ovarian and endometrial cancers could be involved in the post-translational regulation of cl-Par-4.

We first looked at the PI3K pathway using the common PI3K inhibitor Wortmannin at various doses and observed a significant dose-dependent increase in cl-Par-4 protein levels (Figure 4.6A). We pursued experimentations with the use of a clinical PI3K inhibitor, NVP-BEZ-235 that positively supported the previous results and observed a significant increase of cl-Par-4, again in a dose-dependent manner (Figure 4.6B). To further support the role of PI3K signaling in the process, we used insulin to activate the PI3K pathway and assessed whether this would cause the down-regulation of cl-Par-4. In line with our hypothesis, cl-PAR-4 level was decreased within 30 min of insulin treatment (Figure 4.6C). We also examined if the increase of cl-Par-4 previously observed with cisplatin treatments was PI3K-dependent. In order to answer this question, we pre-treated cancer cells with NVP-BEZ235 to initially inhibit PI3K activity in cancer cells. Following the pre-treatment, cancer cells were treated with 20 μ M cisplatin for 24 h. Combining both NVP-BEZ235 with cisplatin increased cl-PAR-4 in a synergetic manner in all three cancer cell lines indicating that the positive regulation of cl-PAR-4 previously observed with cisplatin alone was not solely PI3K-dependent (Figure 4.6D). Indeed, if PI3K was solely responsible for the protein increase of cl-Par-4 observed with cisplatin, the protein level when comparing the pre-treatment with NVP-BEZ235 versus its combination with cisplatin would not be significantly different, which is not the case in our experiment. PI3K inhibition, thus, contribute to the effect observed with cisplatin but is not the only responsible protein.

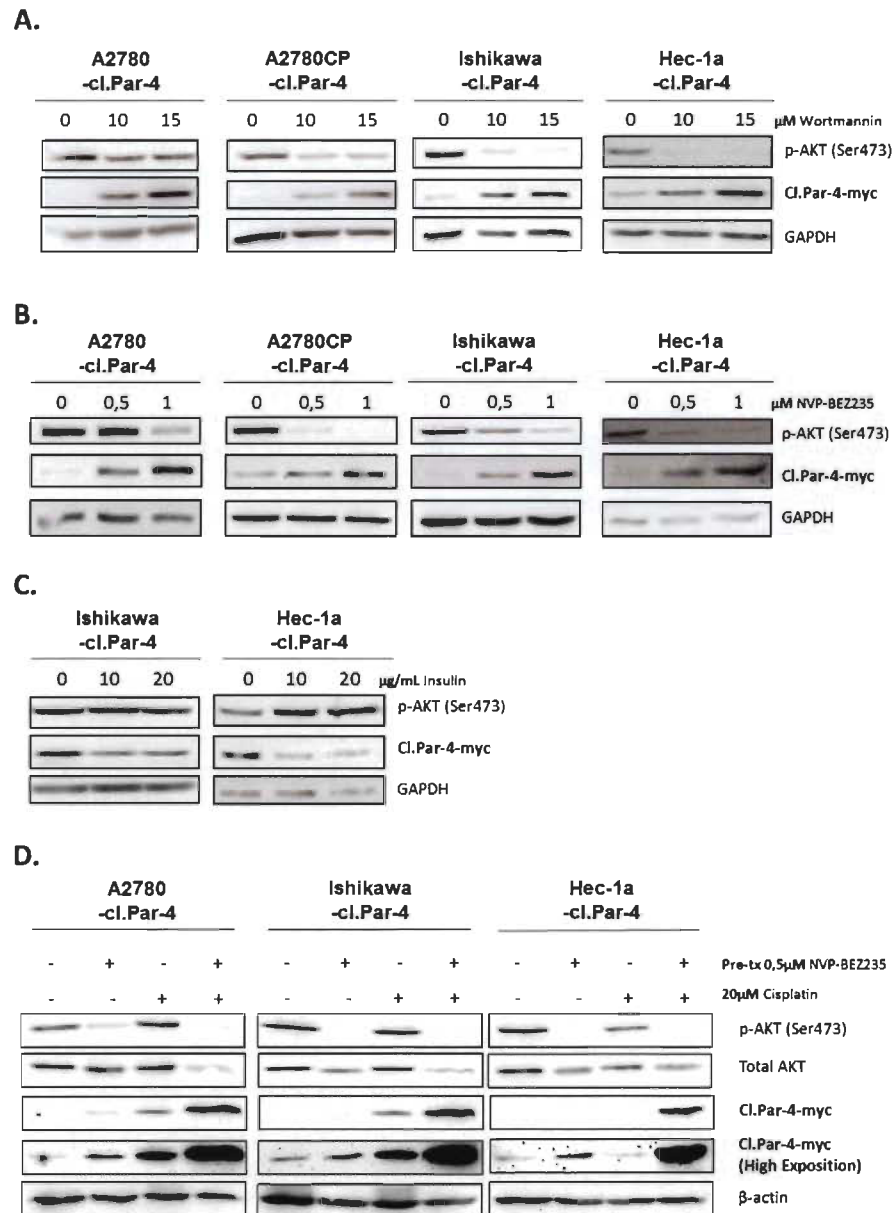


Figure 4.6 PI3K pathway decreases cleaved-Par-4-myc protein.

A. Cl-Par-4 cancer cells were treated with 10 or 15 μM PI3K inhibitor (Wortmannin) for 24 h. B. Cl-Par-4 cancer cells were treated with 0,5 or 1 μM clinical PI3K inhibitor (NVP-BEZ235) for 24 h. C. Endometrial cancers cells were treated with 10 or 20 $\mu\text{g/mL}$ of insulin to induce PI3K activity for 30 min. D. Cl-Par-4 cancer cells were pre-treated with 0,5 μM clinical PI3K inhibitor (NVP-BEZ235) for 24 h followed by a 24 h treatment of 20 μM cisplatin. The levels of p-AKT (Ser473), total AKT and cl-Par-4-myc were determined in treated cells using western blot analysis. GAPDH or β -actin were used as loading controls. Results shown are representative of three independent experiments.

AKT is one of the main downstream targets of PI3K and we wondered if this protein was implicated in the regulation observed with PI3K inhibition and cl-Par-4. To do so, we used three different pan-AKT inhibitors (MK-2206, AZD5363 and Perifosine). Both MK-2206 and Perifosine inhibitors are known to strongly reduce the phosphorylation level of AKT and its activity while AZD5363 is known to inhibit the phosphorylation of AKT downstream substrates [46–48]. The obtained results suggest that inhibition of AKT activity does not regulate cl-Par-4 as we observed with PI3K (Figure 4.7). Indeed, the regulation observed with AKT inhibitors is the opposite of what we previously observed with PI3K inhibitors. Consequently, this indicate that PI3K downregulates cl-Par-4, independently of AKT.

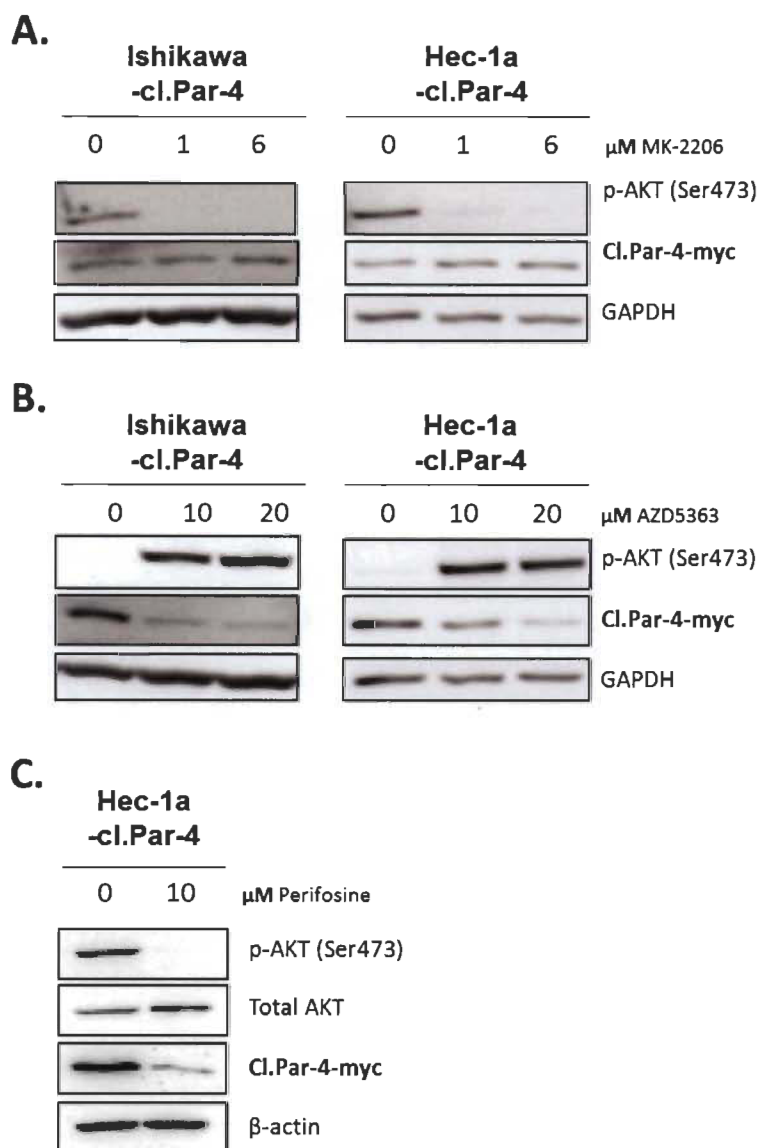


Figure 4.7 AKT inhibition does not increase cleaved-Par-4 protein level. Cl-Par-4 cancer cells were treated with either (A) 1 or 6 μM AKT inhibitor (MK-2206), (B) 10 or 20 μM AKT inhibitor (AZD-5363) or (C) 10 μM of AKT inhibitor (Perifosine) for 24 h. The levels of p-AKT (Ser473), total AKT and cl-Par-4-myc were determined in treated cells using western blot analysis. GAPDH or β -actin were used as loading controls. Results shown are representative of three independent experiments.

Next, we investigated the MAPK pathway using U0126, an inhibitor of MEK1 and MEK2 kinases. MAPK inhibition caused the down-regulation of cl-Par-4 in both ovarian and endometrial cancer cell lines (Figure 4.8A). We observed similar effect with the

MAPK pathway inhibitor PD98059 in Hec-1a endometrial cancer cells (Figure 4.8B). These findings are the exact opposite of what we obtained with PI3K inhibitors, and could be explained by a regulatory cross-talk between PI3K and MAPK pathways. In support of this, we found that MAPK inhibition led to an increase in p-Akt (S473), a downstream target of PI3K in Hec-1a endometrial cancer cells (Figure 4.8C). Overall, these results demonstrate that both the PI3K and MAPK pathways can regulate cl-Par-4 differentially.

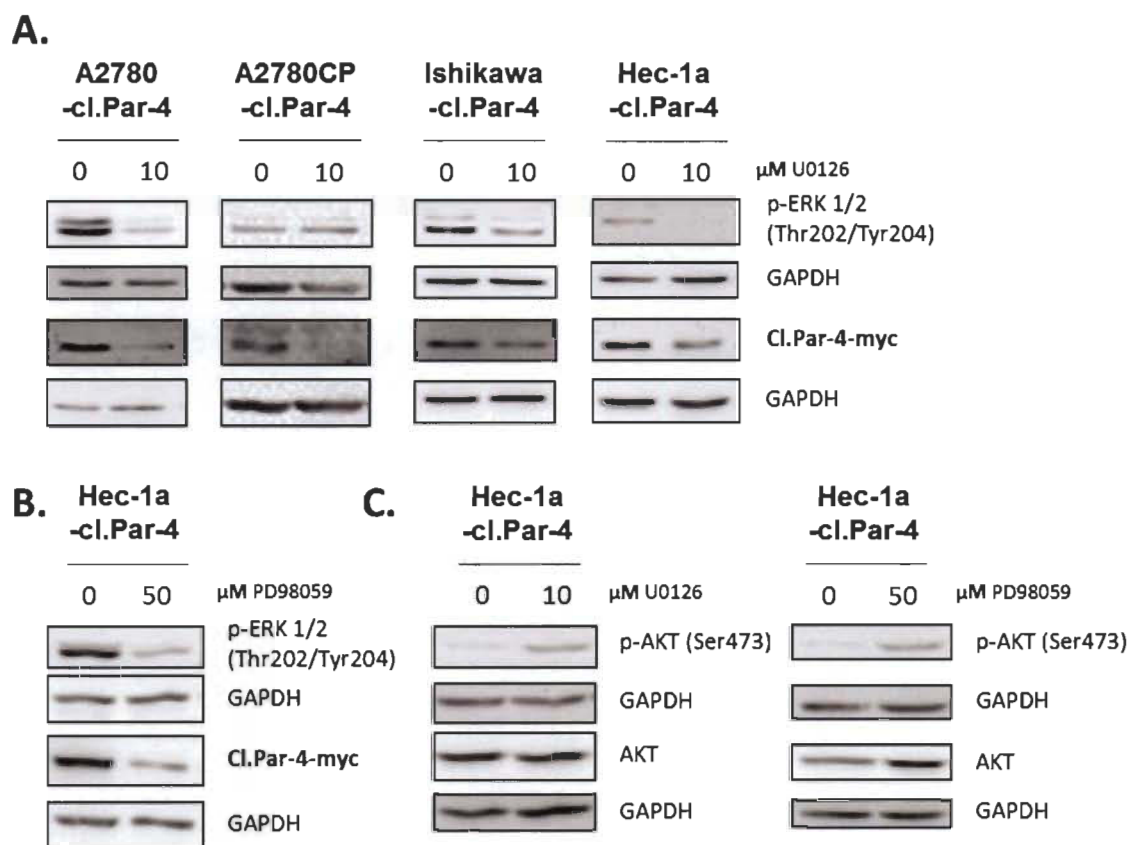


Figure 4.8 MAPK pathway increases cleaved-Par-4 protein.

A-C. Cl-Par-4 cancer cells were treated with either 10 μM MAPK inhibitor (U0126) or 50 μM MAPK inhibitor (PD98059) for 24 h. The levels of p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), p-AKT (Ser473), AKT and cl-Par-4-myc were determined in treated cells using western blot analysis. GAPDH was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments.

Integrating the signaling pathways responsible for cleaved Par-4 regulation

In light of the results shown earlier in this study, we posit that a complex signaling network, composed of multiple regulatory elements, is capable of modulating cleaved Par-4 levels. A schematic representation of the findings of our study can be found in Figure 4.9A. This cartoon clearly shows the intricate relationship between multiple pathways and regulatory mechanisms, all converging into the upregulation of the amount of cl-Par4 found in the cell. Interestingly, by perusing various databases and submitting them to bioinformatics analyses, we uncovered novel similar conclusions in other models [49]. MCF7 cells subjected to Bortezomib treatment, a clinically used proteasome inhibitor, exhibited significantly increased Par-4 expression; the same experiment showed a sharp and significant decrease of Par-4 expression following 17 β -estradiol (E2) treatment (Figure 4.9B). A similar experiment from a different dataset suggested the same effect on Par-4 (Figure 4.9C). Finally, the knockdown of proteasome subunits PSMB3 and PSMB5 were shown to induce significantly increased Par-4 expression in MCF7 cells (Figure 4.9D). Taken together, these results suggest a complicated but certain relationship between proteasome activity, E2 signaling and Par-4 expression.

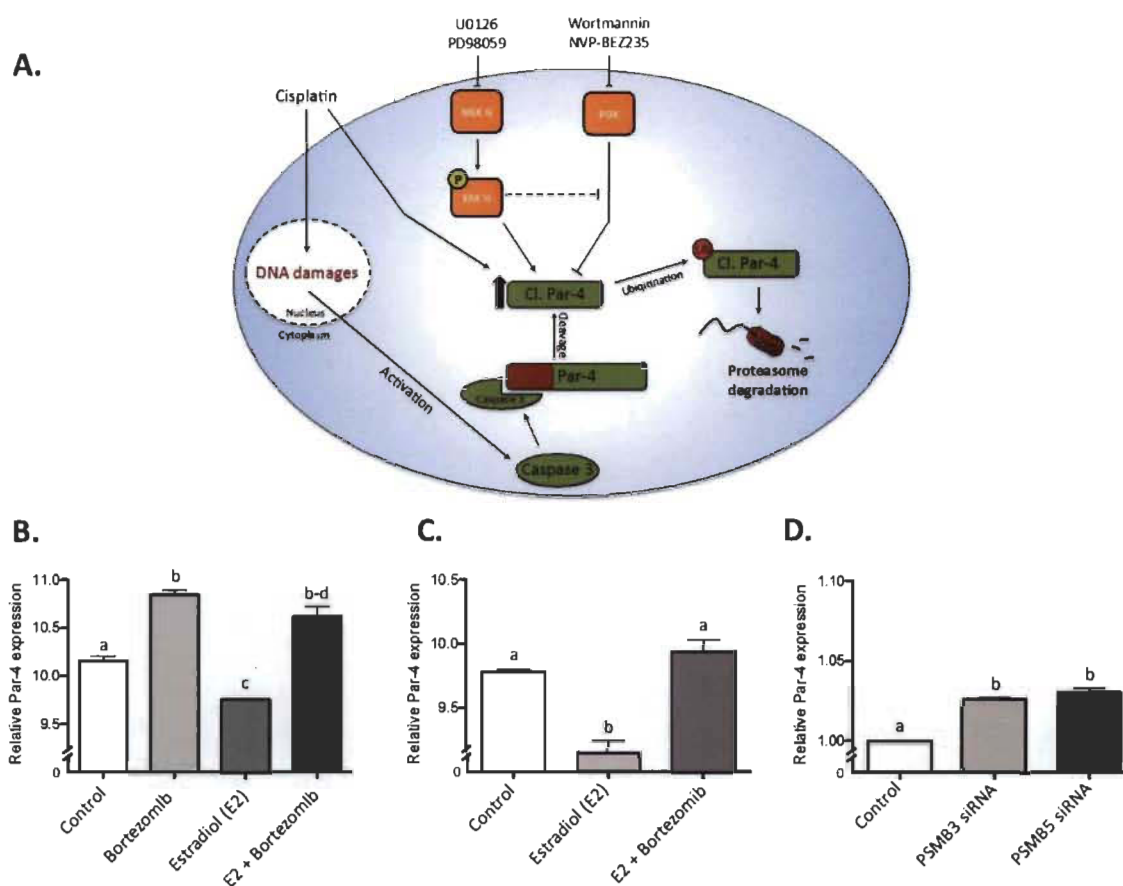


Figure 4.9 Graphical representation of the proposed model and public data.

A. The proposed model of regulation regarding the cleaved fragment of Par-4. (B-D) Data from two independent dataset taken from a study from Prentzel et al. (PMID 21862633). Relative Par-4 mRNA expression was used in all cases. B. The use of Bortezomib, a potent proteasome inhibitor, significantly increases Par-4 expression in MCF7 cells while estradiol significantly reduces it. However, the use of both reverse the negative effect of estradiol (GEO accession GDS4089). C. The use of estradiol in MCF7 cells significantly reduces Par-4 expression and Bortezomib treatment reverse this effect (GEO accession GDS4090). D. The knockdown of PSMB3 and PSMB5 (Proteasome subunits) induces a significant increase of Par-4 mRNA in MCF7 cells (GEO accession GDS4090). Results are mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments and $P < 0.05$.

Discussion

Par-4 is known for being a complex protein associated with multiple pro-apoptotic mechanisms and regulated by several post-translational modifications [9, 10]. Indeed, like previously introduced, Par-4 can be modified through various processes including phosphorylation, ubiquitination and proteolytic cleavage.

In the present manuscript, we focused on the ~25kDa cleaved form of Par-4 which has been previously reported as a product of Par-4 following its cleavage by caspase-8 and caspase-3 under apoptotic stimuli [14, 37]. We found that in ovarian and endometrial cancer cells, cl-Par-4 undergoes rapid degradation by the proteasome in baseline conditions but is stabilized upon cisplatin treatment. Furthermore, we found out that PI3K and MAPK pathways were involved in the regulation of cl-Par-4 stability using different inhibitors.

We and others have shown that Par-4 is cleaved by caspases 3-8 under apoptotic circumstances [14, 37]. As observed in the current findings, the cleavage did not occur in chemoresistant cancer cells probably because pro-caspases, which did not undergo cleavage, are required to produce the cl-Par-4 fragment. However, we also discovered an astonishing regulation of cl-Par-4, independently of the full-length cleavage, when treated with cisplatin. The regulation observed was dependent on chemoresistance status, in both ovarian and endometrial tissue, indicating that mechanisms of resistance also play a role in stabilization of Par-4. This stabilization observed with cisplatin could be related to the proteasome considering we were able to stabilize the protein level similarly and efficiently using either MG-132 or cisplatin when used in combination with cycloheximide to inhibit de novo protein synthesis. Cisplatin stabilizing different proteins via a post-translational mechanism, just like we observed with cl-Par-4, is not something new. Indeed, in the literature, many papers report cisplatin to be implicated in the stabilization of various proteins via the ubiquitin-proteasome, a mechanism required to induce apoptosis efficiently with cisplatin. Interestingly, mechanisms of chemoresistance are also related to these proteins and their ease of stabilization by cisplatin and the proteasome [50–56]. Furthermore, we observed that Hec-1a seems to

have a lower level of cl-Par-4 protein localized in the nucleus when compared with the other cell lines. This difference does not seem to be major but could also be linked to the high chemoresistance profile of the cancer cell line and the possibility of regulation by the proteasome.

Localization of the Par-4 protein has been shown to play an important role in its cellular functions. Actually, various papers reported that the translocation of Par-4 to the nucleus was needed to induce apoptosis and stimulate the transcription of diverse genes [9, 57, 58]. Concerning cl-Par-4, it was previously demonstrated that this product was localized in both cytosol/nucleus with a modest trend for nuclear enrichment [14, 37]. In the present study, we showed that cl-Par-4 was localized in both compartments with slight differences between the different cell lines used. The observed localization from our experiments could be related to tissue specificity (endometrial and ovarian), whereas the other manuscripts investigated the commonly used HeLa cervical cancer cells or HEK293 human embryonic kidney cells [14, 37]. It is also interesting to note that in estrogen-dependent cancers (ovarian and endometrium), other studies have shown Par-4 being mainly localized in the cytoplasm [7].

Our results implicate proteasome degradation as a major regulator of cl-Par-4 stability. This interaction with the proteasome seems to play an important role on the stability of the cleaved protein when looking at the highly increased half-life of the protein when using cycloheximide in combination with proteasome inhibitor, MG-132. Interestingly, a recent study has shown that Par-4 is ubiquitinated by Fbxo45 leading to Par-4 proteasomal degradation [35]. However, cl-Par-4 is devoid of this ubiquitination site: the VASA-like region where Fbxo45 binds on Par-4 is located before amino acid 120, which is upstream of the caspase-3 cleavage site at D131 (Figure 4.1A) [14]. To our knowledge, no other sites of ubiquitination have been found in cl-Par-4.

Interaction of the PI3K pathway and Par-4 is already reported in the literature. Indeed, AKT1, a downstream target of PI3K, can bind and phosphorylate Par-4 to inhibit its activity and prevent translocation to the nucleus. Par-4 activity is also linked

to PTEN tumor suppressor activity since PTEN is a negative regulator of the PI3K pathway [24]. Due to the high mutation rate of PTEN in ovarian and endometrial cancers, PI3K is unrestrained, leading to a high AKT1 phosphorylation and subsequent inhibition of Par-4 activity which is related to chemoresistance [28, 29, 59, 60]. In the case of cl-Par-4, Wortmannin and NVP-BEZ235 inhibits PI3K upstream and downstream targets should be considered. We decided to check if AKT, one of the main target of PI3K, was responsible for the regulation observed with PI3K inhibitors and the results obtained showed that PI3K downregulates cl-PAR-4 independently of AKT. PI3K can regulate various proteins independently of AKT and one possible candidate for the regulation observed with PI3K could be PDK1 kinase and its downstream targets [61]. Par-4 has been shown to downregulate the kinase PDK1, a protein upstream of AKT and downstream of PI3K [62]. Through PDK1, independently of AKT, the proteins SGKs can be regulated and are, in part, responsible for cell survival, proliferation, and growth. SGKs can block apoptosis by inhibiting FOXO proteins just like AKT [61, 63–65]. FOXO3a have previously been observed in relation with PAR-4 by allowing an increase of the transcription of its gene (PAWR) and thus, allowing an increase of apoptosis [66]. It is worth noting, however, that these interactions have been associated with AKT and transcription, which are not the case in our observations here where we observed, instead, post-transcriptional regulation and AKT independent regulation. Interestingly, in our experiments, we are using the cleaved fragment of PAR-4 in feminine cancer models. PKC is another downstream target of PDK1, independent of AKT, which could be responsible for the obtained results [64, 67]. Binding between PAR-4 and PKC zeta/lambda have previously been observed in NIH-3T3 fibroblasts and could also be related to our observations with the PI3k inhibitors. The binding of PAR-4 with PKC inhibits the pro-survival activities of these kinases (PKC zeta and lambda) and thus increasing PAR-4 pro-apoptotic activity [68]. Cisplatin is known for being able to downregulate PI3K downstream targets but resistance to this drug is also caused in part by a downregulation of Par-4 and an increase of the PI3K pathway [33, 71, 72]. Using PI3K inhibitors to increase Par-4, leading to an increase of cl-Par-4, in combination with a chemotherapeutic drug such as cisplatin is an interesting avenue to overcome cancer cells chemoresistance.

Par-4 expression is known for being down-regulated by the Ras oncogene in different models [18, 73, 74]. Indeed, Ras can regulate many downstream targets including Raf, which in turn is involved in the activation of the MAPK pathway [18, 74]. It has been demonstrated that inhibition of MAPK using different inhibitors, including U0126, can restore PAR-4 protein level [18, 74]. Another article indicated a similar effect where MCF-7 breast cancer cells overexpressing Par-4 showed a reduced level of phosphorylation for ERK 1/2 [75]. Ras can also activate the PI3K pathway, however, studies have shown that Ras regulation of Par-4 was not dependent on this survival pathway [18, 74]. In the present study, we observed a different effect where the cleaved fragment of Par-4 was downregulated when using MAPK inhibitors. Considering cl-Par-4 is a sub-product of the protein Par-4, the mechanism of regulation could be slightly different. The type of tissue, here ovary and endometrium, could also influence the effect on cl-Par-4. In addition, inhibition of the MAPK pathway can have an impact on the PI3K pathway by regulating some of its targets such as p-AKT and PDK1 [76, 77]. While inhibiting MAPK, we observed an increase of p-AKT (S473) but a decrease of cl-Par-4; PI3K inhibition, however, presented the opposite effect with a sharp increase in cl-Par-4 and largely reduced p-AKT. This suggest that a cross-talk between PI3K and MAPK pathways could explain these opposite but possibly intertwined effect [77].

As introduced, not much has yet been studied concerning Par-4 in endometrial and ovarian cancer tissues. Endometrium and ovary are known for being hormone-dependent tissues and, interestingly, hormones have an important role in Par-4 regulation. Indeed, as demonstrated by our analysis using bioinformatics datasets, estradiol negatively regulates Par-4 mRNA in MCF-7 breast cancer cell [49]. Another manuscript also stated the same negative effect on Par-4 in MCF-7 breast cancer cells treated with estradiol [78]. Likewise with the bioinformatics dataset, we also observed that the negative effect of estradiol on Par-4 could be canceled using a proteasome inhibitor, then leading to an increase of Par-4 in a way similar to what we observed in the case of cl-Par-4 throughout this manuscript in the context of proteasome inhibition. Very interestingly, the knockdown of proteasome subunits also yield a modest but significant increase in Par-4

mRNA; these results, combined with the results proposed in this study, show that proteasomal degradation of Par-4 is only partly responsible for cl-Par-4 control. The fact that both protein and mRNA levels are modulated through some form of proteasome regulation suggest that a protein under the influence of proteasomal degradation is capable of regulating Par-4 transcription. Considering the high turnover of estrogen receptors and the possible implication of the proteasome in regulating estrogen receptor stability and activation, we find this future avenue of research very compelling [79, 80].

Additionally, in prostate cancer, an androgen-dependent tissue, it was demonstrated that Par-4 was efficient for inducing apoptosis only in hormone-independent cancer cells [7, 25]. Both androgen and estrogen are known for being able to activate the PI3K pathway [81, 82]. Following the logic of the previous observation with estrogen in MCF-7 breast cancer cells, the regulation observed with Par-4 could be PI3K-dependent. Indeed, we observed a regulation of cl-Par-4 using PI3K inhibitors. The hormones presents in our endometrial and ovarian cancer models could be involved in the instability of our protein, cl-Par-4, via the PI3K network. Considering the vast amounts of mechanisms hormones are involved with, it would be relevant to further investigate Par-4 and cl-Par-4 functions in hormone-dependent cancer models such as endometrial and ovarian cancers.

All these findings demonstrate undiscovered regulation mechanisms of Par-4. The observed mechanisms of regulation justify further studies addressing the biological significance of Par-4 regulation in relation to cancer chemosensitivity.

Acknowledgements

We would like to thank Valerie Leblanc for technical assistance.

Kevin Brasseur was holder of doctoral scholarship from Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

References

1. American Cancer Society. (2015). *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society.
2. Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics. (2015). *Canadian Cancer Statistics 2015*. Canadian Cancer Society, Toronto, ON.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 2013; 49: 1374-1403.
4. Ahmad N, Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics. *Cancer Letters*. 2011; 300: 1-9.
5. Ali AY, Farrand L, Kim JY, Byun S, Suh J-Y, Lee HJ, Tsang BK. Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012; 1271: 58-67.
6. Chaudhry P, Asselin E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16: 363-380.
7. El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM. Identification of a Unique Core Domain of Par-4 Sufficient for Selective Apoptosis Induction in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23: 5516-5525.
8. Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. *Oncogene*. 2010; 29: 3873-3880.
9. Irby RB, Kline CL. Par-4 as a potential target for cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013; 17: 77-87.
10. Hebbar N, Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar V. (2014). Cancer-Selective Apoptosis by Tumor Suppressor Par-4. In: Grimm S, ed. *Anticancer Genes*: Springer London, pp. 155-166.
11. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigyrto CA-K, Odeberg J, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 347.

12. García-Cao I, Duran A, Collado M, Carrascosa MJ, Martín-Caballero J, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M. Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4. *EMBO Reports*. 2005; 6: 577-583.
13. Chaudhry P, Fabi F, Singh M, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Prostate apoptosis response-4 mediates TGF-[beta]-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death Dis*. 2014; 5:e1044.
14. Chaudhry P, Singh M, Parent S, Asselin E. Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. *Molecular and Cellular Biology*. 2012; 32: 826-839.
15. Moreno-Bueno G, Fernandez-Marcos PJ, Collado M, Tendero MJ, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia-Cao I, Hardisson D, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M, Palacios J. Inactivation of the Candidate Tumor Suppressor Par-4 in Endometrial Cancer. *Cancer Research*. 2007; 67: 1927-1934.
16. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Okayasu I. Transcriptional regulation of pro-apoptotic Par-4 by NF- κ B/p65 and its function in controlling cell kinetics during early events in endometrial tumourigenesis. *The Journal of Pathology*. 2010; 221: 26-36.
17. Meynier S, Kramer M, Ribaux P, Tille JC, Delie F, Petignat P, Cohen M. (2015). Role of PAR-4 in ovarian cancer.
18. Pruitt K, Ülkü AS, Frantz K, Rojas RJ, Muniz-Medina VM, Rangnekar VM, Der CJ, Shields JM. Ras-mediated Loss of the Pro-apoptotic Response Protein Par-4 Is Mediated by DNA Hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent Signaling Cascades in Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280: 23363-23370.
19. Gonzalez I, Santana P, Gonzalez-Robayna I, Ferrer M, Morales V, Blanco F, Fanjul L. Regulation of the expression of prostate apoptosis response protein 4 (Par-4) in rat granulosa cells. *Apoptosis*. 2007; 12: 769-779.
20. Feng Z, Zhang J-t. Long-term melatonin or 17 β -estradiol supplementation alleviates oxidative stress in ovariectomized adult rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005; 39: 195-204.
21. Boghaert E, Sells S, Walid A, Malone P, Williams N, Weinstein M, Strange R, Rangnekar V. Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Differ*. 1997; 8: 881-890.

22. Gurumurthy S, Goswami A, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Phosphorylation of Par-4 by Protein Kinase A Is Critical for Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25: 1146-1161.
23. Azmi AS, Philip PA, Zafar SF, Sarkar FH, Mohammad RM. PAR-4 as a Possible New Target for Pancreatic Cancer Therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2010; 14: 611-620.
24. Goswami A, Burikhanov R, de Thonel A, Fujita N, Goswami M, Zhao Y, Eriksson JE, Tsuruo T, Rangnekar VM. Binding and Phosphorylation of Par-4 by Akt Is Essential for Cancer Cell Survival. *Molecular cell*. 2005; 20: 33-44.
25. Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Par-4 Drives Trafficking and Activation of Fas and FasL to Induce Prostate Cancer Cell Apoptosis and Tumor Regression. *Cancer Research*. 2001; 61: 7255-7263.
26. Garcia-Cao I, Lafuente MJ, Criado LM, Diaz-Meco MT, Serrano M, Moscat J. Genetic inactivation of Par4 results in hyperactivation of NF- κ B and impairment of JNK and p38. *EMBO Reports*. 2003; 4: 307-312.
27. Wang B-D, Kline CLB, Pastor DM, Olson TL, Frank B, Luu T, Sharma AK, Robertson G, Weirauch MT, Patierno SR, Stuart JM, Irby RB, Lee NH. Prostate apoptosis response protein 4 sensitizes human colon cancer cells to chemotherapeutic 5-FU through mediation of an NF κ B and microRNA network. *Molecular Cancer*. 2010; 9: 98-98.
28. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery*. 2012; 2: 401-404.
29. Fabi F, Asselin E. Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. *Reproduction*. 2014; 148: R85-R95.
30. Girouard J, Lafleur M-J, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*. 2013; 128: 335-343.
31. Gagnon V, Mathieu I, Sexton E, Leblanc K, Asselin E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2004; 94: 785-795.

32. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2004; 30: 193-204.
33. Tan J, You Y, Xu T, Yu P, Wu D, Deng H, Zhang Y, Bie P. Par-4 downregulation confers cisplatin resistance in pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway-dependent EMT. *Toxicology letters*. 2014; 224: 7-15.
34. Sharma AK, Kline CL, Berg A, Amin S, Irby RB. The Akt Inhibitor ISC-4 Activates Prostate Apoptosis Response Protein-4 and Reduces Colon Tumor Growth in a Nude Mouse Model. *Clinical Cancer Research*. 2011; 17: 4474-4483.
35. Chen X, Sahasrabuddhe AA, Szankasi P, Chung F, Basrur V, Rangnekar VM, Pagano M, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ. Fbxo45-mediated degradation of the tumor-suppressor Par-4 regulates cancer cell survival. *Cell Death Differ*. 2014; 21: 1535-1545.
36. Thayyullathil F, Pallichankandy S, Rahman A, Kizhakkayil J, Chathoth S, Patel M, Galadari S. Caspase-3 mediated release of SAC domain containing fragment from Par-4 is necessary for the sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells. *Journal of Molecular Signaling*. 2013; 8: 2.
37. Treude F, Kappes F, Fahrenkamp D, Müller-Newen G, Dajas-Bailador F, Krämer OH, Lüscher B, Hartkamp J. Caspase-8-mediated PAR-4 cleavage is required for TNF α -induced apoptosis. *Oncotarget*. 2014; 5: 2988-2998.
38. Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté J-C, Sirois M. Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0135106.
39. Guo N, Peng Z. MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2013; 9: 6-11.
40. Drexler HCA. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94: 855-860.
41. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. Par-4 phosphosite plus database. Available: <http://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=8332&showAllSites=true>; Accessed: 3 march 2016.
42. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research*. 2014.

43. Ao Li X, Ren J, Jin C, Xue Y. (2009). BDM-PUB: computational prediction of protein ubiquitination sites with a Bayesian discriminant method.
44. Radivojac P, Vacic V, Haynes C, Cocklin RR, Mohan A, Heyen JW, Goebel MG, Iakoucheva LM. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2010; 78: 365-380.
45. Chen X, Qiu J-D, Shi S-P, Suo S-B, Huang S-Y, Liang R-P. Incorporating key position and amino acid residue features to identify general and species-specific Ubiquitin conjugation sites. *Bioinformatics*. 2013; 29: 1614-1622.
46. Davies BR, Greenwood H, Dudley P, Crafter C, Yu D-H, Zhang J, Li J, Gao B, Ji Q, Maynard J, Ricketts S-A, Cross D, Cosulich S, Chresta CC, Page K, Yates J, et al. Preclinical Pharmacology of AZD5363, an Inhibitor of AKT: Pharmacodynamics, Antitumor Activity, and Correlation of Monotherapy Activity with Genetic Background. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012; 11: 873-887.
47. Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, Miyama K, Taguchi S, Tsujioka K, Ueno Y, Hatch H, Majumder PK, Pan B-S. MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*. 2010; 9: 1956-1967.
48. Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2003; 2: 1093-1103.
49. Prenzel T, Begus-Nahrman Y, Kramer F, Hennion M, Hsu C, Gorsler T, Hintermair C, Eick D, Kremmer E, Simons M, Beissbarth T, Johnsen SA. Estrogen-dependent gene transcription in human breast cancer cells relies upon proteasome-dependent monoubiquitination of histone H2B. *Cancer Res*. 2011; 71: 5739-5753.
50. Wei Y, Jiang J, Liu D, Zhou J, Chen X, Zhang S, Zong H, Yun X, Gu J. Cdc34-mediated Degradation of ATF5 Is Blocked by Cisplatin. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283: 18773-18781.
51. Gatti L, Hoe KL, Hayles J, Righetti SC, Carenini N, Bo LD, Kim DU, Park HO, Perego P. Ubiquitin-proteasome genes as targets for modulation of cisplatin sensitivity in fission yeast. *BMC Genomics*. 2011; 12: 1-11.
52. Fribley AM, Evenchik B, Zeng Q, Park BK, Guan JY, Zhang H, Hale TJ, Soengas MS, Kaufman RJ, Wang C-Y. Proteasome Inhibitor PS-341 Induces Apoptosis in Cisplatin-resistant Squamous Cell Carcinoma Cells by Induction of Noxa. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 31440-31447.

53. Johnson CL, Lu D, Huang J, Basu A. Regulation of p53 Stabilization by DNA Damage and Protein Kinase C Molecular Cancer Therapeutics. 2002; 1: 861-867.
54. Wang J, Zhou J-Y, Wu GS. Bim Protein Degradation Contributes to Cisplatin Resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286: 22384-22392.
55. Chanvorachote P, Nimmannit U, Stehlik C, Wang L, Jiang B-H, Ongpipatanakul B, Rojanasakul Y. Nitric Oxide Regulates Cell Sensitivity to Cisplatin-Induced Apoptosis through S-Nitrosylation and Inhibition of Bcl-2 Ubiquitination. *Cancer Research*. 2006; 66: 6353-6360.
56. Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. Mcl-1 is downregulated in cisplatin-induced apoptosis, and proteasome inhibitors restore Mcl-1 and promote survival in renal tubular epithelial cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2007; 292: F1710-F1717.
57. Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T. A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Molecular and cellular biology*. 1996; 16: 6945-6956.
58. Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM, Tari AM, Kumar R, Lopez-Berestein G. Par-4 Transcriptionally Regulates Bcl-2 through a WT1-binding Site on the bcl-2 Promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 19995-20005.
59. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling*. 2002; 14: 381-395.
60. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, Berchuck A. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clinical Cancer Research*. 1998; 4: 3005-3010.
61. Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, Sheppard KE. AKT-independent PI3-K signaling in cancer – emerging role for SGK3. *Cancer Management and Research*. 2013; 5: 281-292.
62. Lee TJ, Lee JT, Kim SH, Choi YH, Song KS, Park JW, Kwon TK. Overexpression of Par-4 enhances thapsigargin-induced apoptosis via down-regulation of XIAP and inactivation of Akt in human renal cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2008; 103: 358-368.
63. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 489-501.

64. Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11: 9-22.
65. Lang F, Strutz-Seeböhm N, Seeböhm G, Lang UE. Significance of SGK1 in the regulation of neuronal function. *The Journal of Physiology.* 2010; 588: 3349-3354.
66. Das T, Suman S, Alatassi H, Ankem M, Damodaran C. Inhibition of AKT promotes FOXO3a-dependent apoptosis in prostate cancer. *Cell Death & Disease.* 2016; 7:e2111.
67. Hodgkinson CP, Sale GJ. Regulation of both PDK1 and the phosphorylation of PKC- ζ and - δ by a C-terminal PRK2 fragment. *Biochemistry.* 2002; 41: 561-569.
68. Díaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, Moscat J. The Product of par-4, a Gene Induced during Apoptosis, Interacts Selectively with the Atypical Isoforms of Protein Kinase C. *Cell.* 1996; 86: 777-786.
69. Joshi J, Fernandez-Marcos PJ, Galvez A, Amanchy R, Linares JF, Duran A, Pathrose P, Leitges M, Cañamero M, Collado M, Salas C, Serrano M, Moscat J, Diaz-Meco MT. Par-4 inhibits Akt and suppresses Ras-induced lung tumorigenesis. *The EMBO Journal.* 2008; 27 :2181-2193.
70. Lee TJ, Jang JH, Noh HJ, Park EJ, Choi KS, Kwon TK. Overexpression of Par-4 sensitizes TRAIL-induced apoptosis via inactivation of NF- κ B and Akt signaling pathways in renal cancer cells. *Journal of cellular biochemistry.* 2010; 109: 885-895.
71. Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-dependent Cleavage during Cisplatin-induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells. *Cancer Research.* 2001; 61: 1862-1868.
72. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *Journal of Nucleic Acids.* 2010; 2010: 16.
73. Nalca A, Qiu SG, El-Guendy N, Krishnan S, Rangnekar VM. Oncogenic Ras Sensitizes Cells to Apoptosis by Par-4. *Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274: 29976-29983.
74. Barradas M, Monjas A, Diaz-Meco MT, Serrano M, Moscat J. (1999). The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression.

75. Pereira MC, De Bessa-Garcia SA, Burikhanov R, Pavanelli AC, Antunes L, Rangnekar VM, Nagai MA. Prostate apoptosis response-4 is involved in the apoptosis response to docetaxel in MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2013; 43: 531-538.
76. Ahn Y-T, Shin IJ, Kim J-M, Kim YS, Lee CHU, Ju S-A, An WG. Counteracting the activation of pAkt by inhibition of MEK/Erk inhibition reduces actin disruption-mediated apoptosis in PTEN-null PC3M prostate cancer cell lines. *Oncology Letters*. 2013; 6: 1383-1389.
77. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011; 36: 320-328.
78. Casolari DA, Pereira MC, de Bessa Garcia SA, Nagai MA. Insulin-like growth factor-1 and 17beta-estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2011; 28: 337-342.
79. Duong V, Boulle N, Daujat S, Chauvet J, Bonnet S, Neel H, Cavailles V. Differential regulation of estrogen receptor alpha turnover and transactivation by Mdm2 and stress-inducing agents. *Cancer Res*. 2007; 67: 5513-5521.
80. Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell*. 2000; 5: 939-948.
81. Sun M, Yang L, Feldman RI, Sun X-m, Bhalla KN, Jove R, Nicosia SV, Cheng JQ. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway by Androgen through Interaction of p85 α , Androgen Receptor, and Src. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 42992-43000.
82. Guo R-X, Wei L-H, Tu Z, Sun P-M, Wang J-L, Zhao D, Li X-P, Tang J-M. 17 β -Estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2006; 99: 9-18.
83. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*. 2012; 9: 671-675.

Le chapitre V consiste en une revue de littérature des différents essais cliniques de thérapies ciblées pour les cancers gynécologiques. Les limitations de la thérapie ciblée en général et des projets abordés dans les chapitres II, III et IV sont aussi discutées.

Le tout se termine avec les perspectives des différents projets abordés dans les chapitres II, III et IV ainsi qu'une conclusion générale sur le sujet de la thérapie ciblée contre les cancers gynécologiques.

CHAPITRE V

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

5.1 Essais cliniques de thérapies ciblées contre les cancers gynécologiques

La communauté scientifique effectuant de la recherche sur le cancer est vaste. Malgré que la thérapie ciblée existe depuis longtemps (ex : Tamoxifène), les thérapies actuelles ne sont pas suffisamment efficaces pour éliminer les cancers gynécologiques de stades avancés. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires ainsi que l'évolution des outils d'analyse diagnostique permettent aujourd'hui de découvrir de nouvelles cibles et de développer de nouveaux traitements. Il va donc de soi que d'autres équipes ont aussi étudié la thérapie ciblée pour les cancers gynécologiques. Plusieurs ont eu la chance de débiter des essais cliniques de phase I et II ciblant diverses protéines impliquées dans la chimiorésistance, tel qu'introduit au début de cette thèse. Afin de saisir l'efficacité et les limitations de ce nouveau type de thérapie, les diverses études cliniques (pour les cancers gynécologiques spécifiquement) menées à ce jour sont pour la majorité revues dans cette section. Un schéma et une table récapitulative des essais cliniques sont disponibles afin de faciliter la compréhension de ces essais cliniques (Figure 5.1) (Annexe A). Une table expliquant les abréviations (anglophones) utilisées pour analyser les résultats est aussi disponible (Tableau 5.1).

Tableau 5.1

Abréviations et explications des termes utilisés pour l'analyse d'études cliniques

CR	Complete response – Réponse complète
PR	Partial response – Réponse partielle (au moins 30 % de réduction de la tumeur)
SD	Stable disease – Maladie stable (entre 30 % de réduction et 25 % d'augmentation de la tumeur)
PFS	Progression free survival – Survie sans progression
ORR	Objective response rate – Taux de réponse objectif (CR+PR)
CBR	Clinical benefit rate – Taux de bénéfice clinique (CR+PR+SD)

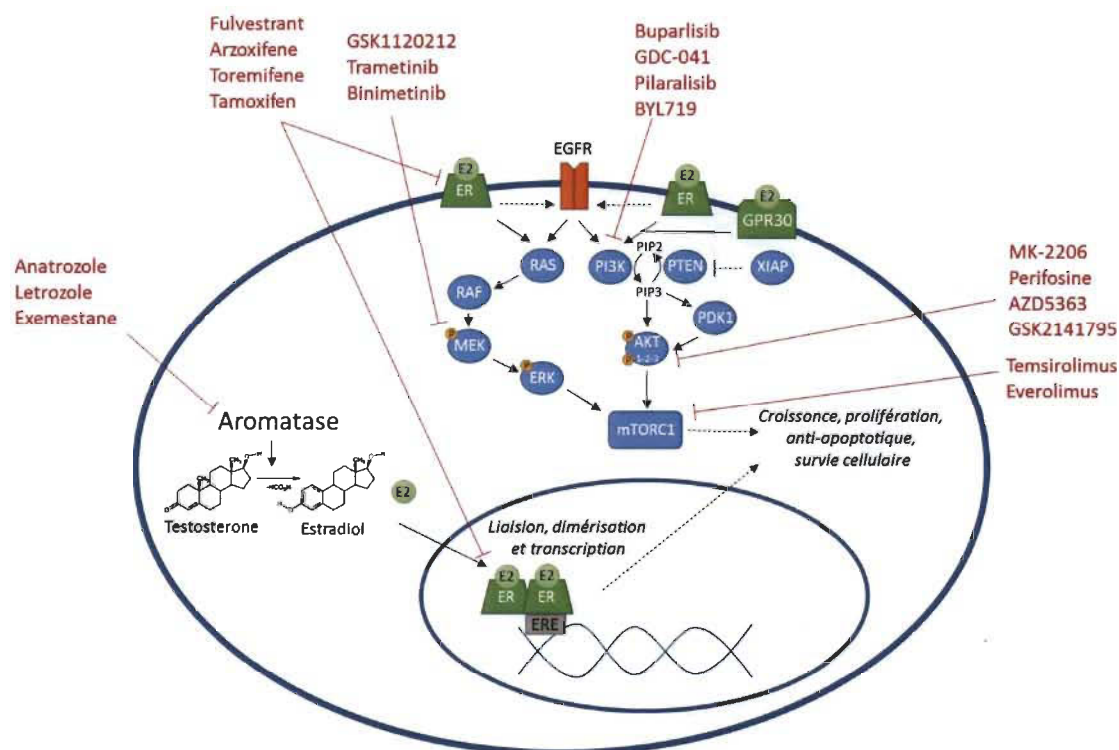


Figure 5.1 Schéma récapitulatif des essais cliniques ciblant mTOR, PI3K/AKT/MAPK et la voie de signalisation des estrogènes. (Brasseur, Gévry, and Asselin 2016.)

5.1.1 Essais cliniques ciblant mTOR

« Mammalian target of rapamycin » (mTOR) est la sous-unité catalytique de deux complexes distincts, soit mTORC1 et mTORC2. Ces deux complexes jouent un

rôle d'une importance cruciale dans la synthèse des protéines, la croissance et la survie cellulaire. Il est intéressant de saisir que le complexe mTORC1 est sensible à la rapamycine tandis que mTORC2 ne l'est pas. Il convient aussi de rappeler que mTORC1 se situe en aval de la cascade de signalisation PI3K/AKT, une cascade fréquemment mutée dans les cancers gynécologiques, impliquée dans la chimiorésistance et d'une importance capitale dans le contrôle de la survie de la cellule (Wullschleger, Loewith, and Hall 2006).

Le temsirolimus, un dérivé de la rapamycine soluble dans l'eau, est un inhibiteur spécifique de mTOR permettant de bloquer la synthèse protéique liée à la survie et la croissance tumorale. Il est important de noter que, comme la rapamycine, le temsirolimus cible l'activité de mTOR seulement dans le complexe mTORC1. Un essai clinique de phase II a été effectué avec le temsirolimus sur 54 patientes atteintes d'un cancer ovarien récurrent. Les résultats obtenus ont été modestes avec seulement 9 patientes ayant obtenu une PR (Behbakht *et al.* 2011). Une autre étude a testé le temsirolimus sur 5 patientes chimiorésistantes ayant un carcinome de cellules claires de l'ovaire. Parmi les 5 patientes, une a obtenu une PR et une autre a obtenu une SD (Takano *et al.* 2011). Le temsirolimus a été testé en combinaison avec le bevacizumab, un composé anti-angiogénique présentement en clinique, chez 31 femmes atteintes d'un cancer ovarien récurrent (17 étant chimiosensibles contre 14 chimiorésistantes). Sur les 25 patientes évaluable, 3 ont obtenu une PR et 9 une SD. Fait intéressant, les 3 patientes ayant eu une PR provenaient du groupe résistant au platine ; un effet souhaitable pour la thérapie d'un cancer avancé et récurrent (Morgan *et al.* 2011). Dans l'ensemble, le temsirolimus a démontré une activité modeste sur les femmes atteintes de cancers de l'ovaire chimiorésistants. En ce qui concerne le cancer de l'endomètre, des études cliniques ont également été réalisées. Un essai de phase II a testé le temsirolimus seul ou en combinaison avec des thérapies hormonales (un progestatif et le tamoxifène) chez des patientes atteintes d'un cancer avancé/récurrent de l'endomètre. Cette étude s'est concentrée sur le fait que la voie de signalisation de mTOR pourrait être impliquée dans la résistance aux traitements hormonaux des cancers de l'endomètre. Le temsirolimus seul a été testé avec 50 patientes réparties en deux groupes, 29 ayant précédemment reçu

des traitements de chimiothérapie et 21 n'ayant pas reçu de chimiothérapie. Le taux de réponse était similaire entre ces deux groupes avec une ORR totale de 22 % (ORR de 24 % pour le groupe ayant précédemment reçu de la chimiothérapie et une ORR de 19 % pour le groupe sans chimiothérapie précédemment). Cette étude a également conclu que la combinaison de l'acétate de mégestrol (un progestatif stéroïdien) avec le tamoxifène et le temsirolimus n'améliore pas l'efficacité du traitement et a plutôt été associée à une toxicité accrue (Fleming *et al.* 2014). Un autre essai de phase II a testé le temsirolimus seul chez 54 patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre récurrent et métastatique. Cette étude a également considéré si la patiente avait déjà reçu un traitement de chimiothérapie. Parmi les 29 patientes chimionaïves, 4 ont obtenu une PR et 20 une SD. Parmi les 25 patientes chimiotraitées, une a obtenu une PR et 12 une SD. L'activité du temsirolimus seul était plus élevée chez les patientes chimionaïves et a démontré un effet bénéfique pour arrêter la progression du cancer dans les deux groupes. Ils ont aussi vérifié si le statut de PTEN, lié à la régulation de la voie mTOR, était associé au taux de réponse du temsirolimus, cependant, aucune association n'a été trouvée. Par conséquent, ils ont conclu que la réponse du temsirolimus était PTEN-indépendante (Oza *et al.* 2011). Deux autres essais de phase II ont testé le temsirolimus en association avec le bevacizumab, un inhibiteur de l'angiogenèse, chez des patientes ayant un cancer de l'endomètre récurrent. La première étude avait 26 patientes; 5 ont obtenu une PR et 12 patientes avaient des tumeurs sans progression à 6 mois (Einstein *et al.* 2012). La deuxième étude avait 49 patientes; une a obtenu une CR, 11 une PR et 23 avaient des tumeurs sans progression à 6 mois (Alvarez, Brady, *et al.* 2013). Dans l'ensemble, ces études ont démontré une certaine efficacité contre des cancers de l'endomètre récurrents, mais aussi une toxicité importante lorsque l'on combine ces deux composés (temsirolimus et bevacizumab).

L'everolimus (RAD-001) est un autre inhibiteur de mTOR avec un mécanisme similaire à la rapamycine et sélectif pour le complexe mTORC1. Une étude préclinique a été effectuée utilisant 58 souris transgéniques avec des adénocarcinomes ovariens séreux bilatéraux accompagnés d'ascites et de dissémination péritonéale. Le traitement de ces souris avec l'utilisation de l'everolimus seul a réduit de 84 % la masse tumorale.

La présence d'ascite et de dissémination péritonéale a, quant à elle, été détectée dans seulement 21 % des souris par rapport à 74 % chez les animaux traités avec un placebo (Mabuchi, Altomare, Connolly, *et al.* 2007). Ils ont également testé l'everolimus seul, et en combinaison avec le cisplatine, contre le cancer de l'ovaire à la fois *in vitro* et *in vivo*. En utilisant des lignées cellulaires cancéreuses de l'ovaire, ils ont découvert que l'everolimus était efficace pour inhiber la prolifération cellulaire, et lorsque combiné avec le cisplatine, augmentait efficacement l'apoptose. Ils ont également observé des résultats similaires *in vivo* en utilisant des modèles de xénogreffes soit une inhibition de la croissance tumorale, une diminution des ascites et une augmentation de l'efficacité du traitement, lorsque combiné avec le cisplatine. Il convient de noter que l'everolimus était efficace uniquement dans les cellules ayant un niveau élevé d'AKT/mTOR actifs (Mabuchi, Altomare, Cheung, *et al.* 2007). Ces résultats précliniques étaient prometteurs pour le traitement des cancers de l'ovaire. Concernant le cancer de l'endomètre, des essais de phase II ont été effectués utilisant l'everolimus. L'un d'eux a testé l'everolimus chez des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre récurrent et qui avaient déjà reçu précédemment un traitement de chimiothérapie. Après le traitement d'everolimus, 6 des 28 patientes avaient une SD se résumant donc un taux de bénéfice clinique (CBR) de 22 % (CBR; somme de CR, PR et SD) (Slomovitz *et al.* 2010). Ils ont également effectué un autre essai de phase II avec l'everolimus combiné avec le létrozole, un inhibiteur clinique de l'aromatase, chez 35 patientes atteintes d'un cancer avancé de l'endomètre. Grâce à la combinaison d'une thérapie hormonale (létrozole) avec l'everolimus, le CBR a augmenté à 40 % (comprenant, entre autres, l'ajout de CR et PR aux résultats obtenus) indiquant un bénéfice élevé, considérable pour la thérapie (Slomovitz *et al.* 2015). Un autre essai de phase II a testé l'everolimus comme agent seul chez 44 patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre avancé (2/3 des patientes ont précédemment reçu de la chimiothérapie). Après 3 mois, 36 % des patientes avaient une tumeur non progressive et après 6 mois, 4 patients avaient une PR (Ray-Coquard *et al.* 2013).

Compte tenu du niveau élevé de mutations sur le gène de PTEN dans le cancer de l'endomètre, de nombreux essais cliniques ont testé des inhibiteurs de mTOR (protéine

en aval de PTEN) pour ce tissu. Les résultats obtenus ont été généralement intéressants. La combinaison d'un inhibiteur mTOR avec un autre médicament/composé tel qu'un inhibiteur de l'aromatase a permis de doubler le taux de réponse (22 % lorsque utilisé seul; 40 % lorsqu'utilisé avec inhibiteur de l'aromatase) et cette combinaison devrait être étudiée plus en détail afin d'obtenir des traitements optimaux (Slomovitz *et al.* 2015). Il est également intéressant de noter que ces deux inhibiteurs de mTOR (le temsirolimus et l'everolimus) testés dans les essais cliniques n'inhibent que le complexe mTORC1. Le complexe mTORC2 est impliqué dans la phosphorylation de la protéine AKT à la S473 conduisant à une activation complète de cette importante kinase de la voie PI3K/AKT, jouant un rôle important dans la survie et la prolifération cellulaire (Sarbasov *et al.* 2005; O'Reilly *et al.* 2006). Un autre fait important concernant le complexe mTORC2 est qu'il peut également activer subséquemment la voie de survie MAPK (O'Reilly *et al.* 2006). Une voie alternative (mTORC2), insensible à l'inhibition classique de mTORC1, est donc présente et nécessite une plus grande attention afin d'augmenter l'efficacité des traitements.

5.1.2 Essais cliniques ciblant PI3K/AKT

Étant donné que la voie PI3K/AKT est une des principales voies de survie impliquée dans la tumorigenèse et fortement mutée dans les cancers gynécologiques, de nombreux médicaments ont été mis au point pour cibler diverses protéines de cette voie. Un objectif de ces nouveaux composés est d'augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux, et ce, en partie par la perte de la chimiorésistance. Les inhibiteurs de PI3K de première génération, tels que la wortmannin et le LY294002, ont été développés et utilisés principalement dans des études précliniques prometteuses afin de mieux comprendre cette voie et son implication dans les thérapies contre les cellules cancéreuses gynécologiques. L'une de ces études précliniques a démontré *in vivo*, utilisant des souris athymiques portant des cellules cancéreuses d'ovaire (xénogreffes intrapéritonéales), que l'administration de wortmannin a efficacement sensibilisé les cellules cancéreuses à un traitement par le cisplatine (Ohta *et al.* 2006). Cependant, en raison de leurs propriétés pharmacocinétiques pauvres, une deuxième génération

d'inhibiteurs a dû être développée afin d'avoir une meilleure sélectivité, parfois même isoforme spécifique. Parmi ces inhibiteurs de PI3K de deuxième génération, le buparlisib (BKM-120), le GDC-0941 et le pilaralisib (XL-147) sont des inhibiteurs pan-classe I PI3K qui ont été testés dans quelques essais pour les cancers gynécologiques.

Une étude précédente impliquant le buparlisib en combinaison avec l'olaparib (inhibiteur clinique de PARP), a été effectuée *in vivo* chez des souris avec des mutations BRCA1. PARP est une protéine réparatrice de l'ADN simple brin qui, lorsqu'inhibée en combinaison avec des mutations des gènes BRCA (protéines impliquées dans la réparation de l'ADN double brin), mène les cellules cancéreuses vers une létalité synthétique (deux événements permettant la mort de la cellule) (Tutt *et al.* 2005). Les résultats obtenus ont démontré une synergie importante et considérable conduisant par la suite à un essai clinique de phase I avec 34 femmes atteintes d'un cancer de l'ovaire séreux avancé ou d'un cancer du sein triple négatif (Juvekar *et al.* 2012; Matulonis *et al.* 2014). Parmi les patientes, 26 étaient connues pour avoir des mutations des gènes de BRCA, un biomarqueur de l'efficacité des inhibiteurs de PARP. Toutes les combinaisons de doses ont permis d'observer des bénéfices cliniques chez les patientes, prometteuses pour de futurs essais (Matulonis *et al.* 2014). Le GDC-041 a été testé dans deux essais de phase I chez des patients atteints de tumeurs solides avancées (Von Hoff *et al.* 2011; Moreno Garcia *et al.* 2011). Le premier essai a été testé avec 49 patients et des résultats minimaux ont été observés avec seulement deux patients ayant obtenu une PR ; l'un d'entre eux avait une tumeur endocervicale avec des mutations au niveau de PIK3CA, un isoforme de PI3K. Une diminution du taux de CA125, un antigène tumoral produit principalement par le cancer ovarien, a également été observée chez 3 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, dont l'une d'entre elles avait un nombre élevé de copies du gène PIK3CA (Von Hoff *et al.* 2011). Le deuxième essai de phase I avec le GDC-0941 a eu des résultats similaires. Parmi les 42 patients testés, l'activité clinique n'a été observée que chez deux de ceux-ci ; dont un avec un cancer de l'ovaire PTEN-négatif (Moreno Garcia *et al.* 2011). Le pilaralisib a été utilisé dans une étude de phase II chez 67 patientes atteintes d'un carcinome de l'endomètre avancé ou récurrent. L'ORR était minime et seulement 2 patientes ont obtenu une CR et 2 autres patientes

une PR. Aucune association n'a été faite entre les altérations moléculaires de la voie PI3K (3 de ces patients exprimaient la protéine PTEN de type sauvage avec des mutations au niveau de PIK3R1, l'autre patiente exprimait une protéine PTEN mutée) et l'activité clinique observée (Matulonis *et al.* 2015). Le BYL719 est un inhibiteur spécifique pour l'isoforme PI3KCA qui a été testé dans un essai de phase I chez 36 patients avec diverses tumeurs ayant des mutations au niveau du gène cible (PIK3CA). Les résultats obtenus ont été de 7 PR ; parmi celles-ci, une tumeur provenait de l'utérus, une de l'endomètre et une autre de l'ovaire (Gonzalez-Angulo *et al.* 2013).

Tel qu'introduit, les inhibiteurs de PI3K ont eu un taux de succès considérable dans les études précliniques, cependant, les études cliniques des inhibiteurs de PI3K présentées pour les cancers gynécologiques n'ont pas eu autant de succès. Le réseau de PI3K étant très complexe et ramifié, comprenant des boucles de rétroaction, des cascades alternatives de signalisation ainsi que de l'intercommunication entre des voies, peut expliquer de manière plausible l'inefficacité observée. Inhiber la voie PI3K est connu pour activer la voie des MAPK par l'intermédiaire d'une intercommunication entre les deux voies, et donc, la double inhibition avec des inhibiteurs de MAPK et PI3K en simultané pourrait être considérable afin d'éviter l'activation de cette voie alternative. L'inverse est également vrai : l'inhibition de la voie des MAPK augmente l'activité de la voie PI3K/AKT (Kigawa 2013; Sinha *et al.* 2004; Brasseur *et al.* 2016). L'inhibiteur de PI3K, le buparlisib, a été testé en combinaison avec un inhibiteur de MEK, le trametinib, dans un essai clinique de phase Ib avec 113 patients présentant des tumeurs solides avancées, comprenant, entre autres, des tumeurs de l'ovaire. Les résultats obtenus parmi les 21 patientes atteintes du cancer de l'ovaire étaient 1 CR, 5 PR et 10 SD pour une ORR de 29 %. De manière remarquable, le buparlisib était efficace presque exclusivement dans le cancer de l'ovaire, l'exception étant une PR observée chez un patient atteint du cancer du poumon avec la protéine KRas mutée, un oncogène de la famille des protéines Ras qui est fréquemment muté et jouant un rôle important dans la tumorigénèse (Goodsell 1999). À noter également le fait que 19 des patientes atteintes du cancer de l'ovaire étaient mutées pour la protéine KRas démontrant un moyen efficace de surmonter cette mutation (Bedard *et al.* 2015). L'inhibiteur de

l'isoforme PIK3CA, le BYL719, a été testé en combinaison avec l'inhibiteur de MEK, le binimetinib, chez 58 patients atteints de tumeurs avancées et ayant le gène KRas ou BRAF (kinase en aval de Ras et donc impliquée dans la tumorigénèse) muté. Quatre des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire avaient une mutation de KRas et trois d'entre elles ont obtenu une PR en utilisant le traitement combiné. Une patiente atteinte d'un cancer de l'endomètre et ayant une mutation KRas a également obtenu une PR. Dans l'ensemble, chez tous les patients, 5 ont eu une PR et 18 avaient une SD indiquant une efficacité intéressante pour les tumeurs avancées, spécialement pour les cancers gynécologiques (Juric *et al.* 2014). Cette combinaison est particulièrement intéressante pour les patients présentant des mutations de KRas considérant que celles-ci sont souvent associées à une absence de réponse lors de l'utilisation d'inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR comme agent seul dans les cancers gynécologiques (Meyer *et al.* 2014).

Inhiber deux cibles en simultanée, soit PI3K et mTOR est également à considérer en raison de la relation entre ces complexes. Considérant ce fait, le NVP-BEZ235 a été développé comme molécule capable d'inhiber les deux protéines, PI3K et mTOR. Des études précliniques ont été réalisées dans les deux types de cancers gynécologiques à l'aide de ce nouvel inhibiteur. L'une d'elles a démontré, par l'intermédiaire de 18 lignées cellulaires du cancer de l'ovaire (modèles sensibles et résistants au cisplatine), une sensibilisation au cisplatine et une corrélation de l'effet observé avec les lignées possédant des mutations de PI3K ou une délétion de PTEN. Ils ont également utilisé un modèle murin transgénique du cancer de l'ovaire (LSL-K-ras^{G12D/+} PTEN^{loxP/loxP}) traité au NVP-BEZ235 et ont observé une médiane de survie plus longue ainsi qu'une forte activité proapoptotique (Santiskulvong *et al.* 2011). Une autre étude a effectué des expériences similaires, mais cette fois en utilisant 13 lignées cellulaires du cancer de l'endomètre (possédant au moins une altération de la protéine PTEN, PIK3CA ou KRas) et des xénogreffes chez des souris « nues » (souris athymiques avec système immunitaire affaibli) *in vivo*. Le NVP-BEZ235 a été efficace pour éliminer les cellules cancéreuses à la fois *in vitro* et *in vivo*. Fait intéressant, les cellules cancéreuses avec des mutations de PTEN, mais un KRas de type sauvage ont démontré une plus grande

sensibilité au NVP-BEZ235 que celles avec des altérations de KRas. Compte tenu de ces observations, ils ont ajouté un inhibiteur de MEK, soit le PD98059 ou l'U0126, et ont avec succès sensibilisé les mutants KRas au NVP-BEZ235, ce qui démontre encore une fois l'implication et l'importance des MAPK dans l'efficacité des inhibiteurs de PI3K (Shoji *et al.* 2012).

AKT est une cible en aval de PI3K et une importante kinase impliquée dans de nombreux processus incluant le métabolisme du glucose, la prolifération cellulaire, la migration cellulaire ainsi que la synthèse protéique (Weigelt and Downward 2014). Considérant que PI3K est une kinase centrale d'un grand réseau, impliquant tous les problèmes précédemment indiqués; cibler AKT, en aval de PI3K, est une avenue intéressante. Des inhibiteurs spécifiques à AKT ont été développés (MK-2206, perifosine, AZD5363 et GSK2141795) et des essais précliniques semblaient des plus prometteurs (Lin *et al.* 2015; Pant *et al.* 2012; Engel *et al.* 2008; Sun, Yu, and Li 2011; Engel *et al.* 2011; Hahne *et al.* 2012; Davies *et al.* 2012). Suite à ceux-ci, quelques essais cliniques ont été réalisés chez des patientes atteintes d'un cancer gynécologique. Le MK-2206, un inhibiteur allostérique d'AKT, a été testé dans un essai de phase II chez 36 femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre récurrent. L'état de PIK3CA a été analysé; 9 patientes avaient le gène PIK3CA muté et 27 avaient le gène PIK3CA de type sauvage. Suite au traitement, une seule patiente par groupe a obtenu une PR indiquant une activité limitée de cet inhibiteur d'AKT lorsqu'administré comme monothérapie, et ce, indépendamment de l'état de PIK3CA des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre (Myers *et al.* 2013). Un essai de phase I a testé la perifosine, un autre inhibiteur d'AKT, combiné avec du docétaxel chez 21 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire résistant aux taxanes. Les résultats obtenus ont été d'une patiente (PTEN mutant) avec une PR, une autre patiente (PIK3CA mutant) avec une SD et deux autres patientes (pas de mutations de PI3K) avec une SD. Il convient de noter que les patientes présentant des mutations de KRas ont eu une progression tumorale rapide indiquant à nouveau qu'il y a une relation avec cette protéine et servant donc d'indicateur de l'inefficacité des inhibiteurs de PI3K/AKT. Encore une fois, l'efficacité de cet inhibiteur d'AKT est limitée et aucune corrélation directe avec des mutations de la voie PI3K n'a

été faite (Fu *et al.* 2012). L'AZD5363, un nouvel inhibiteur d'AKT, a été testé dans un essai de phase I avec 92 patients porteurs de tumeurs avancées. Parmi ces patients, seulement deux ont obtenu une PR (un cancer endométrioïde de l'ovaire et un cancer du col utérin, chacun ayant soit une mutation de PIK3CA ou AKT1) et un seul a obtenu une SD (un cancer endométrioïde de l'ovaire avec une mutation sur PIK3CA) (Banerji *et al.* 2013). Les résultats obtenus ont démontré que l'efficacité était, encore une fois, minime. GSK2141795, un autre inhibiteur d'AKT, a été testé dans un essai de phase I chez 12 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire résistant au platine. Au total, 8 des 12 patientes ont obtenu une SD tandis que les 4 autres ont plutôt eu une tumeur progressive (Gungor *et al.* 2011). Un autre essai de phase I a testé le GSK2141795, mais cette fois avec un grand groupe de 66 patients atteints de tumeurs avancées. Parmi ceux-ci, 12 étaient des patientes avec un cancer de l'endomètre et seulement 2 de celles-ci ont obtenu une SD (mutant PIK3CA et/ou perte de PTEN) (Burris *et al.* 2011). De façon similaire aux inhibiteurs de PI3K, le GSK2141795 a été testé en combinaison avec le GSK1120212, un inhibiteur de MEK1/2, chez 13 patients atteints de diverses tumeurs. Parmi ceux-ci, 3 des 13 patients présentaient une régression tumorale faible (2 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et une patiente avec un cancer de l'endomètre). Les résultats étaient encore une fois minimes. L'étude a testé diverses doses du composé ce qui pourrait avoir eu un impact sur l'efficacité observée (Kurzrock *et al.* 2011). Dans l'ensemble, l'activité clinique des inhibiteurs d'AKT était également limitée lorsque testée sur des patientes humaines atteintes de cancers gynécologiques lors d'essais cliniques.

Afin de mieux prévoir les résultats escomptés et d'augmenter le taux de réponse relativement faible des précédents essais utilisant des inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR, l'utilisation de biomarqueurs serait une option intéressante à considérer. Une étude clinique de phase I incluant 140 patients (comprenant, entre autres, des tumeurs du sein, du col de l'utérus, de l'endomètre et de l'ovaire) traités avec des inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR a permis de mesurer différents biomarqueurs potentiels (PIK3CA, KRas, NRas et BRAF) afin de voir si une corrélation était possible avec le taux de réponse observé chez les patients. Cela a permis de trouver que des mutations de

PIK3CA ont été détectées chez 25 patients et que le taux de réponse des inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR était significativement plus élevé (30 %) par rapport aux patients sans la mutation (10 %) (Janku *et al.* 2012). Le réseau de PI3K est vaste et des combinaisons supplémentaires d'inhibiteurs seraient nécessaires pour surmonter les inefficacités observées. Comme suggéré par des études antérieures, les mutations de KRas ont semblé être un bon indicateur de la résistance aux inhibiteurs de PI3K et une combinaison avec des inhibiteurs de MAPK semblaient être l'une des avenues intéressantes pour surmonter l'absence de réponse. Une autre piste intéressante pourrait être l'utilisation d'inhibiteurs de la protéine réparatrice PARP. L'inhibition de PI3K a été associée à une perte de la recombinaison homologue et l'addition d'un inhibiteur de PARP pourrait fournir une létalité synthétique (deux événements permettant la mort de la cellule) sélectivement aux cellules cancéreuses (Ibrahim *et al.* 2012). PTEN ayant un rôle dans la recombinaison homologue, son statut (sain ou muté) aura aussi un impact lors de l'utilisation des inhibiteurs de PARP afin d'être pleinement efficace (Yin and Shen 2008). Considérant tout cela, afin de surmonter le bénéfice limité des inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR, une meilleure compréhension du profil de mutation du patient combiné avec un autre inhibiteur pour empêcher la résistance au traitement serait une avenue intéressante ayant comme objectif d'augmenter le taux de succès de cette thérapie ciblée.

5.1.3 Essais cliniques ciblant la voie de signalisation des estrogènes

Deux types de traitements ont été mis au point pour cibler la voie de signalisation des estrogènes, soit des inhibiteurs de l'aromatase et des antagonistes des récepteurs de l'estrogène.

L'anastrozole est un puissant inhibiteur de l'aromatase non stéroïdien ayant eu un essai clinique de phase II chez 23 patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre récurrent. Les bénéfices ont été minimes avec seulement 2 PR et 2 SD (Rose *et al.* 2000). Un essai de phase II a été réalisé en utilisant l'anastrozole en tant qu'agent unique chez 53 patientes ayant un cancer récurrent/persistant et asymptomatique, au niveau de l'ovaire (43 patientes), du péritoine (7 patientes) et des trompes de Fallope (3 patientes).

Les résultats ont été seulement d'une patiente avec une PR et 68 % de celles-ci avec une SD (42 % pendant > 90 jours; 15 % > 80 jours; 7 % > 270 jours; 4 % > 360 jours) (Del Carmen *et al.* 2003). Le même groupe de recherche a également effectué un essai de phase II utilisant à la fois l'anastrozole et un inhibiteur de l'EGFR, le gefitinib, chez 35 patientes avec un cancer récurrent/persistant asymptomatique, au niveau de l'ovaire (30 patientes), du péritoine (4 patientes) et des trompes de Fallope (1 patiente). Seulement 23 des patientes étaient évaluables et les résultats obtenus étaient une seule patiente avec une CR et 14 ayant obtenu une SD, démontrant ainsi une activité modeste (Krasner *et al.* 2005).

Le létrozole est un autre inhibiteur de l'aromatase à l'étude en clinique. Dans un groupe de 28 patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre récurrent, non traitées par la chimiothérapie précédemment, le létrozole a été étudié en tant qu'agent unique dans un essai de phase clinique II. Les résultats obtenus étaient de 1 CR, 2 PR et 11 SD indiquant une activité antitumorale modeste. Fait intéressant, différents marqueurs comprenant les récepteurs hormonaux ont été examinés, mais ne corrélaient pas avec la réponse au létrozole (Ma *et al.* 2004). Une autre étude de phase II a testé le létrozole en combinaison avec l'everolimus, inhibiteur en étude clinique de mTOR, chez 35 femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre récurrent et avancé. Les résultats étaient des plus intéressants avec 11 CR, 2 PR et 1 SD (Slomovitz *et al.* 2015). Leur précédente étude utilisant l'everolimus seul avait une CBR de 21 % et avait obtenu seulement des SD (Slomovitz *et al.* 2010). L'addition du létrozole a permis d'augmenter la CBR à 40 % (incluant l'addition de CR et de PR aux résultats) indiquant un avantage des plus intéressants lors de l'ajout cet inhibiteur de l'aromatase (Slomovitz *et al.* 2015). Le létrozole a également été testé dans un essai clinique de phase II chez 50 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. Aucune CR ou PR n'a été obtenue avec les tumeurs et seulement 10 patientes ont obtenu une SD. Il convient de noter qu'ils ont observé une corrélation entre la réponse au létrozole et un niveau élevé du récepteur à l'estrogène (Bowman *et al.* 2002). Une autre étude de phase II a testé le létrozole chez 21 femmes atteintes d'un cancer ovarien récurrent. Après traitement, les résultats ont été de 1 CR, 2 PR et 4 SD, ce qui indique à nouveau une activité antitumorale modeste.

Aucune association n'a été trouvée entre les récepteurs hormonaux et la réponse au létrozole (Papadimitriou *et al.* 2004). Une étude a présélectionné 33 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, toutes exprimant les récepteurs à l'estrogène, et a testé le létrozole dans un essai de phase II. Les résultats obtenus ont été de 3 PR et 14 SD, indiquant qu'une présélection des patients peut augmenter l'efficacité du létrozole et permettre d'arrêter considérablement la progression du cancer (Smyth *et al.* 2007). Enfin, un essai de phase II a testé le létrozole, cette fois avec 31 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire résistant aux thérapies de platine et de taxane. De façon notable, toutes les patientes exprimaient les récepteurs à l'estrogène, cependant, aucune n'a obtenu de CR, une seule a obtenu une PR et sept avaient une SD. Ces résultats indiquent que la chimiorésistance a un impact sur l'efficacité des inhibiteurs d'aromatase, en particulier le létrozole ici, pour stabiliser la progression tumorale (Ramirez *et al.* 2008).

L'exémestane est un nouvel inhibiteur de l'aromatase et un essai a testé ce composé chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire chimiorésistant aux traitements de platine et de taxane. Aucune CR ou PR n'a été obtenue chez les 24 patientes évaluées, cependant, 8 d'entre elles ont obtenu une SD pendant plus de 14 semaines (Verma *et al.* 2006). Il convient de noter que l'exémestane a eu un effet considérable pour stabiliser la progression tumorale, tel que précédemment observé avec les autres inhibiteurs de l'aromatase.

Le fulvestrant (Faslodex) est un nouvel antagoniste des récepteurs à l'estrogène (ER) provoquant une dégradation accrue de sa cible par le protéasome, un complexe enzymatique dégradant des protéines préalablement marquées avec des ubiquitines. Un essai de phase II a testé ce composé dans des cancers avancés de l'endomètre chez 31 patientes (ER positif) et 22 patientes (ER négatif). Aucune patiente n'a obtenu de CR ou de PR en l'absence du récepteur à l'estrogène. Parmi les patientes qui exprimaient le récepteur à l'estrogène, une patiente a obtenu une CR et 4 autres une PR. La tumeur était stable chez 4 patientes du groupe ER-négatif par rapport à 9 chez les patientes ER-positif. L'activité antitumorale du fulvestrant était absente sans la présence du ER et minimale lorsque la cible (ER) était présente ; l'antagoniste était cependant efficace pour

stabiliser la croissance tumorale (Covens *et al.* 2011). En ce qui concerne le cancer de l'ovaire, une étude de phase II a été réalisée en utilisant le fulvestrant chez 26 femmes ayant une tumeur de stade avancé. Les résultats obtenus sont similaires à ceux observés avec le cancer de l'endomètre, soit 1 CR, 1 PR et 9 SD indiquant une activité antitumorale faible, mais une bonne stabilisation de la croissance tumorale (Argenta *et al.* 2009). Le même groupe de recherche a mesuré le niveau protéique du récepteur à l'estrogène par l'utilisation de micropuces tissulaires (tissue microarray – TMA) et ont corrélé l'expression mesurée, de manière positive, avec le bénéfice clinique observé précédemment (Argenta *et al.* 2013). Dans l'ensemble, le fulvestrant est efficace pour la stabilisation de la croissance tumorale, mais modeste pour diminuer la taille de la tumeur lorsqu'il est administré seul.

L'arzoxifène est un autre antagoniste des récepteurs à l'estrogène qui a été testé avec les tissus mammaires et utérins. Un aspect intéressant de l'arzoxifène est l'absence d'effets utérotropiques lorsqu'administré, une caractéristique importante pour son utilisation dans les cancers de l'endomètre contrairement au tamoxifène (Suh *et al.* 2001). En effet, des essais de phase II ont été réalisés chez des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre avancé/récurrent et les résultats obtenus étaient prometteurs. Deux de ces essais ont été faits avec 100 patientes provenant de deux études multi-institutionnelles et brièvement les résultats obtenus étaient une faible toxicité avec une ORR de 25 % et 31 % respectivement (Burke and Walker 2003). Un autre essai clinique a spécifiquement sélectionné 29 patientes avec un cancer de l'endomètre avancé exprimant le ER et/ou le récepteur de la progestérone et qui n'avaient pas préalablement été traitées par chimiothérapie. Les résultats obtenus ont été d'une faible toxicité ainsi que l'obtention d'une CR et de 8 PR (ORR = 31 %) (McMeekin *et al.* 2003).

Le torémifène est un anti-estrogène qui a été testé dans une étude utilisant des lignées cellulaires du cancer de l'ovaire *in vitro* ainsi que des patientes atteintes de cancers de l'ovaire et de l'utérus *in vivo*. Les résultats *in vitro* ont démontré que le torémifène a permis d'augmenter de manière significative l'efficacité de la doxorubicine sur des lignées cellulaires de cancer ovarien ; certaines de ces lignées étaient initialement

résistantes à la doxorubicine. Parmi les 8 patientes évaluées, 3 ont obtenu une PR, 3 une SD mais 2 ont aussi eu une progression tumorale (Mäenpää *et al.* 1992). Cette étude est donc intéressante pour de futurs essais cliniques avec les cancers gynécologiques.

L'effet minimal observé dans ces divers essais peut être dû, en partie, à la non-sélectivité des patientes ; important compte tenu de la perte fréquente des récepteurs à l'estrogène dans les cancers gynécologiques de stades avancés. Malgré tout, l'effet antitumoral de ces agents semble minime, mais réussit cependant à stabiliser efficacement la tumeur. Une combinaison d'un composé de cette famille ciblant la voie de signalisation des estrogènes avec un médicament chimiothérapeutique pourrait donc augmenter l'efficacité du traitement et serait une avenue considérable. Une combinaison avec deux cibles distinctes pourrait aussi être une option intéressante. En effet, cela a été démontré dans la prometteuse étude combinant le létrozole avec l'inhibiteur de mTOR et qui a fourni des résultats des plus étonnants (Slomovitz *et al.* 2011). Tel que démontré avec notre nouveau composé chimiothérapeutique, le VP-128 qui contient à la fois une portion de stéroïde (E2) et une portion toxique (platine), cibler le récepteur à l'estrogène est prometteur et efficace dans le cancer de l'ovaire. Autant *in vitro* qu'*in vivo*, un effet antitumoral significatif a été observé avec les tumeurs exprimant le ER alpha. L'effet était plutôt modeste avec les tumeurs sans le ER, et ce, de manière similaire aux résultats observés dans les essais cliniques (Brasseur *et al.* 2013). Compte tenu de ces observations, nous suggérons qu'une analyse préliminaire du niveau d'expression du ER des patientes soit effectuée avant d'utiliser des composés thérapeutiques ciblant la voie de signalisation de l'estrogène. Cette préanalyse pourrait permettre de s'assurer d'obtenir une efficacité optimale avec l'utilisation d'une thérapie combinée contre les cancers de l'endomètre et de l'ovaire.

5.1.4 Recherches précliniques ciblant Par-4

Par-4 est un candidat prometteur pour de futurs essais cliniques en raison de sa capacité unique à induire l'apoptose uniquement et sélectivement envers les cellules cancéreuses. Utiliser des supprimeurs de tumeurs est une alternative pour le traitement

du cancer via l'utilisation de protéines recombinantes ou par la thérapie génique pour exprimer le gène recherché. Concernant Par-4, très peu de données expérimentales sont disponibles concernant ses applications thérapeutiques. Cependant, quelques expériences *in vivo* sont convaincantes pour de futures études cliniques et le développement de traitements. Une étude a démontré que la livraison d'un plasmide, exprimant Par-4, par des nanoliposomes vers des tumeurs chez des souris nues augmentait l'efficacité du fluorouracile, un inhibiteur de la thymidylate synthase, contre le cancer (Kline *et al.* 2009). Considérant que Par-4 peut activer des mécanismes apoptotiques par signalisation paracrine, l'utilisation de Par-4 recombinant a été considérée et étudiée. Les effets observés, par l'utilisation d'un variant recombinant de Par-4 ou de seulement son domaine SAC (sélectif pour l'apoptose dans les cellules cancéreuses), ont été d'induire l'apoptose dans des cellules cancéreuses *in vitro* (Figure 5.2) (Burikhanov *et al.* 2009). Une autre équipe a produit une protéine recombinante du domaine SAC de Par-4, dérivée de plantes dans l'optique d'une production à grande échelle. Cette protéine recombinante a également maintenu ses capacités pro-apoptotiques, effet recherché pour la thérapie anticancéreuse (Figure 5.2) (Sarkar *et al.* 2015). Considérant que le domaine SAC est suffisant pour l'apoptose et sélectif envers les cellules cancéreuses, de futurs composés ou traitements pourraient être conçus en fonction de sa structure pour la thérapie ciblée.

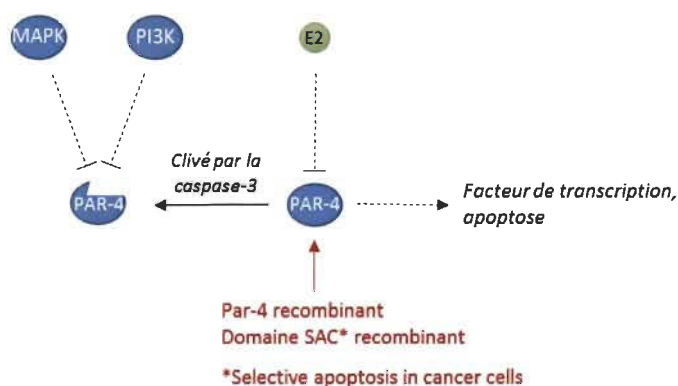


Figure 5.2 Schéma récapitulatif des recherches précliniques ciblant Par-4. (Brasseur, Gévry, and Asselin 2016.)

Une autre option à envisager concernant la thérapie ciblée serait de combiner Par-4 avec un traitement hormonal. Dans le cancer de la prostate, une étude a montré que Par-4 est efficace pour induire l'apoptose seulement dans des cellules cancéreuses hormone indépendantes, ce qui indique un rôle pour les hormones et la régulation négative de Par-4 (El-Guendy *et al.* 2003; Chakraborty *et al.* 2001). Une étude, portant sur 126 patients traités par chimiothérapie néoadjuvante, a évalué l'expression de différents gènes afin d'observer des corrélations entre ces derniers et les résultats obtenus suite au traitement. Les résultats observés ont été très intéressants. En effet, l'ARNm de Par-4 a été régulé à la hausse après la chimiothérapie et Par-4 avait un impact significatif sur le pronostic du patient; l'état du ER était cependant directement corrélé avec le pronostic et Par-4. En effet, Par-4 était prédictif d'un bon résultat thérapeutique chez les patients ER-négatifs et l'inverse, un mauvais pronostic, a été observé chez les patients ER-positifs indiquant un rôle important entre les hormones et Par-4 (Klintman *et al.* 2016).

Tel qu'introduit, peu d'études ont démontré que l'estrogène pouvait réguler négativement Par-4 (Figure 5.2) (Casolari *et al.* 2011). Pour explorer davantage ce mécanisme de régulation, nous avons fait des expériences et avons également observé cet effet de régulation négative de Par-4. Lors d'un traitement avec de l'estrogène sur des cellules Ishikawa du cancer de l'endomètre, le niveau protéique de Par-4 était diminué confirmant ainsi la présence de ce mécanisme de régulation hormonale dans le tissu de l'endomètre (Figure 5.3A). Considérant la régulation négative observée avec l'estrogène, nous avons utilisé la banque de données Gene Expression Omnibus (GEO) et avons trouvé une étude (GSE23893) dans les tissus cancéreux de l'utérus démontrant que le ER α pouvait se lier près du promoteur de Par-4 dans sa région proximale, indiquant un lien potentiel avec la régulation négative observée précédemment avec l'estrogène (Figure 5.3B).

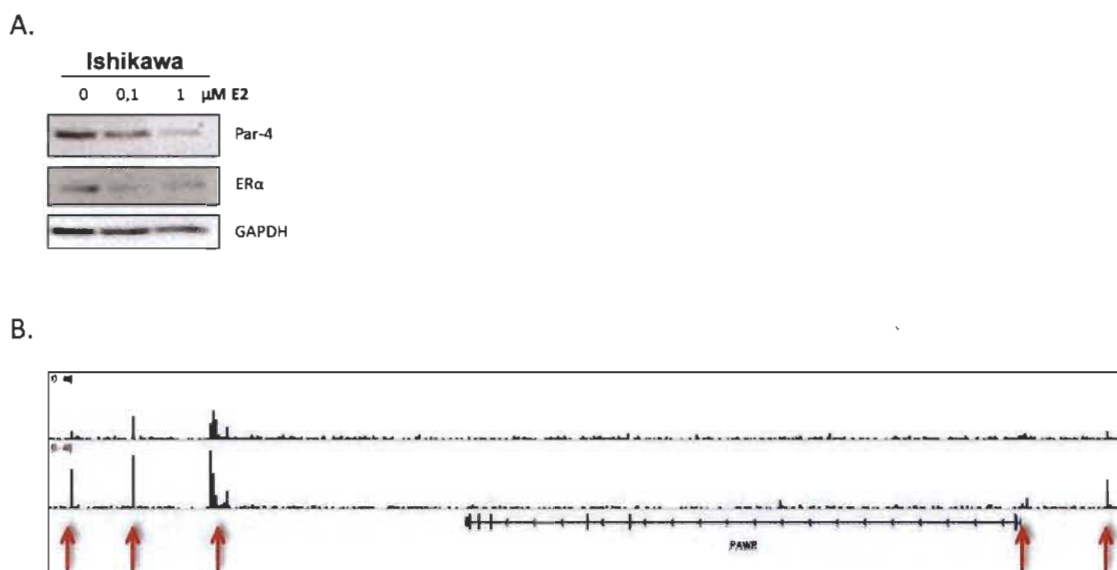


Figure 5.3 Implication de l'estrogène dans la régulation de Par-4.

(A) Les cellules cancéreuses Ishikawa ont été traitées avec 0,1 μ M ou 1 μ M d'estradiol (E2) pendant 4 h. Les niveaux de Par-4 et de ER α ont été déterminés dans les cellules traitées en utilisant l'immunobuvardage de type Western. GAPDH a été utilisé comme contrôle de chargement. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (B) Pistes ChIP-seq provenant de cellules de cancer de l'endomètre démontrant les emplacements de liaison du ER α sur le gène PAWR (Par-4) dans les cellules contrôles (ligne du haut) et les cellules traitées au E2 (ligne du bas) pendant 30 minutes. Les emplacements génomiques ont été obtenus en utilisant la visionneuse génomique intégrée (IGV 2.0). Les flèches rouges indiquent un nouveau profil de liaison d'enrichissement du ER α dans la région proximale du gène de Par-4, pouvant potentiellement être impliqué dans la régulation négative du gène. Numéro d'accèsion Geo: GSE23893. (Tirée de Brasseur *et al.* 2016.)

Considérant que les ovaires et l'endomètre sont en permanence sous l'influence des hormones, que l'estrogène pourrait influencer l'activité de transcription de Par-4 dans le cancer du sein et de l'utérus et que les hormones ont un rôle important dans l'activité anti-apoptotique de Par-4, nous pouvons nous permettre d'émettre l'hypothèse que les estrogènes pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'expression de Par-4 (El-Guendy *et al.* 2003; Chakraborty *et al.* 2001; Klintman *et al.* 2016; Casolari *et al.* 2011). Il est important de considérer que le niveau d'expression de Par-4 n'est pas seulement régulé par les hormones au niveau transcriptionnel, mais aussi par d'autres

mécanismes tels que l'hyperméthylation de son promoteur ou l'ubiquitination suivie de la dégradation de sa protéine par le protéasome (Brasseur *et al.* 2016; Pruitt *et al.* 2005; Chen *et al.* 2014). Il est également possible que l'estrogène régule l'activité de Par-4 et sa localisation, que ce soit grâce à des mécanismes génomiques ou non génomiques, commandant ainsi la dynamique de Par-4; l'estrogène pourrait donc agir comme un agent cancérogène puissant ainsi qu'un inducteur de chimiorésistance en fonction de la situation. Combiner la thérapie hormonale avec Par-4 est donc une option considérable pour acquérir une efficacité optimale afin de rétablir l'expression de Par-4, d'induire l'apoptose tout en réduisant la croissance cellulaire contrôlée par l'estrogène. Ces résultats préliminaires concernant la régulation de Par-4 par l'estrogène associé avec sa capacité unique d'induire sélectivement l'apoptose dans les cellules cancéreuses sont très intéressants et devraient être envisagés pour de futures études.

5.2 Limitations de la thérapie ciblée

À la lumière des essais cliniques rapportés, l'observation initiale que nous pouvons faire est que le nombre d'études testées sur des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre est limité. La raison de ce faible nombre d'études pour le cancer endométrial est probablement due à son taux élevé de survie dans le cas d'un diagnostic précoce. Cependant, tel que présenté, le cancer de l'endomètre est très agressif à un stade avancé et le taux de succès des traitements actuels est très faible. Il est de notre avis que, plus de recherche est nécessaire afin de développer de nouvelles thérapies pour améliorer le pronostic des femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre récurrent.

L'idée de la thérapie ciblée est d'éliminer les cellules cancéreuses gynécologiques de façon plus sélective tout en inhibant leurs mécanismes de chimiorésistance. Cependant, jusqu'à présent, aucun essai clinique n'a été en mesure d'obtenir le taux de réponse souhaité «parfait» via la thérapie ciblée. Ni la monothérapie ciblée ni la combinaison avec des régimes de chimiothérapie courants ne sont suffisants pour accroître de façon efficace et constante la survie des patients. En effet, la conclusion générale est que les inhibiteurs de mTOR ont une activité modeste en général;

les inhibiteurs de PI3K/AKT ont un effet très minime, un effet cependant augmenté dans les cancers de l'ovaire et de l'endomètre et encore plus, lorsque combinés avec des inhibiteurs de la voie des MAPK; les anti-estrogènes permettent l'obtention d'une excellente stabilité de la tumeur, mais qui ne permettent pas sa régression. Comme déjà observé dans les essais cliniques, la combinaison de diverses thérapies ciblées est une avenue intéressante pour surmonter la résistance/absence de réponse observée avec la monothérapie ciblée. En effet, la plupart des voies et mécanismes décrits peuvent avoir une intercommunication avec d'autres voies, une régulation par boucle de rétroaction dans leur vaste réseau ou d'une régulation alternative pas inhibée par les composés utilisés. Par exemple, l'inhibition des MAPK combinée à l'inhibition de PI3K, deux voies qui s'intercommuniquent, permet d'augmenter significativement l'efficacité de ces composés contre les cancers gynécologiques. Compte tenu de ce fait, les essais les plus prometteurs sont ceux combinant deux cibles tels que l'everolimus (ciblage mTORC1) combiné avec le létrozole (ciblage de l'aromatase) ou le buparlisib/BYL719 (composés ciblant PI3K) combiné avec le trametinib/binimetinib (composés ciblant MEK) (Slomovitz *et al.* 2015; Bedard *et al.* 2015; Juric *et al.* 2014).

Une autre avenue à envisager pour accroître l'efficacité des thérapies ciblées serait de trouver des biomarqueurs spécifiques en corrélation avec la réponse au traitement. En effet, beaucoup de ces nouveaux composés n'ont pas encore trouvé de biomarqueur efficace pour estimer le succès du traitement, ce qui peut aussi expliquer l'activité clinique modeste observée dans beaucoup de ces essais. L'utilisation de biomarqueurs conduirait à de la médecine personnalisée via une vaste préanalyse des patientes et de leurs diverses mutations situées dans leurs tumeurs. Faire ce type d'analyse pour chacun des patients peut cependant être très coûteux pour des tests de phases cliniques II et III. Cette préanalyse, cependant, permettrait de mieux identifier la bonne combinaison des composés de ciblage à utiliser et d'ainsi obtenir un taux de réussite optimal pour le traitement. Séquencer le génome humain coûtait extrêmement cher (approximativement 1-2 milliards de dollars) il y a plus de 10 ans, mais aujourd'hui il est possible de le faire pour environ 1000 \$ et les coûts continuent de diminuer. L'hétérogénéité entre les diverses patientes et à l'intérieur même d'une tumeur joue également un rôle important

pour le taux de réponse des traitements ciblés et des mécanismes de chimiorésistance associés. L'instabilité génomique est un des facteurs importants liés à l'hétérogénéité des tumeurs; les mécanismes de réparation de l'ADN ainsi que le réseau de PI3K, qui est considérablement muté dans les cancers gynécologiques, sont en partie responsables de cette hétérogénéité (Burrell *et al.* 2013). Cette hétérogénéité se reflète sur la récurrence des cancers gynécologiques à des stades avancés où seulement les cellules sensibles meurent, laissant place à une petite population résistante qui finira par revenir après plusieurs traitements. Dans l'ensemble, une meilleure compréhension des paramètres de la patiente, avec des biomarqueurs d'efficacité connus, serait rentable pour l'utilisation de thérapies ciblées.

Malgré un fort intérêt pour certaines cibles moléculaires jouant un rôle important dans l'agressivité du cancer, il est parfois complexe de créer un composé pouvant cibler celles-ci de façon efficace. On peut simplement penser à l'oncogène Ras, muté dans plus de 25 % des cancers et rendant ceux-ci très agressifs et difficiles à traiter, qui n'a toujours aucun inhibiteur en date d'aujourd'hui. Une raison pourquoi il est difficile de cibler cette protéine est qu'aucun site actif, permettant à un composé de s'y attacher, n'est disponible sur celle-ci (Gysin *et al.* 2011). Malgré tout, d'autres possibilités s'offrent telles que de cibler des protéines en aval comme les MAPK et PI3K via des inhibiteurs ou d'utiliser de l'ARN interférant pour diminuer l'expression de Ras (Gysin *et al.* 2011). Le principe de l'interférence ARN consiste à une molécule ARN complémentaire à une séquence d'ARN messager qui, lorsque liées ensemble, mèneront à sa dégradation via le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) et conséquemment à une diminution de l'expression protéique du gène. La technologie de l'ARN interférant est efficace, mais requiert encore de la recherche en raison de ses actuelles limitations pour le domaine clinique tel que sa toxicité, sa méthode de livraison et s'il y a des cibles non spécifiques pouvant causer des effets secondaires importants chez la patiente (Chen and Zhaori 2011). Récemment, une technologie révolutionnaire permettant l'édition du génome, CRISPR Cas-9, a été développée. Brièvement, Cas-9 est une endonucléase avec un guide-ARN associé originellement aux séquences CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) pouvant couper l'ADN.

Le guide-ARN, pouvant être synthétisé indépendamment, permet à l'endonuclease d'éliminer spécifiquement une portion d'ADN précise rendant les cellules « knock-out » pour un gène recherché. Suite à la séquence reconnue par le guide-ARN, la Cas-9 doit reconnaître une séquence PAM (5'-NGG-3') sur le génome de l'hôte pour fonctionner, mais celle-ci n'est pas limitante dans le génome humain puisque qu'on la retrouve à toutes les 8-12 paires de bases. Une fois la séquence d'intérêt clivée, l'ADN doit être réparé et il est possible d'y insérer une nouvelle séquence d'« ADN donneur » par recombinaison homologue, permettant l'insertion d'une mutation précise ou d'un marqueur de sélection et obtenir un « knock-out » du gène. L'avantage de cette technologie est l'élimination à 100 % de l'expression du gène, de façon efficace, peu coûteuse, mais aussi la forte sélectivité du clivage de la séquence ADN, par l'utilisation d'ARNs guides, permettant d'éviter de cliver des régions non spécifiques (Figure 5.4) (Charpentier and Doudna 2013; Doudna and Charpentier 2014).

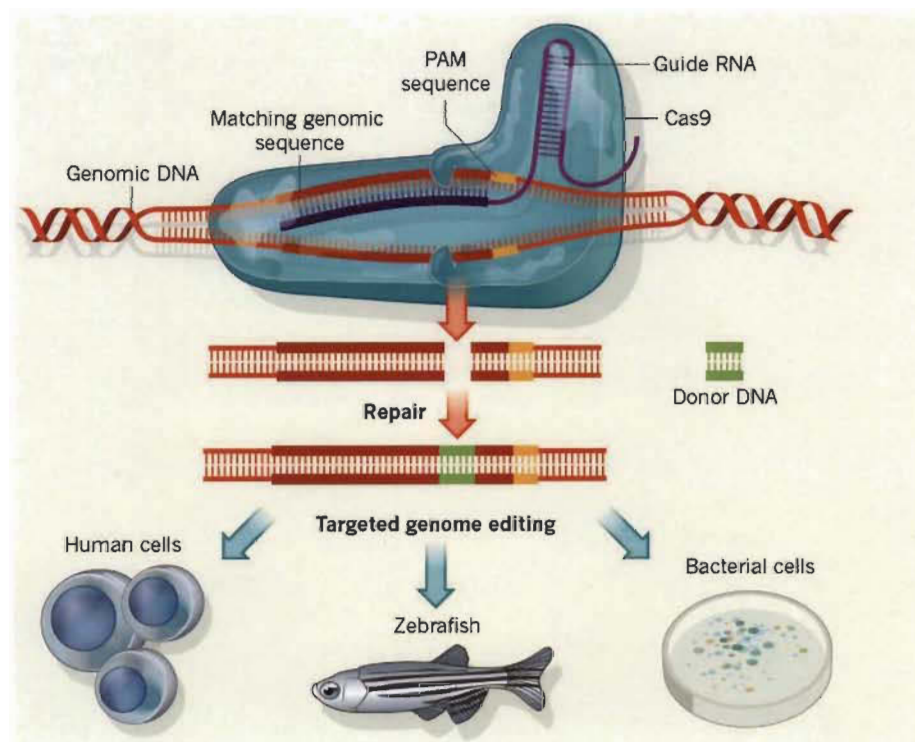


Figure 5.4 Schéma simplifié de l'utilisation de la technologie CRISPR. (Tirée de Charpentier and Doudna 2013.)

Afin d'éviter une non-spécificité, l'enzyme Cas-9 peut être modifiée de diverses manières telles qu'observé avec la Cas-9 nickase qui permet de cliver un simple brin d'ADN à la fois via deux guides ARN à proximité sur chacun des brins d'ADN afin éliminer spécifiquement le gène recherché (Sander and Joung 2014). Question d'éthique médicale, l'utilisation de cette technologie en clinique est limitée puisqu'elle a un impact direct sur le génome, mais considérant l'importance qu'elle peut apporter, un premier essai clinique vient juste d'être approuvé le 21 juin 2016 aux États-Unis afin de savoir, principalement, si la technologie est sécuritaire pour les patients (Reardon 2016).

Un autre exemple de protéine dont le développement d'un composé ciblé est complexe est ERCC1, une protéine impliquée dans la réparation d'adduits d'ADN-platine dans le cancer ovarien via le processus de réparation par excision de nucléotide (NER – nucleotide excision repair) (Selvakumaran *et al.* 2003; Ferry, Hamilton, and Johnson 2000; Dabholkar *et al.* 1994; Reed 1998). Le NER est un processus en plusieurs étapes impliquant diverses protéines permettant d'enlever et de remplacer une séquence de nucléotides sur un brin d'ADN. Fait intéressant, un mécanisme du NER accru est associé à une augmentation de chimiorésistance pour le cancer de l'ovaire. En effet, la protéine ERCC1, formant un complexe avec l'endonucléase XPF et impliqué dans l'incision en 5' des adduits d'ADN, a été rapportée pour être impliquée dans le degré de sensibilité aux composés du platine dans le cancer de l'ovaire (Selvakumaran *et al.* 2003; Ferry, Hamilton, and Johnson 2000; Dabholkar *et al.* 1994; Reed 1998; Chang *et al.* 2005). Les protéines XPF et XPG, impliquées aussi dans le mécanisme de NER, ont également un impact sur la sensibilité au platine dans le cancer de l'ovaire (Stevens *et al.* 2008). La raison pourquoi ERCC1 est difficile à cibler est le fait qu'aucune activité enzymatique connue n'y est associée. Malgré tout, de nouvelles petites molécules sont développées ciblant les complexes impliquant la protéine ERCC1, ayant comme objectif de rétablir la sensibilité au platine (Gentile, Tuszyński, and Barakat 2016). La recherche de nouvelles technologies est toujours d'actualité afin de pouvoir cibler d'importantes protéines complexes impliquées dans le cancer.

Un élément additionnel à considérer pour une thérapie ciblée efficace contre les cellules cancéreuses chimiorésistantes est le fait que ce ne sont pas seulement les modifications qui se produisent à l'intérieur des cellules qui contribuent à la chimiorésistance. En effet, d'autres éléments contribuent à cette résistance, tels que le microenvironnement tumoral et la pharmacocinétique des composés qui doivent aussi être considérés pour les futures thérapies (Agarwal and Kaye 2003). En ce qui concerne le microenvironnement, l'hypoxie est connue pour être reliée à la radiorésistance et à la chimiorésistance des cancers (Tomida and Tsuruo 1999; Brown and Wilson 2004). Les cellules cancéreuses en hypoxie, souvent situées au centre de la tumeur solide, ont moins accès aux vaisseaux sanguins, et par conséquent, sont moins exposées aux médicaments anticancéreux. L'hypoxie est également associée à une prolifération cellulaire plus lente ce qui affecte la chimiothérapie actuelle ciblant les cellules à division rapide (Brown and Wilson 2004). Ce facteur de microenvironnement est donc un élément clé négatif affectant le succès des thérapies anticancéreuses. D'autres éléments interagissent également avec le microenvironnement tel que le système immunitaire, la matrice extracellulaire et les molécules de signalisation provenant de l'environnement extracellulaire. Ces facteurs du microenvironnement sont pris en compte en clinique et des thérapies ciblant l'angiogenèse, l'hypoxie, le système immunitaire ou les récepteurs à tyrosine kinase sont actuellement à l'étude (Balkwill, Capasso, and Hagemann 2012). Une combinaison de traitements, comprenant, entre autres, ceux ciblant le microenvironnement, pourrait être positive au taux de succès du traitement du cancer avec l'utilisation de la thérapie ciblée conventionnelle.

5.2.1 Le VP-128, la parasporine-2 et Par-4

Les études effectuées dans le cadre de cette thèse ont aussi leurs limitations. En ce qui concerne le VP-128, celui-ci cible principalement le ER α , cependant, le récepteur n'est présent que dans 60-70 % des cancers gynécologiques (Pujol *et al.* 1998; Pearce and Jordan 2004; Cuna, Hoffmann, and Pujol 2004; Bender, Buekers, and Leslie 2011; Chon, Hu, and Kavanagh 2006). Malgré le fort pourcentage de cancers gynécologiques exprimant notre cible, le ER α est habituellement muté/non-exprimé dans

les cancers de stades avancés, lesquels sont responsables du faible taux de survie et nécessitant principalement de nouvelles thérapies (Kreizman-Shefer *et al.* 2014; Issa *et al.* 2008; Cuna, Hoffmann, and Pujol 2004; Pujol *et al.* 1998; Sjoquist *et al.* 2011; Pinzone *et al.* 2004; Yoshida *et al.* 2000). Cette perte d'expression peut être associée à divers facteurs tels que la méthylation du gène, l'acétylation des histones, la perte d'expression de facteurs de transcription régulant le gène ou la régulation négative de la transcription du gène par diverses voies incluant les facteurs de croissance (EGF) ou les hormones (gonadotrophine chorionique humaine habituellement produite lors de la grossesse et le GnRH) (Yoshida *et al.* 2000; Pinzone *et al.* 2004). Heureusement, le VP-128 possède aussi une affinité, similaire à l'estradiol, pour le ER β qui est présent dans plusieurs cellules cancéreuses (Descoteaux *et al.* 2008). Les mécanismes d'action du ER β sont néanmoins moins étudiés et donc moins évidents à comprendre le mécanisme. Malgré tout, le VP-128 agit relativement rapidement, et une fois lié à son récepteur il peut utiliser sa portion platine sur l'ADN afin d'activer les mécanismes d'apoptose de la cellule concernée, indépendamment des mécanismes du ER β . Le tout a été confirmé dans nos expérimentations via l'utilisation du composé *in vitro* et *in vivo* avec des modèles ER α négatifs, via lesquels le VP-128 répondait de façon similaire au composé de base, le cisplatine. Il faut savoir cependant que le VP-128 était moins efficace que dans les modèles ER α positifs, mais tout de même actif (Brasseur *et al.* 2013). Le ER α , fréquemment surexprimé dans les cancers gynécologiques, pourrait permettre une meilleure sélection des tumeurs et donc une meilleure efficacité du composé. Une limitation additionnelle à considérer concernant la cible (ER) du VP-128 est que celle-ci n'est exprimée en majorité que dans les cancers gynécologiques, limitant son utilisation qu'à ces types de cancers seulement.

Concernant la parasporine-2, ses limitations actuelles sont nombreuses considérant que son mécanisme d'action est encore loin d'être complètement saisi. En effet, l'utilisation de cette toxine est encore au tout début de ses études précliniques puisque le récepteur responsable de sa sélectivité et toxicité envers les cellules cancéreuses est toujours inconnu à ce jour (Okassov *et al.* 2015). Lors de nos expérimentations, nous avons observé que la parasporine-2 était belle et bien toxique et sélective envers les

cellules cancéreuses provenant de divers cancers, cependant, le niveau d'activité pouvait varier grandement selon la lignée cellulaire traitée (Brasseur *et al.* 2015). La protéine responsable de cette efficacité, probablement le récepteur clé, pourrait permettre de prédire l'efficacité du traitement avant son administration afin d'éviter de potentiels effets secondaires importants, fréquents lors de l'utilisation de bactéries comme thérapie anticancéreuse. En effet, l'utilisation de composés bactériens est souvent associée avec une forte toxicité, limitant donc les doses utilisées et la possible combinaison avec d'autres traitements anticancéreux (Patyar *et al.* 2010). Il est donc important d'étudier la réelle sélectivité de cette toxine *in vivo* avec des modèles animaux afin de s'assurer que la toxicité sera limitée et concentrée au niveau des tumeurs.

Au sujet de Par-4, cette protéine possède la caractéristique unique d'induire l'apoptose spécifiquement aux cellules cancéreuses, cependant les mécanismes pour ce faire sont nombreux et complexes (Irby and Kline 2013). Bien comprendre les mécanismes dans lesquels est impliquée cette protéine est critique pour obtenir le résultat recherché dans un contexte clinique. Dans le cadre de nos recherches, nous avons étudié plus en détail le fragment clivé de Par-4, présent en situation d'apoptose chez des lignées cellulaires cancéreuses sensibles à la chimiothérapie. Il avait été démontré que le cl.Par-4 à lui seul était suffisant pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus lorsque surexprimé par transfection transitoire (Chaudhry *et al.* 2012). Nous avons tenté de reproduire la même situation, induire l'apoptose avec seulement la présence de cl.Par-4, dans le contexte de cellules cancéreuses de l'endomètre et de l'ovaire, mais sans l'obtention de résultats significatifs (Figure 5.5).

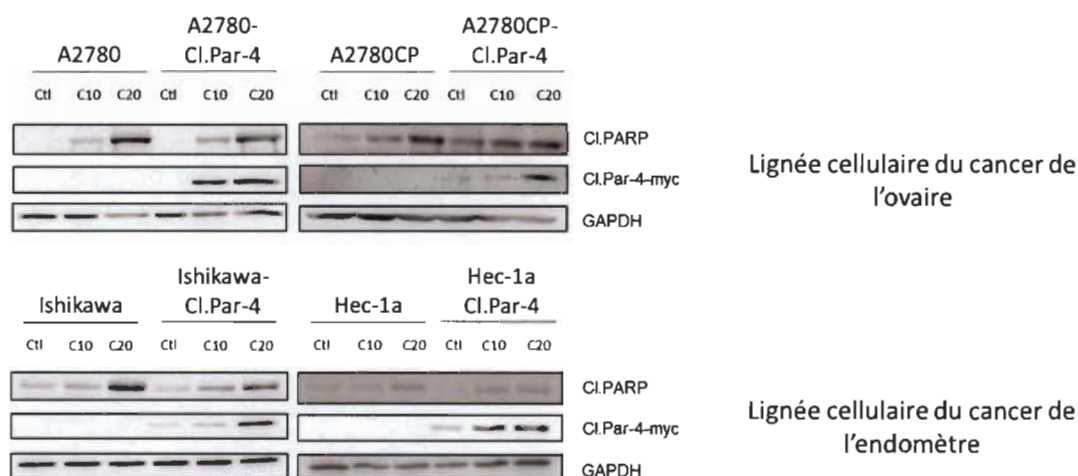


Figure 5.5 Absence de clivage additionnel de PARP en présence de cl-Par-4.
 Des cellules cancéreuses de l'ovaire (A2780-A2780CP) et de l'endomètre (Ishikawa-Hec-1a) ont été transfectées stablement avec le gène de cl.Par-4-myc. Les cellules ont ensuite été traitées avec 10-20 uM de cisplatine pendant 24 h. Les niveaux de Cl.PARP et de Myc-tag ont été déterminés dans les cellules traitées en utilisant l'immunobuvardage de type Western. GAPDH a été utilisé comme contrôle de chargement. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.
 *Données non publiées.

En effet, l'absence de sensibilisation à l'apoptose en induisant l'expression de cl.Par-4 dans nos cellules était surprenante, nécessitant des investigations additionnelles sur la mécanistique s'y rattachant. Nous n'avons pas réussi à rétablir la sensibilité à l'apoptose de nos cellules mais les recherches effectuées ont permis de découvrir que cl.Par-4 était régulé par des mécanismes post-traductionnels impliquant le protéasome, PI3K et les MAPK (Brasseur *et al.* 2016). Ces mécanismes pourraient expliquer de l'absence d'apoptose observée dans nos modèles de l'ovaire et de l'endomètre. Un fait intéressant est que nous avons aussi testé l'expression constitutive de cl.Par-4-myc de façon préliminaire dans des cellules normales transformées de l'endomètre, les HIESC. Il a été surprenant d'observer qu'aucune régulation du transgène ne semblait avoir lieu (Figure 5.6). Nous n'avons pas poursuivi les recherches concernant les cellules normales de l'endomètre, mais il est important de considérer cet élément pour une éventuelle continuité des recherches puisqu'elles pourraient permettre de

comprendre l'absence d'apoptose précédemment observée chez les cellules cancéreuses de l'ovaire et de l'endomètre (Brasseur *et al.* 2016).

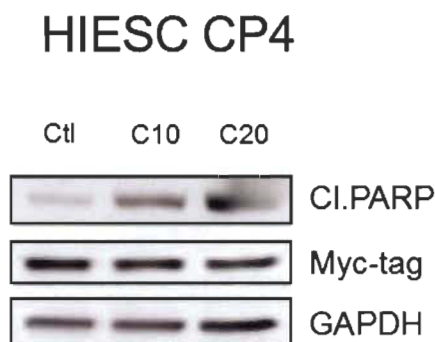


Figure 5.6 Absence de régulation post-traductionnelle dans la lignée normale de l'endomètre HIESC.

Cellules normales de l'endomètre HIESC exprimant stablement le transgène cl.Par-4-myc (Myc-tag) et traitées au cisplatine (10-20 μ M) pendant 24 h.

Des cellules normales de l'endomètre (HIESC) ont été transfectées stablement avec le gène de cl.Par-4-myc (Myc-tag). Les cellules ont ensuite été traitées avec 10-20 μ M de cisplatine pendant 24 h. Les niveaux de Cl.PARP et de Myc-tag ont été déterminés dans les cellules traitées en utilisant l'immunobuvardage de type Western. GAPDH a été utilisé comme contrôle de chargement. Les résultats présentés sont représentatifs d'une seule expérience et devraient être refaits afin de confirmer les résultats.

*Données non publiées.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer nos observations d'absence d'apoptose en présence de cl.Par-4 dans les cancers gynécologiques. En premier lieu, il serait intéressant d'effectuer des tests de mesure de la mort par apoptose en combinaison avec des inhibiteurs des divers mécanismes de régulation précédemment découverts pour cl.Par-4 (protéasome, estrogène, PI3K et MAPK) (Brasseur *et al.* 2016). Aussi, tel que précédemment rapporté, les hormones semblent jouer un rôle de régulation négative sur l'activité de Par-4 et cet effet pourrait être rapporté dans les cancers gynécologiques où les hormones sont fortement présentes (El-Guendy *et al.* 2003; Chakraborty *et al.* 2001; Brasseur *et al.* 2016). La localisation de Par-4 est aussi importante pour dicter le rôle de Par-4 et de son activité pro-apoptotique (Shrestha-Bhattarai and Rangnekar 2010).

Tel que démontré dans nos recherches, une grande proportion de cl.Par-4 se retrouvait dans le cytosol de nos cellules, avec ou sans traitement de cisplatine (Brasseur *et al.* 2016). Dans le cas des cellules du col de l'utérus HeLa, le cl.Par-4 exprimé était localisé en forte proportion au noyau pouvant expliquer l'activité apoptotique observée (Chaudhry *et al.* 2012). Cette localisation observée pourrait être associée aux tissus gynécologiques et associée aux hormones. Des recherches en cours dans notre laboratoire démontrent que de retenir Par-4 au noyau sensibilise les cellules cancéreuses gynécologiques à divers composés pro-apoptotiques tels que le cisplatine et le TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand), une cytokine pouvant induire l'apoptose par la voie extrinsèque particulièrement chez les cellules cancéreuses (Données non illustrées).

Finalement, un dernier élément important qui pourrait expliquer l'absence d'apoptose dans nos cellules cancéreuses est le fait que Par-4 peut aussi jouer un rôle dans la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), un rôle inhabituel pour un suppresseur de tumeur considérant que ce mécanisme est favorable à la formation de métastases. L'EMT consiste au passage des cellules d'une forme épithéliale à une forme mésenchymateuse, les dédifférenciant et permettant d'acquérir des capacités invasives menant aux métastases (Krawczyk *et al.* 2014). Cette découverte a démontré que Par-4 est une protéine en aval de TGF- β , essentielle pour induire l'EMT (Figure 5.7) (Chaudhry *et al.* 2014). Cela indique que Par-4, selon divers facteurs de régulation, pourrait jouer des rôles opposés entre la survie et la mort cellulaire. Cette dualité de rôle pourrait expliquer l'absence d'apoptose dans les cellules cancéreuses provenant d'un tissu gynécologique et exprimant cl.Par-4.

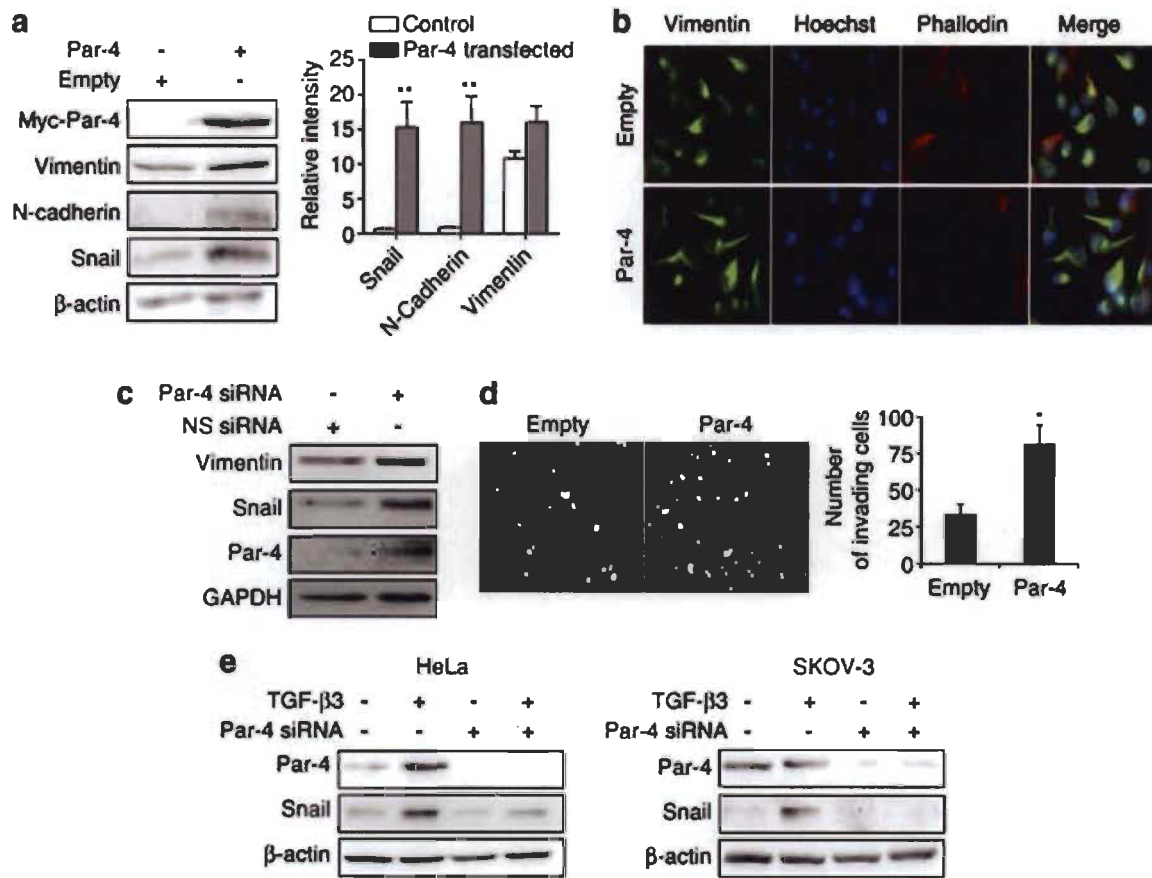


Figure 5.7 Par-4 est impliqué dans les mécanismes de la transition épithélio-mésenchymale.

Cellules HeLa transfectées transitoirement soit avec 2 μ g de vecteur plasmidique exprimant Par-4 ou un siRNA inhibant celui-ci. Après 48 h, les cellules étaient analysées. (a) Transfection avec le plasmide exprimant Par-4. Des analyses de densitométrie représentant le niveau de protéine ont été effectuées et représentent la moyenne $\pm$ SD **P < 0,01 comparées avec le plasmide vide. (b) Immunofluorescence pour la vimentine (Alexa Fluor 594, vert), le noyau (Hoechst 33258, bleu) et le cytosquelette d'actine (phalloïdine en rouge); Magnification $\times 63$. (c) Transfection avec du siRNA contre Par-4. (d) Transfection avec le plasmide exprimant Par-4. Un test d'invasion a été effectué et les cellules ayant adhéré à la surface du bas du filtre ont été colorées avec du Hoescht 33258; Magnification $\times 10$. Histogramme représentant le nombre de cellules ayant effectué une invasion du matrigel. Le noyau a été compté dans cinq différentes zones pour chaque expérience, *P < 0,05. (e) Transfection avec du siRNA contre Par-4 suivi d'un traitement TGF- β 3 dans les HeLa et SKOV-3. Les niveaux de vimentin, N-cadherin, snail, Par-4 et Myc-Par-4 ont été déterminés dans les cellules traitées en utilisant l'immunobuvardage de type Western. β -actin a été utilisé comme contrôle de chargement. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (Tirée de Chaudhry *et al.* 2014.)

Le fait que nous ayons de la difficulté à utiliser Par-4 et son fragment à leurs pleines capacités dans les cancers gynécologiques constitue une limitation importante de cette protéine. Il est donc nécessaire d'obtenir une meilleure compréhension de la mécanistique afin de pouvoir étudier Par-4 et son fragment dans un contexte plus clinique pour ces types de cancer.

5.3 Perspectives et futures expérimentations des divers projets

Brièvement, cette sous-section du dernier chapitre suggérera des expérimentations qui permettront aux divers projets d'aller de l'avant, ayant comme but ultime de se rendre en clinique pour une thérapie ciblée, anticancéreuse et efficace contre les cancers gynécologiques chimiorésistants.

5.3.1 L'hybride estradiol-platine, le VP-128

Le projet de l'hybride estradiol-platine VP-128 est en phase préclinique et est plutôt avancé. Jusqu'à présent, ce composé a été testé seulement sur les cancers du sein et de l'ovaire donc il serait intéressant d'effectuer quelques tests pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* pour le cancer de l'utérus afin de compléter le trio des cancers féminins (Brasseur *et al.* 2013; Van Themsche, Parent, *et al.* 2009).

Par la suite, les précédentes expérimentations *in vivo* étaient limitées à des lignées cellulaires complètement différentes avec ou sans l'expression du ER α . Il serait des plus pertinents de reproduire les expérimentations, mais cette fois-ci avec des modèles isogéniques où la seule différence serait la présence/absence de notre cible moléculaire, le ER α . Ces expérimentations pourraient réellement confirmer l'importance de la cible thérapeutique pour le VP-128 dans un modèle physiologique. Avec les mêmes modèles, il serait aussi intéressant de tester le VP-128 en combinaison avec d'autres composés tels que fréquemment observés en clinique et où les résultats étaient des plus prometteurs. Une des combinaisons qui serait intéressante de tester serait avec un inhibiteur clinique de l'autophagie (ex : l'hydroxychloroquine) en raison de l'augmentation de l'efficacité

du VP-128 observée précédemment *in vitro* dans le cancer de l'ovaire (Brasseur *et al.* 2013). Il serait aussi intéressant de combiner le VP-128 avec un inhibiteur clinique de mTOR, l'everolimus, afin d'essayer de reproduire des résultats prometteurs précédemment obtenus avec sa combinaison avec un inhibiteur de l'aromatase (létrozole) (Slomovitz *et al.* 2015).

Des études préliminaires de pharmacocinétique du VP-128 ont précédemment été faites démontrant que le VP-128 avait des caractéristiques similaires ou même supérieures à son composé de base, le cisplatine (Figure 5.8). Ces expériences n'étant que préliminaires, il serait intéressant d'aller rechercher des informations additionnelles telles que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion du composé, et ce, via plusieurs expérimentations indépendantes afin d'obtenir des résultats fiables et représentatifs.

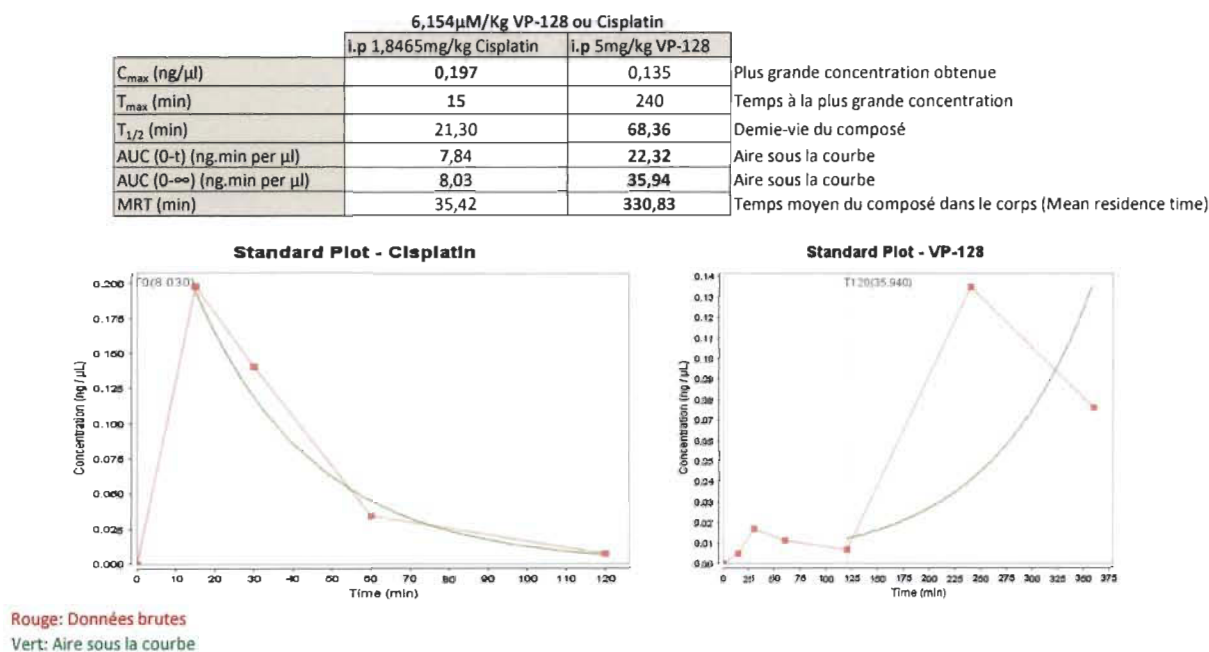


Figure 5.8 Données préliminaires de la pharmacocinétique du VP-128. Administration de 6 154 μ M/Kg de VP-128 ou cisplatine à des souris suivie d'une prise de sang à différents temps (0-15-30-60-120-240-360 min) afin de mesurer les divers facteurs de pharmacocinétique via l'utilisation de spectrophotométrie pouvant mesurer la quantité de platine/échantillon.
*Données non publiées.

Si ces études précliniques suggérées sont convaincantes, des essais de phase clinique I seraient la suite logique pour tester le VP-128 chez l'humain.

5.3.2 La toxine bactérienne cancer-sélective, la parasporine-2Aa1

En ce qui a trait à la parasporine-2Aa1, plusieurs analyses précliniques sont encore nécessaires avant de pouvoir être testée en essai clinique sur des humains.

En premier lieu, déterminer le récepteur responsable de la sélectivité antitumorale de la PS2Aa1 est l'élément critique à la poursuite des recherches. Une technique qui pourrait être utilisée pour ce faire serait celle du double hybride (Yeast two-hybrid system). Brièvement, cette technique permet de découvrir des interactions protéine-protéine par l'utilisation d'un plasmide exprimant une protéine contrôle pouvant activer la transcription d'un gène rapporteur. Une fois le contrôle effectué, les protéines à tester l'interaction sont modifiées génétiquement (une protéine est modifiée avec un domaine de liaison et l'autre protéine est modifiée avec un domaine d'activation) et exprimées par l'utilisation de plasmides. Chacune des protéines (PS2Aa1 et ses potentiels candidats) possède une portion (domaines de liaison ou d'activation) de la protéine contrôle pouvant permettre la transcription du gène rapporteur, et ce, seulement si les deux protéines peuvent interagir ensemble (Figure 5.9) (Young 1998; Hiller-Sturmhofel, Sobin, and Mayfield 2008). Via cette technique, il pourrait être possible de découvrir le récepteur liant la PS2Aa1, cependant, il faudra tester un large éventail de protéines candidates pour découvrir celui-ci.

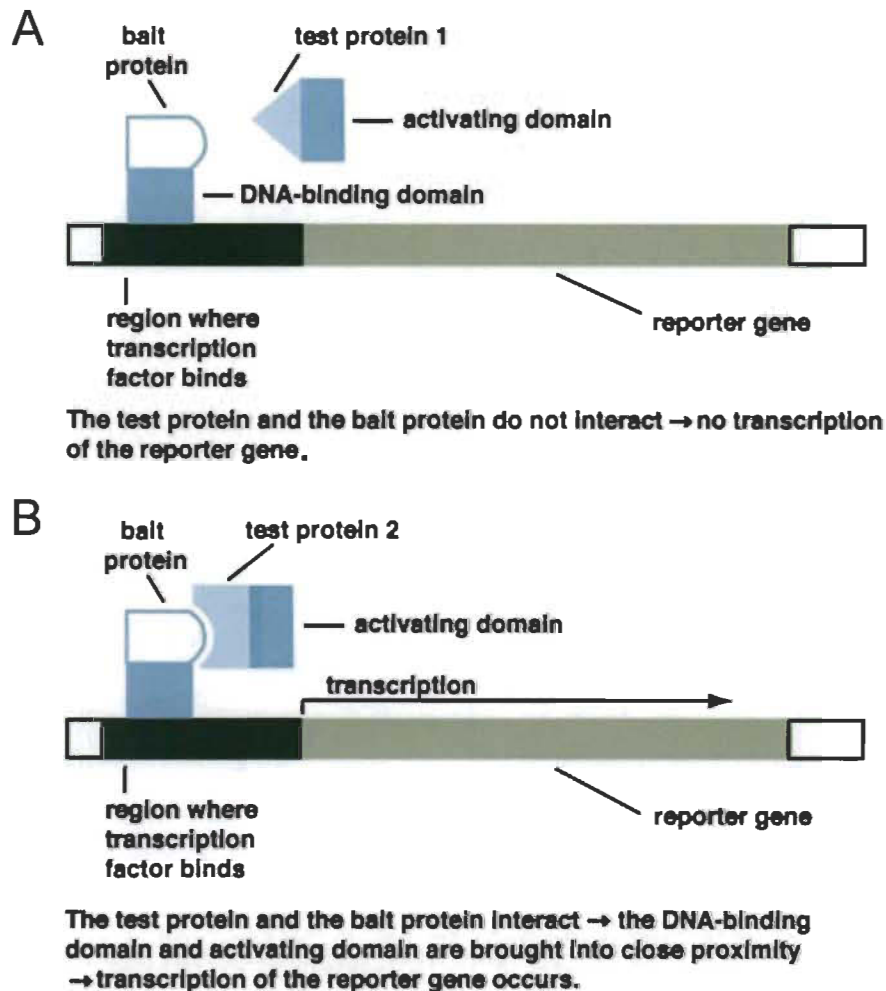


Figure 5.9 Schéma du système du double hybride (Yeast two-hybrid system). A. Si les deux protéines modifiées ne peuvent interagir ensemble, il n'y a aucune transcription du gène rapporteur. B. Les deux protéines modifiées avec les domaines requis doivent être exprimées et interagir ensemble afin de permettre la transcription du gène rapporteur et de confirmer l'interaction entre celles-ci. (Tirée de Hiller-Sturmhofel *et al.* 2008.)

L'utilisation de la technique du «phage display» serait une alternative à celle du double hybride pour découvrir le récepteur clé de la toxine PS2Aa. Brièvement, le principe du « phage display » est de produire une librairie de bactériophages exprimant des protéines à la surface de leur manteau, lesquelles pourront se lier avec d'autres protéines si interaction il y a. Les protéines cibles à étudiées sont immobilisées et exposées dans une microplaque, lesquelles on ajoute la librairie de phages exprimant

diverses protéines pouvant avoir une potentielle interaction. Seuls les phages ayant eu une interaction avec les protéines cibles seront conservés lors de lavages, lesquels leur ADN sera séquencé afin de connaître les protéines responsables (Figure 5.10) (Sidhu, Fairbrother, and Deshayes 2003). Cette méthode pourrait aussi permettre de trouver le récepteur clé de la toxine PS2Aa1.

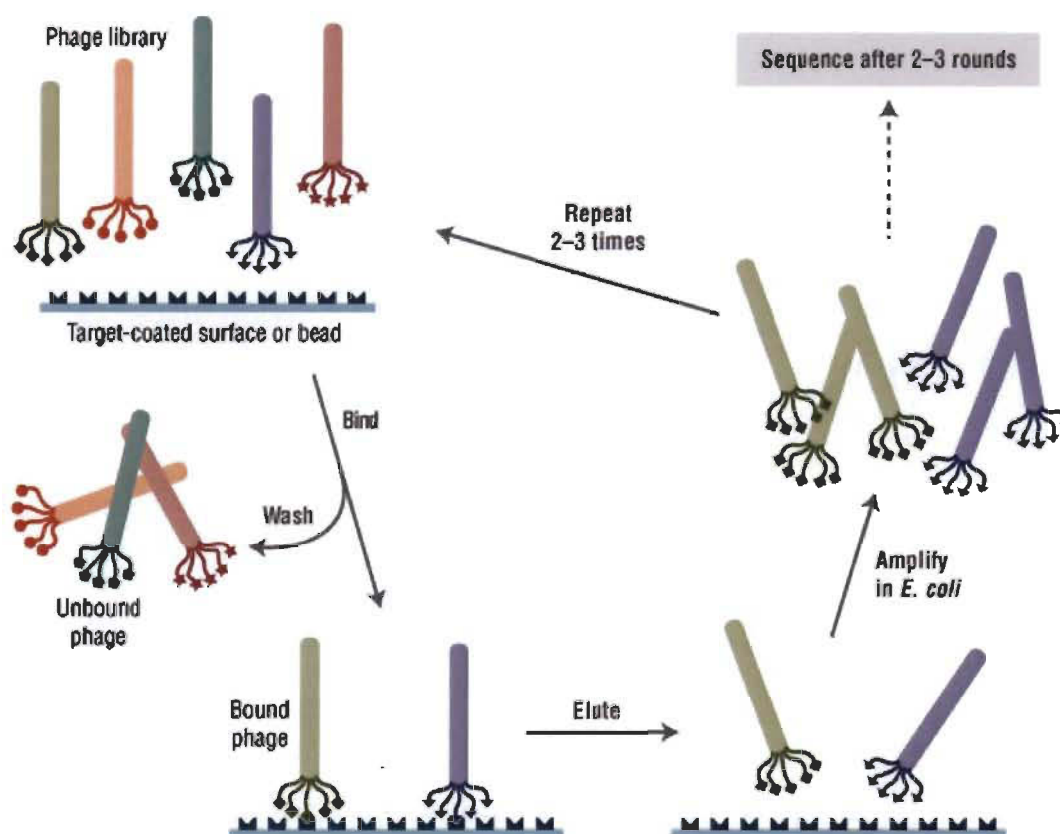


Figure 5.10 Schéma du système « phage display ». (Tirée de la page de New England Biolabs www.neb.com)

Nous avons la chance de savoir qu'il s'agirait d'une protéine située dans le radeau lipidique et que les GPI agissent plutôt comme des co-récepteurs permettant à la toxine d'être pleinement efficace (Abe *et al.* 2016; Kitada *et al.* 2009). Suite à la détermination du récepteur, il serait intéressant d'étudier plus en détail le mécanisme d'action de la toxine PS2Aa1 considérant le peu de recherche effectuée à ce sujet. Une étude large spectre pour comprendre les diverses régulations effectuées par la toxine pourrait être d'un intérêt ici via une technique comme le séquençage ARN (RNA-Seq).

Mieux comprendre son mécanisme d'action pourrait permettre d'utiliser de façon optimale la toxine en combinaison avec d'autres composés cliniques.

La suite logique serait de tester la toxine PS2Aa1 *in vivo* avec des souris possédant des tumeurs de divers cancers, incluant ceux provenant de tissus gynécologiques. Ces expérimentations permettraient de voir si la toxine est toujours aussi efficace, aussi sélective et si des effets secondaires importants, fréquents lors de l'utilisation de bactéries, seraient apparents suite à l'administration du traitement. À notre connaissance, aucune expérience *in vivo* avec la parasporine-2 n'a été effectuée à ce jour. Par la suite, si les résultats obtenus avec la toxine seule sont satisfaisants, des tests *in vivo* de combinaison de traitements tels qu'avec un inhibiteur de la voie PI3K (effet synergique observé dans nos recherches) ou un composé actuellement utilisé en clinique pour la chimiothérapie serait d'un intérêt afin d'être plus efficace, éviter une chimiorésistance et diminuer les doses administrées (Brasseur *et al.* 2015).

Toujours *in vivo*, il serait pertinent de voir si la toxine PS2Aa1 conserve sa sélectivité antitumorale contre des métastases considérant que ces cellules sont dédifférenciées et pourraient perdre l'expression du récepteur spécifique de la toxine.

Suite à ces nombreuses expérimentations précliniques, si les résultats sont toujours aussi concluants, des tests de pharmacocinétique devraient être faits et des études cliniques sur des humains pourraient ensuite être commencées.

5.3.3 Le suppresseur de tumeur cancer-sélectif, Par-4

Malgré la complexité et les multiples mécanismes de Par-4, mieux comprendre ceux-ci sera d'un grand avantage pour la thérapie ciblée en clinique. En effet, il est souvent insuffisant de cibler qu'une seule protéine en raison de l'hétérogénéité des cellules cancéreuses et de leur adaptation aux divers traitements, responsables de l'acquisition d'un statut de chimiorésistance. Puisque Par-4 est associé à plusieurs mécanismes et voies de survie, il est d'un fort intérêt de cibler cette protéine et de

rétablir son expression afin d'affecter ses multiples voies de signalisation et de multiples tumeurs en simultanée, en plus d'induire l'apoptose de façon spécifique des cellules cancéreuses (Irby and Kline 2013).

Dans le cadre de nos recherches, nous nous sommes plutôt concentrés sur le fragment clivé de Par-4. Il sera d'un intérêt de mieux comprendre comment ce simple fragment peut induire l'apoptose considérant que l'effet est existant avec les cellules HeLa (Chaudhry *et al.* 2012) mais négligeable dans nos modèles cellulaires de cancers ovarien et endométrial précédemment utilisés. En premier lieu, il faudrait tester les nouveaux mécanismes découverts de cl.Par-4 (protéasome, estrogène, PI3K et MAPK) et voir si l'inhibition de ceux-ci pourraient sensibiliser les cellules à l'apoptose ou à la chimiothérapie (Brasseur *et al.* 2016). Ensuite, si les résultats obtenus étaient non-satisfaisants, il faudrait tester cl.Par-4 dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses que celles provenant de tissus gynécologiques afin de voir si l'absence d'activité pro-apoptotique est tissu-spécifique. Ensuite, si le résultat obtenu est positif dans un tissu non gynécologique, trouver l'élément tissu-spécifique associé à l'inhibition de l'activité du cl.Par-4 sera la prochaine étape. Si le résultat obtenu est négatif dans les autres types de tissus, il faudra comprendre pourquoi cl.Par-4 était fonctionnel dans les cellules HeLa spécialement. Il faudrait aussi aller étudier plus en détail pourquoi cl.Par-4 n'était pas régulé post-traductionnellement dans la lignée normale de l'endomètre HIESC. Dans tous les cas, une étude large spectre, utilisant, par exemple, le séquençage ARN, sera nécessaire afin de distinguer les différences entre les modèles sensibles et résistants à l'apoptose de cl.Par-4.

Nous avons démontré que le protéasome était impliqué dans la stabilité de cl.Par-4 et avons effectué des analyses de bio-informatique afin de prédire divers sites d'ubiquitination (Brasseur *et al.* 2016). Il serait intéressant de trouver le site responsable de cette régulation. Pour y parvenir, l'utilisation de mutagenèse dirigée sur les sites prédits pourrait permettre de rétablir la stabilité de la protéine sans nécessiter l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome. Si la régulation par le protéasome est indirecte et qu'une autre protéine responsable interagissait avec cl.Par-4, une étude large

spectre, par l'utilisation d'un système double hybride, du « phage display » ou d'une immunoprécipitation de cl.Par-4 suivie d'une analyse par spectrophotométrie de masse, pourrait permettre de découvrir l'acteur responsable de cette régulation indirecte et d'autres protéines s'attachant au fragment de Par-4.

Enfin, d'autres expérimentations, intéressantes et bénéfiques pour l'étude de Par-4 et de cl.Par-4, seraient de tester leurs effets phénotypiques *in vivo* sur la progression tumorale et la sensibilité aux traitements actuels de chimiothérapie et à ceux présentement en essais cliniques (composés ciblant PI3K, AKT, mTOR, MAPK et la voie de l'estrogène). Des xénogreffes de cellules cancéreuses gynécologiques provenant de clones stables exprimant Par-4/cl.Par-4 via un système d'activation inductible à la doxycycline TET-On seraient des plus intéressantes. Le principe d'un système d'induction TET-On est d'exprimer le gène d'intérêt seulement lorsque de la doxycycline est administrée à la cellule/souris (Figure 5.11).

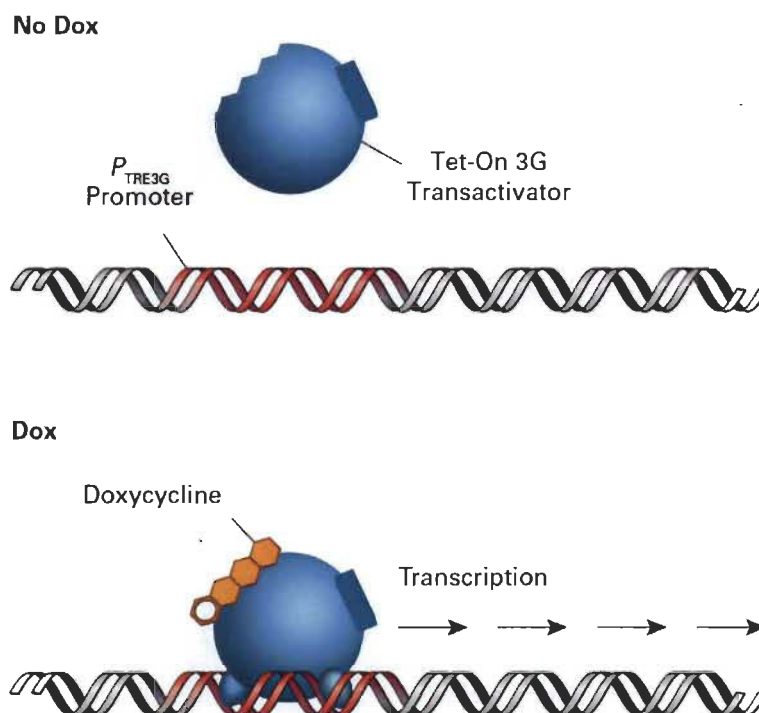


Figure 5.11 Principe d'induction de l'expression d'un gène d'intérêt par le système d'activation Tet-ON. (Tirée de Clontech.)

L'avantage de ce système avec nos protéines d'intérêt Par-4/cl.Par-4 est que si celles-ci induisent l'apoptose ou ralentissent la croissance des cellules, elles n'empêcheront pas la croissance initiale de la tumeur, puisque les protéines ne seront pas exprimées en absence de doxycycline, permettant de commencer les expérimentations dans les mêmes conditions et de mieux comparer leurs effets avec les xénogreffes contrôle.

Tout comme la parasporine, il est critique de bien comprendre le mécanisme de notre protéine d'intérêt afin d'éventuellement pouvoir cibler celle-ci en clinique.

5.4 Conclusion générale

Dans tous nos travaux, l'objectif final et recherché de nos études est de terminer l'étape préclinique afin de pouvoir commencer des études cliniques pour de nouveaux médicaments. Chacun des projets a obtenu des résultats prometteurs. Ils sont présentement à différents stades de la recherche préclinique et permettront sans doute un jour d'améliorer la qualité des traitements administrés contre les cancers gynécologiques. Il est donc d'un grand intérêt pour la communauté scientifique et notre équipe de laboratoire de poursuivre les recherches de ces différents projets abordés dans cette thèse.

Comme il a été précédemment introduit, le nombre de nouveaux cas de cancer est en constante expansion, et ce, principalement en raison du vieillissement de la population (Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics 2015). Il est donc impératif de poursuivre les recherches afin d'améliorer le taux de survie des patients, plus particulièrement ici au niveau des cancers gynécologiques. Avec la constante évolution des technologies modernes, le futur de la thérapie anticancéreuse semble être positif. En effet, l'existence de ces technologies permet, entre autres, d'avoir accès à d'immenses banques de données en ligne, d'avoir la possibilité d'analyser le génome d'un patient en quelques heures seulement ou d'utiliser des algorithmes via des superordinateurs pour analyser des données qui normalement auraient pris plusieurs

années de recherche à un humain pour obtenir. Le partage des informations par l'internet est aussi un des éléments qui permettra l'accélération de découvertes, évitera de répéter les mêmes erreurs et permettra l'avancement des essais cliniques de thérapies ciblées.

En bref, le cancer est une maladie complexe qui nécessite encore de la recherche afin d'être parfaitement comprise. Nos recherches ont démontré que la thérapie ciblée a un fort potentiel clinique, mais requiert encore de l'optimisation afin d'être utilisée efficacement. Tel qu'observé dans les essais cliniques, les monothérapies ciblées ne suffisent pas à surmonter la progression tumorale et la résistance aux différents traitements d'une forte population de tumeurs malgré les réponses parfois positives observées chez certaines patientes. Malgré tout, la thérapie ciblée et le développement des molécules s'améliorent et les progrès de la technologie et de la science permettent aujourd'hui un diagnostic plus précis des cancers. Une meilleure compréhension de la génétique de la tumeur et de ses mécanismes permettra de se diriger vers une ère où chaque patiente sera diagnostiquée et traitée individuellement selon sa génétique et son passé héréditaire. Ces thérapies personnalisées permettront d'augmenter la qualité de vie de patientes atteintes de cancers gynécologiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A Boere, Ingrid, and Maria EL van der Burg. 2012. 'Review of dose-intense platinum and/or paclitaxel containing chemotherapy in advanced and recurrent epithelial ovarian cancer', *Current pharmaceutical design*, 18: 3741-53.
- Abe, Yuich, Hiroshi Inoue, Hisashi Ashida, Yusuke Maeda, Taroh Kinoshita, and Sakae Kitada. 2016. 'Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytotoxic oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547', *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Abe, Yuichi, Hiroyasu Shimada, and Sakae Kitada. 2008. 'Raft-targeting and oligomerization of Parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumour activity', *Journal of biochemistry*, 143: 269-75.
- Abedin, M. J., D. Wang, M. A. McDonnell, U. Lehmann, and A. Kelekar. 2006. 'Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage', *Cell Death Differ*, 14: 500-10.
- Abedini, Mohammad R, Emilie J Muller, Jan Brun, Richard Bergeron, Douglas A Gray, and Benjamin K Tsang. 2008. 'Cisplatin induces p53-dependent FLICE-like inhibitory protein ubiquitination in ovarian cancer cells', *Cancer Research*, 68: 4511-17.
- Abedini, MR, EJ Muller, R Bergeron, DA Gray, and BK Tsang. 2010. 'Akt promotes chemoresistance in human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of FLICE-like inhibitory protein', *Oncogene*, 29: 11-25.
- Adams, Brian D, Henry Furneaux, and Bruce A White. 2007. 'The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor- α (ER α) and represses ER α messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines', *Molecular endocrinology*, 21: 1132-47.
- Agarwal, Roshan, and Stan B Kaye. 2003. 'Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 3: 502-16.
- Ahmed, Mansoor M, David Sheldon, Mushtaq A Fruitwala, Kolaparthi Venkatasubbarao, Eun Y Lee, Seema Gupta, Craig Wood, Mohammed Mohiuddin, and William E Strodel. 2008. 'Downregulation of PAR-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras mutation', *International Journal of Cancer*, 122: 63-70.

- Al-Ramadi, Basel K, Maria J Fernandez-Cabezudo, Hussain El-Hasasna, Suhail Al-Salam, Samir Attoub, Damo Xu, and Salem Chouaib. 2008. 'Attenuated bacteria as effectors in cancer immunotherapy', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1138: 351-57.
- Ali, Ahmed Y., Lee Farrand, Ji Young Kim, Sanguine Byun, Jeong-Yong Suh, Hyong Joo Lee, and Benjamin K. Tsang. 2012. 'Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1271: 58-67.
- Alvarez, Edwin A, William E Brady, Joan L Walker, Jacob Rotmensch, Xun C Zhou, James E Kendrick, S Diane Yamada, Jeanne M Schilder, David E Cohn, and Charles R Harrison. 2013. 'Phase II trial of combination bevacizumab and temsirolimus in the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study', *Gynecologic Oncology*, 129: 22-27.
- Alvarez, James V, Tien-chi Pan, Jason Ruth, Yi Feng, Alice Zhou, Dhruv Pant, Joshua S Grimley, Thomas J Wandless, Angela DeMichele, and Lewis A Chodosh. 2013. 'Par-4 downregulation promotes breast cancer recurrence by preventing multinucleation following targeted therapy', *Cancer Cell*, 24: 30-44.
- American Cancer Society. 2015. "Cancer Facts & Figures 2015." In: Atlanta: American Cancer Society.
- . 2016a. 'Endometrial (Uterine) cancer detailed guide (2016)'. <http://www.cancer.org/cancer/endometrialcancer/detailedguide/>
- . 2016b. 'Ovarian cancer detailed guide (2016)'. <http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer/detailedguide/>
- . 2016c. 'What is cancer?'. <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>
- Anglesio, Michael S, Kimberly C Wiegand, Nataliya Melnyk, Christine Chow, Clara Salamanca, Leah M Prentice, Janine Senz, Winnie Yang, Monique A Spillman, and Dawn R Cochrane. 2013. 'Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research', *PLoS One*, 8: e72162.
- Argenta, Peter A, Sajeena G Thomas, Patricia L Judson, Levi S Downs, Melissa A Geller, Linda F Carson, Amy L Jonson, and Rahel Ghebre. 2009. 'A phase II study of fulvestrant in the treatment of multiply-recurrent epithelial ovarian cancer', *Gynecologic Oncology*, 113: 205-09.

- Argenta, Peter A, Inhwa Um, Charlene Kay, David Harrison, Dana Faratian, Thanasak Sueblinvong, Melissa A Geller, and Simon P Langdon. 2013. 'Predicting response to the anti-estrogen fulvestrant in recurrent ovarian cancer', *Gynecologic Oncology*, 131: 368-73.
- Asselin, Eric, Gordon B. Mills, and Benjamin K. Tsang. 2001. 'XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-dependent Cleavage during Cisplatin-induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells', *Cancer Research*, 61: 1862-68.
- Asselin, Eric, Yifang Wang, and Benjamin K Tsang. 2001. 'X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Rat Granulosa Cells during Follicular Development 1', *Endocrinology*, 142: 2451-57.
- Astanehe, Arezoo, David Arenillas, Wyeth W Wasserman, Peter CK Leung, Sandra E Dunn, Barry R Davies, Gordon B Mills, and Nelly Auersperg. 2008. 'Mechanisms underlying p53 regulation of PIK3CA transcription in ovarian surface epithelium and in ovarian cancer', *Journal of cell science*, 121: 664-74.
- Auersperg, Nelly. 2011. 'The origin of ovarian carcinomas: a unifying hypothesis', *International Journal of Gynecological Pathology*, 30: 12-21.
- Avogadri, Francesca, Chiara Martinoli, Liljana Petrovska, Claudia Chiodoni, Pietro Transidico, Vincenzo Bronte, Renato Longhi, Mario P Colombo, Gordon Dougan, and Maria Rescigno. 2005. 'Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells', *Cancer Research*, 65: 3920-27.
- Azmi, Asfar S., Philip A. Philip, Syed F. Zafar, Fazlul H. Sarkar, and Ramzi M. Mohammad. 2010. 'PAR-4 as a Possible New Target for Pancreatic Cancer Therapy', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14: 611-20.
- Balkwill, Frances R, Melania Capasso, and Thorsten Hagemann. 2012. 'The tumor microenvironment at a glance', *Journal of cell science*, 125: 5591-96.
- Banerji, Udai, Malcolm Ranson, Jan HM Schellens, Taito Esaki, Emma Dean, Andrea Zivi, Ruud Van der Noll, Paul K Stockman, Marcelo Marotti, and Michelle D Garrett. 2013. 'Abstract LB-66: Results of two phase I multicenter trials of AZD5363, an inhibitor of AKT1, 2 and 3: Biomarker and early clinical evaluation in Western and Japanese patients with advanced solid tumors', *Cancer Research*, 73: LB-66-LB-66.
- Bao, Ling-Jie, Melba C Jaramillo, Zhen-Bo Zhang, Yun-Xi Zheng, Ming Yao, Donna D Zhang, and Xiao-Fang Yi. 2014. 'Nrf2 induces cisplatin resistance through activation of autophagy in ovarian carcinoma', *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 1502-13.

- Bao, Lingjie, Melba C Jaramillo, Zhenbo Zhang, Yunxi Zheng, Ming Yao, Donna D Zhang, and Xiaofang Yi. 2015. 'Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells', *Molecular medicine reports*, 11: 91-98.
- Barkett, Margaret, and Thomas D Gilmore. 1999. 'Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors', *Oncogene*, 18.
- Bast, Robert C, Bryan Hennessey, and Gordon B Mills. 2009. 'The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation', *Nature Reviews Cancer*, 9: 415-28.
- Baudelet, Christine, Greg O Cron, Chantal Dessy, Philippe Martinive, Julie De Wever, Julien Verrax, Nelson Beghein, Vincent Gr, Pedro Buc Calderon, and Olivier Feron. 2006. 'Botulinum toxin potentiates cancer radiotherapy and chemotherapy', *Clinical Cancer Research*, 12: 1276-83.
- Bedard, Philippe L, Josep Tabernero, Filip Janku, Zev A Wainberg, Luis Paz-Ares, Johan Vansteenkiste, Eric Van Cutsem, José Pérez-García, Anastasios Stathis, and Carolyn D Britten. 2015. 'A phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors', *Clinical Cancer Research*, 21: 730-38.
- Behbakht, Kian, Michael W Sill, Kathleen M Darcy, Stephen C Rubin, Robert S Mannel, Steven Waggoner, Russell J Schilder, Kathy Q Cai, Andrew K Godwin, and R Katherine Alpaugh. 2011. 'Phase II trial of the mTOR inhibitor, temsirolimus and evaluation of circulating tumor cells and tumor biomarkers in persistent and recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies: a Gynecologic Oncology Group study', *Gynecologic Oncology*, 123: 19-26.
- Bender, David, Thomas Buekers, and Kimberly Leslie. 2011. 'Hormones and receptors in endometrial cancer', *Proceedings in Obstetrics and Gynecology*, 2: 1-25.
- Bergmann, Marion, Natasa Kukoc-Zivojnov, Kai U Chow, Bettina Trepohl, Dieter Hoelzer, Eckhart Weidmann, Paris S Mitrou, and Simone Boehrer. 2004. 'Prostate apoptosis response gene-4 sensitizes neoplastic lymphocytes to CD95-induced apoptosis', *Ann Hematol*, 83: 646-53.
- Bjornstrom, Linda, and Maria Sjoberg. 2005. 'Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes', *Molecular endocrinology*, 19: 833-42.

- Boehrer, Simone, Kai U Chow, Florian Beske, Natasa Kukoc-Zivojnov, Elena Puccetti, Martin Ruthardt, Christine Baum, Vivek M Rangnekar, Dieter Hoelzer, and Paris S Mitrou. 2002. 'In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation', *Cancer Research*, 62: 1768-75.
- Boghaert, ER, SF Sells, AJ Walid, P Malone, NM Williams, MH Weinstein, R Strange, and VM Rangnekar. 1997. 'Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues', *Cell Growth Differ*, 8: 881-90.
- Bowman, Angela, Hani Gabra, Simon P Langdon, Alastair Lessells, Moira Stewart, Ann Young, and John F Smyth. 2002. 'CA125 Response Is Associated with Estrogen Receptor Expression in a Phase II Trial of Letrozole in Ovarian Cancer Identification of an Endocrine-sensitive Subgroup', *Clinical Cancer Research*, 8: 2233-39.
- Brasseur, K, N Gévry, and E Asselin. 2016. 'Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers', *Oncotarget*.
- Brasseur, K. , V. Leblanc, F. Fabi, S. Parent, C. Descôteaux, G. Bérubé, and Eric. Asselin. 2013. 'ER α -Targeted Therapy in Ovarian Cancer Cells by a Novel Estradiol-Platinum(II) Hybrid', *Endocrinology*, 154: 2281-95.
- Brasseur, Kevin, Pascal Auger, Eric Asselin, Sophie Parent, Jean-Charles Côté, and Marc Sirois. 2015. 'Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells', *PLoS One*, 10: e0135106.
- Brasseur, Kevin, François Fabi, Pascal Adam, Sophie Parent, Laurent Lessard, and Eric Asselin. 2016. *Post-translational regulation of the cleaved fragment of Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells*.
- Bravo, Alejandra, Sarjeet S Gill, and Mario Soberón. 2007. 'Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control', *Toxicon*, 49: 423-35.
- Brose, Marcia S., Timothy R. Rebbeck, Kathleen A. Calzone, Jill E. Stopfer, Katherine L. Nathanson, and Barbara L. Weber. 2002. 'Cancer Risk Estimates for BRCA1 Mutation Carriers Identified in a Risk Evaluation Program', *Journal of the National Cancer Institute*, 94: 1365-72.
- Brown, J Martin, and William R Wilson. 2004. 'Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment', *Nature Reviews Cancer*, 4: 437-47.

- Burikhanov, Ravshan, Zhao Yanming, Anindya Goswami, Shirley Qiu, Steven R. Schwarze, and Vivek M. Rangnekar. 2009. *The Tumor Suppressor Par-4 Activates an Extrinsic Pathway for Apoptosis* (Cell Press: Cambridge, MA, États-Unis).
- Burke, Thomas W, and Cheryl L Walker. 2003. 'Arzoxifene as therapy for endometrial cancer', *Gynecologic Oncology*, 90: S40-S46.
- Burrell, Rebecca A, Nicholas McGranahan, Jiri Bartek, and Charles Swanton. 2013. 'The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution', *Nature*, 501: 338-45.
- Burris, HA, LL Siu, JR Infante, JJ Wheler, C Kurkjian, J Opalinska, DA Smith, JM Antal, JL Gauvin, and T Gonzalez. 2011. "Safety, pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and clinical activity of the oral AKT inhibitor GSK2141795 (GSK795) in a phase I first-in-human study." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 3003.
- Cagnol, Sebastien, and Jean-Claude Chambard. 2010. 'ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence', *FEBS Journal*, 277: 2-21.
- Campbell, Ian G, Sarah E Russell, David YH Choong, Karen G Montgomery, Marianne L Ciavarella, Christine SF Hooi, Briony E Cristiano, Richard B Pearson, and Wayne A Phillips. 2004. 'Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer', *Cancer Research*, 64: 7678-81.
- Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics. 2015. "Canadian Cancer Statistics 2015." In.: Canadian Cancer Society, Toronto, ON.
- Cann, SA Hoption, JP Van Netten, and C Van Netten. 2003. 'Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future', *Postgraduate medical journal*, 79: 672-80.
- Carey, RW, JF Holland, HY Whang, E Neter, and B Bryant. 1967. 'Clostridial oncolysis in man', *European Journal of Cancer (1965)*, 3: 37-46.
- Casciato, Dennis Albert, and Mary C Territo. 2009. *Manual of clinical oncology* (Lippincott Williams & Wilkins).
- Casolari, D. A., M. C. Pereira, S. A. de Bessa Garcia, and M. A. Nagai. 2011. 'Insulin-like growth factor-1 and 17beta-estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells', *Int J Mol Med*, 28: 337-42.

- Cerami, Ethan, Jianjiong Gao, Ugur Dogrusoz, Benjamin E. Gross, Selcuk Onur Sumer, Bülent Arman Aksoy, Anders Jacobsen, Caitlin J. Byrne, Michael L. Heuer, Erik Larsson, Yevgeniy Antipin, Boris Reva, Arthur P. Goldberg, Chris Sander, and Nikolaus Schultz. 2012. 'The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data', *Cancer Discovery*, 2: 401-04.
- Chakraborty, Mala, Shirley Guofang Qiu, Krishna Murthi Vasudevan, and Vivek M. Rangnekar. 2001. 'Par-4 Drives Trafficking and Activation of Fas and FasL to Induce Prostate Cancer Cell Apoptosis and Tumor Regression', *Cancer Research*, 61: 7255-63.
- Chan, David W, Vincent WS Liu, George SW Tsao, Kwok-Ming Yao, Toru Furukawa, Karen KL Chan, and Hextan YS Ngan. 2008. 'Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells', *Carcinogenesis*, 29: 1742-50.
- Chang, In-Youb, Mi-Hwa Kim, Hong Beum Kim, Soo-Hyun Kim, Han-Yong Kim, and Ho Jin You. 2005. 'Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327: 225-33.
- Chang, Suhwan, Jung Hoe Kim, and Jaekyoon Shin. 2002. 'p62 forms a ternary complex with PKC ζ and PAR-4 and antagonizes PAR-4-induced PKC ζ inhibition', *FEBS Letters*, 510: 57-61.
- Charpentier, Emmanuelle, and Jennifer A Doudna. 2013. 'Biotechnology: Rewriting a genome', *Nature*, 495: 50-51.
- Chaudhry, P., and E. Asselin. 2009. 'Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer', *Endocr Relat Cancer*, 16: 363-80.
- Chaudhry, P., F. Fabi, M. Singh, S. Parent, V. Leblanc, and E. Asselin. 2014. 'Prostate apoptosis response-4 mediates TGF-[beta]-induced epithelial-to-mesenchymal transition', *Cell Death Dis*, 5: e1044.
- Chaudhry, Parvesh, Mohan Singh, Sophie Parent, and Eric Asselin. 2012. 'Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation', *Molecular and Cellular Biology*, 32: 826-39.
- Chen, Shao-Hua, and Getu Zhaori. 2011. 'Potential clinical applications of siRNA technique: benefits and limitations', *European journal of clinical investigation*, 41: 221-32.

- Chen, X., A. A. Sahasrabudhe, P. Szankasi, F. Chung, V. Basrur, V. M. Rangnekar, M. Pagano, M. S. Lim, and K. S. J. Elenitoba-Johnson. 2014. 'Fbxo45-mediated degradation of the tumor-suppressor Par-4 regulates cancer cell survival', *Cell Death Differ*, 21: 1535-45.
- Chendil, Damodaran, Anindita Das, Swatee Dey, Mohammed Mohiuddin, and Mansoor M Ahmed. 2002. 'Par-4, a pro-apoptotic gene, inhibits radiation-induced NF κ B activity and Bcl-2 expression leading to induction of radiosensitivity in human prostate cancer cells PC-3', *Cancer Biol Ther*, 1: 152-60.
- Cheng, Jin Q, Xiuxian Jiang, Michael Fraser, Ming Li, Han C Dan, Mei Sun, and Benjamin K Tsang. 2002. 'Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway', *Drug Resistance Updates*, 5: 131-46.
- Cheung, Lydia WT, Bryan T Hennessy, Jie Li, Shuangxing Yu, Andrea P Myers, Bojana Djordjevic, Yiling Lu, Katherine Stemke-Hale, Mary D Dyer, and Fan Zhang. 2011. 'High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability', *Cancer Discovery*, 1: 170-85.
- Chirino, Y. I., and J. Pedraza-Chaverri. 2009. 'Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity', *Exp Toxicol Pathol*, 61: 223-42.
- Chlebowski, Rowan T. 2014. 'Strategies to overcome endocrine therapy resistance in hormone receptor-positive advanced breast cancer', *Clinical Investigation*, 4: 19-33.
- Chon, Hye S, Wei Hu, and John J Kavanagh. 2006. 'Targeted therapies in gynecologic cancers', *Current cancer drug targets*, 6: 333-63.
- Clairmont, C, KC Lee, J Pike, M Ittensohn, KB Low, J Pawelek, D Bermudes, SM Brecher, D Margitich, and J Turnier. 2000. 'Biodistribution and Genetic Stability of the Novel Antitumor Agent VNP20009, a Genetically Modified Strain of *Salmonella typhimurium*', *Journal of Infectious Diseases*, 181: 1996-2002.
- Clancy, S. 2008. 'DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity', *Nature Education*, 1: 103.
- Codogno, Patrice, and AJ Meijer. 2005. 'Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death', *Cell Death & Differentiation*, 12: 1509-18.
- Colditz, Graham A. 1993. 'Epidemiology of breast cancer: Findings from the nurses' health study', *Cancer*, 71: 1480-89.

- Covens, Allan L, Virginia Filiaci, Deborah Gersell, Christopher V Lutman, Albert Bonebrake, and Yi-Chun Lee. 2011. 'Phase II study of fulvestrant in recurrent/metastatic endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study', *Gynecologic Oncology*, 120: 185-88.
- Cowan, Kyra J, and Kenneth B Storey. 2003. 'Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress', *Journal of Experimental Biology*, 206: 1107-15.
- Crickmore, Neil, DR Zeigler, J Feitelson, ESCHERICHIA Schnepf, J Van Rie, Dean Lereclus, J Baum, and DH Dean. 1998. 'Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins', *Microbiology and molecular biology reviews*, 62: 807-13.
- Cui, Jie, Yong Shen, and Rena Li. 2013. 'Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain', *Trends in molecular medicine*, 19: 197-209.
- Cunat, Séverine, Pascale Hoffmann, and Pascal Pujol. 2004. 'Estrogens and epithelial ovarian cancer', *Gynecologic Oncology*, 94: 25-32.
- Dabholkar, Meenakshi, Justine Vionnet, Frieda Bostick-Bruton, Jing Jie Yu, and Eddie Reed. 1994. 'Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy', *Journal of Clinical Investigation*, 94: 703.
- Dan, Han C., Mei Sun, Satoshi Kaneko, Richard I. Feldman, Santo V. Nicosia, Hong-Gang Wang, Benjamin K. Tsang, and Jin Q. Cheng. 2004. 'Akt Phosphorylation and Stabilization of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP)', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 5405-12.
- Daugas, Eric, Dominique Nochy, Luigi Ravagnan, Markus Loeffler, Santos A. Susin, Naoufal Zamzami, and Guido Kroemer. 2000. 'Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis', *FEBS Letters*, 476: 118-23.
- Dauvois, S., R. White, and M. G. Parker. 1993. 'The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling', *J Cell Sci*, 106 (Pt 4): 1377-88.
- Davies, Barry R., Hannah Greenwood, Phillippa Dudley, Claire Crafter, De-Hua Yu, Jingchuan Zhang, Jing Li, Beirong Gao, Qunsheng Ji, Juliana Maynard, Sally-Ann Ricketts, Darren Cross, Sabina Cosulich, Christine C. Chresta, Ken Page, James Yates, Clare Lane, Rebecca Watson, Richard Luke, Donald Ogilvie, and Martin Pass. 2012. 'Preclinical Pharmacology of AZD5363, an Inhibitor of AKT: Pharmacodynamics, Antitumor Activity, and Correlation of Monotherapy Activity with Genetic Background', *Molecular Cancer Therapeutics*, 11: 873-87.

- Del Carmen, Marcela G, Arlan F Fuller, Ursula Matulonis, Nora K Horick, Annekathryn Goodman, Linda R Duska, Richard Penson, Susana Campos, Maria Roche, and Michael V Seiden. 2003. 'Phase II trial of anastrozole in women with asymptomatic müllerian cancer', *Gynecologic Oncology*, 91: 596-602.
- Descoteaux, C., V. Leblanc, G. Belanger, S. Parent, E. Asselin, and G. Berube. 2008. 'Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum(II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta', *Steroids*, 73: 1077-89.
- Diel, Patrick. 2002. 'Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms', *Toxicol Lett*, 127: 217-24.
- Doudna, Jennifer A, and Emmanuelle Charpentier. 2014. 'The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', *Science*, 346: 1258096.
- Einstein, Mark H, Robert M Wenham, Robert Morgan, Mihaela C Cristea, Elizabeth Laureen Strevel, Amit M Oza, Andreas Kaubisch, Briant Fruth, Rui Qin, and Charles Erlichman. 2012. "Phase II trial of temsirolimus and bevacizumab for initial recurrence of endometrial cancer." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 5025.
- El-Guendy, Nadia, Yanming Zhao, Sushma Gurumurthy, Ravshan Burikhanov, and Vivek M. Rangnekar. 2003. 'Identification of a Unique Core Domain of Par-4 Sufficient for Selective Apoptosis Induction in Cancer Cells', *Molecular and Cellular Biology*, 23: 5516-25.
- Elmore, Susan. 2007. 'Apoptosis: a review of programmed cell death', *Toxicologic pathology*, 35: 495-516.
- Emons, Günter, and Andrew V Schally. 1994. 'The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers', *Human Reproduction*, 9: 1364-79.
- Engel, Jörg B, Arnd Honig, Tanja Schönhals, Claudia Weidler, Sebastian Häusler, Mathias Krockenberger, Thomas G Grunewald, Yvonne Dombrowski, Lorenz Rieger, and Johannes Dietl. 2008. 'Perifosine inhibits growth of human experimental endometrial cancers by blockade of AKT phosphorylation', *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 141: 64-69.

- Engel, Jörg B, Tanja Schönhals, Sebastian Häusler, Mathias Krockenberger, Melanie Schmidt, Evi Horn, Frank Köster, Johannes Dietl, Jörg Wischhusen, and Arnd Honig. 2011. 'Induction of programmed cell death by inhibition of AKT with the alkylphosphocholine perifosine in in vitro models of platinum sensitive and resistant ovarian cancers', *Archives of gynecology and obstetrics*, 283: 603-10.
- Fabi, François, and Eric Asselin. 2014. 'Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus', *Reproduction*, 148: R85-R95.
- Fabian, CJ. 2007. 'The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer', *International journal of clinical practice*, 61: 2051-63.
- Fan, Dominic, Seiji Yano, Hisashi Shinohara, Carmen Solorzano, Melissa Van Arsdall, Corazon D Bucana, Sen Pathak, Ewa Kruzel, Roy S Herbst, and Amir Onn. 2002. 'Targeted Therapy against Human Lung Cancer in Nude Mice by High-Affinity Recombinant Antimesothelin Single-Chain Fv Immunotoxin 1 Supported in part by Cancer Center Support Core Grant CA16672 and Grant R35-CA42107 from the National Cancer Institute, NIH. 1', *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 595-600.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray. 2013. 'Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012', *European Journal of Cancer*, 49: 1374-403.
- Fernandez-Marcos, Pablo J, Shadi Abu-Baker, Jayashree Joshi, Anita Galvez, Elias A Castilla, Marta Cañamero, Manuel Collado, Carmen Saez, Gema Moreno-Bueno, and Jose Palacios. 2009. 'Simultaneous inactivation of Par-4 and PTEN in vivo leads to synergistic NF- κ B activation and invasive prostate carcinoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 12962-67.
- Ferry, Katherine V., Thomas C. Hamilton, and Steven W. Johnson. 2000. 'Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ercc1-xpf', *Biochemical Pharmacology*, 60: 1305-13.
- Fisher, Bernard, Joseph P Costantino, Carol K Redmond, Edwin R Fisher, D Lawrence Wickerham, and Walter M Cronin. 1994. 'Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14', *Journal of the National Cancer Institute*, 86: 527-37.

- Fleming, Gini F, Virginia L Filiaci, Brandon Marzullo, Richard J Zaino, Susan A Davidson, Michael Pearl, Vicky Makker, James J Burke, Susan L Zweizig, and Linda Van Le. 2014. 'Temsitrolimus with or without megestrol acetate and tamoxifen for endometrial cancer: a gynecologic oncology group study', *Gynecologic Oncology*, 132: 585-92.
- Foley, Olivia W, and Marcela G Del Carmen. 2013. 'Recurrent epithelial ovarian cancer: an update on treatment', *Oncology*, 27: 288.
- Fowler, Amy M, and Elaine T Alarid. 2007. 'Amping up estrogen receptors in breast cancer', *Breast Cancer Research*, 9: 1.
- Frankel, Arthur E, Patrick Rossi, Timothy M Kuzel, and Francine Foss. 2002. 'Diphtheria fusion protein therapy of chemoresistant malignancies', *Current cancer drug targets*, 2: 19-36.
- Fraser, Michael, Tao Bai, and Benjamin K Tsang. 2008. 'Akt promotes cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through inhibition of p53 phosphorylation and nuclear function', *International Journal of Cancer*, 122: 534-46.
- Fraser, Michael, Brendan M. Leung, Xiaojuan Yan, Han C. Dan, Jin Q. Cheng, and Benjamin K. Tsang. 2003. 'p53 Is a Determinant of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein/Akt-Mediated Chemoresistance in Human Ovarian Cancer Cells', *Cancer Research*, 63: 7081-88.
- Fu, Siqing, Bryan T Hennessy, Chaaan S Ng, Zhenlin Ju, Kevin R Coombes, Judith K Wolf, Anil K Sood, Charles F Levenback, Robert L Coleman, and John J Kavanagh. 2012. 'Perifosine plus docetaxel in patients with platinum and taxane resistant or refractory high-grade epithelial ovarian cancer', *Gynecologic Oncology*, 126: 47-53.
- Gagnon, V., I. Mathieu, E. Sexton, K. Leblanc, and E. Asselin. 2004. 'AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells', *Gynecol Oncol*, 94: 785-95.
- Gagnon, V., C. Van Themsche, S. Turner, V. Leblanc, and E. Asselin. 2008. 'Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol', *Apoptosis*, 13: 259-71.
- García-Cao, Isabel, Angeles Duran, Manuel Collado, Maria J. Carrascosa, Juan Martín-Caballero, Juana M. Flores, Maria T. Diaz-Meco, Jorge Moscat, and Manuel Serrano. 2005. 'Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4', *EMBO Reports*, 6: 577-83.

- Garrett, Andrea, and Michael A. Quinn. 2008. 'Hormonal therapies and gynaecological cancers', *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 22: 407-21.
- Gentile, Francesco, Jack A Tuszynski, and Khaled H Barakat. 2016. 'New design of nucleotide excision repair (NER) inhibitors for combination cancer therapy', *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 65: 71-82.
- Girouard, Julie, Marie-Judith Lafleur, Sophie Parent, Valérie Leblanc, and Eric Asselin. 2013. 'Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells', *Gynecologic Oncology*, 128: 335-43.
- Gonzalez-Angulo, Ana M, Dejan Juric, Guillem Argiles, Jan HM Schellens, Howard A Burris, Jordan Berlin, Mark R Middleton, Martin H Schuler, Robin Van Geel, and Thorunn Helgason. 2013. "Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the α -specific PI3K inhibitor BYL719: Results from the first-in-human study." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 2531.
- Goodsell, David S. 1999. 'The molecular perspective: the ras oncogene', *The Oncologist*, 4: 263-64.
- Goswami, Anindya, Ravshan Burikhanov, Aurelie de Thonel, Naoya Fujita, Mamta Goswami, Yanming Zhao, John E. Eriksson, Takashi Tsuruo, and Vivek M. Rangnekar. 2005. 'Binding and Phosphorylation of Par-4 by Akt Is Essential for Cancer Cell Survival', *Molecular cell*, 20: 33-44.
- Goswami, Anindya, Shirley Qiu, Thomas S Dexheimer, Padhma Ranganathan, Ravshan Burikhanov, Yves Pommier, and Vivek M Rangnekar. 2008. 'Par-4 binds to topoisomerase 1 and attenuates its DNA relaxation activity', *Cancer Research*, 68: 6190-98.
- Gungor, H, A Saleem, R Agarwal, SP Blagden, A Michael, EA Stronach, M Chen, E Pickford, NR Rama, and YL Lewis. 2011. "Pharmacokinetic (PK)/pharmacodynamic (PD) analysis of escalating repeat doses of the AKT inhibitor GSK2141795 (GSK795) in patients (pts) with ovarian cancer." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 5064.
- Guo, Xian-ling, Ding Li, Fei Hu, Jian-rui Song, Shan-shan Zhang, Wei-jie Deng, Kai Sun, Qiu-dong Zhao, Xu-qin Xie, Yu-jiao Song, Meng-chao Wu, and Li-xin Wei. 2012. 'Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells', *Cancer Letters*, 320: 171-79.
- Gurumurthy, Sushma, Anindya Goswami, Krishna Murthi Vasudevan, and Vivek M. Rangnekar. 2005. 'Phosphorylation of Par-4 by Protein Kinase A Is Critical for Apoptosis', *Molecular and Cellular Biology*, 25: 1146-61.

- Gysin, Stephan, Megan Salt, Amy Young, and Frank McCormick. 2011. 'Therapeutic strategies for targeting ras proteins', *Genes & cancer*, 2: 359-72.
- Hahne, JC, A Honig, SR Meyer, S Gambaryan, U Walter, J Wischhusen, SFM Häussler, SE Segerer, N Fujita, and J Dietl. 2012. 'Downregulation of AKT reverses platinum resistance of human ovarian cancers in vitro', *Oncol Rep*, 28: 2023-28.
- Haldosén, Lars-Arne, Chunyan Zhao, and Karin Dahlman-Wright. 2014. 'Estrogen receptor beta in breast cancer', *Molecular and cellular endocrinology*, 382: 665-72.
- Hanahan, Douglas, and Robert A Weinberg. 2000. 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100: 57-70.
- . 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Hayashi, S-I, H Eguchi, K Tanimoto, T Yoshida, Y Omoto, A Inoue, N Yoshida, and Y Yamaguchi. 2003. 'The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application', *Endocrine-Related Cancer*, 10: 193-202.
- Hayashi, Shin-ichi, Kazue Imai, Kenji Suga, Terumasa Kurihara, Yasuhiro Higashi, and Kei Nakachi. 1997. 'Two promoters in expression of estrogen receptor messenger RNA in human breast cancer', *Carcinogenesis*, 18: 459-64.
- Heath, Mackley, and Irby Rosalyn Bryson. 2011. 'Par-4 sensitizes human colon cancer cells to chemoradiotherapy', *Journal of Cancer Therapy*, 2011.
- Herr, Harry W, and Alvaro Morales. 2008. 'History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story', *The Journal of urology*, 179: 53-56.
- Hiller-Sturmböfel, Susanne, Josip Sobin, and R Dayne Mayfield. 2008. 'Proteomic approaches for studying alcoholism and alcohol-induced organ damage', *Alcohol Health & Research World*, 31: 36.
- Holst, Frederik, Phillip R Stahl, Christian Ruiz, Olaf Hellwinkel, Zeenath Jehan, Marc Wendland, Annette Lebeau, Luigi Terracciano, Khawla Al-Kuraya, and Fritz Jänicke. 2007. 'Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer', *Nature genetics*, 39: 655-60.

- Honma, Naoko, Rie Horii, Takuji Iwase, Shigehira Saji, Mamoun Younes, Kaiyo Takubo, Masaaki Matsuura, Yoshinori Ito, Futoshi Akiyama, and Goi Sakamoto. 2008. 'Clinical importance of estrogen receptor- β evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy', *Journal of Clinical Oncology*, 26: 3727-34.
- Hopp, Torsten A, Heidi L Weiss, Irma S Parra, Yukun Cui, C Kent Osborne, and Suzanne AW Fuqua. 2004. 'Low levels of estrogen receptor β protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer', *Clinical Cancer Research*, 10: 7490-99.
- Howlader, N, AM Noone, M Krapcho, D Miller, K Bishop, SF Altekruse, CL Kosary, M Yu, J Ruhl, Z Tatalovich, A Mariotto, DR Lewis, HS Chen, EJ Feuer, and KA (eds) Cronin. 2016. 'SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013', Accessed April 2016. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013
- Ibrahim, Yasir H, Celina García-García, Violeta Serra, Lei He, Kristine Torres-Lockhart, Aleix Prat, Pilar Anton, Patricia Cozar, Marta Guzmán, and Judit Grueso. 2012. 'PI3K inhibition impairs BRCA1/2 expression and sensitizes BRCA-proficient triple-negative breast cancer to PARP inhibition', *Cancer Discovery*, 2: 1036-47.
- Irby, Rosalyn B, and Christina LB Kline. 2013. 'Par-4 as a potential target for cancer therapy', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17: 77-87.
- Issa, Rana M, Annette Lebeau, Tobias Grob, Frederik Holst, Holger Moch, Luigi Terracciano, Matthias Choschzick, Guido Sauter, and Ronald Simon. 2009. 'Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer', *Modern Pathology*, 22: 191-96.
- Issa, Rana M., Annette Lebeau, Tobias Grob, Frederik Holst, Holger Moch, Luigi Terracciano, Matthias Choschzick, Guido Sauter, and Ronald Simon. 2008. 'Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer', *Mod Pathol*, 22: 191-96.
- Ito, Akio, Yasuyuki Sasaguri, Sakae Kitada, Yoshitomo Kusaka, Kyoko Kuwano, Kenjiro Masutomi, Eiichi Mizuki, Tetsuyuki Akao, and Michio Ohba. 2004. 'A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 21282-86.
- Iwase, Hirotaka, Zhenhan Zhang, Yoko Omoto, Hiroshi Sugiura, Hiroko Yamashita, Tatsuya Toyama, Hiroji Iwata, and Shunzo Kobayashi. 2003. 'Clinical significance of the expression of estrogen receptors α and β for endocrine therapy of breast cancer', *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 52: 34-38.

- Jagtap, Jayashree C, D Parveen, Reecha D Shah, Aarti Desai, Dipali Bhosale, Ashish Chugh, Deepak Ranade, Swapnil Karnik, Bhushan Khedkar, and Aaishwarya Mathur. 2015. 'Secretory prostate apoptosis response (Par)-4 sensitizes multicellular spheroids (MCS) of glioblastoma multiforme cells to tamoxifen-induced cell death', *FEBS open bio*, 5: 8-19.
- Jagtap, Jayashree C., Parveen Dawood, Reecha D. Shah, Goparaju Chandrika, Kumar Natesh, Anjali Shiras, Amba S. Hegde, Deepak Ranade, and Padma Shastri. 2014. 'Expression and Regulation of Prostate Apoptosis Response-4 (Par-4) in Human Glioma Stem Cells in Drug-Induced Apoptosis', *PLoS One*, 9: e88505.
- Janku, Filip, Jennifer J Wheler, Shannon N Westin, Stacy L Moulder, Aung Naing, Apostolia M Tsimberidou, Siqing Fu, Gerald S Falchook, David S Hong, and Ignacio Garrido-Laguna. 2012. 'PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations', *Journal of Clinical Oncology*, 30: 777-82.
- Jordan, Mary Ann, and Leslie Wilson. 2004. 'Microtubules as a target for anticancer drugs', *Nat Rev Cancer*, 4: 253-65.
- Jordan, VC, and M Morrow. 1994. 'Should clinicians be concerned about the carcinogenic potential of tamoxifen?', *European Journal of Cancer*, 30: 1714-21.
- Joshi, Jayashree, Pablo J. Fernandez-Marcos, Anita Galvez, Ramars Amanchy, Juan F. Linares, Angeles Duran, Peterson Pathrose, Michael Leitges, Marta Cañamero, Manuel Collado, Clara Salas, Manuel Serrano, Jorge Moscat, and Maria T. Diaz-Meco. 2008. 'Par-4 inhibits Akt and suppresses Ras-induced lung tumorigenesis', *The EMBO Journal*, 27: 2181-93.
- Juric, Dejan, Jean-Charles Soria, Sunil Sharma, Udai Banerji, Analia Azaro, Jayesh Desai, Francois Philippe Ringeisen, Audrey Kaag, Rajkumar Radhakrishnan, and Florence Hourcade-Potelleret. 2014. "A phase 1b dose-escalation study of BYL719 plus binimetinib (MEK162) in patients with selected advanced solid tumors." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 9051.
- Juvekar, Ashish, Laura N Burga, Hai Hu, Elaine P Lunsford, Yasir H Ibrahim, Judith Balmaña, Anbazhagan Rajendran, Antonella Papa, Katherine Spencer, and Costas A Lyssiotis. 2012. 'Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer', *Cancer Discovery*, 2: 1048-63.
- Kaufmann, Scott H, and William C Earnshaw. 2000. 'Induction of apoptosis by cancer chemotherapy', *Exp Cell Res*, 256: 42-49.

- Khynriam, D., and S. B. Prasad. 2001. 'Hematotoxicity and blood glutathione levels after cisplatin treatment of tumor-bearing mice', *Cell Biology and Toxicology*, 17: 357-70.
- Kigawa, Junzo. 2013. 'New Strategy for Overcoming Resistance to Chemotherapy of Ovarian Cancer', *Yonago Acta medica*, 56: 43-50.
- Kim, J. Julie, and Eloise Chapman-Davis. 2010. 'Role of Progesterone in Endometrial Cancer', *Semin Reprod Med*, 28: 081-90.
- Kim, R., M. Emi, K. Tanabe, Y. Uchida, and K. Arihiro. 2006. 'The role of apoptotic or nonapoptotic cell death in determining cellular response to anticancer treatment', *European Journal of Surgical Oncology*, 32: 269-77.
- Kim, Su-Hyeong, Yong-Sung Juhnn, and Yong-Sang Song. 2007. 'Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1095: 82-89.
- King, Mary-Claire, Joan H Marks, Jessica B Mandell, and New York Breast Cancer Study Group. 2003. 'Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2', *Science*, 302: 643-46.
- Kitada, S, Y Abe, A Ito, O Kuge, T Akao, E Mizuki, M Ohba, JC Côté, IS Otvos, and JL Schwartz. 2005. "Molecular identification and cytotoxic action of parasporin, a protein group of novel crystal toxins targeting human cancer cells." In *Proceedings of the 6th Pacific Rim Conference on the biotechnology of Bacillus thuringiensis and its environmental impact, Victoria, BC, Canada, 30 October-3 November, 2005.*, 23-27. National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).
- Kitada, Sakae, Yuichi Abe, Toshitaka Maeda, and Hiroyasu Shimada. 2009. 'Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells', *Toxicology*, 264: 80-88.
- Kitada, Sakae, Yuichi Abe, Hiroyasu Shimada, Yoshitomo Kusaka, Yoko Matsuo, Hideki Katayama, Shiro Okumura, Tetsuyuki Akao, Eiichi Mizuki, and Osamu Kuge. 2006. 'Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*', *Journal of Biological Chemistry*, 281: 26350-60.
- Kline, Christina Leah, Sriram S Shanmugavelandy, Mark Kester, and Rosalyn B Irby. 2009. 'Delivery of PAR-4 plasmid in vivo via nanoliposomes sensitizes colon tumor cells subcutaneously implanted into nude mice to 5-FU', *Cancer Biol Ther*, 8: 1831-37.

- Klintman, Marie, Richard Buus, Maggie Chon U Cheang, Amna Sheri, Ian E Smith, and Mitch Dowsett. 2016. 'Changes in Expression of Genes Representing Key Biologic Processes after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer, and Prognostic Implications in Residual Disease', *Clinical Cancer Research*, 22: 2405-16.
- Knudson, Alfred G. 1971. 'Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68: 820-23.
- . 2001. 'Two genetic hits (more or less) to cancer', *Nature Reviews Cancer*, 1: 157-62.
- Kominsky, Scott L, Mustafa Vali, Dorian Korz, Theodore G Gabig, Sigmund A Weitzman, Pedram Argani, and Saraswati Sukumar. 2004. 'Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4', *The American Journal of Pathology*, 164: 1627-33.
- Krasner, CN, RL Debernardo, M Findley, R Penson, U Matulonis, T Atkinson, M Roche, and MV Seiden. 2005. "Phase II trial of anastrozole in combination with gefitinib in women with asymptomatic mullerian cancer." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 5063.
- Krawczyk, Natalia, Franziska Meier-Stiegen, Malgorzata Banyś, Hans Neubauer, Eugen Ruckhaeberle, and Tanja Fehm. 2014. 'Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients', *BioMed research international*, 2014.
- Kreizman-Shefer, Hila, Jana Pricop, Shlomit Goldman, Irit Elmalah, and Eliezer Shalev. 2014. 'Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer', *Diagnostic Pathology*, 9: 1-8.
- Kuiper, George GJM, and Jan-Åke Gustafsson. 1997. 'The novel estrogen receptor- β subtype: potential role in the cell-and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens', *FEBS Letters*, 410: 87-90.
- Kuiper, GG, Eva Enmark, Markku Peltö-Huikko, Stefan Nilsson, and Jan-Ake Gustafsson. 1996. 'Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 5925-30.
- Kurzrock, R, A Patnaik, L Rosenstein, S Fu, KP Papadopoulos, DA Smith, GS Falchook, G Chambers, JL Gauvin, and A Naing. 2011. "Phase I dose-escalation of the oral MEK1/2 inhibitor GSK1120212 (GSK212) dosed in combination with the oral AKT inhibitor GSK2141795 (GSK795)." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 3085.

- Lalwani, Neeraj, Srinivasa R Prasad, Raghunandan Vikram, Alampady K Shanbhogue, Phyllis C Huettner, and Najla Fasih. 2011. 'Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment', *Radiographics*, 31: 625-46.
- Lee, Sooyong, Eui-Ju Choi, Changbae Jin, and Dong-Hyun Kim. 2005. 'Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line', *Gynecologic Oncology*, 97: 26-34.
- Lengyel, Ernst. 'Ovarian Cancer Development and Metastasis', *The American Journal of Pathology*, 177: 1053-64.
- Leygue, Etienne, Helmut Dotzlaw, Peter H Watson, and Leigh C Murphy. 1998. 'Altered estrogen receptor α and β messenger RNA expression during human breast tumorigenesis', *Cancer Research*, 58: 3197-201.
- Li, Julang, Hiromasa Sasaki, Y Sheng, Danielle Schneiderman, C Xiao, Fumikazu Kotsuji, and Benjamin K Tsang. 2000. 'Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant?', *Neurosignals*, 9: 122-30.
- Lin, SL, TL Spinka, TX Le, TJ Pianta, I King, MF Belcourt, and Z Li. 1999. "Tumor-directed delivery and amplification of tumor-necrosis factor-alpha (TNF) by attenuated *Salmonella typhimurium*." In *Clinical Cancer Research*, 3822S-22S. Amer. Assoc. Cancer Research PO Box 11806, Birmingham, AL 35202 USA.
- Lin, Ying-Hsi, Bert Yu-Hung Chen, Wei-Ting Lai, Shao-Fu Wu, Jih-Hwa Guh, Ann-Lii Cheng, and Lih-Ching Hsu. 2015. 'The Akt inhibitor MK-2206 enhances the cytotoxicity of paclitaxel (Taxol) and cisplatin in ovarian cancer cells', *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 388: 19-31.
- Liu, SC, NP Minton, AJ Giaccia, and JM Brown. 2002. 'Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis', *Gene therapy*, 9: 291-96.
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. 2000. 'Proto-oncogenes and tumor-suppressor genes'.
- Loeffler, Markus, Gaelle Le'Negrate, Maryla Krajewska, and John C Reed. 2007. 'Attenuated *Salmonella* engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 12879-83.

- Low, KB, M Ittensohn, S Lin, C Clairmont, X Luo, LM Zheng, I King, JM Pawelek, and D Bermudes. 1999. "VNP20009, a genetically modified *Salmonella typhimurium* for treatment of solid tumors." In *Proc Am Assoc Cancer Res*, 851.
- Lu, Zhimin, and Shuichan Xu. 2006. 'ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis', *IUBMB Life*, 58: 621-31.
- Luo, X, M Ittensohn, B Low, J Pawelek, Z Li, X Ma, and D Bermudes. 1999. "Genetically modified *Salmonella typhimurium* inhibited growth of primary tumors and metastase." In *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res*, 3146.
- Luvsandagva, Baigalimaa, Kazuto Nakamura, Yoshikazu Kitahara, Hiroshi Aoki, Tomomi Murata, Sadatomo Ikeda, and Takashi Minegishi. 2012. 'GRP78 induced by estrogen plays a role in the chemosensitivity of endometrial cancer', *Gynecologic Oncology*, 126: 132-39.
- Ma, BBY, A Oza, E Eisenhauer, G Stanimir, M Carey, W Chapman, E Latta, K Sidhu, J Powers, and W Walsh. 2004. 'The activity of letrozole in patients with advanced or recurrent endometrial cancer and correlation with biological markers—a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group', *International Journal of Gynecological Cancer*, 14: 650-58.
- Ma, Jia-jia, Bi-liang Chen, and Xiao-yan Xin. 2009. 'XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma', *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 146: 222-26.
- Ma, Xiaojun Max, and John Blenis. 2009. 'Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control', *Nature reviews Molecular cell biology*, 10: 307-18.
- Mabuchi, Seiji, Deborah A Altomare, Mitchell Cheung, Lili Zhang, Poulikos I Poulikakos, Harvey H Hensley, Russell J Schilder, Robert F Ozols, and Joseph R Testa. 2007. 'RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model', *Clinical Cancer Research*, 13: 4261-70.
- Mabuchi, Seiji, Deborah A Altomare, Denise C Connolly, Andres Klein-Szanto, Samuel Litwin, Matthew K Hoelzle, Harvey H Hensley, Thomas C Hamilton, and Joseph R Testa. 2007. 'RAD001 (Everolimus) delays tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer', *Cancer Research*, 67: 2408-13.

- Mabuchi, Seiji, Masahide Ohmichi, Akiko Kimura, Yukihiro Nishio, Emi Arimoto-Ishida, Namiko Yada-Hashimoto, Keiichi Tasaka, and Yuji Murata. 2004. 'Estrogen inhibits paclitaxel-induced apoptosis via the phosphorylation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in human ovarian cancer cell lines', *Endocrinology*, 145: 49-58.
- Mäenpää, Juhani, Pirkko Sipilä, Lauri Kangas, Päivi Karnani, and Matti Grönroos. 1992. 'Chemosensitizing effect of an antiestrogen, toremifene, on ovarian cancer', *Gynecologic Oncology*, 46: 292-97.
- Malmgren, Richard A, and Clyde C Flanigan. 1955. 'Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration', *Cancer Research*, 15: 473-78.
- Mann, Sherri, Rodolfo Laucirica, Nicole Carlson, Pamela S Younes, Najeeba Ali, Anas Younes, Yang Li, and Mamoun Younes. 2001. 'Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer', *Human pathology*, 32: 113-18.
- Mansouri, Abdellah, Lon D Ridgway, Anita L Korapati, Qingxiu Zhang, Ling Tian, Yibin Wang, Zahid H Siddik, Gordon B Mills, and François X Claret. 2003. 'Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 19245-56.
- Mansouri, Abdellah, Qingxiu Zhang, Lon D Ridgway, Ling Tian, and Francois-Xavier Claret. 2003. 'Cisplatin resistance in an ovarian carcinoma is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation', *Oncology research*, 13: 399.
- Matulonis, Ursula, Ignace Vergote, Floor Backes, Lainie P Martin, Scott McMeekin, Michael Birrer, Frank Campana, Yi Xu, Coumaran Egile, and Sharad Ghamande. 2015. 'Phase II study of the PI3K inhibitor pilaralisib (SAR245408; XL147) in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma', *Gynecologic Oncology*, 136: 246-53.
- Matulonis, Ursula, Gerburg M Wulf, Michael J Birrer, Shannon Neville Westin, Philippa Quay, Katherine M Bell-McGuinn, Brian Lasonde, Christin Whalen, Carol Aghajanian, and David B Solit. 2014. "Phase I study of oral BKM120 and oral olaparib for high-grade serous ovarian cancer (HGSC) or triple-negative breast cancer (TNBC)." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 2510.
- McCluggage, W Glenn. 2011. 'Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis', *Pathology*, 43: 420-32.

- McMeekin, D Scott, Alan Gordon, Jeffrey Fowler, Allen Melemed, Richard Buller, Thomas Burke, Jeffery Bloss, and Paul Sabbatini. 2003. 'A phase II trial of arzoxifene, a selective estrogen response modulator, in patients with recurrent or advanced endometrial cancer', *Gynecologic Oncology*, 90: 64-69.
- Mendoza, Michelle C., E. Emrah Er, and John Blenis. 2011. 'The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation', *Trends in Biochemical Sciences*, 36: 320-28.
- Meyer, Larissa A, Brian M Slomovitz, Bojana Djordjevic, Shannon N Westin, David A Iglesias, Mark F Munsell, Yunyun Jiang, Rosemarie Schmandt, Russell R Broaddus, and Robert L Coleman. 2014. 'The search continues: looking for predictive biomarkers for response to mammalian target of rapamycin inhibition in endometrial cancer', *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 24: 713-17.
- Meynier, Sonia, Marianne Kramer, Pascale Ribaux, Jean Christophe Tille, Florence Delie, Patrick Petignat, and Marie Cohen. 2015. *Role of PAR-4 in ovarian cancer*.
- Michl, Patrick, Malte Buchholz, Monika Rolke, Steffen Kunsch, Matthias Löhr, Bruce McClane, Shoichiro Tsukita, Gerhard Leder, Guido Adler, and Thomas M Gress. 2001. 'Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin', *Gastroenterology*, 121: 678-84.
- Miki, Yoshio, Jeff Swensen, Donna Shattuck-Eidens, P Andrew Futreal, Keith Harshman, Sean Tavtigian, Qingyun Liu, Charles Cochran, L Michelle Bennett, and Wei Ding. 1994. 'A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1', *Science*, 266: 66-71.
- Mitsuuchi, Yasuhiro, Steven W Johnson, Muthu Selvakumaran, Stephen J Williams, Thomas C Hamilton, and Joseph R Testa. 2000. 'The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signal transduction pathway plays a critical role in the expression of p21WAF1/CIP1/SDI1 induced by cisplatin and paclitaxel', *Cancer Research*, 60: 5390-94.
- Mizuki, E, M Ohba, T Akao, S Yamashita, H Saitoh, and YS Park. 1999. 'Unique activity associated with non-insecticidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells', *Journal of applied microbiology*, 86: 477-86.
- Mizuki, Eiichi, Yu Shin Park, Hiroyuki Saitoh, Satoko Yamashita, Tetsuyuki Akao, Kazuhiko Higuchi, and Michio Ohba. 2000. 'Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of Bacillus thuringiensis', *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7: 625-34.

- Moreno-Bueno, Gema, Pablo J. Fernandez-Marcos, Manuel Collado, Mercedes J. Tendero, Socorro M. Rodriguez-Pinilla, Isabel Garcia-Cao, David Hardisson, Maria T. Diaz-Meco, Jorge Moscat, Manuel Serrano, and Jose Palacios. 2007. 'Inactivation of the Candidate Tumor Suppressor Par-4 in Endometrial Cancer', *Cancer Research*, 67: 1927-34.
- Moreno Garcia, V, RD Baird, KJ Shah, B Basu, N Tunariu, M Blanco, PA Cassier, JV Pedersen, M Puglisi, and D Sarker. 2011. "A phase I study evaluating GDC-0941, an oral phosphoinositide-3 kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors or multiple myeloma." In *ASCO annual meeting proceedings*, 3021.
- Morgan, R, AM Oza, R Qin, KM Laumann, H Mackay, EL Strevel, S Welch, D Sullivan, RM Wenham, and HX Chen. 2011. "A phase II trial of temsirolimus and bevacizumab in patients with endometrial, ovarian, hepatocellular carcinoma, carcinoid, or islet cell cancer: Ovarian cancer (OC) subset--A study of the Princess Margaret, Mayo, Southeast phase II, and California Cancer (CCCP) N01 Consortia NCI# 8233." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 5015.
- Moxley, Katherine M., and D. Scott McMeekin. 2010. 'Endometrial Carcinoma: A Review of Chemotherapy, Drug Resistance, and the Search for New Agents', *The Oncologist*, 15: 1026-33.
- Muchmore, Douglas B. 2000. 'Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator (SERM) with multiple target system effects', *The Oncologist*, 5: 388-92.
- Myers, Andrea P, Russell Broaddus, Vicky Makker, Panagiotis A Konstantinopoulos, Ronny Drapkin, Neil S Horowitz, Joyce Liu, Paul Van Hummelen, Funda Meric-Bernstam, and Michael J Birrer. 2013. "Phase II, two-stage, two-arm, PIK3CA mutation stratified trial of MK-2206 in recurrent endometrial cancer (EC)." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 5524.
- Nagai, Maria Aparecida, Rene Gerhard, Sibeli Salaorni, José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, Suely Nonogaki, Mario Mourao Netto, and Fernando Augusto Soares. 2010. 'Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer', *International Journal of Oncology*, 37: 41-49.
- Nalca, Aysegul, Shirley Guofang Qiu, Nadia El-Guendy, Sumathi Krishnan, and Vivek M. Rangnekar. 1999. 'Oncogenic Ras Sensitizes Cells to Apoptosis by Par-4', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 29976-83.
- O'Reilly, Kathryn E, Fredi Rojo, Qing-Bai She, David Solit, Gordon B Mills, Debra Smith, Heidi Lane, Francesco Hofmann, Daniel J Hicklin, and Dale L Ludwig. 2006. 'mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt', *Cancer Research*, 66: 1500-08.

- Oda, Katsutoshi, David Stokoe, Yuji Taketani, and Frank McCormick. 2005. 'High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma', *Cancer Research*, 65: 10669-73.
- Oh, Soo-Young, Suk-Joo Choi, Kyung Hee Kim, EunYoon Cho, Jong-Hwa Kim, and Cheong-Rae Roh. 2008. 'Autophagy-Related Proteins, LC3 and Beclin-1, in Placentas From Pregnancies Complicated by Preeclampsia', *Reproductive Sciences*, 15: 912-20.
- Ohta, Tsuyoshi, Masahide Ohmichi, Tadashi Hayasaka, Seiji Mabuchi, Maki Saitoh, Jun Kawagoe, Kazuhiro Takahashi, Hideki Igarashi, Botao Du, and Masakazu Doshida. 2006. 'Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in in vivo ovarian cancer models', *Endocrinology*, 147: 1761-69.
- Okassov, Almas, Armen Nersesyan, Sakae Kitada, and Alexander Ilin. 2015. 'Parasporins as new natural anticancer agents: a review', *Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 20: 5.
- Okumura, S., Ohba, M., Mizuki, E., Crickmore, N., Côté, J.-C., Nagamatsu, Y., Kitada, S., Sakai, H., Harata, K. and Shin, T. 2010. 'Parasporin nomenclature. Available: <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>; Accessed: 16th march 2015'.
- Omoto, Y, S Inoue, S Ogawa, T Toyama, H Yamashita, M Muramatsu, S Kobayashi, and Hirotaka Iwase. 2001. 'Clinical value of the wild-type estrogen receptor β expression in breast cancer', *Cancer Letters*, 163: 207-12.
- Omoto, Yoko, and Hirotaka Iwase. 2015. 'Clinical significance of estrogen receptor β in breast and prostate cancer from biological aspects', *Cancer Science*, 106: 337-43.
- Orr, George A., Pascal Verdier-Pinard, Hayley McDaid, and Susan Band Horwitz. 2003. 'Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules', *Oncogene*, 22: 7280-95.
- Osborne, C Kent, and Rachel Schiff. 2011. 'Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer', *Annual review of medicine*, 62: 233.
- Oza, Amit M, Laurie Elit, Ming-Sound Tsao, Suzanne Kamel-Reid, Jim Biagi, Diane Michele Provencher, Walter H Gotlieb, Paul J Hoskins, Prafull Ghatage, and Katia S Tonkin. 2011. 'Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group', *Journal of Clinical Oncology*, 29: 3278-85.

- Pal, Tuya, Jenny Permuth-Wey, Judith A. Betts, Jeffrey P. Krischer, James Fiorica, Hector Arango, James LaPolla, Mitchell Hoffman, Martin A. Martino, Katie Wakeley, George Wilbanks, Santo Nicosia, Alan Cantor, and Rebecca Sutphen. 2005. 'BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases', *Cancer*, 104: 2807-16.
- Pant, Alok, Irene I Lee, Zhenxiao Lu, Bo R Rueda, Julian Schink, and J Julie Kim. 2012. 'Inhibition of AKT with the orally active allosteric AKT inhibitor, MK-2206, sensitizes endometrial cancer cells to progesterin', *PLoS One*, 7: e41593.
- Papadimitriou, Christos A, Sophia Markaki, John Siapkarakas, Georgios Vlachos, Eleni Efsthathiou, Irene Grimani, George Hamilos, Markella Zorzou, and M-A Dimopoulos. 2004. 'Hormonal therapy with letrozole for relapsed epithelial ovarian cancer', *Oncology*, 66: 112-17.
- Patch, Ann-Marie, Elizabeth L Christie, Dariush Etemadmoghadam, Dale W Garsed, Joshy George, Sian Fereday, Katia Nones, Prue Cowin, Kathryn Alsop, and Peter J Bailey. 2015. 'Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer', *Nature*, 521: 489-94.
- Patyar, S, R Joshi, DS Prasad Byrav, A Prakash, B Medhi, and BK Das. 2010. 'Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy', *Journal of Biomedical Science*, 17: 21.
- Pearce, Sandra Timm, and V. Craig Jordan. 2004. 'The biological role of estrogen receptors [alpha] and [beta] in cancer', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50: 3-22.
- Pearson, Gray, Fred Robinson, Tara Beers Gibson, Bing-e Xu, Mahesh Karandikar, Kevin Berman, and Melanie H Cobb. 2001. 'Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1', *Endocrine Reviews*, 22: 153-83.
- Peng, Dong-Jun, Juan Wang, Jun-Ying Zhou, and Gen Sheng Wu. 2010. 'Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394: 600-05.
- Pereira, Michelly C., Simone A. De Bessa-Garcia, Ravshan Burikhanov, Ana Carolina Pavanelli, Lourival Antunes, Vivek M. Rangnekar, and Maria A. Nagai. 2013. 'Prostate apoptosis response-4 is involved in the apoptosis response to docetaxel in MCF-7 breast cancer cells', *International Journal of Oncology*, 43: 531-38.
- Perez-Gracia, Jose Luis, and Eva María Carrasco. 2002. 'Tamoxifen therapy for ovarian cancer in the adjuvant and advanced settings: systematic review of the literature and implications for future research', *Gynecologic Oncology*, 84: 201-09.

- Peter, M El, and PH Krammer. 2003. 'The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond', *Cell Death & Differentiation*, 10: 26-35.
- Petrucelli, Nancie, Mary B Daly, and Gerald L Feldman. 2013. 'BRCA1 and BRCA2 hereditary breast and ovarian cancer'.
- Pinzone, Joseph J, Holly Stevenson, Jeannine S Strobl, and Patricia E Berg. 2004. 'Molecular and cellular determinants of estrogen receptor α expression', *Molecular and Cellular Biology*, 24: 4605-12.
- Piva, R, N Bianchi, GL Aguiari, R Gambari, and L Del Senno. 1993. 'Sequencing of an RNA transcript of the human estrogen receptor gene: evidence for a new transcriptional event', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 46: 531-38.
- Plataniotis, G, M Castiglione, and ESMO Guidelines Working Group. 2010. 'Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of Oncology*, 21: v41-v45.
- Prossnitz, Eric R, Jeffrey B Arterburn, and Larry A Sklar. 2007. 'GPR30: AG protein-coupled receptor for estrogen', *Molecular and cellular endocrinology*, 265: 138-42.
- Pruitt, Kevin, Aylin S. Ülkü, Karen Frantz, Rafael J. Rojas, Vanessa M. Muniz-Medina, Vivek M. Rangnekar, Channing J. Der, and Janiel M. Shields. 2005. 'Ras-mediated Loss of the Pro-apoptotic Response Protein Par-4 Is Mediated by DNA Hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent Signaling Cascades in Epithelial Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 23363-70.
- Pujol, P., J. M. Rey, P. Nirde, P. Roger, M. Gastaldi, F. Laffargue, H. Rochefort, and T. Maudelonde. 1998. 'Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis', *Cancer Res*, 58: 5367-73.
- Puri, RK. 1998. 'Development of a recombinant interleukin-4-Pseudomonas exotoxin for therapy of glioblastoma', *Toxicologic pathology*, 27: 53-57.
- Qadir, M., B. Kwok, W. Dragowska, K. To, D. Le, M. Bally, and Sharon Gorski. 2008. 'Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization', *Breast Cancer Research and Treatment*, 112: 389-403.

- Ramirez, Pedro T, Kathleen M Schmeler, Michael R Milam, Brian M Slomovitz, Judith A Smith, John J Kavanagh, Michael Deavers, Charles Levenback, Robert L Coleman, and David M Gershenson. 2008. 'Efficacy of letrozole in the treatment of recurrent platinum-and taxane-resistant high-grade cancer of the ovary or peritoneum', *Gynecologic Oncology*, 110: 56-59.
- Ray-Coquard, I, L Favier, B Weber, C Roemer-Becuwe, P Bournoux, M Fabbro, A Floquet, F Joly, A Plantade, and D Paraiso. 2013. 'Everolimus as second-or third-line treatment of advanced endometrial cancer: ENDORAD, a phase II trial of GINECO', *British journal of cancer*, 108: 1771-77.
- Reardon, Sara. 2016. 'First CRISPR clinical trial gets green light from US panel', *Nature*.
- Rebbeck, Timothy R, Tara Friebe, Theresa Wagner, Henry T Lynch, Judy E Garber, Mary B Daly, Claudine Isaacs, Olufunmilayo I Olopade, Susan L Neuhausen, and Rosalind Eeles. 2005. 'Effect of short-term hormone replacement therapy on breast cancer risk reduction after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group', *Journal of Clinical Oncology*, 23: 7804-10.
- Reed, E. 1998. 'Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy', *Cancer Treatment Reviews*, 24: 331-44.
- Robert, Nicholas J. 1997. 'Clinical efficacy of tamoxifen', *Oncology (Williston Park, NY)*, 11: 15-20.
- Roberts, PJ, and CJ Der. 2007. 'Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer', *Oncogene*, 26: 3291-310.
- Roger, Pascal, Majida Esslimani Sahla, Sari Mäkelä, Jan Åke Gustafsson, Pierre Baldet, and Henri Rochefort. 2001. 'Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors', *Cancer Research*, 61: 2537-41.
- Roh, Jong Yul, Jae Young Choi, Ming Shun Li, Byung Rae Jin, and Yeon Ho Je. 2007. 'Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control', *Journal of microbiology and biotechnology*, 17: 547.
- Rose, Peter G, Virginia L Brunetto, Linda VanLe, Jeffrey Bell, Joan L Walker, and Roger B Lee. 2000. 'A phase II trial of anastrozole in advanced recurrent or persistent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study', *Gynecologic Oncology*, 78: 212-16.

- Ruan, Zhihua, Zhao Yang, Yiqin Wang, Huiming Wang, Yongwen Chen, Xiaoyun Shang, Chenying Yang, Sheng Guo, Junfeng Han, and Houjie Liang. 2009. 'DNA vaccine against tumor endothelial marker 8 inhibits tumor angiogenesis and growth', *Journal of Immunotherapy*, 32: 486-91.
- Rudd, Meghan L, Jessica C Price, Sarah Fogoros, Andrew K Godwin, Dennis C Sgroi, Maria J Merino, and Daphne W Bell. 2011. 'A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110 α) mutations within primary endometrial carcinomas', *Clinical Cancer Research*, 17: 1331-40.
- Saltzman, Daniel A, Emmanuel Katsanis, Charles P Heise, Diane E Hasz, Sandra M Kelly, Roy Curtiss III, Arnold S Leonard, and Peter M Anderson. 1997. 'Patterns of hepatic and splenic colonization by an attenuated strain of *Salmonella typhimurium* containing the gene for human interleukin-2: a novel anti-tumor agent', *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 12: 37-45.
- Sanchez, Mélanie, Nathalie Picard, Karine Sauvé, and André Tremblay. 2010. 'Challenging estrogen receptor β with phosphorylation', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21: 104-10.
- Sander, Jeffry D, and J Keith Joung. 2014. 'CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes', *Nature Biotechnology*, 32: 347-55.
- Santiskulvong, Chintda, Gottfried E Konecny, Mirela Fekete, Kuang-Yui Michael Chen, Amer Karam, David Mulholland, Carol Eng, Hong Wu, Min Song, and Oliver Dorigo. 2011. 'Dual targeting of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach in human ovarian carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 17: 2373-84.
- Sarbassov, Dos D, David A Guertin, Siraj M Ali, and David M Sabatini. 2005. 'Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex', *Science*, 307: 1098-101.
- Sarkar, Shayan, Sumeet Jain, Vineeta Rai, Dipak K Sahoo, Sumita Raha, Sujit Suklabaidya, Shantibhusan Senapati, Vivek M Rangnekar, Indu B Maiti, and Nrisingha Dey. 2015. 'Plant-derived SAC domain of PAR-4 (Prostate Apoptosis Response 4) exhibits growth inhibitory effects in prostate cancer cells', *Frontiers in plant science*, 6.
- Sasaki, Hiromasa, YingLun Sheng, Fumikazu Kotsuji, and Benjamin K Tsang. 2000. 'Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells', *Cancer Research*, 60: 5659-66.

- Schiff, Rachel, Suleiman A Massarweh, Jiang Shou, Lavina Bharwani, Syed K Mohsin, and C Kent Osborne. 2004. 'Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance', *Clinical Cancer Research*, 10: 331s-36s.
- Schnepf, E, N v Crickmore, J Van Rie, D Lereclus, J Baum, J Feitelson, DR Zeigler, and DH Dean. 1998. 'Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins', *Microbiology and molecular biology reviews*, 62: 775-806.
- Screnci, D., and M. J. McKeage. 1999. 'Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches', *J Inorg Biochem*, 77: 105-10.
- Sells, StephenF, DP Wood Jr, SS Joshi-Barve, SUMATHI Muthukumar, RJ Jacob, SA Crist, S Humphreys, and VM Rangnekar. 1994. 'Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and-independent prostate cells', *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 5: 457-66.
- Selvakumaran, Muthu, Debra A. Pisarcik, Rudi Bao, Anthony T. Yeung, and Thomas C. Hamilton. 2003. 'Enhanced Cisplatin Cytotoxicity by Disturbing the Nucleotide Excision Repair Pathway in Ovarian Cancer Cell Lines', *Cancer Research*, 63: 1311-16.
- Shoji, Keiko, Katsutoshi Oda, Tomoko Kashiyama, Yuji Ikeda, Shunsuke Nakagawa, Kenbun Sone, Yuichiro Miyamoto, Haruko Hiraie, Michihiro Tanikawa, and Aki Miyasaka. 2012. 'Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas', *PLoS One*, 7: e37431.
- Shrestha-Bhattarai, T., and V. M. Rangnekar. 2010. 'Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4', *Oncogene*, 29: 3873-80.
- Sidhu, Sachdev S, Wayne J Fairbrother, and Kurt Deshayes. 2003. 'Exploring protein-protein interactions with phage display', *Chembiochem*, 4: 14-25.
- Siegel, Rebecca, Deepa Naishadham, and Ahmedin Jemal. 2013. 'Cancer statistics, 2013', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63: 11-30.
- Singh, Mohan, Parvesh Chaudhry, Francois Fabi, and Eric Asselin. 2013. 'Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance', *BMC Cancer*, 13: 233.

- Sinha, Diviya, Saswati Bannerjee, John H Schwartz, Wilfred Lieberthal, and Jerrold S Levine. 2004. 'Inhibition of ligand-independent ERK1/2 activity in kidney proximal tubular cells deprived of soluble survival factors up-regulates Akt and prevents apoptosis', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 10962-72.
- Sjoquist, Katrin M, Julie Martyn, Richard J Edmondson, and Michael L Friedlander. 2011. 'The role of hormonal therapy in gynecological cancers-current status and future directions', *International Journal of Gynecological Cancer*, 21: 1328-33.
- Slomovitz, BM, J Brown, TA Johnston, D Mura, C Levenback, J Wolf, KR Adler, KH Lu, and RL Coleman. 2011. "A phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 5012.
- Slomovitz, Brian M, Yunyun Jiang, Melinda S Yates, Pamela T Soliman, Taren Johnston, Maureen Nowakowski, Charles Levenback, Qian Zhang, Kari Ring, and Mark F Munsell. 2015. 'Phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma', *Journal of Clinical Oncology: JCO*. 2014.58. 3401.
- Slomovitz, Brian M, Karen H Lu, Taren Johnston, Robert L Coleman, Mark Munsell, Russell R Broaddus, Cheryl Walker, Lois M Ramondetta, Thomas W Burke, and David M Gershenson. 2010. 'A phase 2 study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor, everolimus, in patients with recurrent endometrial carcinoma', *Cancer*, 116: 5415-19.
- Smith, Robert A, Andrew C von Eschenbach, Richard Wender, Bernard Levin, Tim Byers, David Rothenberger, Durado Brooks, William Creasman, Carmel Cohen, and Carolyn Runowicz. 2001. 'American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers: Also: update 2001-testing for early lung cancer detection', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 51: 38-75.
- Smyth, John F, Charlie Gourley, Graeme Walker, Melanie J MacKean, Alan Stevenson, Alistair RW Williams, Awatif Al Nafussi, Tzyvia Rye, Ron Rye, and Moira Stewart. 2007. 'Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients', *Clinical Cancer Research*, 13: 3617-22.
- Song, Jing Yu, and IS Fraser. 1995. 'Effects of progestogens on human endometrium', *Obstetrical & gynecological survey*, 50: 385-94.

- Stevens, Ellen V, Satoshi Nishizuka, Smitha Antony, Mark Reimers, Sudhir Varma, Lynn Young, Peter J Munson, John N Weinstein, Elise C Kohn, and Yves Pommier. 2008. 'Predicting cisplatin and trabectedin drug sensitivity in ovarian and colon cancers', *Molecular Cancer Therapeutics*, 7: 10-18.
- Suh, Nanjoo, Andrew L Glasebrook, Alan D Palkowitz, Henry U Bryant, Lorris L Burris, James J Starling, Homer L Pearce, Charlotte Williams, Christopher Peer, and Yongping Wang. 2001. 'Arzoxifene, a new selective estrogen receptor modulator for chemoprevention of experimental breast cancer', *Cancer Research*, 61: 8412-15.
- Sui, M., H. Zhang, and W. Fan. 2011. 'The Role of Estrogen and Estrogen Receptors in Chemoresistance', *Curr Med Chem*.
- Sun, Hui, Teng Yu, and Jinchao Li. 2011. 'Co-administration of perifosine with paclitaxel synergistically induces apoptosis in ovarian cancer cells: more than just AKT inhibition', *Cancer Letters*, 310: 118-28.
- Takano, Masashi, Yoshihiro Kikuchi, Kazuya Kudoh, Tomoko Goto, Kenichi Furuya, Ryoko Kikuchi, Tsunekazu Kita, Keiichi Fujiwara, Tanri Shiozawa, and Daisuke Aoki. 2011. 'Weekly administration of temsirolimus for heavily pretreated patients with clear cell carcinoma of the ovary: a report of six cases', *International journal of clinical oncology*, 16: 605-09.
- Tan, Jiaxin, Yu You, Tubin Xu, Peng Yu, Dingguo Wu, Hao Deng, Yujun Zhang, and Ping Bie. 2014. 'Par-4 downregulation confers cisplatin resistance in pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway-dependent EMT', *Toxicol Lett*, 224: 7-15.
- Tanimoto, Keiji, Hidetaka Eguchi, Takashi Yoshida, Kyoko Hajiro-Nakanishi, and Shin-ichi Hayashi. 1999. 'Regulation of estrogen receptor α gene mediated by promoter B responsible for its enhanced expression in human breast cancer', *Nucleic Acids Res*, 27: 903-09.
- Tashiro, Hironori, Marian S Blazes, Rong Wu, Kathleen R Cho, Shikha Bose, Steven I Wang, Jing Li, Ramon Parsons, and Lora Hedrick Ellenson. 1997. 'Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies', *Cancer Research*, 57: 3935-40.
- Thayyullathil, Faisal, Siraj Pallichankandy, Anees Rahman, Jaleel Kizhakkayil, Shahanas Chathoth, Mahendra Patel, and Sehamuddin Galadari. 2013. 'Caspase-3 mediated release of SAC domain containing fragment from Par-4 is necessary for the sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells', *Journal of Molecular Signaling*, 8: 2.

- Theys, Jan, Willy Landuyt, Sandra Nuyts, Lieve Van Mellaert, Allan Van Oosterom, Philippe Lambin, and Jozef AnneÅ. 2001. 'Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by', *Cancer gene therapy*, 8: 294-97.
- Thorn, Caroline F, Connie Oshiro, Sharon Marsh, Tina Hernandez-Boussard, Howard McLeod, Teri E Klein, and Russ B Altman. 2011. 'Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects', *Pharmacogenetics and genomics*, 21: 440.
- Tomida, Akihiro, and Takashi Tsuruo. 1999. 'Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors', *Anti-cancer drug design*, 14: 169-77.
- Toso, John F, Vee J Gill, Patrick Hwu, Francesco M Marincola, Nicholas P Restifo, Douglas J Schwartzentruber, Richard M Sherry, Suzanne L Topalian, James C Yang, and Frida Stock. 2002. 'Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma', *Journal of Clinical Oncology*, 20: 142-52.
- Treude, Fabian, Ferdinand Kappes, Dirk Fahrenkamp, Gerhard Müller-Newen, Federico Dajas-Bailador, Oliver H. Krämer, Bernhard Lüscher, and Jörg Hartkamp. 2014. 'Caspase-8-mediated PAR-4 cleavage is required for TNF α -induced apoptosis', *Oncotarget*, 5: 2988-98.
- Tutt, ANJ, CJ Lord, N McCabe, H Farmer, N Turner, NM Martin, SP Jackson, GCM Smith, and A Ashworth. 2005. "Exploiting the DNA repair defect in BRCA mutant cells in the design of new therapeutic strategies for cancer." In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 139-48. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Uhlén, Mathias, Linn Fagerberg, Björn M. Hallström, Cecilia Lindskog, Per Oksvold, Adil Mardinoglu, Åsa Sivertsson, Caroline Kampf, Evelina Sjöstedt, Anna Asplund, IngMarie Olsson, Karolina Edlund, Emma Lundberg, Sanjay Navani, Cristina Al-Khalili Szigarto, Jacob Odeberg, Dijana Djureinovic, Jenny Ottosson Takanen, Sophia Hober, Tove Alm, Per-Henrik Edqvist, Holger Berling, Hanna Tegel, Jan Mulder, Johan Rockberg, Peter Nilsson, Jochen M. Schwenk, Marica Hamsten, Kalle von Feilitzen, Mattias Forsberg, Lukas Persson, Fredric Johansson, Martin Zwahlen, Gunnar von Heijne, Jens Nielsen, and Fredrik Pontén. 2015. 'Tissue-based map of the human proteome', *Science*, 347.
- Urick, Mary E, Meghan L Rudd, Andrew K Godwin, Dennis Sgroi, Maria Merino, and Daphne W Bell. 2011. 'PIK3R1 (p85 α) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer', *Cancer Research*, 71: 4061-67.

- Van Themsche, C., V. Leblanc, S. Parent, and E. Asselin. 2009. 'X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization', *J Biol Chem*, 284: 20462-6.
- Van Themsche, C., S. Parent, V. Leblanc, C. Descoteaux, A. M. Simard, G. Berube, and E. Asselin. 2009. 'VP-128, a novel oestradiol-platinum(II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo', *Endocr Relat Cancer*, 16: 1185-95.
- Vara, Juan Ángel Fresno, Enrique Casado, Javier de Castro, Paloma Cejas, Cristóbal Belda-Iniesta, and Manuel González-Barón. 2004. 'PI3K/Akt signalling pathway and cancer', *Cancer Treatment Reviews*, 30: 193-204.
- Verma, S, M Alhayki, T Le, K Baines, L Rambout, L Hopkins, and M Fung Kee Fung. 2006. "Phase II study of exemestane (E) in refractory ovarian cancer (ROC)." In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 5026.
- Villedieu, M, E Deslandes, M Duval, J-F Héron, P Gauduchon, and L Poulain. 2006. 'Acquisition of chemoresistance following discontinuous exposures to cisplatin is associated in ovarian carcinoma cells with progressive alteration of FAK, ERK and p38 activation in response to treatment', *Gynecologic Oncology*, 101: 507-19.
- Von Hoff, DD, P LoRusso, GD Demetri, GJ Weiss, G Shapiro, RK Ramanathan, JA Ware, R Raja, J Jin, and GG Levy. 2011. "A phase I dose-escalation study to evaluate GDC-0941, a pan-PI3K inhibitor, administered QD or BID in patients with advanced or metastatic solid tumors." In *ASCO annual meeting proceedings*, 3052.
- Wang, Dong, and Stephen J. Lippard. 2005. 'Cellular processing of platinum anticancer drugs', *Nat Rev Drug Discov*, 4: 307-20.
- Wang, Juan, and Gen Sheng Wu. 2014. 'Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells', *Journal of Biological Chemistry*, 289: 17163-73.
- Weiderpass, Elisabete, Hans-Olov Adami, John A Baron, Cecilia Magnusson, Reinhold Bergström, Anders Lindgren, Nestor Correia, and Ingemar Persson. 1999. 'Risk of endometrial cancer following estrogen replacement with and without progestins', *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 1131-37.
- Weigelt, Britta, and Julian Downward. 2014. 'Genomic determinants of PI3K pathway inhibitor response in cancer', *Targeting PI3K/mTOR signaling in cancer*: 5.

- Weihua, Zhang, Shigehira Saji, Sirpa Mäkinen, Guojun Cheng, Elwood V Jensen, Margaret Warner, and Jan-Åke Gustafsson. 2000. 'Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 5936-41.
- Won, Yong Sung, Sung Jong Lee, Seung Geun Yeo, and Dong Choon Park. 2012. 'Effects of female sex hormones on clusterin expression and paclitaxel resistance in endometrial cancer cell lines', *Int J Med Sci*, 9: 86-92.
- Wong, Rebecca SY. 2011. 'Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30: 1.
- Wray, S., and K. Noble. 2008. 'Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones', *J Neuroendocrinol*, 20: 451-61.
- Wu, HuiJuan, Yang Cao, Danhui Weng, Hui Xing, Xiaohong Song, Jianfeng Zhou, Gang Xu, Yunping Lu, Shixuan Wang, and Ding Ma. 2008. 'Effect of tumor suppressor gene PTEN on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms', *Cancer Letters*, 271: 260-71.
- Wulschleger, Stephan, Robbie Loewith, and Michael N Hall. 2006. 'TOR signaling in growth and metabolism', *Cell*, 124: 471-84.
- Xu, Jian, Xiao Song Liu, Shu-Feng Zhou, and Ming Q Wei. 2009. 'Combination of immunotherapy with anaerobic bacteria for immunogene therapy of solid tumours', *Gene Ther Mol Biol*, 13: 36-52.
- Xu, Ye, Huimei Yu, Hanjiao Qin, JinSong Kang, Chunyan Yu, Jiateng Zhong, Jing Su, HongYan Li, and LianKun Sun. 2012. 'Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells', *Cancer Letters*, 314: 232-43.
- Yan, Xiaojuan, Michael Fraser, Qing Qiu, and Benjamin K Tsang. 2006. 'Over-expression of PTEN sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner', *Gynecologic Oncology*, 102: 348-55.
- Yan, Y, X Li, A Blanchard, VHC Bramwell, KI Pritchard, D Tu, L Shepherd, Y Myal, C Penner, and PH Watson. 2013. 'Expression of both Estrogen Receptor-beta 1 (ER- β 1) and its co-regulator Steroid Receptor RNA Activator Protein (SRAP) are predictive for benefit from tamoxifen therapy in patients with Estrogen Receptor-alpha (ER- α)-Negative Early Breast Cancer (EBC)', *Annals of Oncology*: mdt132.

- Yang, X., M. Fraser, M. R. Abedini, T. Bai, and B. K. Tsang. 2008. 'Regulation of apoptosis-inducing factor-mediated, cisplatin-induced apoptosis by Akt', *Br J Cancer*, 98: 803-08.
- Yang, Xiaokui, Michael Fraser, Ute M Moll, Ajoy Basak, and Benjamin K Tsang. 2006. 'Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway', *Cancer Research*, 66: 3126-36.
- Yap, Timothy A., Craig P. Carden, and Stan B. Kaye. 2009. 'Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer', *Nat Rev Cancer*, 9: 167-81.
- Yin, Y, and WH Shen. 2008. 'PTEN: a new guardian of the genome', *Oncogene*, 27: 5443-53.
- Ying, Huanchun, Donghui Qu, Chuan Liu, Tianshu Ying, Jing Lv, Shanshan Jin, and Hongying Xu. 2015. 'Chemoresistance is associated with Beclin-1 and PTEN expression in epithelial ovarian cancers', *Oncology Letters*, 9: 1759-63.
- Yoshida, Takashi, Hidetaka Eguchi, Kei Nakachi, Keiji Tanimoto, Yasuhiro Higashi, Kimito Suemasu, Yuichi Iino, Yasuo Morishita, and Shin-ichi Hayashi. 2000. 'Distinct mechanisms of loss of estrogen receptor α gene expression in human breast cancer: methylation of the gene and alteration of trans-acting factors', *Carcinogenesis*, 21: 2193-201.
- Young, KH. 1998. 'Yeast two-hybrid: so many interactions,(in) so little time', *Biology of reproduction*, 58: 302-11.
- Yuan, Zeng-qiang, Richard I Feldman, Gene E Sussman, Domenico Coppola, Santo V Nicosia, and Jin Q Cheng. 2003. 'AKT2 Inhibition of Cisplatin-induced JNK/p38 and Bax Activation by Phosphorylation of ASK1 implication of AKT2 in chemoresistance', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 23432-40.
- Zhang, Y, Y Cheng, X Ren, L Zhang, K L Yap, H Wu, R Patel, D Liu, Z-H Qin, I-M Shih, and J-M Yang. 2011. *NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response*.
- Zheng, LM, Xiang Luo, Ming Feng, Zujin Li, Trung Le, Martina Ittensohn, Marke Trailsmith, David Bermudes, Stanley L Lin, and Ivan C King. 2001. 'Tumor amplified protein expression therapy: Salmonella as a tumor-selective protein delivery vector', *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 12: 127-35.

ANNEXE A

TABLEAU RÉSUMÉ DES ESSAIS CLINIQUES DE THÉRAPIES CIBLÉES POUR LES CANCERS GYNÉCOLOGIQUES

Agent	Seul/combiné	Cible	Phase	Tissu	# patients	Réponse	Commentaires	Référence
Temsirolimus	Seul	mTORC1	II	Ovaire	54 patients	9/54 PR		(Behbakht et al. 2011)
Temsirolimus	Seul	mTORC1		Ovaire	5 patients chimio-résistants	1/5 PR; 1/5 SD		(Takano et al. 2011)
Temsirolimus	Combiné avec bevacizumab	mTORC1 et angiogénèse		Ovaire	31 patients (17 platine-sensibles et 14 platine-résistants); 25 patients étaient	3/25 PR; 9/25 SD	Les 3 PR observées étaient du groupe platine-résistant.	(Morgan et al. 2011)
Temsirolimus	Seul	mTORC1	II	Endomètre	50 patients (29 chimio-naïfs et 21 chimio-traités)	Tout les patients: ORR de 22% Chimio-naïve: ORR de 24% Chimio-traité: ORR de 19%		(Fleming et al. 2014)
Temsirolimus	Combiné avec megestrol acetate et	mTORC1, PR et ER	II	Endomètre	21 patients	3/21 réponses	L'ajout de megestrol acetate et de tamoxifène avec le traitement de temsirolimus n'a pas augmenté	(Fleming et al. 2014)
Temsirolimus	Seul	mTORC1	II	Endomètre	54 patients (29 chimio-naïfs et 25 chimio-traités)	Chimio-naïve: 4/29 PR; 20/29 SD Chimio-traité: 5/26 PR	Aucune association avec le statut de PTEN.	(Oza et al. 2011)
Temsirolimus	Combiné avec bevacizumab	mTORC1 et angiogenesis	II	Endomètre	26 patients	12/26 patients ont eu un PFS > 6		(Einstein et al. 2012)
Temsirolimus	Combiné avec bevacizumab	mTORC1 et angiogenesis	II	Endomètre	49 patients	1/49 CR; 11/49 PR 23/49 patients ont eu un PFS > 6 months		(Alvarez, Brady, et al. 2013)
Everolimus	Seul	mTORC1	II	Endomètre	28 patients précédemment traité à la chimiothérapie	6/28 SD 6/28 CBR (22%)		(Slomovitz et al. 2010)
Everolimus	Combiné avec Letrozole	mTORC1 et aromatase	II	Endomètre	35 patients	11/35 CR; 2/35 PR; 1/35 SD 14/35 CBR (40%)	L'ajout d'un inhibiteur de l'aromatase a augmenté le CBR de 22% à 40%.	(Slomovitz et al. 2015)
Everolimus	Seul	mTORC1	II	Endomètre	44 patients (2/3 précédemment traité à la chimiothérapie)	4/44 PR	36% avaient une tumeur non-progressive après 3 mois.	(Ray-Coquard et al. 2013)
Buparlisib	Combiné avec Olaparib	Pan-PI3K et PARP	I	Ovaire et sein	34 patients (25 cancers de l'ovaire)	Des évidences de bénéfice clinique par RECIST 1.1 ont été observées à tous les niveaux de dose	Toutes les combinaisons de doses ont permis l'observation de bénéfices cliniques chez les patients. 26 patients avaient une mutation de BRCA.	(Matulonis et al. 2014)

GDC-041	Seul	Pan-PI3K	I	Divers (incluant ovaire et endomètre)	49 patients	2/49 PR	Une des PR était une tumeur endocervicale avec des mutations sur PIK3CA. Des réponses au CA125 ont aussi été observées chez trois patients atteint d'un cancer de l'ovaire; incluant un avec un nombre élevé de copie du gène de PIK3CA.	(Von Hoff et al. 2011)
GDC-041	Seul	Pan-PI3K	I	Divers (incluant ovaire)	42 patients	2/42 PR	Une des PR était une tumeur de l'ovaire avec une perte de PTEN.	(Moreno Garcia et al. 2011)
Pilaralisib	Seul	Pan-PI3K	II	Endomètre	67 patients	2/67 CR; 2/67 PR	Aucune association n'a été faite entre les altérations moléculaires de la voie PI3K et le taux de réponse.	(Matulonis et al. 2015)
BYL719	Seul	PIK3CA	I	Divers (incluant ovaire et endomètre)	36 patients PIK3CA mutants	7/36 PR	Parmi les PR, il y avait un patient avec une tumeur cervicale, une de l'endomètre et une de l'ovaire.	(Gonzalez-Angulo et al. 2013)
Buparlisib	Combiné avec Trametinib	Pan-PI3K et MEK	Ib	Divers (incluant ovaire)	113 patients (21 cancers de l'ovaire)	Tout les patients: ORR de 6% Patients avec une cancer de l'ovaire: 1/21 CR; 5/21 PR; 10/21 SD ORR of 29%	19 patients avec un cancer de l'ovaire étaient mutés au niveau du gène de KRAS démontrant une manière efficace de surmonter cette mutation. Le buparlisib était efficace presque exclusivement dans les cancers de l'ovaire; l'exception étant une PR observée avec un patient KRAS muté ayant une tumeur du poulmon.	(Bedard et al. 2015)
BYL719	Combiné avec binimetinib	PIK3CA et MEK	Ib	Divers (incluant ovaire et endomètre)	58 patients avec mutations RAS et BRAF	5/58 PR; 18/58 SD	Quatre patients avaient un cancer de l'ovaire avec une mutation KRAS; trois de ceux-ci ont obtenu une PR. Un patient avec un cancer de l'endomètre muté KRAS a aussi obtenu une PR.	(Juric et al. 2014)
MK-2206	Seul	AKT	II	Endomètre	36 patients (9 PIK3CA mutants et 27 PIK3CA WT)	2/36 PR	Les résultats obtenus étaient indépendants du statut de PIK3CA.	(Myers et al. 2013)
Perifosine	Combiné avec docetaxel	AKT et mitosis	I	Ovaire	21 patients taxane-résistants	1/21 PR; 3/21 SD	The patient with a PR was PTEN mutant. Among the patients with SD, two were PIK3CA mutant et 1 WT. Patients with KRAS mutation had a rapid tumor progression.	(Fu et al. 2012)
AZD5363	Seul	AKT	I	Divers (incluant ovaire et endomètre)	92 patients	2/92 PR; 1/92 SD	Parmi les deux PR, une provenait d'un cancer endométrioïde de l'ovaire et l'autre d'un cancer cervical avec soit une mutation de PIK3CA ou AKT1. Le patient avec uen SD était un cancer endométrioïde de l'ovaire avec des mutations au niveau de PIK3CA.	(Banerji et al. 2013)
GSK2141795	Seul	AKT	I	Ovaire	12 patients platine-résistants	8/12 SD	Les quatre patients restants avaient une tumeur progressive.	(Gungor et al. 2011)
GSK2141795	Seul	AKT	I	Divers (incluant endomètre)	66 patients (12 cancers de l'endomètre)	Patients avec un cancer de l'endomètre: 2/12 SD	Les deux patients avec une SD étaient PIK3CA muté et/ou avaient une perte de PTEN.	(Burris et al. 2011)
GSK2141795	Combiné avec GSK1120212	AKT et MEK	I	Divers (incluant ovaire et endomètre)	13 patients	3/13 ont eu une faible régression de la tumeur	Les deux patients avec une SD avaient une tumeur provenant de l'ovaire et l'autre, de l'endomètre.	(Kurzrock et al. 2011)
Anastrozole	Seul	Aromatase	II	Endomètre	23 patients	2/23 PR; 2/23 SD		(Rose et al. 2000)
Anastrozole	Seul	Aromatase	II	Ovaire, trompes de Fallope ou péritoine	53 patients (43 cancers de l'ovaire)	1/53 PR; 36/53 SD		(Del Carmen et al. 2003)
Anastrozole	Combiné avec gefitinib	Aromatase et EGFR	II	Ovaire, trompes de Fallope ou péritoine	35 patients (30 cancers de l'ovaire) 23 patients étaient évaluable	1/23 CR; 14/23 SD		(Krasner et al. 2005)

Letrozole	Seul	Aromatase	II	Endomètre	28 patients chimio-naïfs	1/28 CR; 2/28 PR; 11/28 SD	Différents marqueurs incluant les récepteurs hormonaux ont été analysés mais n'ont pas corrélié avec la réponse au letrozole.	(Ma et al. 2004)
Letrozole	Seul	Aromatase	II	Ovaire	50 patients	10/50 SD	Ils ont observé une corrélation entre la réponse au letrozole et un haut taux de récepteurs à l'estrogène.	(Bowman et al. 2002)
Letrozole	Seul	Aromatase	II	Ovaire	21 patients	1/21 CR; 2/21 PR; 4/21 SD	Aucune association n'a été trouvée entre les récepteurs hormonaux et la réponse au letrozole.	(Papadimitriou et al. 2004)
Letrozole	Seul	Aromatase	II	Ovaire	33 patients exprimant RE	3/33 PR; 14/33 SD		(Smyth et al. 2007)
Letrozole	Seul	Aromatase	II	Ovaire	31 patients platine- et taxane-résistants; exprimant RE	7/31 SD		(Ramirez et al. 2008)
Exemestane	Seul	Aromatase	II	Ovaire	24 patients platine- et taxane-traités	8/24 SD		(Verma et al. 2006)
Fulvestrant	Seul	Récepteur estrogène	II	Endomètre	53 patients (31 RE positif et 22 RE négatif)	RE positif: 1/31 CR; 4/31 PR; 9/31 SD RE négatif: 4/22 SD		(Covens et al. 2011)
Fulvestrant	Seul	Récepteur estrogène	II	Ovaire	26 patients	1/26 CR; 1/26 PR; 9/26 SD	Le taux de réponse a corrélié positivement avec le statut du RE.	(Argenta et al. 2009)
Arzoxifène	Seul	Récepteur estrogène	II	Endomètre	66 patients (35 progestogen sensibles et 31 progestogen refractaires)	ORR de 25% (ORR de 34% dans le groupe progestogen sensible)		(Burke and Walker 2003)
Arzoxifène	Seul	Récepteur estrogène	II	Endomètre	34 patients	ORR de 31%		(Burke and Walker 2003)
Arzoxifène	Seul	Récepteur estrogène	II	Endomètre	29 patients chimio-naïfs; exprimant RE	ORR de 31% (1/29 CR; 8/29 PR)		(McMeekin et al. 2003)
Toremifène	Seul	Récepteur estrogène		Ovaire ou utérus	8 patients	3/8 PR; 3/8 SD	Les deux autres patients ont eu une tumeur progressive.	(Mäenpää et al. 1992)

ANNEXE B

CHEMORESISTANCE AND TARGETED THERAPIES IN OVARIAN AND ENDOMETRIAL CANCERS

Brasseur K, Gévry N, Asselin E.

Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers.

Oncotarget. 2016 Dec 19. doi: 10.18632/oncotarget.14021.

Le contenu de l'annexe B est une revue de littérature qui a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue Oncotarget le 19 décembre 2015. Il s'agit d'une revue cotée avec un facteur d'impact de 6,368 (5-ans) utilisant un processus d'examen par les pairs.

Contribution des auteurs

Kevin Brasseur a effectué en totalité l'écriture du manuscrit et la préparation des figures. Nicolas Gévry est un chercheur à l'université de Sherbrooke qui a révisé le manuscrit et a fourni l'analyse et les résultats provenant de l'essai d'immunoprécipitation de la chromatine d'une base de données. Éric Asselin est le directeur de recherche de l'équipe de laboratoire; il a révisé le manuscrit et supervisé sa production.

Article complet (anglais) : Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers**Abstract**

Gynecological cancers are known for being very aggressive at their advanced stages. Indeed, the survival rate of both ovarian and endometrial cancers is very low when diagnosed lately and the success rate of current chemotherapy regimens is not very efficient. One of the main reasons for this low success rate is the acquired chemoresistance of these cancers during their progression. The mechanisms responsible for this acquired chemoresistance are numerous, including efflux pumps, repair mechanisms, survival pathways (PI3K/AKT, MAPK, EGFR, mTOR, estrogen signaling) and tumor suppressors (P53 and Par-4). To overcome these resistances, a new type of therapy has emerged named targeted therapy. The principle of targeted therapy is simple, taking advantage of changes acquired in malignant cancer cells (receptors, proteins, mechanisms) by using compounds specifically targeting these, thus limiting their action on healthy cells. Targeted therapies are emerging and many clinical trials targeting these pathways, frequently involved in chemoresistance, have been tested on gynecological cancers. Despite some targets being less efficient than expected as mono-therapies, the combination of compounds seems to be the promising avenue. For instance, we demonstrate using ChIP-seq analysis that estrogen downregulate tumor suppressor Par-4 in hormone-dependent cells by directly binding to its DNA regulatory elements and inhibiting estrogen signaling could reinstate Par-4 apoptosis-inducing abilities. This review will focus on the chemoresistance mechanisms and the clinical trials of targeted therapies associated with these, specifically for endometrial and ovarian cancers.

Introduction

Gynecological cancers are pathologies developing in the women's reproductive organs, mainly located in the uterus and ovaries. Overall, these cancers accounts for

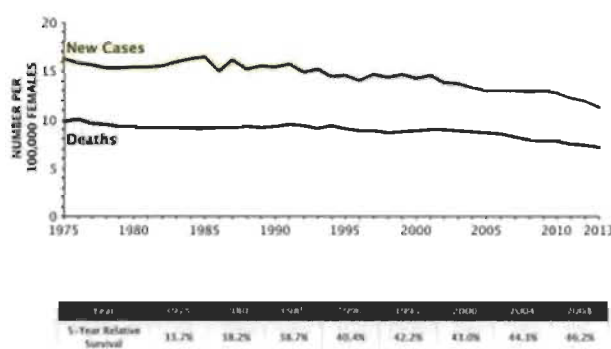
more than 10% of cancer deaths and new cases among women, each year in North America and Europe [1-6].

Ovarian cancer is hard to diagnose because of the almost total lack of symptoms during the early development stages of the tumor. Considering that more than 75% of the cases are detected at an advanced stage, ovarian cancer has a high mortality rate being the gynecological cancer with the lowest average 5-year survival rate (46%) (Figure 1A) [1-7]. An important fact to consider about ovarian cancer, as well as its low survival rate, is the current treatments low efficiency; current treatments become ineffective after a few cycles of administration, with a risk of recurrence estimated at 80-85% [4, 8].

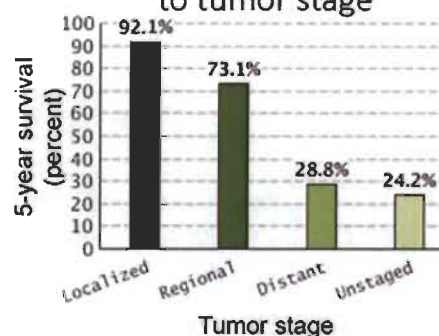
Uterine cancer is the most frequent gynecological cancer and is frequently diagnosed early leading to a better outcome for the patient [1-5, 9]. Most of the cancers occurring in the uterus begin in the endometrium (> 95%) and this subtype is called endometrial cancer [5]. Considering this fact, endometrial cancer will be mainly discussed here. Although the prognosis of endometrial cancer is good, more than 25% of patients are diagnosed at an advanced stage (Stage > 1) with an invasive primary tumor and subsequently accompanied by metastases [10]. One considerable hurdle for these patients diagnosed with an advanced/recurrent cancer, even though they are treated with aggressive therapies, is that the survival rate is very low (< 20%) (Figure 1B) [5].

In the last decades, treatments for gynecological cancers have not much advanced beyond the platinum-based chemotherapy when compared with many other types of cancer; nor has the patient survival and cure rates increased much (Figure 1) [5, 6, 11, 12]. Reasons for the low survival outcome of gynecological cancers diagnosed lately/recurrent are the resistance to chemotherapy acquired by cancer cells and the non-selectivity of current treatments. This problematic lead to highly damageable side effects for the patients, thus limiting the use of drugs and how they are administered. Because of the inefficacy of the current chemotherapeutic regimens, more research and improvement of the current treatments are required to overcome this challenge.

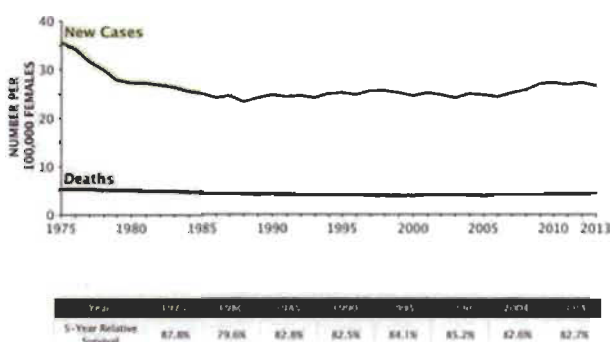
A. Ovarian cancer



5-year survival related to tumor stage



B. Endometrial cancer



5-year survival related to tumor stage

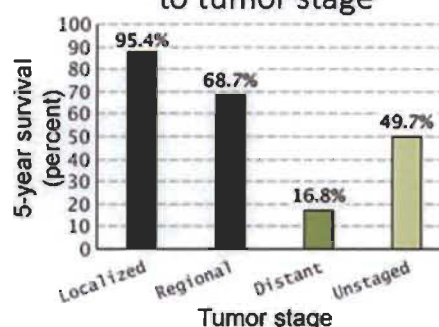


Figure 1: Ovarian and endometrial cancers statistics.

A. Ovarian and B. endometrial cancers statistics for new cases, deaths and 5-year survival). Data for new cases and deaths are represented by the number per 100 000 females (1975 to 2013), the 5-year survival rate (%) is available for all diagnosed patients (1975-2008) in a table or specifically sorted by tumor stage (2006-2012) in a histogram. The tumor stage is a factor related the chemoresistance. Data were obtained from seer.cancer.gov.

In this manuscript, we will review the current treatments, their limitations against gynecological cancers and the molecular pathways responsible for the acquired chemoresistance thus leading to the current use of targeted therapies in clinical trials to increase the efficiency of treatments, which prevents recurrent cancers and increases survival of women suffering from these types of cancers.

Current treatments

Current treatments for both ovarian and endometrial cancers are known for being very similar. Initially, surgery is conducted in order to remove the vast majority of the tumor localized in its corresponding organ. Concerning advanced cancers, the remaining mass following the initial surgery is a good prognostic for survival. If needed, further treatments need to be administered to completely eliminate the tumor left and its distant metastases depending on the stage of the cancer [5, 13-15].

Radiation and hormone therapies are two potential methods of elimination of the remaining cancer cells, which can be used in both types of gynecological cancers. These two types of treatment are rarely used for ovarian and endometrial cancers when compared with breast tumors.

Concerning radiation, this method is rarely used as a treatment for ovarian cancer, considering their frequently late diagnosis, but is instead used as an option for recurrent cases, patients with high-risk of surgical mortality or those who cannot tolerate chemotherapeutic compounds. In the case of endometrial cancer, radiation is more frequently used considering the early diagnosis of the tumor; however, it is not as much used for advanced stages cancers [5, 14, 15].

Concerning hormonal therapies, a majority still expresses the estrogen receptors (mainly ER α) and progesterone receptor and those requiring hormones for growth can be classified as hormone dependent. Interestingly, hormone therapy has been used mainly to treat breast cancers and their effects are well known, but are sometimes prescribed in gynecological cancers despite the variability of their response rates [16, 17]. Not unlike breast cancer, mostly in the late stages, gynecological cancers can have mutations/inactivation leading to a loss of the expression of these hormone receptors or not responding to hormonal signals, becoming hormone-independent, thus making hormonal therapies ineffective [16, 18-21]. The different treatment administered for hormone therapy in gynecological cancers still expressing the ER consists of progestin, Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists and aromatase inhibitors

[5, 14-17, 22-24]. The response rate of these types of treatment is moderate and they are mainly used for endometrial cancers expressing the ER. Notably, the success rate of hormonal therapy in gynecological cancers needs to be further investigated considering that many factors (receptor status, cancer stage, chemoresistance status, heterogeneity of the patients and drugs combination) can influence the efficiency of these treatments and were not always considered when used as a treatment in past studies [16, 17].

Lastly, the most frequently used method to eliminate the remaining gynecological cancer cells, widespread in the patient, is the chemotherapy approach. The principle of this method is to use anti-cancer drugs which generally target cells undergoing rapid division, a characteristic of cancer cells. The different chemotherapeutic drugs used for gynecological cancer consist mainly of platinum compounds (cisplatin or carboplatin), taxanes (paclitaxel or docetaxel) and doxorubicin [5, 10, 25]. Platinum compound mechanism consists of damaging DNA by forming platinum-DNA adducts leading to the inhibition of DNA replication and leading cells to apoptosis [26]. Taxanes mechanism is different and instead target microtubule polymerization, inhibiting mitosis and thus inducing apoptosis [27, 28]. Doxorubicin is an anthracycline compound which intercalate DNA, inhibits topoisomerase-II by stabilizing its complex and generate free radicals leading to cell death [29]. Some other chemotherapeutics drugs can also be helpful and used in gynecological cancers including cyclophosphamide (an alkylating agent), gemcitabine (a nucleoside analog), topotecan (a topoisomerase-I inhibitor) or vinorelbine (an inhibitor of mitosis through interaction with tubulin). These agents are mostly used in combination and the platinum-paclitaxel and platinum-doxorubicin combos have been designated as first-line treatment for gynecological cancers [5, 10, 30]. The response rate of these combinations is very good, being around 70% for ovarian cancer and 45% for endometrial cancer [5, 30]. However, a very frequent occurrence in gynecological cancers is that most of the patients relapse and the arising tumor becomes resistant to chemotherapeutic compounds, leading to a low survival rate [31, 32]. Overall, chemotherapy is a very efficient initial treatment but the recurrence of gynecological cancers and their acquisition of chemoresistance is a huge hurdle to overcome.

Chemoresistance in gynecological cancers

Chemoresistance is presumably responsible for causing treatment failure and mortality for more than 90% of patients with cancer of advanced stage [13, 33]. This major hurdle, having an impact on patient survival, can be acquired via diverse modifications including the increase of efflux pumps to reject drugs and a decrease in cell division limiting the effect of chemotherapeutic compounds targeting mitosis arrest. At the molecular level, genes can be modified to influence the efficiency of repair proteins and diverse survival pathways while decreasing the level of different tumor suppressor. The following will discuss about the literature of known mechanisms of chemoresistance exclusively in gynecological cancers. A better understanding of these mechanisms will allow more efficient therapies to be administered to patients in the clinic.

Efflux pumps

Overexpression of the multidrug-resistance gene MDR1 is associated with acquisition of chemoresistance, particularly against paclitaxel. This acquisition is explained by the increased level of the efflux pump P-glycoprotein (Pgp), thus eliminating more efficiently the presence of chemotherapeutic drugs in both endometrial and ovarian cancers [34-37]. Resistance to platinum compounds has also been related to increased levels of copper pumps [38-42]; indeed, it has been demonstrated that cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines have acquired, in part, their resistance via an increased protein level of copper-transporting ATPases (ATP7A and ATP7B) [38, 42, 43]. In a patient-derived gene expression profile, ATP7B has also been associated as a chemoresistance marker in ovarian carcinomas treated with cisplatin [39]. Concerning endometrial cancer, copper-transporter ATP7B overexpression in endometrial carcinoma is also related to cisplatin resistance and indicate an unfavorable outcome for patients [40].

DNA repair mechanisms

For a long time, mechanisms of DNA repair have been associated with chemoresistance in ovarian cancers [44-47].

Nucleotide excision repair process (NER)

One known mechanism responsible for the repair of platinum DNA adducts in ovarian cancer is the nucleotide excision repair process (NER) [48-51]. NER is a multi-step process implicating various proteins to remove and replace a sequence of nucleotides on a DNA strand. Enhanced NER is associated with increased resistance in ovarian cancer. The protein ERCC1, forming an endonuclease complex with XPF and involved in the 5' incision of DNA adducts, has been reported to be correlated in the degree of sensitivity to platinum compounds in ovarian cancers [48-52]. XPF and XPG proteins, involved in NER process, are also reported to have an impact on platinum sensitivity of ovarian cancers [53]. On the contrary, very little association have been drawn between endometrial cancer and NER.

Mismatch repair (MMR)

Another repair mechanism, mismatch repair (MMR), is also known to be associated with chemoresistance mechanisms of ovarian cancers. The principle of MMR is to recognize a mismatched or unmatched DNA base, repair and reassemble DNA correctly [54]. When platinum compounds are administered, the MMR process is unable to complete repairs of mismatched DNA, thus leading to apoptosis [55]. It is suggested that a MMR deficiency in ovarian cancers, mainly due to the loss of the MLH1 gene, allows the cells to continue proliferating, even in presence of cisplatin or carboplatin, thus enabling chemoresistance through the failure to enter apoptosis following exposure to chemotherapy [56-61]. Conversely, other studies seems to report that there is no significant association between MMR deficiency and resistance to platinum compounds [62, 63]. They suggest that the limited quantity of samples studied and the presence of other potential resistance mechanisms could explain the absence of a significant

association with MMR and platinum resistance. Very little has been studied concerning chemoresistance and MMR deficiency in endometrial cancers. Few studies report the acquisition of chemoresistance associated with MMR via the use of HEC59 endometrial cancer cell line [60, 64, 65]. Interestingly, endometrial cancer frequently has MMR deficiency associated with microsatellite instability which could have an impact on the efficiency of platinum compounds [66-69].

Homologous recombination (BRCA1/2 genes)

BRCA1 and BRCA2 are a known genes involved in an error-free repair mechanism via homologous recombination for double strand DNA breaks [70]. These genes are well known for increasing risks of breast as well as ovarian cancers when mutated and transmitted through by heredity [71-75]. Interestingly, mutations on BRCA1 and BRCA2 genes have also been associated with an increased risk of endometrial cancer, but this relation was observed more frequently in association with tamoxifen-treated women's [76-78]. Downregulation of BRCA1 is frequent (> 72%) in high-grade ovarian cancers [79, 80]. It was also observed with BRCA genes that they are involved in response to various chemotherapeutic drugs and consequently associated to chemoresistance [80]. Downregulation of BRCA1 in ovarian cancer provides sensitivity to platinum compounds while providing resistance to taxane drugs [80-85]. BRCA2 has also been associated with sensitivity to platinum compounds when mutated/downregulated in ovarian cancer [85, 86].

Survival pathways

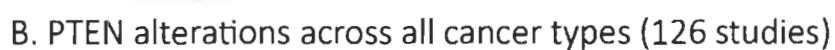
Survival pathways play a major role in mechanisms of chemoresistance of gynecological cancers.

PI3K/AKT pathway

The PI3K/AKT survival pathway is one major signaling cascade, which is frequently mutated/hyperactivated at different levels in both ovarian and endometrial

cancers [12, 87-91]. Using TCGA datasets, it is possible to observe that major components of the PI3K/AKT pathway present a high frequency of alteration in gynecological cancers (> 40% in ovaries; > 90% in the uterus) (Figure 2A) [92, 93]. These alterations of the PI3K pathway are involved in the tumorigenesis of gynecological tumors but also their chemoresistance profile. PI3K is a kinase located on the cellular membrane, stimulated by growth hormones and responsible for phosphorylating PIP2 to PIP3. Once phosphorylated, PIP3 can activate downstream targets of the PI3K pathway such as AKT and PDK1 kinases, thus activating various downstream targets involved in protein synthesis and cell growth. PI3K and its subunits (mainly PIK3CA) are known for being highly mutated and responsible for increasing chemoresistance in ovarian cancer [94, 95]. Downstream of PI3K, AKT isoforms (AKT1-2-3) have been reported to also increase the chemoresistance against platinum drugs, taxane and doxorubicin, in both ovarian and endometrial cancers [95-104]. It has been demonstrated that only AKT1 and AKT2 isoforms are responsible for the acquisition of resistance against cisplatin and paclitaxel while all three isoforms of AKT increase doxorubicin resistance in endometrial cancer cells [98]. Concerning ovarian cancer, it has been demonstrated that AKT2 expression increase resistance to cisplatin [105]. PTEN is a tumor suppressor lipid phosphatase acting negatively on the PI3K pathway via its ability to dephosphorylate PIP3 to PIP2, thus controlling the activity of PI3K downstream targets. A very interesting fact concerning PTEN is the high percentage of alterations observed in endometrial cancers (> 65%), which is astonishing when compared to other cancers types (Figure 2B) [92]. Observations have been made concerning this protein, PTEN, and chemoresistance status of gynecological cancers. Indeed, downregulation/inactivity of PTEN (frequently mutated in the endometrium) leads to an increase of resistance against platinum compounds [91, 94, 106-110]. XIAP, an inhibitor of apoptosis, is involved in PI3K/AKT pathway to protect cells by acting as a promoter of AKT activity via its interaction with PTEN as an E3 ubiquitin ligase, thus regulating negatively PTEN protein level and its cytosolic/nuclear localization [100, 111, 112]. XIAP is also involved in the chemoresistance against cisplatin (endometrial and ovarian), taxane (ovarian) and doxorubicin (endometrial) for both cancers [97, 100, 113-118]. p53 is another well-known tumor suppressor involved in the development of

resistance observed in relation to the PI3K/AKT pathway in gynecological cancers. Indeed, it has been demonstrated that p53 inhibits PI3K activity, and consequently AKT, by binding on one of PIK3CA gene promoters thus inhibiting its transcription in ovarian cancer [119]. AKT can also, inversely, inhibit p53 activation through MDM2 and thus inhibit mitochondrial p53-dependent apoptosis [101, 102, 120]. Wild-type p53 is involved in the chemoresistance attributed to PI3K/AKT and XIAP in ovarian cancer. To overcome this resistance via the inhibition of PI3K pathway components, the presence of wild-type p53 is required for an optimal sensitization of the cancer cells [99, 101, 102, 118, 120].



A. A histogram representing the frequency of alterations for genes from the PI3K pathway (PIK3CA, PIK3R1, PTEN, AKT1-2-3), specifically in

ovarian and uterine cancers from 6 studies. B.-C. The histograms representing the frequency of alterations for B. PTEN or C. p53 in various cancer types from 126 studies. Only the first 30 studies are shown to first simplify the figure, but also to indicate the importance of these alterations in ovarian and uterine cancers. The studies shown in the histograms were sorted from those with the highest to the lowest frequency of alterations for the associated genes. Data were obtained using www.cbioportal.org database.

MAPK pathway

Another survival pathway to consider in gynecological cancers is the MAPK pathway. MAPK pathway consists of cascades of protein kinases, which can be activated by various stimuli including growth factors or genotoxic stress. Following stimulation, MAPK play a major role for cell growth, survival and/or apoptosis. An important aspect of the MAPK pathway is the fact that upstream of one cascade lies the RAS oncogene, frequently deregulated in various cancers including those affecting gynecological tissues [121]. The activation of the MAPK pathway is divided in various cascades, the main ones being the ERK1/ERK2, JNK/SAPK and p-38 MAPK [121, 122]. RAS activates RAF, subsequently leading to the ERK1/ERK2 cascade, which is stimulated mainly by mitogenic factors and is associated to cell division and survival. Chemotherapeutic compounds can also stimulate and increase ERK1/ERK2 phosphorylation allowing them to play a role of balance in apoptosis and cell survival [123, 124]. JNK and p-38 MAPK cascades are stimulated differently, via genotoxic stress including chemotherapeutics compounds, and play roles in cell growth arrest, inflammation and apoptosis [122, 123]. In ovarian cancer, decreased MAPK activity by the JNK and p-38 cascades has been associated with platinum-resistant cancer models [125, 126]. On the contrary, ERK1/ERK2 are associated to survival and cell growth and their inhibition by the protein MKP3 sensitized ovarian cancer cells to cisplatin [127]. MAPK and PI3K pathways are interconnected and can influence each other [128]. In fact, the chemoresistance associated with AKT2 in ovarian cancer is related to the inability of cisplatin to activate JNK and p-38 to induce apoptosis. Indeed, AKT2 is responsible for inhibiting ASK1 and its downstream targets including JNK and p-38 [105]. Concerning endometrial cancer, MAPK and chemoresistance, not much has been

studied so far but we can hypothesize that the effect observed would be similar to those reported in ovarian cancer models.

HER family

Another family of oncogenes to consider in gynecological cancers is the epidermal growth factor receptors EGFR (HER-1) and ErbB2 (HER-2), which are known for being cell-surface receptors tyrosine kinases being structurally similar. Indeed, EGFR and ErbB2 are known for being overexpressed in advanced stages of both ovarian and endometrial cancers and being markers of poor prognosis [129-136]. Both EGFR and ErbB2 receptors can activate various signaling pathways, including both the PI3K and MAPK (via RAS-RAF oncogenes) which provide survival signaling, cell growth to tumors and contribute to the overall acquisition of chemoresistance in gynecological cancers. Interestingly, it has been demonstrated that EGFR and ErbB2 overexpression, in association with the activation of PI3K and MAPK signaling pathways, increase resistance to cisplatin and paclitaxel in gynecological cancers [137-142]. It is worth noting that the effect of EGFR and ErbB2 on chemoresistance and prognosis is controversial in the literature. Some studies indicate no association with these oncogenes, but it is overall still worth considering for cancer research.

Estrogen receptors

An important characteristic unique to gynecological cancers is the high presence of estrogen and its corresponding receptors (ER α/β), thus promoting cell proliferation and tumorigenesis [143]. Estrogen binds to its receptor, dimerize, allowing its translocation from the cytoplasm to the nucleus, then bind on ERE (DNA Estrogen Response Element) and act as a transcription factor [144, 145]. Estrogen can also act in a non-genomic manner by binding with estrogen receptors, located on the plasma membrane, which then interact with other receptors such as IGF-1R and ErbB2 [146, 147]. Estrogen can also directly bind on a G-coupled protein, the GPR30 receptor, independently of the estrogen receptors [147]. These non-genomic interactions of

estrogen induce activity for both the PI3K and MAPK pathways, pathways involved in the chemoresistance of gynecological cancer [146, 147]. It appears important to note that estrogen is strongly associated with chemoresistance mechanisms in both endometrial and ovarian cancers [148-150]. It has been demonstrated in endometrial cancer cells that estrogen can positively activate GRP78, thus preventing apoptosis and providing chemoresistance to both paclitaxel and cisplatin [149]. Another study demonstrated that estrogen can provide chemoresistance to paclitaxel treatment in ovarian cancer cells via the phosphorylation of AKT-ASK1 complex [150]. The use of hormonal therapy is much more prevalent in the context of breast cancer; consequently, more data is available with this model. Results show that higher levels of ER α in breast cancer are correlated with a chemoresistance status against cisplatin, paclitaxel and doxorubicin [151].

Tumour suppressors

Up to now, survival pathways were discussed in relation to chemoresistance of gynecological cancers, however, tumor suppressors also play an important role in these mechanisms.

p53

A largely studied tumor suppressor in all cancers is p53. Briefly, p53 is a tumor suppressor protein who has various roles of protection against cancer including DNA repair, cell growth arrest and apoptosis which gave this protein the nickname “guardian of the genome”. p53 a tetramer tightly regulated by MDM2 and can be stabilized/activated upon diverse stimuli including oncogene activation, DNA damage, starvation or hypoxia. p53 can act as a transcription factor and is involved in the regulation of many genes from different mechanisms to keep the cell in good condition [152, 153]. Nonetheless, p53 is highly mutated in gynecological cancers (> 90% in ovaries and 25-85% in the endometrium) being an important factor for tumorigenesis and cancer initiation (Figure 2C) [92, 152, 154]. Also noteworthy, ovarian and endometrial cancers frequently overexpress p53, WT or mutant [154-156]. Considering

the importance of p53 apoptosis pathway, it appears clear that this protein is involved in gynecological cancers response to chemotherapy. As previously stated, p53 is involved in the chemoresistance associated to the PI3K pathway alteration in gynecological cancers [99, 101, 102, 118-120]. Epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process of tumor invasion and metastasis, is related to the inhibition of p53-dependent apoptosis mechanisms and involved in the resistance of ovarian cancer to paclitaxel and radiation [157]. p53 alterations are also associated, via many different mechanisms, to the resistance of platinum compounds in ovarian [158-165] and in endometrial cancers [166, 167]. p53 inactivation is associated with an increase of the mitochondrial BCL-2, an anti-apoptotic protein, and it has been demonstrated that upregulation of BCL-2 was responsible for the acquired chemoresistance to platinum compounds in gynecological cancers [168, 169]. Overall, p53 is easily the most widely studied tumor suppressor in gynecological malignancies and its importance in these types of cancer is irrefutable.

Prostate apoptosis response-4 (Par-4)

Finally, an interesting tumor suppressor for therapies, and also related to chemoresistance, has recently taken interest in the scientific community and is named Prostate apoptosis response 4 (Par-4). Par-4 is a very interesting protein because of its unique ability to induce apoptosis in a cancer-selective manner [170, 171]. Indeed, this unique mechanism of selectivity has been demonstrated in various models and also seemed to be involved in chemoresistance (including Tamoxifen, taxane and platinum agents) and tumorigenesis mechanisms [172-176]. As previously described, gynecological tissues are known for being hormone-dependent and, interestingly, it has been demonstrated that estrogen can downregulate Par-4 and thus could be involved in chemoresistance-associated mechanisms [177, 178]. A study demonstrated that Par-4 increase the apoptotic response to paclitaxel treatment in ovarian cancer cells [179]. Our laboratory recently published a manuscript indicating that the cleaved form of Par-4 was highly reduced/absent in chemoresistant gynecological cancers indicating a potential venue for this protein to overcome this hurdle. This inhibition was post-translational and regulated by the PI3K and MAPK pathways, previously described as

being involved in chemoresistance mechanisms [178]. Except these studies, the role of Par-4 on chemoresistance in gynecological cancer has received very little attention. We do believe that further studies of this promising tumor suppressor would be a very interesting avenue for gynecological cancer therapeutics.

A table summarizing the chemoresistance mechanisms discussed is available (Table 1).

Table 1: Chemoresistance mechanisms in ovarian and endometrial cancers

Mechanism	Tissue	Resistance	Comments	Reference
Efflux pumps				
↑ P-glycoprotein	Ovary and endometrium	Taxanes and doxorubicin		[34-37]
↑ ATP7A/ATP7B	Ovary and endometrium	Platinum		[38-42]
DNA Repair mechanisms				
↑ NER	Ovary	Platinum		[48-53]
↓ MMR	Ovary and endometrium	Platinum		[56-61, 64, 65]
↓ BRCA1	Ovary	Taxane	provides sensitivity to platinum compounds	[80-85]
↓ BRCA2	Ovary	-	provides sensitivity to platinum compounds	[85, 86]
Signaling pathways				
↑ PI3K	Ovary	Platinum		[94, 95]
↑ AKT	Ovary and endometrium	Platinum, taxanes and doxorubicin		[95-105, 120, 150]
↓ PTEN	Ovary and endometrium	Platinum		[91, 94, 106-110]
↑ XIAP	Ovary and endometrium	Platinum, taxanes and doxorubicin	XIAP induces chemoresistance against cisplatin (endometrial and ovarian), taxane (ovarian) and doxorubicin (endometrial)	[97, 100, 113-118]

↓ JNK	Ovary	Platinum		[105, 125]
↓ p-38	Ovary	Platinum		[105, 125, 126]
↑ ERK1/2	Ovary	Platinum		[127]
↑ EGFR	Ovary	Taxanes		[141]
↑ ErbB2	Ovary and endometrium	Platinum and taxanes		[137-140, 142]
↑ GRP78	Endometrium	Platinum and taxanes	Estrogen-regulated	[149]
↑ ASK1	Endometrium	Taxane	Estrogen-regulated	[150]
↑ ER α	Breast	Platinum, taxanes and doxorubicin		[151]
↓/mut p53	Ovary and endometrium	Platinum, taxanes and radiation	Resistance to radiation have been observed in ovarian cancer only	[99, 101, 102, 118-120, 157-167]
↑ BCL-2	Ovary and endometrium	Platinum		[168, 169]
↓ PAR-4	Ovary	Taxane		[179]

The table summarizes the mechanisms of chemoresistance observed in ovarian and endometrial cancers. The different column indicates the mechanism and its regulation, the tissues concerned, the drug resistance, additional comments as well as the bibliographical references.

Targeted therapies to overcome chemoresistance

Considering current therapies are not sufficient to overcome advanced gynecological cancers, new therapies are still being researched by the scientific community. Targeted therapy is a new approach of treatment that uses compounds which aim, in a specific manner, the cancer cells by attacking its oncogenic mechanisms. These mechanisms are also often linked with their chemoresistance status, so targeting these could sensitize cancer cells to standard chemotherapy. This section will discuss of the current targets and their associated drugs currently under study, specifically in gynecological cancers. A figure summarizing the previous mechanisms/pathways involved in chemoresistance as well as the molecules targeting these is available to ease

the reading (Figure 3). A table is also available to summarize the different clinical trials discussed in this section (Supplementary Table 1).

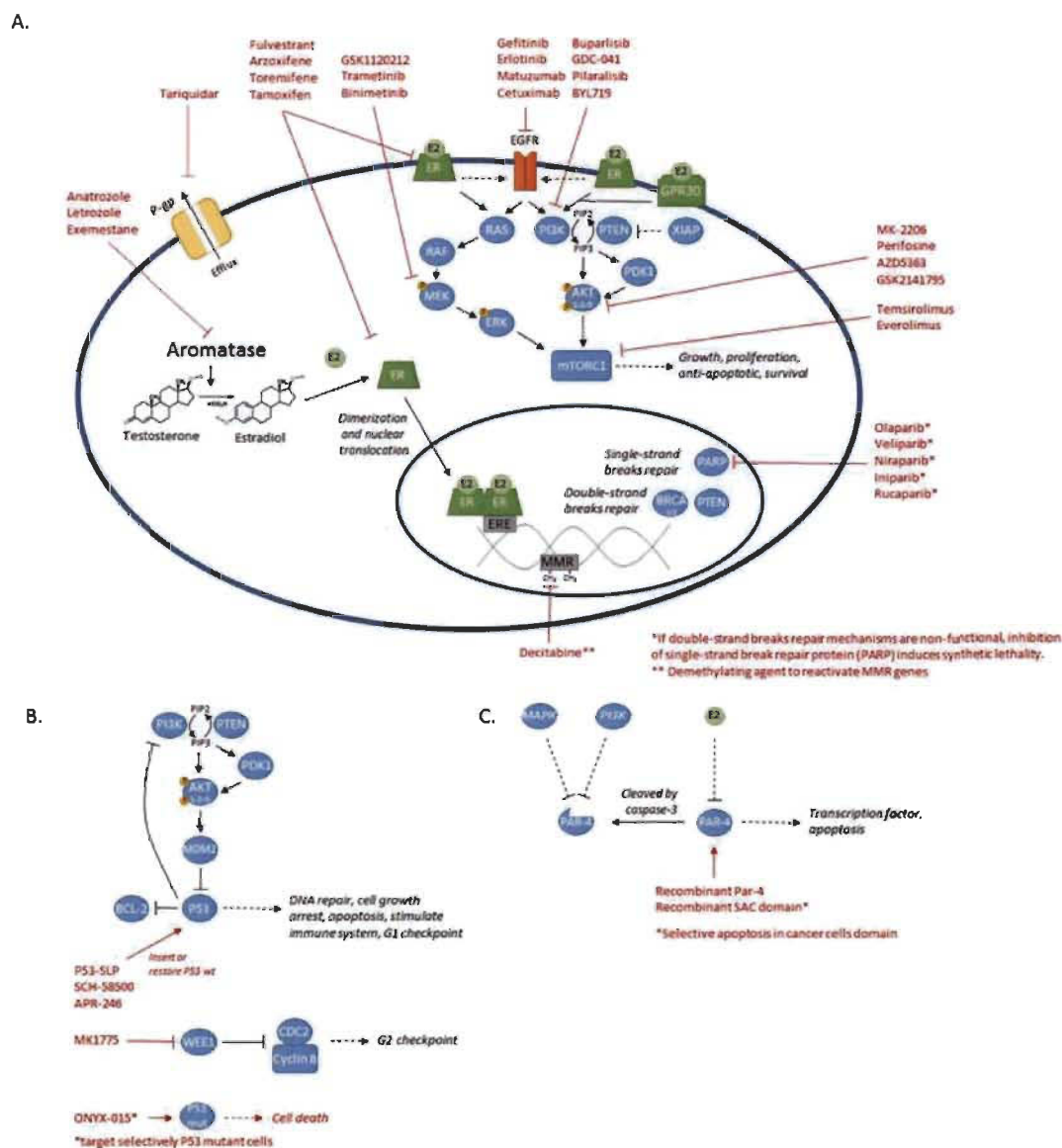


Figure 3: Summary of the diverse mechanisms/pathways involved in chemoresistance and their associated targeted treatments.

A. Schematic representing most of the mechanisms/pathways (P-gp, MMR, PARP, aromatase, ER, EGFR, PI3K/AKT, MAPK, mTOR) discussed and their associated therapeutics molecules. B. Schematic of the p53 mechanisms discussed and the diverse targeted therapies previously tested on ovarian and endometrial cancers. C. Schematic of the Par-4 mechanisms and the targeted therapy approach suggested using recombinant proteins (Par-4 or SAC domain only) on cancer cells.

Targeting efflux pumps

The p-Glycoprotein, involved in chemoresistance mechanisms, is a target of interest in cancers and some drugs have been tested under clinical trials, specifically on gynecological tissues. First- (verapamil; cyclosporine) and second-generation (PSC833; VX-710) have been developed but the results in clinical trials were disappointing considering their low potency, the low specificity and the increase of toxicity when combined with other chemotherapeutic drugs such as paclitaxel in ovarian cancer patients [180-182].

Tariquidar (XR9576) is a third-generation Pgp inhibitor, showing increased specificity and potency to inhibit the drug efflux mediated by Pgp. In contrast to second-generation Pgp inhibitors, Tariquidar, combined with docetaxel, showed minimal toxicity, less systemic pharmacokinetic interaction and was well tolerated by patients (including ovarian and cervical cancers) [183]. Interestingly, both in vitro and in vivo experiments indicated that Tariquidar can completely reverse the resistance of ovarian cancer cells against doxorubicin and paclitaxel [184]. Ex vivo experiments using ovarian tumors biopsies also demonstrated that combination of Tariquidar with either doxorubicin or paclitaxel increased the efficiency of these standards chemotherapeutic treatments by decreasing the chemoresistance status [185]. Further studies in clinical trials are needed to determine if the effect observed on chemoresistance and increase of efficiency is reproducible the toxicity of the compound on various types of cancer.

Targeting repair mechanisms

PARP inhibitors

As previously introduced, BRCA mutations are frequent and involved in the chemoresistance mechanisms of gynecological cancers. One idea of therapy that has been developed involves the protein poly-ADP ribose polymerase (PARP), responsible for DNA repair of single strand break. The principle of this therapy is to inhibit PARP and thus reduce the ability of the cell to repair single strand breaks; these accumulated

breaks will eventually lead to double strand breaks during cell DNA replication. Normal cells will be able to repair these double strand breaks, in part through homologous recombination repair, however, BRCA-1/2 deficient cancer cells will not and thus will undergo chromosomal instability and apoptosis. This is because the BRCA-1/2 genes, when mutated, induces a defect in homologous recombination, and pairing this with PARP inhibition allow synthetic lethality of cancer cells [186]. BRCA-1/2 deficiency is not required when using PARP inhibitors but they will be a lot more efficient with patients bearing this mutation. Some inhibitors of PARP previously used in clinical trials for gynecological cancers are the following: Olaparib, Veliparib, Niraparib, Iniparib and Rucaparib.

Olaparib has been widely studied in ovarian cancer disease. Indeed, many phase II trials have demonstrated an important improvement, using this PARP inhibitor as monotherapy, on the progression-free survival (PFS) and good response rate for women with advanced ovarian cancer [187-190]. The first study tested Olaparib on 33 patients with advanced and recurrent ovarian cancer and 11 of these had an objective response rate (the sum of partial responses (PR) and complete responses (CR); ORR) [187]. The second study was large scale with 265 platinum-sensitive relapsed patients randomized in 2 groups (Olaparib versus placebo). The results obtained were significant with a median progression-free survival of 8.4 months versus 4.8 months for the Olaparib-treated versus placebo-treated patients respectively. Regardless of the BRCA status, patients treated with Olaparib had a decreased risk of progression on the long term [188]. Another trial tested Olaparib in 63 patients with advanced ovarian carcinoma. The findings were very interesting: 7 of the 17 (41%) patients with BCRA1/2 mutations had an ORR to Olaparib while 11 of the 46 (24%) patient without mutations also had an ORR [189]. These results demonstrated that PARP inhibition can also be efficient in absence of BRCA mutations and that other proteins might be involved in the homologous recombination of cancer cells. A phase II trial also tested Olaparib in 193 women with advanced platinum-resistant ovarian cancer and 60 obtained an ORR (31%) demonstrating again a clinical benefit similar to previous trials with chemoresistant patients [190]. Further studies tested Olaparib in combination

with chemotherapy in ovarian cancers. A phase I/Ib study tested Olaparib in combination with carboplatin on 37 women with ovarian cancer and BRCA mutations. Their findings were 1 CR and 15 PR, but also found out that FOXO3a expression, a transcription factor negatively regulated by AKT and involved in the regulation of genes in favor of apoptosis, may be predictive of the response to the treatment [191, 192]. Another phase II trial tested Olaparib in combination with both paclitaxel and carboplatin in 162 women with recurrent and platinum-sensitive ovarian cancer. The progression-free survival was significantly improved in the combination group (12.2 months) versus the chemotherapy alone (9.6 months). Very interestingly, only 41 of 107 measurable patients had BRCA mutations, demonstrating again, a clinical benefit of PARP inhibitors on patients without BRCA mutations [193]. A phase II trial tested Olaparib in combination with cediranib, an anti-angiogenic agent, in 90 patients with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. Women treated with Olaparib alone had a median progressive-free survival of 9 months while those who received the combination had median of 17.7 months [194]. The combination of these drugs (Olaparib and cediranib) improved the survival of patients greatly and studies further testing this combination are currently going on.

The other clinical PARP inhibitors also underwent a limited number of clinical trials in ovarian cancer. Veliparib was tested in a phase II trial as a single agent in ovarian cancer patients with BRCA mutations either platinum-sensitive (20 patients) or platinum-resistant (30 patients). The ORR of all patients was of 26% (2 CR and 11 PR) and when compared with their platinum-sensitivity, the ORR was of 20% for the resistant group versus 35% for the sensitive group [195]. A second study also tested Veliparib in combination with cyclophosphamide, an alkylating agent, in a study group of 72 women with BRCA mutated ovarian cancer. No significant results were obtained from these experiments and the addition of Veliparib did not improve the response rate nor the PFS [196]. Another PARP inhibitor selective for PARP-1 and PARP-2, Niraparib, went under a phase I study (42 ovarian/peritoneal cancer patients) and the preliminaries antitumor results were 8 PR and 2 SD among the 20 BRCA mutations carrier patients while being 5 PR and 3 SD among the 22 WT BRCA patients.

Platinum sensitivity of patients was also considered when analyzing the response rate. No significant difference was observed in the CBR from BRCA mutation carrier (50% for sensitive and 50% for resistant), however, CBR was twice lower in BRCA WT platinum-resistant patients (67% for sensitive versus 32% for resistant) [197]. Iniparib, an additional PARP inhibitor, had a very promising phase II trial involving 17 platinum-sensitive patients with recurrent ovarian cancer and was used in combination with carboplatin and gemcitabine, a nucleoside analog. The ORR of patients treated with carboplatin and gemcitabine alone is normally around 47% but adding Iniparib to the combination significantly increased the ORR to 71%. Additionally, the ORR did not seem to be associated with the BRCA status of the patients [198]. Iniparib, combined with paclitaxel and carboplatin, have also been tested in a group of 17 women with advanced or recurrent uterine carcinosarcoma (displaying histological features from both endometrium and the outer layer of the uterus). The results obtained were limited considering that only 4 patients responded to the treatment [199]. Still, PARP1 overexpression is present in uterine carcinomas and studies with PARP inhibitors should not be neglected because of the failure of Iniparib in those latter studies.

Finally, Rucaparib is another PARP1/2 inhibitor undergoing clinical studies in ovarian cancer. Rucaparib have been initially tested in a pre-clinical study with 39 ovarian cancer cell lines characterized for BCRA1/2, PTEN and their chemosensitivity to platinum compounds. Responses to platinum chemotherapy was associated with Rucaparib responses and combining the PARP inhibitor with topotecan, carboplatin, doxorubicin, paclitaxel or gemcitabine provided additive or synergistic effects resulting in increased apoptosis [200]. Phase I trial has been done using Rucaparib and 29 patients with advanced solid tumors including ovarian/peritoneal cancer (7 patients). Preliminary results were very interesting with 2 PR and 10 SD among the various doses of Rucaparib tested. The most interesting part of this trial is the efficiency observed in ovarian/peritoneal cancer patients, which account for half of the response rates obtained and a CBR of 86% (1 PR and 5 SD) [201]. A phase II trial has also been done testing Rucaparib in women with BRCA mutated advanced breast and ovarian cancer. 22 of the 27 patients tested for oral Rucaparib were ovarian cancer

patients but the ORR with the different doses administered was only 15%. However, 12 of the 13 patients who received continuously Rucaparib achieved either CR, PR or SD for more than 12 weeks [202].

Even if BRCA mutations can also occur in endometrial cancers, they are sporadic and not much have been tested concerning these mutations through the use of PARP inhibitors. An aspect of endometrial cancers is their high mutation rates of PTEN (Figure 2B), which also has a phosphatase-independent role in genomic stability and homologous recombination [203]. Considering the repair role of PTEN for double strand break, Olaparib have been tested in endometrial cancers with this protein of interest (PTEN). Preclinical studies have been performed in endometrial cancer cells and one of these demonstrated, using 16 cell lines, that the PARP inhibitor Olaparib was efficient but not necessarily associated with the PTEN status of the cell line [204]. Another pre-clinical trial, however, demonstrated both in vitro and in vivo that Olaparib was efficient and the effect was related to the PTEN status of endometrial cancer cells [205]. A clinical case has also been done with Olaparib and a 58-year-old woman with metastatic and recurrent endometrial cancer. After treatment with the PARP inhibitor Olaparib, a significant reduction of brain metastases was observed as well as improvement of tumor-associated symptoms. This clinical case report, after a biopsy, also mention the absence of BRCA mutations but a loss of PTEN instead, thus indicating that PTEN status should be considered for administration of PARP inhibitors against gynecological cancers [206]. Considering these preliminary results, endometrial and PARP inhibitors should be further studied.

An important aspect of PARP inhibitors is their low toxicity for patients, a very desirable effect for cancer treatment and possible combination with other chemotherapeutic compounds. In addition, the platinum sensitivity of the patients was a good marker of efficiency when using different PARP inhibitors. Finally, patient who did not have BRCA mutations also had a clinical benefit, indicating that other biomarkers should be studied for PARP inhibitors efficiency, such as the protein PTEN which also has a role in genomic stability and homologous recombination. Further trials

are thus required for measuring the efficiency of PARP inhibitors, which currently look like a very promising therapy to use in the context of advanced gynecological cancers.

Nucleotide excision repair (NER)

Nucleotide excision repair (NER) is also involved in the chemoresistance of gynecological cancer and therapies targeting this mechanism are also emerging. ERCC1 is a potential target involved in this repair mechanism and involved in platinum resistance. However no enzymatic activity related to this protein (ERCC1) is known, making it hard to target. Though, novel small molecules have been developed targeting the XPA-ERCC1 complex and thus reestablishing platinum sensitivity [207].

Mismatch repair (MMR)

Mismatch repair deficiency is known for being involved in cancer development as well as chemoresistance, and some research is currently going on to target this mechanism and provoke synthetic lethality, as previously discussed with PARP inhibitors and BRCA genes. The principle of synthetic lethality is based on the loss of two genes (one from the inhibitor and one from mutation) from the same pathway leading to cancer cell death while normal cells only lose one of these (from the inhibitor) and still survive. Potential targets have been identified to be targeted along with MMR deficiency: dihydrofolate reductase (DHFR), DNA polymerase β (POL β), DNA polymerase γ (POL γ) and PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), all causing accumulation of oxidative DNA damage when inhibited and combined with MMR deficiency (MSH1-2-6) [208-210]. However, synthetic lethality has not yet been tested in patients with advanced ovarian tumors [211]. Hypermethylation of hMLH1 gene is in part responsible for the MMR deficiency observed in ovarian cancer. Using Decitabine, a demethylating agent, on chemoeresistant/MLH1 silenced ovarian cancer xenografts, an improvement of sensitivity to cisplatin, carboplatin, temozolomide (an alkylating agent), and epirubicin (an anthracycline drug) was observed. Additionally, Decitabine also permitted a re-expression of MLH1 in these ovarian cancer xenografts [212].

Phase I trial has been done with Decitabine combined with carboplatin on 10 patients with recurrent platinum-resistant ovarian cancers. Results were 1 CR and 3 SD for more than 6 months. Noteworthy, HOXA11 and BRCA1 cancer associated genes were demethylated after treatment [213]. The same group is pursuing in a phase II trial with 17 patients with recurrent platinum-resistant ovarian cancer. They found out that Decitabine, followed by carboplatin treatment, allowed efficient demethylation of RASSF1A, HOXA10, HOXA11 and MLH1, which correlated with the progression-free survival of the patients (median of 10.2 months). The response rate obtained was of 35% and half of the patients were free of progression after 6 months [214]. The use of demethylating agent should be considered as a possible treatment to overcome chemoresistance in gynecological cancers presenting MMR deficiency and hypermethylation of genes.

Targeting PI3K/AKT and MAPK

Considering the PI3K/AKT pathway is one of the main pathways involved in tumorigenesis and being highly mutated in gynecological cancers, many drugs have been developed to target various proteins of this pathway and to increase the efficiency of anti-cancer treatment, partly via the loss of chemoresistance. First generation PI3K inhibitors, such as Wortmannin and LY294002, were developed and mainly used in promising pre-clinical studies to better understand this pathway and their implication in therapies against gynecological cancer cells. One of these pre-clinical studies demonstrated *in vivo*, using athymic mice bearing ovarian cancer cells, that administration of Wortmannin efficiently sensitized the cancer cells to cisplatin treatment [215]. Yet, because of their poor pharmacokinetics properties, a second generation of inhibitors have been developed being more selective and sometime isoform specific. Among these second-generation PI3K inhibitors, Buparlisib (BKM-120), GDC-0941 and Pilaralisib (XL-147) are pan-class I PI3K inhibitors, which have been tested in few trials for gynecological cancers.

PI3K inhibitors

A previous study involving Buparlisib, in combination with Olaparib (PARP inhibitor), administered in vivo in mice with BRCA-1 mutations demonstrated an important synergy, which leads to a phase I trial with 34 women bearing high-grade serous ovarian cancer or triple-negative breast cancer [216, 217]. Among the patients, 26 were known for having BRCA mutations, a biomarker of efficiency for PARP inhibitors. All dose combinations allowed the observation of clinical benefits among the patients being promising for further trials [217]. GDC-041 has been tested in two phases I trial in patients with advanced solid tumors [218, 219]. The first trial was tested with 49 patients and minimal clinical results were observed with only two patients with a PR; one of these was an endocervical tumor with mutations on PIK3CA. CA125 responses were also observed in three patients with ovarian cancer including one with known high PIK3CA gene copy number [218]. The second phase I trial with GDC-0941 had similar results. Among the 42 patients tested, clinical activity was observed only on two patients, including one with a PTEN negative ovarian cancer [219]. Pilaralisib has been used in a phase II study in 67 patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma. The ORR was minimal and only two patients had CR and two other patients had PR. No association was made between the molecular alterations of the PI3K pathway (three of these patients had wild-type PTEN with PIK3R1 mutations, one had PTEN mutation) and the clinical activity observed [220]. BYL719 is a PI3KCA isoform specific inhibitor that has been tested in a phase I trial in 36 patients with diverse tumors with PIK3CA mutations. Results were 7 PR (including one from cervical, one from endometrium and one from the ovary) [221].

As introduced, PI3K inhibitors had a considerable success rate in preclinical studies, however, the clinical studies of PI3K inhibitors presented in gynecological cancer were not as successful. The PI3K network is vastly complex and ramified, including feedback loops, alternates signaling cascades and crosstalk, all plausibly explaining the observed ineffectiveness. Inhibition of the PI3K pathway is known for also activating the MAPK pathway via crosstalk and dual inhibition with MAPK inhibitors could be considerable. The opposite is also true: inhibiting the MAPK

upregulates PI3K/AKT activity [178, 222, 223]. The PI3K inhibitor Buparlisib have been tested in combination with the MEK inhibitor Trametinib in a phase Ib trial with 113 patients with advanced solid tumors, including ovarian cancer. Results among the 21 patients with ovarian cancer were 1 CR, 5 PR and 10 SD for an ORR of 29%. Remarkably, Buparlisib was efficient almost exclusively in ovarian cancer, the exception being a PR observed in a KRAS mutated non-small cell lung Cancer patient. Also noteworthy was the fact that 19 ovarian cancer patients were KRAS mutated demonstrating an efficient way to overcome this aggressive mutation [224]. The PIK3CA isoform inhibitor, BYL719, has been tested in combination with the MEK inhibitor Binimetinib in 58 patients with advanced tumors and mutated with RAS or BRAF. Four patients with ovarian cancer had KRAS mutation and 3 of these had a PR with the combined treatment. A patient with endometrial cancer and a KRAS mutation also had a PR. Overall, among all patients, 5 had PR and 18 had SD indicating an interesting efficiency for advanced tumors, especially gynecological cancers [225]. This combination is of particular interest for patients with KRAS mutations considering this mutation is often associated with an absence of response when using PI3K/AKT/mTOR inhibitor alone in gynecological cancers [226].

The use of dual-inhibiting PI3K and mTOR is also considered because of the intricate relationship between these complexes. Considering this fact, NVP-BEZ235 has been developed as a molecule capable of inhibiting both PI3K and mTOR. Preclinical studies have been performed in both gynecological cancers using this new inhibitor. One of these demonstrated, via 18 ovarian cancer cell lines (cisplatin sensitive and resistant models), sensitization to cisplatin and a correlation of the effect observed with those bearing PI3K-activations mutations or PTEN deletions. They also used a transgenic murine model of ovarian cancer (LSL-K-rasG12D/+PtenloxP/loxP) treated with NVP-BEZ235 and observed a longer median of survival as well as apoptotic activity [227]. Another study made similar experiments, but this time using 13 endometrial cancer cell lines (possessing at least one alteration of PTEN, PIK3CA or KRAS) and xenografts in nude mice in vivo. NVP-BEZ235 was efficient to eliminate cancer cells both in vitro and in vivo. Interestingly, cancer cells with PTEN mutations

but without KRAS alterations demonstrated a higher sensitivity to NVP-BEZ235 than those with KRAS alterations. Considering these observations, they added a MAPK inhibitor, PD98059 or U0126, and successfully sensitized the K-RAS mutants to NVP-BEZ235, again demonstrating the implication of MAPK in the efficiency of PI3K inhibitors [228].

AKT inhibitors

AKT is a downstream target of PI3K and an important kinase involved in many mechanisms. Considering PI3K is a kinase central to a large network, which entails all the previously stated problematic; targeting AKT, downstream of PI3K, is thus an interesting avenue. AKT specific inhibitors have been developed (MK-2206, Perifosine, AZD5363 and GSK2141795) and pre-clinical trials looked promising [229-235]. Following these, few trials have been done in gynecological cancer patients. MK-2206, an allosteric inhibitor of AKT, has been tested in a phase II trial in 36 women with recurrent endometrial cancer. PIK3CA status was checked on patients; 9 were mutated and 27 were wild-type. Each group only had one patient with a PR, indicating a limited activity of this AKT inhibitor administered as a single agent and independently of the PIK3CA status in endometrial cancer patients [236]. Phase I trial tested Perifosine, another AKT inhibitor, combined with docetaxel in 21 taxane-resistant ovarian cancer patients. One patient (PTEN mutant) had a PR, another patient (PIK3CA mutant) had a SD and two other patients (no PI3K mutations) also had a SD. Noteworthy, patients with KRAS mutations had a rapid progression indicating again a relation with this protein as an indicator of inefficiency for PI3K/AKT inhibitors. Again, the efficiency of this AKT inhibitor was limited and no direct correlation with mutations of the PI3K pathway was made [237]. AZD5363, a novel and potent AKT inhibitor, have been through a phase I trial with 92 patients bearing advanced tumors. Among these patients, only 2 obtained a PR (one endometrioid cancer of the ovary and one cervical cancer with either PIK3CA or AKT1 mutation) and one got a SD (endometrioid cancer of the ovary with PIK3CA mutations) [238]. The results obtained showed that efficiency was, again, minimal. GSK2141795, another AKT inhibitor, have been tested in a phase I trial in 12 patients

with recurrent platinum-resistant ovarian cancer. 8 of the 12 patients had a SD while the 4 left had a progressive disease [239]. Another phase I trial tested GSK2141795, but with a large group of 66 patients with advanced tumors. Among these, 12 were endometrial cancer patients and only 2 had a SD (PIK3CA mutant and/or PTEN loss) [240]. Similarly to PI3K inhibitors, GSK2141795 has been tested in combination with GSK1120212, a MEK1/2 inhibitor, in 13 patients with diverse tumors. 3 of the 13 patients had weak tumor regression (2 patients with ovarian cancer and 1 with endometrial cancer). The results were limited here. The study was a dose-escalating trials, which could have an impact on the efficiency observed [241]. Overall, AKT inhibitors clinical activity was also limited when tested on human patients with gynecological cancers in clinical trials.

To better estimate the expected results following chemotherapy regimens and increase the low response rate previously observed when using PI3K/AKT/mTOR inhibitors, biomarkers are a very interesting option. A study including 140 patients (breast, cervical, endometrial, and ovarian cancers) from phase I program treated with PI3K/AKT/mTOR inhibitors, measured different potential biomarkers (PIK3CA, KRAS, NRAS, and BRAF) to see if a correlation was possible with the response rate of patients. PIK3CA mutations were detected in 25 patients and their response rate to PI3K/AKT/mTOR inhibitors was significantly higher (30%) when compared with patients without the mutation (10%) [242]. The PI3K network is large and additional combinations of inhibitors would be necessary to overcome the inefficiency observed. As suggested by previous studies, KRAS mutations seemed to be a good indicator of resistance to PI3K inhibitors and combination with MAPK inhibitors seemed to be one of the attractive avenues to overcome absence of response. Another interesting avenue could be the use of PARP inhibitors. PI3K inhibition has been associated with the loss of homologous recombination and the addition of a PARP inhibitor could provide synthetic lethality selectively to cancer cells [243]. Indeed, as previously stated, PTEN has a role in homologous recombination and its status is considerable for using PARP inhibitors [203]. All things considered, to overcome the limited benefit of PI3K/AKT/mTOR inhibitors, a better understanding of the patient's mutation status combined with another

inhibitor to prevent resistance to treatment would be an appealing avenue to increase the success rate of this targeted therapy.

Targeting mTor

Mammalian target of rapamycin (mTOR) is the catalytic subunit of two distinct complexes, mTORC1 and mTORC2. Both complexes associate with different proteins, thus regulating different substrates and play crucially important roles in protein synthesis, growth and survival. Interestingly, mTORC1 is sensitive to rapamycin while mTORC2 is not. It should be noted that mTOR lies downstream of the PI3K-AKT signaling cascade, a pathway frequently mutated in gynecological cancers and of paramount importance in the control of cell fate [244]. As such, it is a prime target for drug targeting and requires, in our opinion, further investigations.

Temsirolimus, a water-soluble derivative of rapamycin, is a specific mTOR inhibitor which blocks protein synthesis related to survival and tumor growth of cancer cells. Temsirolimus only target mTOR activity in the mTORC1 complex. A phase II trial was done with temsirolimus on 54 patients with recurrent ovarian cancer. Results obtained were modest with 9 patients having a PR [245]. Another study tested temsirolimus on 5 chemoresistant patients with clear cell carcinoma of the ovary. Of the 5 patients, 1 had a PR and another 1 had a stable disease (SD) [246]. Temsirolimus have been tested in combination with bevacizumab, an anti-angiogenesis compound under trial, enrolled with 31 women with recurrent ovarian cancer (17 chemosensitives versus 14 chemoresistants). Of the 25 patients evaluable, 3 obtained a PR and 9 had a SD. Interestingly, the 3 PR were from the platinum-resistant group, a desirable effect on advanced and recurrent cancer therapy [247]. Overall, temsirolimus showed only a modest activity on chemoresistant women with ovarian cancer. Concerning endometrial cancer, clinical studies have also been performed. A phase II trial tested temsirolimus alone or in combination with hormonal therapies (a progestin and tamoxifen) on patients with advanced/recurrent endometrial cancer. This study was focused on the fact that the mTOR pathway could be involved in the resistance to hormonal therapy in endometrial

cancers. Temsirolimus alone was tested with 50 patients divided in two groups, 29 with prior chemotherapy and 21 without prior chemotherapy. The response rate was similar between these two groups with an ORR of 22% (24% ORR prior chemotherapy; 19% ORR without prior chemotherapy). This study also concluded that combining megestrol acetate (a steroidal progestin), tamoxifen and temsirolimus did not improve the treatment efficiency and was associated with an increased toxicity [248]. Another phase II trial tested temsirolimus alone in 54 recurrent and metastatic endometrial cancer patients. This study also considered if the patient had previously received chemotherapy, which were distributed in two distinct groups. Of the 29 chemo-naïve patients, 4 had a PR and 20 a SD. From the 25 chemo-treated patients, 1 had a PR and 12 a SD. The single agent activity was higher in chemo-naïve patients and demonstrated a beneficial effect to arrest cancer progression in both groups. They also checked if PTEN status, related to the regulation of mTOR pathway, was associated with the response rate of temsirolimus and found no association. Therefore, they concluded temsirolimus response was PTEN-independent [249]. Two other phase II trials tested temsirolimus in combination with bevacizumab, an angiogenesis inhibitor, in recurrent endometrial cancers patients. One study had 26 patients and obtained 5 PR and 12 were progression free at 6 months [250]. The second study had 49 patients and obtained 1 CR, 11 PR and 23 were progression free at 6 months [251]. Overall, these studies demonstrated a certain efficiency against recurrent endometrial cancer but also a considerable toxicity when combining both these compounds.

Everolimus (RAD-001) is another mTOR inhibitor with a mechanism similar to rapamycin and selective to mTORC1. A pre-clinical study has been done using 58 transgenic mice with bilateral ovarian serous adenocarcinomas developed accompanied by ascites and peritoneal dissemination. Treating these mice with everolimus alone reduced tumor burden by 84% and ascites and peritoneal dissemination were detected in only 21% of the treated mice versus 74% in the placebo-treated animals [252]. They also tested everolimus alone and in combination with cisplatin against ovarian cancer both in vitro and in vivo. Using ovarian cancer cell lines, they found out that everolimus was efficient for inhibiting cell proliferation and when combined with

cisplatin, enhanced apoptosis. They also observed similar findings in vivo using xenografts models (inhibition of tumor growth, decrease of ascites and increased treatment efficiency when combined with cisplatin). Noteworthy, everolimus was efficient only in cells with high AKT/mTOR activity [253]. These pre-clinical findings were promising for the treatment of ovarian cancers. In endometrial cancer, phase II trials have been done using everolimus. One of these, tested everolimus in patients with recurrent endometrial cancer that have previously received chemotherapy. After treatment, 6 of the 28 patients had a SD, thus a clinical benefit rate of 22% (CBR; sum of CR, PR and SD) [254]. They also performed another phase II trial testing everolimus in combination with letrozole, an aromatase inhibitor, with 35 patients with advanced endometrial cancer. Using hormonal therapy in combination with everolimus increased the CBR, as well as the addition of CR and PR to the results, to 40% indicating a high benefit, considerable for therapy [255]. Another phase II trial tested everolimus alone in 44 patients with advanced endometrial cancer (2/3 previously received chemotherapy). After 3 months, 36% had a non-progressive disease and after 6 months, 4 patients had a PR [256].

Considering the high level of PTEN mutations in endometrial cancer, many trials tested mTOR inhibitors in this tissue. Results obtained were overall interesting but the combination of an mTOR inhibitor with another drug/compound such as an aromatase inhibitor provided very interesting results and will be necessary for optimal therapies. It is also worth noting that these two compounds inhibiting mTOR (temsirolimus and everolimus) tested in clinics only inhibit the mTORC1 complex. The mTORC2 complex is involved in the phosphorylation of the AKT protein at S473 leading to a full activation of this important kinase from the PI3K/AKT pathway, playing an important role in survival and proliferation [257, 258]. Another important fact concerning mTORC2 complex is that it can also subsequently activate the MAPK survival pathway [258]. An alternative pathway, insensitive to classical mTORC1 inhibition, is thus present and requires further attention to increase the efficiency of treatments.

Targeting EGFR

Considering the high level of mutation/overexpression of EGFR in gynecological cancers, some therapeutics compounds targeting this family of oncogene have been tested in gynecological cancers.

Low molecular weight tyrosine kinase inhibitors Gefitinib (ZD-1839) and Erlotinib (OSI-774) have been developed to inhibit EGFR activity and prevent tumor growth. Gefitinib alone was administered in a phase II trial in 26 women with advanced endometrial cancer and the results obtained were four patients with a PFS of more than 6 months, one had a CR and 7 had a SD [259]. In ovarian cancer, phase II trials also tested gefitinib as a single agent. The results indicated that the inhibitor was able to decrease EGFR and p-EGFR protein levels but had minimal clinical benefits observed when using the agent alone [260, 261]. A phase II study decided to assess Gefitinib effectiveness in combination with tamoxifen with 56 women with ovarian cancer resistant to platinum and taxane therapies. The results were not conclusive because of the inefficacy of the treatment against the resistant cancers; no additional side effects were observed when combining tamoxifen with Gefitinib [262]. A phase II trial assessed the efficacy of Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin for both platinum-sensitive and platinum-resistant ovarian, tubal or peritoneal adenocarcinoma patients (total of 68 patients). The results obtained were interesting considering the ORR of 19.2% and 61.9% and the CBR was of 69.2% and 81.0% for resistant and sensitive groups respectively [263]. Phase I/II trial combined Gefitinib with oxaliplatin and vinorelbine (an inhibitor of microtubule assembly) in 33 women with advanced ovarian cancer were divided between platinum-sensitive and resistant groups. The ORR was of 23.8% (3 CR and 2 PR) and 90% (4 CR and 5 PR) in the resistant and sensitive groups respectively [264]. These results show that Gefitinib present high effectiveness only when combined with chemotherapeutic compounds, particularly in chemosensitive cancers.

A phase II trial tested Erlotinib, as a single agent, in 32 women affected by advanced endometrial cancer and the results obtained were 4 PR and 15 SD [265].

Another phase II trial tested Erlotinib as a single agent, but this time in 34 women attained with advanced ovarian cancer. The results were 2 PR and 14 SD, similar to the results observed with endometrial cancers [266]. A phase IB trial tested Erlotinib combined with both carboplatin and docetaxel in 23 women with chemo-naïve ovarian cancer. Results obtained were 5 CR and 7 PR giving an ORR of 52% [267]. A phase II study combined Erlotinib with carboplatin for 50 women with advanced ovarian cancer. Results were an ORR 7% (1 PR) for the resistant group versus 57% (14 PR) for the sensitive group [268]. Again, this indicates a good clinical efficiency when combined with chemotherapy but most particularly for chemosensitive patients.

Monoclonal antibodies against EGFR have also been developed, Cetuximab (IMC-C225; Erbitux) and matuzumab (EMD-72000). A phase II trial tested matuzumab, as a single agent, in ovarian cancer for 37 patients who previously received platinum treatment and became chemoresistant, demonstrated that the treatment was well tolerated but only led to 7 SD indicating that the clinical activity was limited [269]. Similar results were observed in a phase II trial of cetuximab as monotherapy in ovarian cancer patients with recurrent diseases [270]. Cetuximab combined with carboplatin and paclitaxel have been tested in another phase II trial for 40 women as an initial therapy for advanced ovarian cancer. The therapy was well tolerated, however, the results obtained were not beneficial (no increase of the progression-free survival (PFS) of the patients) [271]. Another phase II trial tested cetuximab combined with carboplatin in 28 patients with platinum sensitive ovarian cancers. Following treatments, 9 patients had an ORR and 8 SD indicating a certain clinical activity of the monoclonal antibody while not being optimal for therapy [272]. The effect of cetuximab seems to be reproducible in endometrial cancer and a pre-clinical study demonstrated that the monoclonal antibody was able to inhibit cell growth and invasion in endometrial Hec-1a cells in vitro while being able to inhibit tumor growth, lymph nodes and lung metastasis in vivo [273].

Interestingly, these trials demonstrated that inhibiting EGFR in gynecological cancers is well tolerated but the efficiency is low when used alone, thus necessitating a combination with another chemotherapeutic drug. The combination of EGFR inhibitors

with another drug was effective in chemosensitive patients while being less effective in chemoresistant patients.

Targeting the estrogen signaling pathway

Two types of treatments have been developed to target the estrogen signaling pathway, aromatase inhibitors and estrogen receptor antagonists.

Aromatase inhibitors

Anastrozole is a potent non-steroidal aromatase inhibitor that had one phase II trial in 23 recurrent endometrial cancer patients. The results were minimal with only 2 PR and 2 SD [274]. A phase II trial was performed using Anastrozole as a single agent in 53 asymptomatic recurrent/persistent ovarian (43), peritoneal (7) and fallopian tube (3) cancer patients. Results were 1 patient with a PR and 68% of these with a SD (42% > 90 days; 15% > 180 days; 7% > 270 days; 4% > 360 days) [275]. The same research group also performed a phase II trial using both Anastrozole and EGFR inhibitor Gefitinib in 35 patients with asymptomatic recurrent/persistent ovarian (30), peritoneal (4) and fallopian tube (1) cancers. 23 patients were evaluable and results were 1 CR and 14 SD, thus having only modest activity [276].

Letrozole is another aromatase inhibitor under study. In a group of 28 patients with recurrent endometrial cancer, but never treated with chemotherapy previously, letrozole was studied as a single agent in a phase II trial. Results obtained were 1 CR, 2 PR and 11 SD indicating a modest antitumoral activity. Interestingly, different markers including the hormone receptors were screened but were not correlated with response to letrozole [277]. Another phase II study tested letrozole in combination with the clinical mTor inhibitor everolimus in 35 women with advanced recurrent endometrial cancer. The results were very interesting with 11 CR, 2 PR and 1 SD [255]. Their previous study using everolimus alone had a CBR of 21% and only SD [254]. The addition of letrozole increased the CBR to 40%, as well as the addition of CR and PR, indicating a benefit

when adding this aromatase inhibitor [255]. Letrozole was also tested in 50 ovarian cancer patients in a phase II trial. No CR or PR was attained with tumors and only 10 patients had a SD. Noteworthy, they observed a correlation between the response to letrozole and high estrogen receptor level [278]. Another phase II study tested letrozole in 21 women with recurrent ovarian cancer. Following treatment, the results were 1 CR, 2 PR and 4 SD, again indicating a modest antitumoral activity. No association was found between hormone receptors and response to letrozole [279]. Another study preselected 33 patients with ovarian cancer, all with the presence of estrogen receptors, and tested letrozole in a phase II trial. Results obtained were 3 PR and 14 SD, indicating that a pre-selection of patients can increase the efficiency of letrozole a little to arrest the progression of the cancer [280]. Finally, a phase II trial tested letrozole, but this time with 31 patients with ovarian cancer both resistant to platinum and taxane therapies. Notably, all patients were positive for estrogen receptors, however, none had a CR, one had a PR and 7 had a SD. These results indicate that chemoresistance has an impact on aromatase inhibitors, especially letrozole here, and their efficiency to stabilize tumor progression [281].

Exemestane is a novel aromatase inhibitor and one trial tested this compound in refractory ovarian cancer patients who previously received platinum and taxane therapies. No CR or PR was obtained with the 24 patients, however, 8 had a SD > 14 weeks [282]. Noteworthy, exemestane had an important effect on the tumor progression as previously observed with other aromatase inhibitors.

Estrogen receptor antagonists

Fulvestrant (Faslodex), is a novel estrogen receptor (ER) antagonist providing increased proteasomal degradation of its target. A phase II trial tested this compound in advanced endometrial cancer with 31 patients (estrogen receptor positive) and 22 patients (estrogen receptor negative). No patients demonstrated a CR or PR in the absence of estrogen receptor while 1 CR and 4 PR was observed in patients expressing the estrogen receptor. The disease was stable in 4 patients in the ER-negative group

versus 9 in the ER-positive one. Fulvestrant antitumoral activity was absent without the presence of ER and minimal when the target (ER) was present; however the antagonist was efficient for stabilizing tumor growth [283]. Concerning ovarian cancer, a phase II was performed using fulvestrant in 26 women with advanced disease. The results obtained were similar to the ones obtained with endometrial cancer, 1 CR, 1 PR and 9 SD indicating a weak antitumoral activity with great stabilization of tumor growth [284]. The same research group measured the estrogen receptor protein level with tissue microarray (TMA) and correlated the expression measured, positively, with the clinical benefit previously observed [285]. Overall, Fulvestrant is also efficient for stabilizing tumor growth but modest for decreasing tumor size when administered alone.

Arzoxifene is another estrogen receptor antagonist tested for both the mammary and uterine tissues. An interesting aspect of arzoxifene is the lack of uterotrophic effect, a considerable feature for its use in endometrial cancers as compared to tamoxifen. Indeed, phase II trials have been done in patients with advanced or recurrent endometrial cancers and the results were promising. Two of these trials were done with 100 patients from two multi-institutional studies and results obtained were a low toxicity with an ORR of 25% and 31% respectively [286]. Another trial specifically selected 29 patients with advanced endometrial cancer expressing ER and/or progesterone receptor and not previously treated with chemotherapy. Results obtained were a low toxicity, 1 CR and 8 PR (ORR = 31%) with a median duration of response greater than 13 months [287].

Toremifene is an antiestrogen that had a study using ovarian cancer cell lines in vitro and patients with ovarian and uterine cancers in vivo. Results in vitro demonstrated that toremifene was able to increase significantly the efficiency of doxorubicin on ovarian cancer cell lines; some were initially resistant to doxorubicin. On the 8 patients tested, 3 had PR, 3 had SD but 2 also had a tumor progression [288]. This study is thus promising for the further clinical trials tested with gynecological cancers.

The minimal effect observed in these diverse trials can be partly due to the non-selectivity of patients considering the frequent loss of estrogen receptors in

recurrent gynecological cancers. However, the antitumoral effect of these agents seemed minimal but they were able to efficiently stabilize the disease. A combination of a compound from this family targeting the estrogen signaling pathway with a chemotherapeutic drug could increase the efficiency of the treatment. A combination with two targeted pathways could also be an interesting avenue. This was demonstrated in the promising study combining Letrozole with an mTOR inhibitor, which provided astonishing results [289]. Our laboratory previously studied a new chemotherapeutic compound called VP-128, which contained both a steroid portion (E2) and a toxic portion (platinum). Preclinical studies shown that this combination targeting the estrogen receptor was promising and efficient in ovarian cancer. Both in vitro and in vivo studies demonstrated a significant antitumoral effect against selected tumors expressing the estrogen receptor alpha. The effect was only modest in tumors without the estrogen receptor, similarly to the clinical results observed in trials [290]. Considering these observations, we suggest that screening patients before using therapeutic compounds targeting the estrogen signaling pathway seems to be of paramount importance to insure the combination therapy potency against endometrial and ovarian cancers.

Targeting p53

Another important tumor suppressor involved in chemoresistance mechanisms to consider is p53. Many therapeutic avenues have been studied concerning p53. Another aspect to consider is the high amount of gynecological cancers overexpressing p53, making this protein an interesting target for therapy [154-156]. However, because of its multiple mechanisms and mutations, high levels of effectiveness are hard to achieve. In gynecological cancers, few trials have been made to test the efficiency of p53 targeting, a protein highly altered in these cancers (Figure 2C).

Gene therapy has been tested with the p53 gene via diverse techniques to re-express the functional p53 protein and regain its functions to eliminate tumor cells. p53-SLP is a synthetic peptide-vaccine containing a peptide derived from the middle portion of the p53 protein. The goal of this vaccine is to stimulate the immune system, a

known function of p53, to mount a cytotoxic response against tumor cells overexpressing p53. This vaccine (p53-SLP) was tested in a phase II trial with 20 patients with ovarian cancer. Results obtained were 2 SD and 18 patients had a progression of the tumor. Beside the weak clinical benefit, they confirmed that the vaccine was well tolerated and stimulated T-cell responses in patients which was the primary objective of this vaccine [291]. p53-SLP was also tested in a phase II trial with 10 patients with recurrent ovarian cancer, pre-treated with low-dose cyclophosphamide to improve the immunogenicity of the vaccine. They observed a higher number of IFN- γ -producing T cells when compared to their previous study testing p53-SLP alone. However, the clinical results were again minimal with 2 SD and 8 progressive disease [292]. They also tested p53-SLP on 20 patients with advanced ovarian cancer, which also had a secondary chemotherapy following vaccine treatment. The administration of p53-SLP before chemotherapy allowed 2 SD only. Following analyses indicated that the administration of p53-SLP did not enhance the efficiency of chemotherapy treatments, thus was not able to overcome the chemoresistance of advanced ovarian cancer patients [293]. SCH-58500 is another therapy consisting of a genetically engineered adenovirus, unable to replicate and containing the wild-type gene p53. Phase I/II trial have been performed using SCH-58500 combined with platinum-based therapy with 24 patients diagnosed with recurrent ovarian cancer. Results obtained were satisfying considering the success to efficiently re-express p53 in tumors and a decrease higher than 50% CA125 (8/16 of the evaluable patients), an ovarian tumor marker, observed when combining both SCH-58500 with platinum compounds [294]. On the long term, they also observed that patients who only received a single dose of SCH-58500 had a median survival of 5 months versus 13 months for those who received multiple doses of SCH-58500 [295]. Overall, the trial of SCH-58500 in combination with platinum compounds tested on recurrent ovarian cancers was promising and more successful than the use of peptides-based approach.

Another promising compound, ONYX-015, is an oncolytic adenovirus that replicates selectively in cancer cells with malfunctioning p53, followed by lysis to eliminate tumors. Indeed, the replication and cytopathogenicity of this adenovirus is

blocked by WT-p53 and thus only replicate in mutant p53 tumors [296]. If p53 is responsible for the chemoresistance of cancer cells, these would be eliminated leaving sensitive cells only to be treated with standard chemotherapy. Phase I trial tested ONYX-015 as monotherapy on patients with recurrent ovarian cancer but observed no clinical effect when used alone [297]. No more trials of ONYX-015 have been performed in gynecological cancer but the compound is still promising and has been tested in combination with chemotherapy in other tissues (head, neck and gastrointestinal with metastases) giving excellent results with complete responses and being responsive against chemoresistant patients [298, 299].

MK-1775 is a small molecule inhibitor targeting WEE1, a kinase responsible for inactivating CDC2/Cyclin B complex, involved in the G2 checkpoint for DNA damage. Most cell type presenting mutant-p53 lack the G1 checkpoint for DNA damage. Thus, inactivating the second checkpoint (G2) with a WEE1 inhibitor can sensitize to chemotherapeutic treatments in gynecological cancers [300]. Some trials have been performed using this new inhibitor in combination with chemotherapy in ovarian cancer. Phase I trial combining MK-1775 with carboplatin and paclitaxel with 14 patients sensitive to platinum therapy obtained 11 PR and 3 SD; 7 of these were evaluable by CA125 with 3 CR and 4 PR [301]. A similar trial has been done in a phase II trial with MK-1775 combined with carboplatin and paclitaxel and was tested on 121 women with platinum sensitive ovarian cancer (59 received carboplatin/paclitaxel + MK-1775 while 62 only received carboplatin/paclitaxel). Progression-free survival was greater with the addition of MK-1775 when compared with carboplatin/paclitaxel only group. The overall response rate was of 81% for the group who received the combination of carboplatin/paclitaxel including MK-1775 versus an ORR of 74% for patients who received only carboplatin/paclitaxel, indicating an increase of efficiency for treatment via the inhibition of WEE1 [302]. Another phase II study tested MK-1775 in combination with carboplatin on 22 patients with recurrent and platinum resistant ovarian cancer. Following treatments, 6 patients had a PR and 9 had a SD. The progression-free survival median was 11 months. Considering that patients were platinum-resistant, results were still interesting [303]. A similar phase II study is

currently undergoing and testing MK-1775 in combination with gemcitabine also in recurrent and platinum-resistant ovarian cancer patients [304]. MK-1775 is relatively new and seems promising for the treatment of p53-mutated ovarian cancers. Trials in endometrial cancers could also be of interest considering the high alteration rate of p53 in this tissue.

APR-246 is a small molecule with the ability to restore mutant p53 to its wild-type conformation, allowing the activation apoptotic mechanisms to eliminate cancer cells. Preclinical studies have demonstrated a high synergetic effect of the molecule in combination with platinum compounds in ovarian cancer models both in vitro and in vivo. These studies also demonstrated that the addition of APR-246 in combination with standard chemotherapy was able to sensitize ovarian cancer cells and overcome chemoresistance to cisplatin and doxorubicin [305, 306]. A Phase I/II trial is currently undergoing in 160 ovarian cancer patients treated with APR-246 combined with carboplatin and doxorubicin and preliminary results still show positive and similar effects to those observed in pre-clinical trials [307]. In general, p53 targeted therapy is still actively studied and impressive with the diversity of bioengineered compounds targeting this protein. The number of clinical trials studying therapies targeting p53 is limited in gynecological cancers but look promising.

Targeting Par-4

Par-4 is a promising candidate for future clinical trials because of its unique ability to induce apoptosis only and selectively in cancer cells. Using tumor suppressors is an alternative for cancer treatment via the use of recombinant proteins or gene therapy to express the gene as previously done with p53. Concerning Par-4, very little experimental data is available concerning therapeutic applications. However, a few in vivo experiments are convincing for future clinical studies and development of treatments. A study has demonstrated that the delivery of Par-4 plasmid via nanoliposomes to tumors in nude mice increased the efficiency of Fluorouracil, a thymidylate synthase inhibitor, in cancer [308]. Considering that Par-4 can activate apoptotic mechanisms via

paracrine signaling, recombinant Par-4 has been studied. The effects observed using a recombinant variant of either Par-4 or its SAC (Selective for Apoptosis in Cancer cells) domain was successful in inducing apoptosis in cancer cells in vitro [309]. Another team produced recombinant SAC domain of Par-4 derived from plants, in the optic of large-scale production, which also kept its pro-apoptotic capabilities [310]. Considering the SAC domain is sufficient for apoptosis and selective for cancer cells, future compounds or treatments could be designed based on its structure for targeted therapy.

Another option to consider concerning Par-4 targeted therapy is to combine with hormonal therapy. In prostate cancer, a study showed that Par-4 was efficient for inducing apoptosis only in hormone-independent cancer cells, indicating a role for hormone and Par-4 negative regulation [170, 311]. A study, involving 126 patients treated with neoadjuvant chemotherapy, assessed the expression of different genes to observe correlations between these and the outcome of the treatment. Results obtained were very interesting. Par-4 mRNA was upregulated following chemotherapy and Par-4 had a significant impact on prognostic, dependent of the ER status. Indeed, Par-4 level was predictive of a good outcome in ER- patients and the opposite was observed in ER+ patients indicating an important role for hormones and Par-4 [312]. As introduced, few studies demonstrated that estrogen can downregulate Par-4 [177, 178]. To further explore this mechanism of regulation, we used Gene Expression Omnibus (GEO) database and found a study (GSE23893) in uterine cancer tissues showing that ER α binds near Par-4 promoter in its proximal region indicating a potential link with estrogen regulation (Figure 4B). Considering that the ovaries and endometrium are continuously under the influence of hormones and that estrogen exerts such a strong influence on Par-4 transcription, we are allowed to hypothesize that estrogen might play a role in the regulation of Par-4 expression. It is also possible that estrogen regulates Par-4 activity and localization, either through genomic or non-genomic mechanisms, further controlling Par-4 dynamics; estrogen could thus act as a potent carcinogenic agent as well as an inducer of chemoresistance depending on the situation. Combining hormonal therapy with Par-4 is thus a considerable option to acquire an optimal efficiency to induce apoptosis and reduce estrogen-driven growth stimulation. These preliminary

findings concerning the estrogen regulation of Par-4 combined with its unique ability to selectively induce apoptosis in cancer cells only are very interesting and should be considered for future studies.

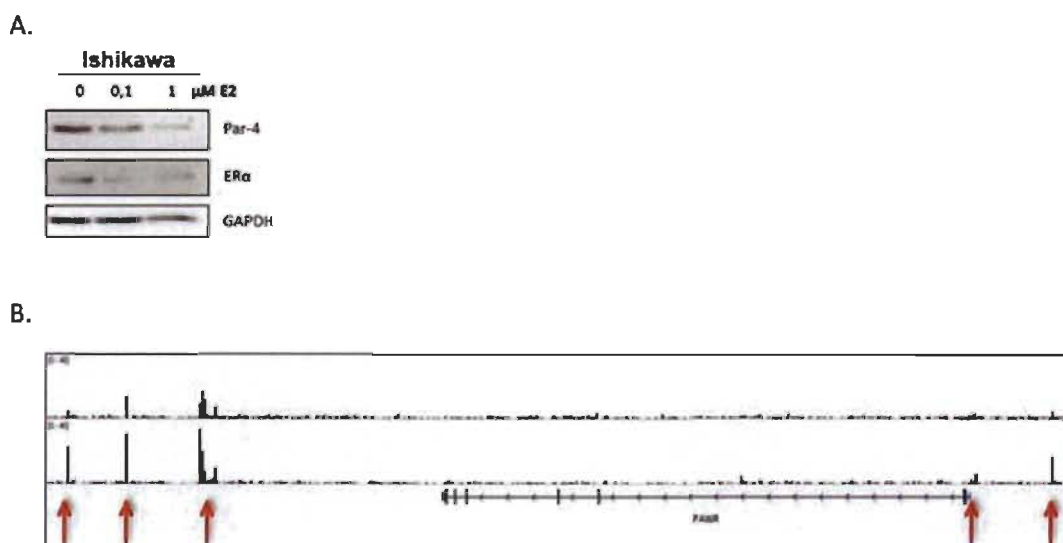


Figure 4: Estrogen implication in Par-4 regulation.

A. Ishikawa cancer cells were treated with either 0,1 μ M or 1 μ M estradiol (E2) for 4 h. The levels of Par-4 and ER α were determined in treated cells using western blot analysis. GAPDH was used as a loading control. Results shown are representative of three independent experiments. B. ChIP-seq tracks showing ER α binding location on PAWR gene (Par-4) in control cells (top lane) and E2 treated cells (bottom lane) for 30 minutes. Genomic locations were obtained using the integrated genomic viewer (IGV 2.0). Red arrows indicate a novel ER α binding enrichment profile in the proximal region of Par-4 gene that can potentially be involved in negative regulation of the gene. Geo accession number: GSE23893.

Future directions of targeted therapies

In light of the previous and current clinical trials reported in this review, our initial and primary observation is the modest amount of scrutiny endometrial cancer has been the subject of. Indeed, very few clinical studies have focused on endometrial cancer, probably because of its high survival rate in the case of early diagnosis. However, as introduced, endometrial cancer is very aggressive at advanced stage and the success rate

of current therapies is very low. It is our opinion that, based on that fact, more investigations is required to develop novel therapies to improve the prognostic of women afflicted with recurrent endometrial cancer.

The idea of targeted-therapy is to eliminate gynecological cancer cells more selectively and turning-off their chemoresistance mechanisms. However, up to now, no cancer trials have been able to have the desired “perfect” response rate via targeted therapy. Neither mono targeted-therapy nor combination with current chemotherapy regimen is sufficient to enhance greatly the survival of patients. As already observed under trials, combination of diverse targeted-therapies is an interesting avenue to overcome the resistance/absence of response seen with mono targeted-therapy. Indeed, many of the pathways and mechanisms discussed can have crosstalk with other pathways, feedback loop regulations in their large network or simply alternative regulation not inhibited by the compounds. For example, MAPK inhibition combined with PI3K inhibition increase significantly the efficiency of these compounds against gynecological cancers. Considering this fact, the most promising trials were those combining two targets such as Everolimus (targeting mTORC1) combined with Letrozole (targeting aromatase) or Buparlisib/BYL719 (compounds targeting PI3K) combined with Trametinib/binimetinib (compounds targeting MEK) [224, 225, 255].

Another avenue to consider for increasing the efficiency of targeted therapies would be to find specific biomarkers correlating with the response to treatment. Indeed, many of these new compounds have not yet, found efficient biomarkers to estimate the success of the treatment, which can also explain the modest clinical activity observed in many of these trials. Using biomarkers would lead to personalized medicine with a large pre-screening of the patients and the diverse mutations located in their tumors, which can be costly for phases II and III trials. This pre-screening, however, would allow to better identify the right combination of targeting compounds and obtain an optimal success rate of treatment.

The heterogeneity between and within tumors also plays a large role in the response rate of targeted treatments and chemoresistance mechanisms. Genomic instability is an important factor related to the heterogeneity of the tumor and, as stated in this review, repair mechanisms are involved in this instability as well as the PI3K network, which is vastly mutated in gynecological cancers [313]. This heterogeneity is reflected on the recurrence of gynecological cancers at advanced stages where only sensitive cells are dying to leave a resistant population, which will eventually come back. Heterogeneity of the tumors is also related to cancer stem cells (CSC). CSC are a small population of the tumor which have the capacities to initiate tumor, self-renew and differentiate to make the bulk of the tumor. They also have the ability to metastasize, an event occurring in advanced stages of cancer. One characteristic of these CSC is that they also play a role in the resurgence of the tumor following chemotherapy, indicating that they also resist chemotherapeutic treatments which is likely associated with a poor prognosis [314, 315]. The presence of chemoresistant and tumorigenic CSC has already been observed in ovarian cancer, however, these are still difficult to identify and target [316-319]. Noteworthy, one of these mechanisms of resistance is also related to AKT, a protein implicated in the PI3K network which is highly mutated in ovarian and endometrial cancers [320]. The biology of CSC is unique and their mechanisms of resistance are diverse. Many trials targeting CSC are currently under study. Considering their important role in tumor, this particular type of cell should be considered when targeting tumors to prevent recurrence and improve success rate.

Overall, considering that heterogeneity is a major hurdle for chemotherapy, targeting multiple pathways/proteins would be useful to overcome a maximum of cancer cells, including stem cells, during treatment. A better understanding of patients' parameters will be profitable for the use of targeted-therapies.

Other elements to consider for efficient targeted-therapy against chemoresistant cancer cells are the fact that not only the modifications occurring inside the cells contribute to the chemoresistance. This manuscript mainly focus on this aspect,

however, tumor cell micro-environment and the pharmacokinetic of compounds also play important roles on the acquisition of chemoresistance and should be considered for future therapies [13]. Concerning microenvironment, hypoxia is known for being related to radioresistance and chemoresistance of cancer [321, 322]. Hypoxic cancer cells, frequently located in the center of the solid tumor, have fewer blood vessels and consequently are less exposed to cancer drugs. Hypoxia is also involved in a slower proliferation rate, which affect current chemotherapy targeting cells with rapid division [322]. This microenvironment factor is thus a negative key player for the success of cancer therapies. Noteworthy, cancer stem cells also take advantage of the tumor microenvironment [314]. The immune system also interacts with the microenvironment of tumors as well as the extracellular matrix and signaling molecules from the environment. These microenvironment factors are considered in clinic and therapies targeting angiogenesis, hypoxia, immune system or tyrosine kinase receptors are currently under study [323]. A combination of treatment including these could be positive for the success rate of cancer treatment with other targeted-therapies.

Cancer is a complex disease and still requires research and investigations to better understand it. Current results indicate that mono-targeted therapies are not enough to overcome tumor progression and its resistance to various treatments. However, therapies and molecules are improving and the advance in technology allows a more precise diagnosis of the patients. A better understanding of tumor genetics will allow the administration of an efficient personalized medicine in gynecological cancers.

Abbreviations

CR: Complete response

PR: Partial response (at least 30% reduction of the tumor)

SD: Stable disease (between 30% reduction and 25% increase of the tumor)

PFS: Progression Free Survival

ORR: Objective response rate (CR+PR)

CBR: Clinical benefit rate (CR+PR+SD)

ER: Estrogen receptor
LHRH: Luteinizing hormone-releasing hormone
NER: Nucleotide excision repair
MMR: Mismatch repair
ERE: Estrogen response element
EMT: Epithelial-mesenchymal transition
Pgp: p-Glycoprotein
PARP: Poly-ADP ribose polymerase
DHFR: Dihydrofolate reductase
POL β : DNA polymerase β
POL γ : DNA polymerase γ
PINK1: PTEN-induced putative kinase 1
TMA: Tissue microarray
E2: Estradiol
CSC: Cancer stem cell

Acknowledgements

We would like to thank François Fabi for reviewing the manuscript before submission.

Grant support

Eric Asselin is chairholder of the Canada Research Chair in Molecular Gynecology. Funded by a NSERC grant number 238501-01.

References

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 2013; 49: 1374-403. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
2. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. Atlanta: American Cancer Society.
3. Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics. *Canadian Cancer Statistics 2015*. Canadian Cancer Society, Toronto, ON.
4. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63: 11-30.
5. Casciato DA, Territo MC. (2009). *Manual of clinical oncology*: Lippincott Williams & Wilkins.
6. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse S, Kosary C, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis D, Chen H, et al. (2016). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013*. National Cancer Institute Bethesda, MD, pp. accessed at http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 5 SEER data submission, posted to the SEER web site.
7. Lengyel E. Ovarian Cancer Development and Metastasis. *The American Journal of Pathology*. 177: 1053-64. doi: 10.2353/ajpath.2010.100105
8. Foley OW, Del Carmen MG. Recurrent epithelial ovarian cancer: an update on treatment. *Oncology*. 2013; 27: 288.
9. Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, Levin B, Byers T, Rothenberger D, Brooks D, Creasman W, Cohen C, Runowicz C. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers: Also: update 2001-testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin*. 2001; 51: 38-75.
10. Plataniotis G, Castiglione M, Group EGW. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2010; 21: v41-v5.
11. Patch A-M, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, Nones K, Cowin P, Alsop K, Bailey PJ. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015; 521: 489-94.

12. Bast RC, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature Reviews Cancer*. 2009; 9: 415-28.
13. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3: 502-16.
14. American Cancer Society. Endometrial (Uterine) cancer detailed guide. 2016.
15. American Cancer Society. Ovarian cancer detailed guide. 2016.
16. Sjoquist KM, Martyn J, Edmondson RJ, Friedlander ML. The role of hormonal therapy in gynecological cancers-current status and future directions. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2011; 21: 1328-33.
17. Garrett A, Quinn MA. Hormonal therapies and gynaecological cancers. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2008; 22: 407-21. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2007.08.003>
18. Kreizman-Shefer H, Pricop J, Goldman S, Elmalah I, Shalev E. Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer. *Diagnostic Pathology*. 2014; 9: 1-8. doi: 10.1186/1746-1596-9-77
19. Issa RM, Lebeau A, Grob T, Holst F, Moch H, Terracciano L, Choschzick M, Sauter G, Simon R. Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer. *Mod Pathol*. 2008; 22: 191-6.
20. Cunaat S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2004; 94: 25-32. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.03.026>
21. Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T. Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res*. 1998; 58: 5367-73.
22. Kim JJ, Chapman-Davis E. Role of Progesterone in Endometrial Cancer. *Semin Reprod Med*. 2010; 28: 081-90. doi: 10.1055/s-0029-1242998
23. Song JY, Fraser I. Effects of progestogens on human endometrium. *Obstetrical & gynecological survey*. 1995; 50: 385-94.
24. Gould RE, Garcia AA. Update on aromatase inhibitors in breast cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2006; 18: 41-6.

25. Lalwani N, Prasad SR, Vikram R, Shanbhogue AK, Huettner PC, Fasih N. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics*. 2011; 31: 625-46.
26. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4: 307-20.
27. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 2003; 22: 7280-95.
28. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 253-65.
29. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011; 21: 440.
30. A Boere I, EL van der Burg M. Review of dose-intense platinum and/or paclitaxel containing chemotherapy in advanced and recurrent epithelial ovarian cancer. *Current pharmaceutical design*. 2012; 18: 3741-53.
31. Yap TA, Carden CP, Kaye SB. Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9: 167-81.
http://www.nature.com/nrc/journal/v9/n3/supinfo/nrc2583_S1.html
32. Moxley KM, McMeekin DS. Endometrial Carcinoma: A Review of Chemotherapy, Drug Resistance, and the Search for New Agents. *The Oncologist*. 2010; 15: 1026-33. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0087
33. Longley D, Johnston P. Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of pathology*. 2005; 205: 275-92.
34. Esteller M, Martinez-Palones JM, García A, Xercavins J, Reventós J. High rate of MDR-1 and heterogeneous pattern of MRP expression without gene amplification in endometrial cancer. *International journal of cancer*. 1995; 63: 798-803.
35. Schneider J, Centeno M, Rodriguez-Escudero F, Efferth T, Mattern J, Volm M. High rate of expression of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in human endometrial carcinoma and normal endometrial tissue. *European Journal of Cancer*. 1993; 29: 554-8.

36. Holzmayer TA, Hilsenbeck S, Von Hoff DD, Roninson IB. Clinical Correlates of MDR1 (P-glycoprotein) Gene Expression in Ovarian and Small-Cell Lung Carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1992; 84: 1486-91. doi: 10.1093/jnci/84.19.1486
37. Kamazawa S, Kigawa J, Kanamori Y, Itamochi H, Sato S, Iba T, Terakawa N. Multidrug Resistance Gene-1 Is a Useful Predictor of Paclitaxel-Based Chemotherapy for Patients with Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology*. 2002; 86: 171-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/gyno.2002.6738>
38. Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, Kuo Y-M, Rochdi M, Howell SB. Acquisition of Resistance to Cisplatin Is Accompanied by Changes in the Cellular Pharmacology of Copper. *Cancer Research*. 2002; 62: 6559-65.
39. Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: Comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *International Journal of Cancer*. 2002; 101: 488-95. doi: 10.1002/ijc.10608
40. Aida T, Takebayashi Y, Shimizu T, Okamura C, Higashimoto M, Kanzaki A, Nakayama K, Terada K, Sugiyama T, Miyazaki K, Ito K, Takenoshita S, Yaegashi N. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a prognostic factor in human endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 2004; 97: 41-5. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.12.042
41. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen Z-S, Terada K, Furukawa T, Yang X-L, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S-i. Copper-transporting P-Type Adenosine Triphosphatase (ATP7B) Is Associated with Cisplatin Resistance. *Cancer Research*. 2000; 60: 1312-6.
42. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M, Howell SB. Increased Expression of the Copper Efflux Transporter ATP7A Mediates Resistance to Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin in Ovarian Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 2004; 10: 4661-9. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-0137
43. Xu W, Cai B, Chen JL, Li LX, Zhang JR, Sun YY, Wan XP. ATP7B antisense oligodeoxynucleotides increase the cisplatin sensitivity of human ovarian cancer cell line SKOV3ipl. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2008; 18: 718-22. doi: 10.1111/j.1525-1438.2007.01085.x

44. Parker RJ, Eastman A, Bostick-Bruton F, Reed E. Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 87: 772-7.
45. Masuda H, Tanaka T, Matsuda H, Kusaba I. Increased Removal of DNA-bound Platinum in a Human Ovarian Cancer Cell Line Resistant to cis-Diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Research*. 1990; 50: 1863-6.
46. Johnson SW, Perez RP, Godwin AK, Yeung AT, Handel LM, Ozols RF, Hamilton TC. Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Biochemical Pharmacology*. 1994; 47: 689-97. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90132-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(94)90132-5)
47. Lai G-M, Ozols RF, Smyth JF, Young RC, Hamilton TC. Enhanced DNA repair and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *Biochemical pharmacology*. 1988; 37: 4597-600.
48. Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, Hamilton TC. Enhanced Cisplatin Cytotoxicity by Disturbing the Nucleotide Excision Repair Pathway in Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Research*. 2003; 63: 1311-6.
49. Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ercc1-xpf. *Biochemical Pharmacology*. 2000; 60: 1305-13. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00441-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00441-X)
50. Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *Journal of Clinical Investigation*. 1994; 94: 703.
51. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer treatment reviews*. 1998; 24: 331-44.
52. Chang I-Y, Kim M-H, Kim HB, Kim S-H, Kim H-Y, You HJ. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005; 327: 225-33.
53. Stevens EV, Nishizuka S, Antony S, Reimers M, Varma S, Young L, Munson PJ, Weinstein JN, Kohn EC, Pommier Y. Predicting cisplatin and trabectedin drug sensitivity in ovarian and colon cancers. *Molecular cancer therapeutics*. 2008; 7: 10-8.

54. Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair*. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74: 681-710.
55. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways. *Clinical Cancer Research.* 2008; 14: 1291-5. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-2238
56. Samimi G, Fink D, Varki NM, Husain A, Hoskins WJ, Alberts DS, Howell SB. Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clinical cancer research.* 2000; 6: 1415-21.
57. Drummond JT, Anthoney A, Brown R, Modrich P. Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL α and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *Journal of Biological Chemistry.* 1996; 271: 19645-8.
58. Strathdee G, MacKean M, Illand M, Brown R. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene.* 1999; 18.
59. Brown R, Hirst GL, Gallagher WM, McIlwrath AJ, Margison GP, van der Zee AG, Anthoney DA. hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene.* 1997; 15: 45-52.
60. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, Christen RD, Boland CR, Koi M, Fishel R. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer research.* 1996; 56: 3087-90.
61. Zeller C, Dai W, Steele NL, Siddiq A, Walley AJ, Wilhelm-Benartzi C, Rizzo S, van der Zee A, Plumb J, Brown R. Candidate DNA methylation drivers of acquired cisplatin resistance in ovarian cancer identified by methylome and expression profiling. *Oncogene.* 2012; 31: 4567-76.
62. Helleman J, Staveren IL, Dinjens WN, Kuijk PF, Ritstier K, Ewing PC, Burg ME, Stoter G, Berns EM. Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC cancer.* 2006; 6: 1.
63. Mesquita B, Veiga I, Pereira D, Tavares A, Pinto IM, Pinto C, Teixeira MR, Castedo S. No significant role for beta tubulin mutations and mismatch repair defects in ovarian cancer resistance to paclitaxel/cisplatin. *BMC cancer.* 2005; 5: 101.
64. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, Christen RD, Howell SB. The Role of DNA Mismatch Repair in Platinum Drug Resistance. *Cancer Research.* 1996; 56: 4881-6.

65. Lin X, Howell SB. Effect of loss of DNA mismatch repair on development of topotecan-, gemcitabine-, and paclitaxel-resistant variants after exposure to cisplatin. *Molecular pharmacology*. 1999; 56: 390-5.
66. Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *The American journal of pathology*. 1999; 155: 1767-72.
67. Kanaya T, Kyo S, Maida Y, Yatabe N, Tanaka M, Nakamura M, Inoue M. Frequent hypermethylation of MLH1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers. *Oncogene*. 2003; 22: 2352-60.
68. Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. Causes and Consequences of Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma. *Cancer Research*. 1999; 59: 462-6.
69. Masuda K, Banno K, Yanokura M, Kobayashi Y, Kisu I, Ueki A, Ono A, Asahara N, Nomura H, Hirasawa A, Susumu N, Aoki D. Relationship between DNA Mismatch Repair Deficiency and Endometrial Cancer. *Molecular Biology International*. 2011; 2011: 256063. doi: 10.4061/2011/256063
70. Welsh PL, King M-C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*. 2001; 10: 705-13. doi: 10.1093/hmg/10.7.705
71. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; 266: 66-71.
72. Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. Cancer Risk Estimates for BRCA1 Mutation Carriers Identified in a Risk Evaluation Program. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002; 94: 1365-72. doi: 10.1093/jnci/94.18.1365
73. Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. BRCA1 and BRCA2 hereditary breast and ovarian cancer. 2013.
74. Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, LaPolla J, Hoffman M, Martino MA, Wakeley K, Wilbanks G, Nicosia S, Cantor A, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*. 2005; 104: 2807-16. doi: 10.1002/cncr.21536

75. King M-C, Marks JH, Mandell JB, Group NYBCS. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*. 2003; 302: 643-6.
76. Segev Y, Iqbal J, Lubinski J, Gronwald J, Lynch HT, Moller P, Ghadirian P, Rosen B, Tung N, Kim-Sing C. The incidence of endometrial cancer in women with BRCA1 and BRCA2 mutations: an international prospective cohort study. *Gynecologic oncology*. 2013; 130: 127-31.
77. Beiner ME, Finch A, Rosen B, Lubinski J, Moller P, Ghadirian P, Lynch HT, Friedman E, Sun P, Narod SA. The risk of endometrial cancer in women with BRCA1 and BRCA2 mutations. A prospective study. *Gynecologic oncology*. 2007; 104: 7-10.
78. Thompson D, Easton DF, Consortium BCL. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002; 94: 1358-65.
79. Russell PA, Pharoah PD, De Foy K, Ramus SJ, Symmonds I, Wilson A, Scott I, Ponder BA, Gayther SA. Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *International journal of cancer*. 2000; 87: 317-21.
80. Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, Chang GK, Mullan PB, Johnston PG, Wilson RH, Harkin DP. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13: 7413-20.
81. Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer research*. 1998; 58: 1120-3.
82. Sylvain V, Lafarge S, Bignon Y-J. Dominant-negative activity of a Brcal truncation mutant: effects on proliferation, tumorigenicity in vivo, and chemosensitivity in a mouse ovarian cancer cell line. *International journal of oncology*. 2002; 20: 845-53.
83. Xing D, Orsulic S. A mouse model for the molecular characterization of brcal-associated ovarian carcinoma. *Cancer research*. 2006; 66: 8949-53.
84. Bartz SR, Zhang Z, Burchard J, Imakura M, Martin M, Palmieri A, Needham R, Guo J, Gordon M, Chung N. Small interfering RNA screens reveal enhanced cisplatin cytotoxicity in tumor cells having both BRCA network and TP53 disruptions. *Molecular and cellular biology*. 2006; 26: 9377-86.

85. Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, Arden-Jones A, Norman A, Kaye SB, Gore ME. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 26: 5530-6.
86. Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, Villegas E, Jacquemont C, Farrugia DJ, Couch FJ. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*. 2008; 451: 1116-20.
87. Cheung LW, Hennessy BT, Li J, Yu S, Myers AP, Djordjevic B, Lu Y, Stemke-Hale K, Dyer MD, Zhang F. High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer discovery*. 2011; 1: 170-85.
88. Urick ME, Rudd ML, Godwin AK, Sgroi D, Merino M, Bell DW. PIK3R1 (p85 α) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. *Cancer research*. 2011; 71: 4061-7.
89. Rudd ML, Price JC, Fogoros S, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ, Bell DW. A unique spectrum of somatic PIK3CA (p110 α) mutations within primary endometrial carcinomas. *Clinical Cancer Research*. 2011; 17: 1331-40.
90. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer research*. 2004; 64: 7678-81.
91. Oda K, Stokoe D, Taketani Y, McCormick F. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer research*. 2005; 65: 10669-73.
92. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery*. 2012; 2: 401-4. doi: 10.1158/2159-8290.cd-12-0095
93. Fabi F, Asselin E. Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. *Reproduction*. 2014; 148: R85-R95. doi: 10.1530/rep-14-0270
94. Lee S, Choi E-J, Jin C, Kim D-H. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecologic oncology*. 2005; 97: 26-34.

95. Mitsuuchi Y, Johnson SW, Selvakumaran M, Williams SJ, Hamilton TC, Testa JR. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signal transduction pathway plays a critical role in the expression of p21WAF1/CIP1/SDI1 induced by cisplatin and paclitaxel. *Cancer Research*. 2000; 60: 5390-4.
96. Gagnon V, Mathieu I, Sexton E, Leblanc K, Asselin E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2004; 94: 785-95. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.06.023
97. Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis*. 2008; 13: 259-71. doi: 10.1007/s10495-007-0165-6
98. Girouard J, Lafleur M-J, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*. 2013; 128: 335-43. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.11.016>
99. Fraser M, Leung BM, Yan X, Dan HC, Cheng JQ, Tsang BK. p53 Is a Determinant of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein/Akt-Mediated Chemoresistance in Human Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*. 2003; 63: 7081-8.
100. Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-dependent Cleavage during Cisplatin-induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells. *Cancer Research*. 2001; 61: 1862-8.
101. Yang X, Fraser M, Moll UM, Basak A, Tsang BK. Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway. *Cancer research*. 2006; 66: 3126-36.
102. Abedini M, Muller E, Bergeron R, Gray D, Tsang B. Akt promotes chemoresistance in human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of FLICE-like inhibitory protein. *Oncogene*. 2010; 29: 11-25.
103. Kim SH, Juhnn YS, Song YS. Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1095: 82-9.
104. Peng D-J, Wang J, Zhou J-Y, Wu GS. Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 394: 600-5.

105. Yuan Z-q, Feldman RI, Sussman GE, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT2 Inhibition of Cisplatin-induced JNK/p38 and Bax Activation by Phosphorylation of ASK1 implication of AKT2 in chemoresistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 23432-40.
106. Yan X, Fraser M, Qiu Q, Tsang BK. Over-expression of PTEN sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner. *Gynecologic oncology*. 2006; 102: 348-55.
107. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, Li J, Parsons R, Ellenson LH. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer research*. 1997; 57: 3935-40.
108. Wu H, Cao Y, Weng D, Xing H, Song X, Zhou J, Xu G, Lu Y, Wang S, Ma D. Effect of tumor suppressor gene PTEN on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms. *Cancer letters*. 2008; 271: 260-71.
109. Singh M, Chaudhry P, Fabi F, Asselin E. Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance. *BMC cancer*. 2013; 13: 233.
110. Ying H, Qu D, Liu C, Ying T, Lv J, Jin S, Xu H. Chemoresistance is associated with Beclin-1 and PTEN expression in epithelial ovarian cancers. *Oncology letters*. 2015; 9: 1759-63.
111. Van Themsche C, Leblanc V, Parent S, Asselin E. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. *J Biol Chem*. 2009; 284: 20462-6. doi: C109.009522
112. Asselin E, Wang Y, Tsang BK. X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Rat Granulosa Cells during Follicular Development 1. *Endocrinology*. 2001; 142: 2451-7.
113. Cheng JQ, Jiang X, Fraser M, Li M, Dan HC, Sun M, Tsang BK. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. *Drug resistance updates*. 2002; 5: 131-46.
114. Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang H-G, Tsang BK, Cheng JQ. Akt Phosphorylation and Stabilization of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 5405-12. doi: 10.1074/jbc.M312044200

115. Mansouri A, Zhang Q, Ridgway LD, Tian L, Claret F-X. Cisplatin resistance in an ovarian carcinoma is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation. *Oncology research*. 2003; 13: 399.
116. Ma J-j, Chen B-l, Xin X-y. XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009; 146: 222-6.
117. Sasaki H, Sheng Y, Kotsuji F, Tsang BK. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Research*. 2000; 60: 5659-66.
118. Li J, Sasaki H, Sheng Y, Schneiderman D, Xiao C, Kotsuji F, Tsang BK. Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant? *Neurosignals*. 2000; 9: 122-30.
119. Astanehe A, Arenillas D, Wasserman WW, Leung PC, Dunn SE, Davies BR, Mills GB, Auersperg N. Mechanisms underlying p53 regulation of PIK3CA transcription in ovarian surface epithelium and in ovarian cancer. *Journal of cell science*. 2008; 121: 664-74.
120. Fraser M, Bai T, Tsang BK. Akt promotes cisplatin resistance in human ovarian cancer cells through inhibition of p53 phosphorylation and nuclear function. *International Journal of Cancer*. 2008; 122: 534-46.
121. Roberts P, Der C. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007; 26: 3291-310.
122. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B-e, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1. *Endocrine reviews*. 2001; 22: 153-83.
123. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life*. 2006; 58: 621-31. doi: 10.1080/15216540600957438
124. Cagnol S, Chambard J-C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal*. 2010; 277: 2-21. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x
125. Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y, Siddik ZH, Mills GB, Claret FX. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 19245-56.

126. Villedieu M, Deslandes E, Duval M, Héron J-F, Gauduchon P, Poulain L. Acquisition of chemoresistance following discontinuous exposures to cisplatin is associated in ovarian carcinoma cells with progressive alteration of FAK, ERK and p38 activation in response to treatment. *Gynecologic oncology*. 2006; 101: 507-19.
127. Chan DW, Liu VW, Tsao GS, Yao K-M, Furukawa T, Chan KK, Ngan HY. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29: 1742-50.
128. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011; 36: 320-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
129. Villella J, Cohen S, Smith D, Hibshoosh H, Hershman D. HER-2/neu overexpression in uterine papillary serous cancers and its possible therapeutic implications. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2006; 16: 1897-902.
130. Slomovitz BM, Broaddus RR, Burke TW, Sneige N, Soliman PT, Wu W, Sun CC, Munsell MF, Gershenson DM, Lu KH. Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2004; 22: 3126-32.
131. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European journal of cancer*. 2001; 37: 9-15.
132. Konecny G, Santos L, Winterhoff B, Hatmal M, Keeney G, Mariani A, Jones M, Neuper C, Thomas B, Muderspach L. HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer. *British journal of cancer*. 2009; 100: 89-95.
133. Sheng Q, Liu J. The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer*. 2011; 104: 1241-5.
134. Stadlmann S, Gueth U, Reiser U, Diener P-A, Zeimet AG, Wight E, Mirlacher M, Sauter G, Mihatsch MJ, Singer G. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer. *Modern Pathology*. 2006; 19: 607-10.
135. Siwak DR, Carey M, Hennessy BT, Nguyen CT, McGahren Murray MJ, Nolden L, Mills GB. Targeting the epidermal growth factor receptor in epithelial ovarian cancer: current knowledge and future challenges. *Journal of oncology*. 2009; 2010.

136. Reyes HD, Thiel KW, Carlson MJ, Meng X, Yang S, Stephan J-M, Leslie KK. Comprehensive profiling of EGFR/HER receptors for personalized treatment of gynecologic cancers. *Molecular diagnosis & therapy*. 2014; 18: 137-51.
137. Marth C, Widschwendter M, Kaern J. Cisplatin resistance is associated with reduced interferon-gamma-sensitivity and increased HER-2 expression in cultured ovarian carcinoma cells. *British journal of cancer*. 1997; 76: 1328.
138. Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ, Slamon DJ. The effect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1997; 15.
139. Mori N, Kyo S, Nakamura M, Hashimoto M, Maida Y, Mizumoto Y, Takakura M, Ohno S, Kiyono T, Inoue M. Expression of HER-2 affects patient survival and paclitaxel sensitivity in endometrial cancer. *British journal of cancer*. 2010; 103: 889-98.
140. Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhöfer N, Meinert R, Arand M, Knapstein PG, Becker R, Oesch F, Tanner B. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase II α to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer research*. 1999; 59: 3206-14.
141. Qiu L, Di W, Jiang Q, Scheffler E, Derby S, Yang J, Kouttab N, Wanebo H, Yan B, Wan Y. Targeted inhibition of transient activation of the EGFR-mediated cell survival pathway enhances paclitaxel-induced ovarian cancer cell death. *International journal of oncology*. 2005; 27: 1441-8.
142. Sasaki N, Kudoh K, Kita T, Tsuda H, Furuya K, Kikuchi Y. Effect of HER-2/neu overexpression on chemoresistance and prognosis in ovarian carcinoma. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2007; 33: 17-23.
143. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors [alpha] and [beta] in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2004; 50: 3-22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.003
144. Wray S, Noble K. Sex hormones and excitation-contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20: 451-61. doi: JNE1665
145. Dauvois S, White R, Parker MG. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci*. 1993; 106 (Pt 4): 1377-88.
146. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology*. 2005; 19: 833-42.

147. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. GPR30: AG protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007; 265: 138-42.
148. Won YS, Lee SJ, Yeo SG, Park DC. Effects of female sex hormones on clusterin expression and paclitaxel resistance in endometrial cancer cell lines. *Int J Med Sci*. 2012; 9: 86-92.
149. Luvsandagva B, Nakamura K, Kitahara Y, Aoki H, Murata T, Ikeda S, Minegishi T. GRP78 induced by estrogen plays a role in the chemosensitivity of endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*. 2012; 126: 132-9.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.04.025>
150. Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, Nishio Y, Arimoto-Ishida E, Yada-Hashimoto N, Tasaka K, Murata Y. Estrogen inhibits paclitaxel-induced apoptosis via the phosphorylation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in human ovarian cancer cell lines. *Endocrinology*. 2004; 145: 49-58.
151. Sui M, Zhang H, Fan W. The Role of Estrogen and Estrogen Receptors in Chemoresistance. *Curr Med Chem*. 2011.
152. Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*. 2014; 14: 359-70.
153. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992; 358: 15-6.
154. Berchuck A, Kohler MF, Marks JR, Wiseman R, Boyd J, Bast RC. The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994; 170: 246-52.
155. Garg K, Leitao MM, Wynveen CA, Sica GL, Shia J, Shi W, Soslow RA. p53 overexpression in morphologically ambiguous endometrial carcinomas correlates with adverse clinical outcomes. *Modern Pathology*. 2010; 23: 80-92.
156. Nijman H, Lambeck A, Van Der Burg S, Van Der Zee A, Daemen T. Immunologic aspect of ovarian cancer and p53 as tumor antigen. *Journal of translational medicine*. 2005; 3: 34.
157. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA. Snail and Slug Mediate Radioresistance and Chemoresistance by Antagonizing p53-Mediated Apoptosis and Acquiring a Stem-Like Phenotype in Ovarian Cancer Cells. *Stem cells*. 2009; 27: 2059-68.

158. Reles A, Wen WH, Schmider A, Gee C, Runnebaum IB, Kilian U, Jones LA, El-Naggar A, Minguillon C, Schönborn I. Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2001; 7: 2984-97.
159. Buttitta F, Marchetti A, Gadducci A, Pellegrini S, Morganti M, Carnicelli V, Cosio S, Galletti O, Genazzani A, Bevilacqua G. p53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study. *British journal of cancer*. 1997; 75: 230.
160. Leung E, Fraser M, Fiscus R, Tsang B. Cisplatin alters nitric oxide synthase levels in human ovarian cancer cells: involvement in p53 regulation and cisplatin resistance. *British journal of cancer*. 2008; 98: 1803-9.
161. Abedini MR, Muller EJ, Brun J, Bergeron R, Gray DA, Tsang BK. Cisplatin induces p53-dependent FLICE-like inhibitory protein ubiquitination in ovarian cancer cells. *Cancer research*. 2008; 68: 4511-7.
162. Sato S, Kigawa J, Minagawa Y, Okada M, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Terakawa N. Chemosensitivity and p53-dependent apoptosis in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer*. 1999; 86: 1307-13.
163. Jones NA, Turner J, McIlwrath AJ, Brown R, Dive C. Cisplatin-and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53. *Molecular pharmacology*. 1998; 53: 819-26.
164. Mir R, Tortosa A, Martinez-Soler F, Vidal A, Condom E, Pérez-Perarnau A, Ruiz-Larroya T, Gil J, Giménez-Bonafé P. Mdm2 antagonists induce apoptosis and synergize with cisplatin overcoming chemoresistance in TP53 wild-type ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2013; 132: 1525-36.
165. Lavarino C, Delia D, Di Palma S, Zunino F, Pilotti S. p53 in drug resistance in ovarian cancer. *The Lancet*. 1997; 349: 1556.
166. Vandenput I, Capoen A, Coenegrachts L, Verbist G, Moerman P, Vergote I, Amant F. Expression of ERCC1, p53, and class III β -tubulin do not reveal chemoresistance in endometrial cancer: results from an immunohistochemical study. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2011; 21: 1071-7.
167. Sultana H, Kigawa J, Kanamori Y, Itamochi H, Oishi T, Sato S, Kamazawa S, Ohwada M, Suzuki M, Terakawa N. Chemosensitivity and p53–Bax pathway-mediated apoptosis in patients with uterine cervical cancer. *Annals of oncology*. 2003; 14: 214-9.

168. Rouette A, Parent S, Girouard J, Leblanc V, Asselin E. Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2012; 130: 1755-67. doi: 10.1002/ijc.26183
169. Perego P, Righetti S, Supino R, Delia D, Caserini C, Carenini N, Bedogne B, Broome E, Krajewski S, Reed J. Role of apoptosis and apoptosis-related proteins in the cisplatin-resistant phenotype of human tumor cell lines. *Apoptosis*. 1997; 2: 540-8.
170. El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM. Identification of a Unique Core Domain of Par-4 Sufficient for Selective Apoptosis Induction in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23: 5516-25. doi: 10.1128/mcb.23.16.5516-5525.2003
171. Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. *Oncogene*. 2010; 29: 3873-80.
172. Tan J, You Y, Xu T, Yu P, Wu D, Deng H, Zhang Y, Bie P. Par-4 downregulation confers cisplatin resistance in pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway-dependent EMT. *Toxicology Letters*. 2014; 224: 7-15. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.008>
173. Boehrer S, Chow KU, Beske F, Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Ruthardt M, Baum C, Rangnekar VM, Hoelzer D, Mitrou PS. In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation. *Cancer research*. 2002; 62: 1768-75.
174. Jagtap JC, Dawood P, Shah RD, Chandrika G, Natesh K, Shiras A, Hegde AS, Ranade D, Shastry P. Expression and Regulation of Prostate Apoptosis Response-4 (Par-4) in Human Glioma Stem Cells in Drug-Induced Apoptosis. *PLoS ONE*. 2014; 9: e88505. doi: 10.1371/journal.pone.0088505
175. Pereira MC, De Bessa-Garcia SA, Burikhanov R, Pavanelli AC, Antunes L, Rangnekar VM, Nagai MA. Prostate apoptosis response-4 is involved in the apoptosis response to docetaxel in MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2013; 43: 531-8. doi: 10.3892/ijo.2013.1983
176. Jagtap JC, Parveen D, Shah RD, Desai A, Bhosale D, Chugh A, Ranade D, Karnik S, Khedkar B, Mathur A. Secretory prostate apoptosis response (Par)-4 sensitizes multicellular spheroids (MCS) of glioblastoma multiforme cells to tamoxifen-induced cell death. *FEBS open bio*. 2015; 5: 8-19.

177. Casolari DA, Pereira MC, de Bessa Garcia SA, Nagai MA. Insulin-like growth factor-1 and 17beta-estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2011; 28: 337-42. doi: 10.3892/ijmm.2011.691
178. Brasseur K, Fabi F, Adam P, Parent S, Lessard L, Asselin E. Post-translational regulation of the cleaved fragment of Par-4 in ovarian and endometrial cancer cells. 2016; 7: 36971-36987. doi: 10.18632/oncotarget.9235
179. Meynier S, Kramer M, Ribaux P, Tille JC, Delie F, Petignat P, Cohen M. Role of PAR-4 in ovarian cancer. 2015; 8: 6: 22641-52. doi: 10.18632/oncotarget.4010
180. Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *The oncologist*. 2003; 8: 411-24.
181. Seiden MV, Swenerton KD, Matulonis U, Campos S, Rose P, Batist G, Ete E, Garg V, Fuller A, Harding MW. A phase II study of the MDR inhibitor biricodar (INCEL, VX-710) and paclitaxel in women with advanced ovarian cancer refractory to paclitaxel therapy. *Gynecologic oncology*. 2002; 86: 302-10.
182. Fracasso PM, Brady MF, Moore DH, Walker JL, Rose PG, Letvak L, Grogan TM, McGuire WP. Phase II study of paclitaxel and valspodar (PSC 833) in refractory ovarian carcinoma: a gynecologic oncology group study. *Journal of clinical oncology*. 2001; 19: 2975-82.
183. Kelly RJ, Draper D, Chen CC, Robey RW, Figg WD, Piekarz RL, Chen X, Gardner ER, Balis FM, Venkatesan AM. A pharmacodynamic study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist tariquidar (XR9576) in patients with lung, ovarian, and cervical cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011; 17: 569-80.
184. Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, Okiji S, Liddle C, Bootle D, Plumb JA, Templeton D, Charlton P. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer research*. 2001; 61: 749-58.
185. Di Nicolantonio F, Knight LA, Glaysher S, Whitehouse PA, Mercer SJ, Sharma S, Mills L, Prin A, Johnson P, Charlton PA. Ex vivo reversal of chemoresistance by tariquidar (XR9576). *Anti-cancer drugs*. 2004; 15: 861-9.
186. Tutt A, Lord C, McCabe N, Farmer H, Turner N, Martin N, Jackson S, Smith G, Ashworth A. Exploiting the DNA repair defect in BRCA mutant cells in the design of new therapeutic strategies for cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 139-48. 2005.

187. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N. Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *The Lancet*. 2010; 376: 245-51.
188. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott C, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2012; 366: 1382-92.
189. Gelmon KA, Tischkowitz M, Mackay H, Swenerton K, Robidoux A, Tonkin K, Hirte H, Huntsman D, Clemons M, Gilks B. Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: a phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *The lancet oncology*. 2011; 12: 852-61.
190. Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmaña J, Mitchell G, Fried G, Stemmer SM, Hubert A. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *Journal of Clinical Oncology*. 2015; 33: 244-50.
191. Lee J-M, Hays JL, Annunziata CM, Noonan AM, Minasian L, Zujewski JA, Yu M, Gordon N, Ji J, Sissung TM. Phase I/Ib study of olaparib and carboplatin in BRCA1 or BRCA2 mutation-associated breast or ovarian cancer with biomarker analyses. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014; 106: dju089.
192. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *cell*. 1999; 96: 857-68.
193. Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, Poole C, Mathijssen RH, Sonke GS, Colombo N, Špaček J, Vuylsteke P, Hirte H. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2015; 16: 87-97.
194. Liu JF, Barry WT, Birrer M, Lee J-M, Buckanovich RJ, Fleming GF, Rimel B, Buss MK, Nattam S, Hurteau J. Combination cediranib and olaparib versus olaparib alone for women with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2014; 15: 1207-14.

195. Coleman RL, Sill MW, Bell-McGuinn K, Aghajanian C, Gray HJ, Tewari KS, Rubin SC, Rutherford TJ, Chan JK, Chen A. A phase II evaluation of the potent, highly selective PARP inhibitor veliparib in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer in patients who carry a germline BRCA1 or BRCA2 mutation—An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2015; 137: 386-91.
196. Kummar S, Oza AM, Fleming GF, Sullivan DM, Gandara DR, Naughton MJ, Villalona-Calero MA, Morgan RJ, Szabo PM, Youn A. Randomized trial of oral cyclophosphamide and veliparib in high-grade serous ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancers, or BRCA-mutant ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015; 21: 1574-82.
197. Sandhu SK, Schelman WR, Wilding G, Moreno V, Baird RD, Miranda S, Hylands L, Riisnaes R, Forster M, Omlin A. The poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor niraparib (MK4827) in BRCA mutation carriers and patients with sporadic cancer: a phase 1 dose-escalation trial. *The lancet oncology*. 2013; 14: 882-92.
198. Penson R, Whalen C, Lasonde B, Krasner C, Konstantinopoulos P, Stallings T, Bradley C, Birrer M, Matulonis U. (2011). A phase II trial of iniparib (BSI-201) in combination with gemcitabine/carboplatin (GC) in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 5004.
199. Aghajanian C, Sill MW, Secord AA, Powell MA, Steinhoff M. Iniparib plus paclitaxel and carboplatin as initial treatment of advanced or recurrent uterine carcinosarcoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic oncology*. 2012; 126: 424-7.
200. Ihnen M, zu Eulenburg C, Kolarova T, Qi JW, Manivong K, Chalukya M, Dering J, Anderson L, Ginther C, Meuter A. Therapeutic potential of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib for the treatment of sporadic human ovarian cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2013; 12: 1002-15.
201. Kristeleit RS, Shapiro G, LoRusso P, Infante JR, Flynn M, Patel MR, Tolaney SM, Hilton JF, Calvert AH, Giordano H. (2013). A phase I dose-escalation and PK study of continuous oral rucaparib in patients with advanced solid tumors. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 2585.
202. Drew Y, Ledermann J, Hall G, Rea D, Glasspool R, Highley M, Jayson G, Sludden J, Murray J, Jamieson D. Phase 2 multicentre trial investigating intermittent and continuous dosing schedules of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib in germline BRCA mutation carriers with advanced ovarian and breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2016.

203. Yin Y, Shen W. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*. 2008; 27: 5443-53.
204. Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, Wada-Hiraike O, Kashiya T, Enomoto A, Hosoya N, Koso T, Fukuda T, Inaba K. Anti-tumor activity of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. *BMC cancer*. 2014; 14: 179.
205. Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim JS, Waldman T, Lord CJ, Ashworth A. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO molecular medicine*. 2009; 1: 315-22.
206. Forster MD, Dedes KJ, Sandhu S, Frentzas S, Kristeleit R, Ashworth A, Poole CJ, Weigelt B, Kaye SB, Molife LR. Treatment with olaparib in a patient with PTEN-deficient endometrioid endometrial cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011; 8: 302-6.
207. Gentile F, Tuszynski JA, Barakat KH. New design of nucleotide excision repair (NER) inhibitors for combination cancer therapy. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2016; 65: 71-82.
208. Martin SA, Hewish M, Sims D, Lord CJ, Ashworth A. Parallel high-throughput RNA interference screens identify PINK1 as a potential therapeutic target for the treatment of DNA mismatch repair-deficient cancers. *Cancer research*. 2011; 71: 1836-48.
209. Martin SA, McCabe N, Mullarkey M, Cummins R, Burgess DJ, Nakabeppu Y, Oka S, Kay E, Lord CJ, Ashworth A. DNA polymerases as potential therapeutic targets for cancers deficient in the DNA mismatch repair proteins MSH2 or MLH1. *Cancer cell*. 2010; 17: 235-48.
210. Martin SA, McCarthy A, Barber LJ, Burgess DJ, Parry S, Lord CJ, Ashworth A. Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2. *EMBO molecular medicine*. 2009; 1: 323-37.
211. Xiao X, Melton DW, Gourley C. Mismatch repair deficiency in ovarian cancer-molecular characteristics and clinical implications. *Gynecologic oncology*. 2014; 132: 506-12.
212. Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer research*. 2000; 60: 6039-44.

213. Fang F, Balch C, Schilder J, Breen T, Zhang S, Shen C, Li L, Kulesavage C, Snyder AJ, Nephew KP. A phase 1 and pharmacodynamic study of decitabine in combination with carboplatin in patients with recurrent, platinum-resistant, epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 2010; 116: 4043-53.
214. Matei D, Fang F, Shen C, Schilder J, Arnold A, Zeng Y, Berry WA, Huang T, Nephew KP. Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer. *Cancer research*. 2012; 72: 2197-205.
215. Ohta T, Ohmichi M, Hayasaka T, Mabuchi S, Saitoh M, Kawagoe J, Takahashi K, Igarashi H, Du B, Doshida M. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in in vivo ovarian cancer models. *Endocrinology*. 2006; 147: 1761-9.
216. Juvekar A, Burga LN, Hu H, Lunsford EP, Ibrahim YH, Balmaña J, Rajendran A, Papa A, Spencer K, Lyssiotis CA. Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer. *Cancer discovery*. 2012; 2: 1048-63.
217. Matulonis U, Wulf GM, Birrer MJ, Westin SN, Quy P, Bell-McGuinn KM, Lasonde B, Whalen C, Aghajanian C, Solit DB. (2014). Phase I study of oral BKM120 and oral olaparib for high-grade serous ovarian cancer (HGSC) or triple-negative breast cancer (TNBC). *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 2510.
218. Von Hoff D, LoRusso P, Demetri G, Weiss G, Shapiro G, Ramanathan R, Ware J, Raja R, Jin J, Levy G. (2011). A phase I dose-escalation study to evaluate GDC-0941, a pan-PI3K inhibitor, administered QD or BID in patients with advanced or metastatic solid tumors. *ASCO annual meeting proceedings*, pp. 3052.
219. Moreno Garcia V, Baird R, Shah K, Basu B, Tunariu N, Blanco M, Cassier P, Pedersen J, Puglisi M, Sarker D. (2011). A phase I study evaluating GDC-0941, an oral phosphoinositide-3 kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors or multiple myeloma. *ASCO annual meeting proceedings*, pp. 3021.
220. Matulonis U, Vergote I, Backes F, Martin LP, McMeekin S, Birrer M, Campana F, Xu Y, Egile C, Ghamande S. Phase II study of the PI3K inhibitor pilaralisib (SAR245408; XL147) in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology*. 2015; 136: 246-53.
221. Gonzalez-Angulo AM, Juric D, Argiles G, Schellens JH, Burris HA, Berlin J, Middleton MR, Schuler MH, Geel RV, Helgason T. (2013). Safety, pharmacokinetics, and preliminary activity of the α -specific PI3K inhibitor BYL719: Results from the first-in-human study. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 2531.

222. Kigawa J. New Strategy for Overcoming Resistance to Chemotherapy of Ovarian Cancer. *Yonago Acta medica*. 2013; 56: 43-50.
223. Sinha D, Bannerjee S, Schwartz JH, Lieberthal W, Levine JS. Inhibition of ligand-independent ERK1/2 activity in kidney proximal tubular cells deprived of soluble survival factors up-regulates Akt and prevents apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 10962-72.
224. Bedard PL, Tabernero J, Janku F, Wainberg ZA, Paz-Ares L, Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Pérez-García J, Stathis A, Britten CD. A phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2015; 21: 730-8.
225. Juric D, Soria J-C, Sharma S, Banerji U, Azaro A, Desai J, Ringeisen FP, Kaag A, Radhakrishnan R, Hourcade-Potelleret F. (2014). A phase 1b dose-escalation study of BYL719 plus binimetinib (MEK162) in patients with selected advanced solid tumors. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 9051.
226. Meyer LA, Slomovitz BM, Djordjevic B, Westin SN, Iglesias DA, Munsell MF, Jiang Y, Schmandt R, Broaddus RR, Coleman RL. The search continues: looking for predictive biomarkers for response to mammalian target of rapamycin inhibition in endometrial cancer. *International journal of gynecological cancer*. 2014; 24: 713-7.
227. Santiskulvong C, Konecny GE, Fekete M, Chen K-YM, Karam A, Mulholland D, Eng C, Wu H, Song M, Dorigo O. Dual targeting of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach in human ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2011;17: 2373-84.
228. Shoji K, Oda K, Kashiyama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A. Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas. *PloS one*. 2012; 7: e37431.
229. Lin Y-H, Chen BY-H, Lai W-T, Wu S-F, Guh J-H, Cheng A-L, Hsu L-C. The Akt inhibitor MK-2206 enhances the cytotoxicity of paclitaxel (Taxol) and cisplatin in ovarian cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2015; 388: 19-31.
230. Pant A, Lee II, Lu Z, Rueda BR, Schink J, Kim JJ. Inhibition of AKT with the orally active allosteric AKT inhibitor, MK-2206, sensitizes endometrial cancer cells to progestin. *PLoS One*. 2012; 7: e41593.

231. Engel JB, Honig A, Schönhals T, Weidler C, Häusler S, Krockenberger M, Grunewald TG, Dombrowski Y, Rieger L, Dietl J. Perifosine inhibits growth of human experimental endometrial cancers by blockade of AKT phosphorylation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2008; 141: 64-9.
232. Sun H, Yu T, Li J. Co-administration of perifosine with paclitaxel synergistically induces apoptosis in ovarian cancer cells: more than just AKT inhibition. *Cancer letters*. 2011; 310: 118-28.
233. Engel JB, Schönhals T, Häusler S, Krockenberger M, Schmidt M, Horn E, Köster F, Dietl J, Wischhusen J, Honig A. Induction of programmed cell death by inhibition of AKT with the alkylphosphocholine perifosine in in vitro models of platinum sensitive and resistant ovarian cancers. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2011; 283: 603-10.
234. Hahne J, Honig A, Meyer S, Gambaryan S, Walter U, Wischhusen J, Häussler S, Segerer S, Fujita N, Dietl J. Downregulation of AKT reverses platinum resistance of human ovarian cancers in vitro. *Oncology reports*. 2012; 28: 2023-8.
235. Davies BR, Greenwood H, Dudley P, Crafter C, Yu D-H, Zhang J, Li J, Gao B, Ji Q, Maynard J, Ricketts S-A, Cross D, Cosulich S, et al. Preclinical Pharmacology of AZD5363, an Inhibitor of AKT: Pharmacodynamics, Antitumor Activity, and Correlation of Monotherapy Activity with Genetic Background. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012; 11: 873-87. doi: 10.1158/1535-7163.mct-11-0824-t
236. Myers AP, Broaddus R, Makker V, Konstantinopoulos PA, Drapkin R, Horowitz NS, Liu J, Van Hummelen P, Meric-Bernstam F, Birrer MJ. Phase II, two-stage, two-arm, PIK3CA mutation stratified trial of MK-2206 in recurrent endometrial cancer (EC). *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 5524. 2013.
237. Fu S, Hennessey BT, Ng CS, Ju Z, Coombes KR, Wolf JK, Sood AK, Levenback CF, Coleman RL, Kavanagh JJ. Perifosine plus docetaxel in patients with platinum and taxane resistant or refractory high-grade epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2012; 126: 47-53.
238. Banerji U, Ranson M, Schellens JH, Esaki T, Dean E, Zivi A, Van der Noll R, Stockman PK, Marotti M, Garrett MD. Abstract LB-66: Results of two phase I multicenter trials of AZD5363, an inhibitor of AKT1, 2 and 3: Biomarker and early clinical evaluation in Western and Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Research*. 2013; 73: LB-66-LB-.

239. Gungor H, Saleem A, Agarwal R, Blagden S, Michael A, Stronach E, Chen M, Pickford E, Rama N, Lewis Y. (2011). Pharmacokinetic (PK)/pharmacodynamic (PD) analysis of escalating repeat doses of the AKT inhibitor GSK2141795 (GSK795) in patients (pts) with ovarian cancer. ASCO Annual Meeting Proceedings, pp. 5064.
240. Burris H, Siu L, Infante J, Wheler J, Kurkjian C, Opalinska J, Smith D, Antal J, Gauvin J, Gonzalez T. (2011). Safety, pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), and clinical activity of the oral AKT inhibitor GSK2141795 (GSK795) in a phase I first-in-human study. ASCO Annual Meeting Proceedings, pp. 3003.
241. Kurzrock R, Patnaik A, Rosenstein L, Fu S, Papadopoulos K, Smith D, Falchook G, Chambers G, Gauvin J, Naing A. Phase I dose-escalation of the oral MEK1/2 inhibitor GSK1120212 (GSK212) dosed in combination with the oral AKT inhibitor GSK2141795 (GSK795). ASCO Annual Meeting Proceedings, pp. 3085. 2011.
242. Janku F, Wheler JJ, Westin SN, Moulder SL, Naing A, Tsimberidou AM, Fu S, Falchook GS, Hong DS, Garrido-Laguna I. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2012; 30: 777-82.
243. Ibrahim YH, García-García C, Serra V, He L, Torres-Lockhart K, Prat A, Anton P, Cozar P, Guzmán M, Grueso J. PI3K inhibition impairs BRCA1/2 expression and sensitizes BRCA-proficient triple-negative breast cancer to PARP inhibition. *Cancer discovery*. 2012; 2: 1036-47.
244. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006; 124: 471-84.
245. Behbakht K, Sill MW, Darcy KM, Rubin SC, Mannel RS, Waggoner S, Schilder RJ, Cai KQ, Godwin AK, Alpaugh RK. Phase II trial of the mTOR inhibitor, temsirolimus and evaluation of circulating tumor cells and tumor biomarkers in persistent and recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2011; 123: 19-26.
246. Takano M, Kikuchi Y, Kudoh K, Goto T, Furuya K, Kikuchi R, Kita T, Fujiwara K, Shiozawa T, Aoki D. Weekly administration of temsirolimus for heavily pretreated patients with clear cell carcinoma of the ovary: a report of six cases. *International journal of clinical oncology*. 2011; 16: 605-9.

247. Morgan R, Oza A, Qin R, Laumann K, Mackay H, Strevel E, Welch S, Sullivan D, Wenham R, Chen H. A phase II trial of temsirolimus and bevacizumab in patients with endometrial, ovarian, hepatocellular carcinoma, carcinoid, or islet cell cancer: Ovarian cancer (OC) subset--A study of the Princess Margaret, Mayo, Southeast phase II, and California Cancer (CCCCP) N01 Consortia NCI# 8233. ASCO Annual Meeting Proceedings, pp. 5015. 2011.
248. Fleming GF, Filiaci VL, Marzullo B, Zaino RJ, Davidson SA, Pearl M, Makker V, Burke JJ, Zweizig SL, Van Le L. Temsirolimus with or without megestrol acetate and tamoxifen for endometrial cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecologic oncology*. 2014; 132: 585-92.
249. Oza AM, Elit L, Tsao M-S, Kamel-Reid S, Biagi J, Provencher DM, Gotlieb WH, Hoskins PJ, Ghatage P, Tonkin KS. Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29: 3278-85.
250. Einstein MH, Wenham RM, Morgan R, Cristea MC, Strevel EL, Oza AM, Kaubisch A, Fruth B, Qin R, Erlichman C. (2012). Phase II trial of temsirolimus and bevacizumab for initial recurrence of endometrial cancer. ASCO Annual Meeting Proceedings, pp. 5025.
251. Alvarez EA, Brady WE, Walker JL, Rotmensch J, Zhou XC, Kendrick JE, Yamada SD, Schilder JM, Cohn DE, Harrison CR. Phase II trial of combination bevacizumab and temsirolimus in the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2013; 129: 22-7.
252. Mabuchi S, Altomare DA, Connolly DC, Klein-Szanto A, Litwin S, Hoelzle MK, Hensley HH, Hamilton TC, Testa JR. RAD001 (Everolimus) delays tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer. *Cancer Research*. 2007; 67: 2408-13.
253. Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulikakos PI, Hensley HH, Schilder RJ, Ozols RF, Testa JR. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13: 4261-70.
254. Slomovitz BM, Lu KH, Johnston T, Coleman RL, Munsell M, Broaddus RR, Walker C, Ramondetta LM, Burke TW, Gershenson DM. A phase 2 study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor, everolimus, in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Cancer*. 2010; 116: 5415-9.

255. Slomovitz BM, Jiang Y, Yates MS, Soliman PT, Johnston T, Nowakowski M, Levenback C, Zhang Q, Ring K, Munsell MF. Phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015; JCO. 2014.58. 3401.
256. Ray-Coquard I, Favier L, Weber B, Roemer-Becuwe C, Bournoux P, Fabbro M, Floquet A, Joly F, Plantade A, Paraiso D. Everolimus as second-or third-line treatment of advanced endometrial cancer: ENDORAD, a phase II trial of GINECO. *British journal of cancer*. 2013; 108: 1771-7.
257. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005; 307: 1098-101.
258. O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research*. 2006; 66: 1500-8.
259. Leslie K, Sill M, Darcy K, Baron A, Wilken J, Godwin A, Cook L, Schilder R, Schilder J, Maible N. (2009). Efficacy and safety of gefitinib and potential prognostic value of soluble EGFR, EGFR mutations, and tumor markers in a Gynecologic Oncology Group phase II trial of persistent or recurrent endometrial cancer. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. e16542.
260. Posadas EM, Liel MS, Kwitkowski V, Minasian L, Godwin AK, Hussain MM, Espina V, Wood BJ, Steinberg SM, Kohn EC. A phase II and pharmacodynamic study of gefitinib in patients with refractory or recurrent epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 2007; 109: 1323-30.
261. Schilder RJ, Sill MW, Chen X, Darcy KM, Decesare SL, Lewandowski G, Lee RB, Arciero CA, Wu H, Godwin AK. Phase II study of gefitinib in patients with relapsed or persistent ovarian or primary peritoneal carcinoma and evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group Study. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 5539-48.
262. Wagner U, du Bois A, Pfisterer J, Huober J, Loibl S, Lück H-J, Sehouli J, Gropp M, Stähle A, Schmalfeldt B. Gefitinib in combination with tamoxifen in patients with ovarian cancer refractory or resistant to platinum-taxane based therapy-a phase II trial of the AGO Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR 2.6). *Gynecologic oncology*. 2007; 105: 132-7.

263. Pautier P, Joly F, Kerbrat P, Bougnoux P, Fumoleau P, Petit T, Rixe O, Ringeisen F, Carrasco AT, Lhommé C. Phase II study of gefitinib in combination with paclitaxel (P) and carboplatin (C) as second-line therapy for ovarian, tubal or peritoneal adenocarcinoma (1839IL/0074). *Gynecologic oncology*. 2010; 116: 157-62.
264. Mavroudis D, Efstathiou E, Polyzos A, Athanasiadis A, Milaki G, Kastritis E, Kalykaki A, Saridaki Z, Dimopoulos A, Georgoulas V. A phase I-II trial of gefitinib in combination with vinorelbine and oxaliplatin as salvage therapy in women with advanced ovarian cancer (AOC). *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 5020. 2004.
265. Oza AM, Eisenhauer EA, Elit L, Cutz J-C, Sakurada A, Tsao MS, Hoskins PJ, Biagi J, Ghatage P, Mazurka J. Phase II study of erlotinib in recurrent or metastatic endometrial cancer: NCIC IND-148. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 26: 4319-25.
266. Finkler N, Gordon A, Crozier M, Edwards R, Figueroa J, Garcia A, Hainsworth J, Irwin D, Silberman S, Allen L. Phase 2 evaluation of OSI-774, a potent oral antagonist of the EGFR-TK in patients with advanced ovarian carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol*, pp. 208a. 2001.
267. Vasey P, Gore M, Wilson R, Rustin G, Gabra H, Guastalla J, Lauraine E, Paul J, Carty K, Kaye S. A phase Ib trial of docetaxel, carboplatin and erlotinib in ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancers. *British journal of cancer*. 2008; 98: 1774-80.
268. Hirte H, Oza A, Swenerton K, Ellard S, Grimshaw R, Fisher B, Tsao M, Seymour L. A phase II study of erlotinib (OSI-774) given in combination with carboplatin in patients with recurrent epithelial ovarian cancer (NCIC CTG IND. 149). *Gynecologic oncology*. 2010; 118: 308-12.
269. Seiden MV, Burris H, Matulonis U, Hall J, Armstrong D, Speyer J, Weber J, Muggia F. A phase II trial of EMD72000 (matuzumab), a humanized anti-EGFR monoclonal antibody, in patients with platinum-resistant ovarian and primary peritoneal malignancies. *Gynecologic oncology*. 2007; 104: 727-31.
270. Schilder RJ, Pathak HB, Lokshin AE, Holloway RW, Alvarez RD, Aghajanian C, Min H, Devarajan K, Ross E, Drescher CW. Phase II trial of single agent cetuximab in patients with persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma with the potential for dose escalation to rash. *Gynecologic oncology*. 2009; 113: 21-7.

271. Konner J, Schilder RJ, DeRosa FA, Gerst SR, Tew WP, Sabbatini PJ, Hensley ML, Spriggs DR, Aghajanian CA. A phase II study of cetuximab/paclitaxel/carboplatin for the initial treatment of advanced-stage ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *Gynecologic oncology*. 2008; 110: 140-5.
272. Secord AA, Blessing JA, Armstrong DK, Rodgers WH, Miner Z, Barnes MN, Lewandowski G, Mannel RS. Phase II trial of cetuximab and carboplatin in relapsed platinum-sensitive ovarian cancer and evaluation of epidermal growth factor receptor expression: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2008; 108: 493-9.
273. Takahashi K, Saga Y, Mizukami H, Takei Y, Machida S, Fujiwara H, Ozawa K, Suzuki M. Cetuximab inhibits growth, peritoneal dissemination, and lymph node and lung metastasis of endometrial cancer, and prolongs host survival. *International journal of oncology*. 2009; 35: 725-9.
274. Rose PG, Brunetto VL, VanLe L, Bell J, Walker JL, Lee RB. A phase II trial of anastrozole in advanced recurrent or persistent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2000; 78: 212-6.
275. Del Carmen MG, Fuller AF, Matulonis U, Horick NK, Goodman A, Duska LR, Penson R, Campos S, Roche M, Seiden MV. Phase II trial of anastrozole in women with asymptomatic müllerian cancer. *Gynecologic oncology*. 2003; 91: 596-602.
276. Krasner C, Debernardo R, Findley M, Penson R, Matulonis U, Atkinson T, Roche M, Seiden M. Phase II trial of anastrozole in combination with gefitinib in women with asymptomatic mullerian cancer. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 5063. 2005.
277. Ma B, Oza A, Eisenhauer E, Stanimir G, Carey M, Chapman W, Latta E, Sidhu K, Powers J, Walsh W. The activity of letrozole in patients with advanced or recurrent endometrial cancer and correlation with biological markers—a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2004; 14: 650-8.
278. Bowman A, Gabra H, Langdon SP, Lessells A, Stewart M, Young A, Smyth JF. CA125 Response Is Associated with Estrogen Receptor Expression in a Phase II Trial of Letrozole in Ovarian Cancer Identification of an Endocrine-sensitive Subgroup. *Clinical cancer research*. 2002; 8: 2233-9.
279. Papadimitriou CA, Markaki S, Siapkarakas J, Vlachos G, Efstathiou E, Grimani I, Hamilos G, Zorzou M, Dimopoulos M-A. Hormonal therapy with letrozole for relapsed epithelial ovarian cancer. *Oncology*. 2004; 66: 112-7.

280. Smyth JF, Gourley C, Walker G, MacKean MJ, Stevenson A, Williams AR, Al Nafussi A, Rye T, Rye R, Stewart M. Antiestrogen therapy is active in selected ovarian cancer cases: the use of letrozole in estrogen receptor-positive patients. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13: 3617-22.
281. Ramirez PT, Schmeler KM, Milam MR, Slomovitz BM, Smith JA, Kavanagh JJ, Deavers M, Levenback C, Coleman RL, Gershenson DM. Efficacy of letrozole in the treatment of recurrent platinum-and taxane-resistant high-grade cancer of the ovary or peritoneum. *Gynecologic oncology*. 2008; 110: 56-9.
282. Verma S, Alhayki M, Le T, Baines K, Rambout L, Hopkins L, Fung Kee Fung M. Phase II study of exemestane (E) in refractory ovarian cancer (ROC). ASCO Annual Meeting Proceedings, pp. 5026. 2006.
283. Covens AL, Filiaci V, Gersell D, Lutman CV, Bonebrake A, Lee Y-C. Phase II study of fulvestrant in recurrent/metastatic endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2011; 120: 185-8.
284. Argenta PA, Thomas SG, Judson PL, Downs LS, Geller MA, Carson LF, Jonson AL, Ghebre R. A phase II study of fulvestrant in the treatment of multiply-recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2009; 113: 205-9.
285. Argenta PA, Um I, Kay C, Harrison D, Faratian D, Sueblinvong T, Geller MA, Langdon SP. Predicting response to the anti-estrogen fulvestrant in recurrent ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2013; 131: 368-73.
286. Burke TW, Walker CL. Arzoxifene as therapy for endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2003; 90: S40-S6.
287. McMeekin DS, Gordon A, Fowler J, Melemed A, Buller R, Burke T, Bloss J, Sabbatini P. A phase II trial of arzoxifene, a selective estrogen response modulator, in patients with recurrent or advanced endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2003; 90: 64-9.
288. Mäenpää J, Sipilä P, Kangas L, Karnani P, Grönroos M. Chemosensitizing effect of an antiestrogen, toremifene, on ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 1992; 46: 292-7.
289. Slomovitz B, Brown J, Johnston T, Mura D, Levenback C, Wolf J, Adler K, Lu K, Coleman R. A phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma. ASCO Annual Meeting Proceedings, pp. 5012. 2011.

290. Brasseur K, Leblanc V, Fabi F, Parent S, Descôteaux C, Bérubé G, Asselin E. ER α -Targeted Therapy in Ovarian Cancer Cells by a Novel Estradiol-Platinum(II) Hybrid. *Endocrinology*. 2013; 154: 2281-95. doi:10.1210/en.2013-1083
291. Leffers N, Lambeck AJ, Gooden MJ, Hoogeboom BN, Wolf R, Hamming IE, Hepkema BG, Willemse PH, Molmans BH, Hollema H. Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial. *International Journal of Cancer*. 2009; 125: 2104-13.
292. Vermeij R, Leffers N, Hoogeboom BN, Hamming IL, Wolf R, Reyners AK, Molmans BH, Hollema H, Bart J, Drijfhout JW. Potentiation of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: A single-arm phase II study. *International Journal of Cancer*. 2012; 131: E670-E80.
293. Leffers N, Vermeij R, Hoogeboom BN, Schulze UR, Wolf R, Hamming IE, van der Zee AG, Melief KJ, van der Burg SH, Daemen T. Long-term clinical and immunological effects of p53-SLP $\text{\textcircled{R}}$ vaccine in patients with ovarian cancer. *International Journal of Cancer*. 2012; 130: 105-12.
294. Buller RE, Runnebaum IB, Karlan BY, Horowitz JA, Shahin M, Buekers T, Petrauskas S, Kreienberg R, Slamon D, Pegram M. A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer. *Cancer gene therapy*. 2002; 9: 553-66.
295. Buller RE, Shahin MS, Horowitz JA, Runnebaum IB, Mahavni V, Petrauskas S, Kreienberg R, Karlan B, Slamon D, Pegram M. Long term follow-up of patients with recurrent ovarian cancer after Ad p53 gene replacement with SCH 58500. *Cancer gene therapy*. 2002; 9: 567-72.
296. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature medicine*. 1997; 3: 639-45.
297. Vasey P, Shulman L, Campos S, Davis J, Gore M, Johnston S, Kirn D, O'Neill V, Siddiqui N, Seiden MV. Phase I Trial of Intraperitoneal Injection of the E1B-55-kd-Gene-Deleted Adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical oncology*. 2002; 20: 1562-9.

298. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall R, Heise C. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature medicine*. 2000; 6: 879-85.
299. Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, Sze D, Wein LM, Andrews J, Randlev B, Heise C, Uprichard M, Hatfield M. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520) phase ii viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer research*. 2002; 62: 6070-9.
300. Hirai H, Iwasawa Y, Okada M, Arai T, Nishibata T, Kobayashi M, Kimura T, Kaneko N, Ohtani J, Yamanaka K. Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Molecular cancer therapeutics*. 2009; 8: 2992-3000.
301. Brana I, Moore KN, Shapira-Frommer R, Welch S, Jou Y-M, Marinucci M, Freshwater T, Rose S, Oza AM. Targeting p53 mutant ovarian cancer: Phase I results of the WEE1 inhibitor MK-1775 with carboplatin plus paclitaxel in patients (pts) with platinum-sensitive, p53-mutant ovarian cancer (OC). *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 5518. 2013.
302. Oza AM, Weberpals JI, Provencher DM, Grischke E-M, Hall M, Uyar D, Estevez-Diz MDP, Marme F, Kuzmin A, Rosenberg P. An international, biomarker-directed, randomized, phase II trial of AZD1775 plus paclitaxel and carboplatin (P/C) for the treatment of women with platinum-sensitive, TP53-mutant ovarian cancer. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 5506. 2015.
303. Leijen S, Van Geel R, Sonke GS, de Jong D, Rosenberg EH, Marchetti S, Pluim D, van Werkhoven ED, Rose S, Lee MA. Phase II study with Wee1 inhibitor AZD1775 plus carboplatin in patients with p53 mutated ovarian cancer refractory or resistant (< 3 months) to standard first line therapy. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. 2507. 2015.
304. Lheureux S, Weberpals JI, Wahner Hendrickson AE, Fleming GF, Olawaiye A, Brana I, Mackay H, Dhani NC, Wilson MK, Rodriguez-Freixinos V. A randomized, placebo-controlled phase II trial comparing gemcitabine monotherapy to gemcitabine in combination with AZD 1775 (MK 1775) in women with recurrent, platinum-resistant epithelial ovarian, primary peritoneal, or Fallopian tube cancers: Trial of Princess Margaret, Mayo, Chicago, and California consortia. *ASCO Annual Meeting Proceedings*, pp. TPS5613. 2015.
305. Kobayashi N, Abedini M, Sakuragi N, Tsang BK. PRIMA-1 increases cisplatin sensitivity in chemoresistant ovarian cancer cells with p53 mutation: a requirement for Akt down-regulation. *Journal of ovarian research*. 2013; 6: 1.

306. Mohell N, Alfredsson J, Fransson Å, Uustalu M, Byström S, Gullbo J, Hallberg A, Bykov V, Björklund U, Wiman K. APR-246 overcomes resistance to cisplatin and doxorubicin in ovarian cancer cells. *Cell death & disease*. 2015; 6: e1794.
307. Mikael vE, Klas GW, Hani G, James DB, Ignace V, Charlie G, Smith A, Jessica A, Nina M, John G. Phase I/II study of APR-246, a mutant p53 reactivating compound, in combination with standard chemotherapy in platinum sensitive ovarian cancer. 12th international congress on targeted anticancer therapies. 2014.
308. Kline CL, Shanmugavelandy SS, Kester M, Irby RB. Delivery of PAR-4 plasmid in vivo via nanoliposomes sensitizes colon tumor cells subcutaneously implanted into nude mice to 5-FU. *Cancer biology & therapy*. 2009; 8: 1831-7.
309. Burikhanov R, Yanming Z, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR, Rangnekar VM. The Tumor Suppressor Par-4 Activates an Extrinsic Pathway for Apoptosis. (Cambridge, MA, États-Unis: Cell Press). 2009.
310. Sarkar S, Jain S, Rai V, Sahoo DK, Raha S, Suklabaidya S, Senapati S, Rangnekar VM, Maiti IB, Dey N. Plant-derived SAC domain of PAR-4 (Prostate Apoptosis Response 4) exhibits growth inhibitory effects in prostate cancer cells. *Frontiers in plant science*. 2015; 6.
311. Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM. Par-4 Drives Trafficking and Activation of Fas and FasL to Induce Prostate Cancer Cell Apoptosis and Tumor Regression. *Cancer Research*. 2001; 61: 7255-63.
312. Klintman M, Buus R, Cheang MCU, Sheri A, Smith IE, Dowsett M. Changes in Expression of Genes Representing Key Biologic Processes after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer, and Prognostic Implications in Residual Disease. *Clinical Cancer Research*. 2016; 22: 2405-16.
313. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013; 501: 338-45.
314. Zhao J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacology & therapeutics*. 2016; 160: 145-58.
315. Abdullah LN, Chow EK-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and translational medicine*. 2013; 2: 1.
316. Haygood CLW, Arend RC, Straughn JM, Buchsbaum DJ. Ovarian cancer stem cells: Can targeted therapy lead to improved progression-free survival? *World J Stem Cells*. 2014; 6: 441-7.

317. Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer research*. 2005; 65: 3025-9.
318. 318. Hu L, McArthur C, Jaffe R. Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumourigenic and chemoresistant. *British journal of cancer*. 2010; 102: 1276-83.
319. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai H-C, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer research*. 2008; 68: 4311-20.
320. Ma S, Lee T, Zheng B, Chan K, Guan X. CD133+; HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*. 2008; 27: 1749-58.
321. Tomida A, Tsuruo T. Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors. *Anti-cancer drug design*. 1999; 14: 169-77.
322. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4: 437-47.
323. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science*. 2012; 125: 5591-6.

Supplementary table

Agent	Single/combined	Target	Phase	Tissue	# patients	Response	Comments	Reference
Tarividar	Combined with docetaxel	p-Glycoprotein and mitosis		Ovary, cervix and lung	48 patients	4/48 PR (1 PR in ovarian cancer)		[184]
Olaparib	Single	PARP	II	Ovary	33 patients	11/33 ORR		[188]
Olaparib	Single	PARP	II	Ovary	265 patients platinum-sensitive (136 treated and 129 placebo)	Treated patients: PFS of 8,4 months Placebo patients: PFS of 4,8 months	The effect observed was independent of BRCA status.	[189]
Olaparib	Single	PARP	II	Ovary	63 patients (17 BRCA mutations and 46 BRCA WT)	BRCA mutations: 7/17 ORR BRCA WT: 11/46 ORR		[190]
Olaparib	Single	PARP	II	Ovary	193 patients platinum-resistant	60/193 ORR		[191]
Olaparib	Combined with carboplatin	PARP and mitosis	I/Ib	Ovary	37 patients	1/37 CR; 15/37 PR	FOXO3a expression was predictive of the response.	[192]
Olaparib	Combined with carboplatin and paclitaxel	PARP and mitosis	II	Ovary	162 patients platinum-sensitive (81 treated with Olaparib+chemotherapy and 75 chemotherapy only)	PFS of 12,2 months for combined treatment versus 9,6 months for chemotherapy only	Only 41/107 patients had BRCA mutations.	[194]
Olaparib	Combined with cediranib	PARP and angiogenesis	II	Ovary	90 patients platinum-sensitive (44 treated with Olaparib+cediranib and 46 Olaparib only)	PFS of 17,7 months for combined treatment versus 9 months for Olaparib only		[195]
Olaparib	Single	PARP		Endometrium	58-year-old women	Reduction of brain metastases Improvement of tumor-related symptoms	Absence of BRCA mutations but instead, PTEN loss.	[207]
Veliparib	Single	PARP	II	Ovary	50 patients (20 platinum-sensitive and 30 platinum-resistant)	All patients: ORR of 26% (2 CR and 11 PR) Platinum-sensitive: ORR of 35% Platinum-resistant: ORR of 20%		[196]
Veliparib	Combined with cyclophosphamide	PARP and mitosis	II	Ovary	72 patients (37 treated with Veliparib+cyclophosphamide and 38 cyclophosphamide only)	Combination: 1/37 CR; 3/37 PR Cyclophosphamide only: 1/38 CR; 6/37 PR	The addition of Veliparib did not improve the response rate or PFS.	[197]

Niraparib	Single	PARP	I	Ovary and peritoneum	42 patients (20 BRCA mutations and 22 BRCA WT)	BRCA mutations : 8/20 PR; 2/20 SD	Platinum sensitivity of patients was also considered when analyzing the response rate. No significant difference was observed in the CBR from BRCA mutation carrier (50% for sensitive and 50% for resistant), however, CBR was twice lower in BRCA WT platinum resistant patients (67% for sensitive and 32% for resistant)	[198]
						BRCA WT : 5/22 PR; 3/22 SD	No correlation has been associated with loss of PTEN.	
Iniparib	Combined with carboplatin and gemcitabine	PARP and mitosis	II	Ovary	17 patients platinum-sensitive	ORR of 71%	BRCA status was not associated with response rate.	[199]
Iniparib	Combined with carboplatin and paclitaxel	PARP and mitosis		Uterus	17 patients	4/17 ORR		[200]
Rucaparib	Single	PARP	I	Diverse (including ovary)	29 patients (7 ovarian/peritoneal cancer)	All cancer : 2/29 PR; 10/29 SD Ovarian/peritoneal cancer: 1/7 PR; 5/7 SD; 6/7 CBR (86%)	Efficient in ovarian/peritoneal cancer patients.	[202]
Rucaparib	Single	PARP	II	Ovary	22 patients	ORR of 15%	12 of the 13 patients who received continuously Rucaparib achieved either CR, PR or SD for more than 12 weeks.	[203]
Decitabine	Combined with carboplatin	Demethylating genes related to MMR deficiency and mitosis	I	Ovary	10 patients platinum-resistant	1/10 CR; 3/10 SD	HOXA11 and BRCA1 cancer associated genes were demethylated after treatment.	[214]
Decitabine	Combined with carboplatin	Demethylating genes related to MMR deficiency and mitosis	II	Ovary	17 patients platinum-resistant	Response rate of 35% 53% had a PFS > 6 months The PFS had a median of 10.2 months	Efficient demethylation of RASSF1A, HOXA10, HOXA11 and MLH1 which correlated with PFS.	[215]
Temsirolimus	Single	mTORC1	II	Ovary	54 patients	9/54 PR		[217]
Temsirolimus	Single	mTORC1		Ovary	5 patients chemo-resistant	1/5 PR; 1/5 SD		[218]
Temsirolimus	Combined with bevacizumab	mTORC1 and angiogenesis		Ovary	31 patients (17 platinum-sensitive and 14 platinum-resistant); 25 patients were evaluable	3/25 PR; 9/25 SD	The 3 PR observed were from the platinum-resistant group.	[219]
Temsirolimus	Single	mTORC1	II	Endometrium	50 patients (29 chemo-naïve and 21 chemo-treated)	All patients: ORR of 22% Chemo-naïve: ORR of 24% Chemo-treated: ORR of 19%		[220]
Temsirolimus	Combined with megestrol acetate and tamoxifen	mTORC1, PR and ER	II	Endometrium	21 patients	3/21 responses	Adding megestrol acetate and tamoxifen to temsirolimus treatment did not improve the treatment efficiency and was associated with an increased toxicity. The trial was closed early because of toxicity.	[220]

Temsirolimus	Single	mTORC1	II	Endometrium	54 patients (29 chemo-naïve and 25 chemo-treated)	Chemo-naïve: 4/29 PR; 20/29 SD Chemo-treated: 1/25 PR; 12/25 SD	No association with PTEN status.	[221]
Temsirolimus	Combined with bevacizumab	mTORC1 and angiogenesis	II	Endometrium	26 patients	5/26 PR 12/26 patients had a PFS > 6 months		[222]
Temsirolimus	Combined with bevacizumab	mTORC1 and angiogenesis	II	Endometrium	49 patients	1/49 CR; 11/49 PR 23/49 patients had a PFS > 6 months		[223]
Everolimus	Single	mTORC1	II	Endometrium	28 patients previously chemo-treated	6/28 SD 6/28 CBR (22%)		[226]
Everolimus	Combined with Letrozole	mTORC1 and aromatase	II	Endometrium	35 patients	11/35 CR; 2/35 PR; 1/35 SD 14/35 CBR (40%)	Adding aromatase inhibitor increased the CBR from 22% to 40%.	[227]
Everolimus	Single	mTORC1	II	Endometrium	44 patients (2/3 previously chemo-treated)	4/44 PR	36% had a non-progressive disease after 3 months.	[228]
Buparlisib	Combined with Olaparib	Pan-PI3K and PARP	I	Ovary and breast	34 patients (25 ovarian cancer)	Evidence of clinical benefit by RECIST 1.1 was observed on all escalating dose levels	All dose combinations allowed the observation of clinical benefits among the patients. 26 patients had BRCA mutations.	[233]
GDC-041	Single	Pan-PI3K	I	Diverse (including ovary and endometrium)	49 patients	2/49 PR	One of the PR was an endocervical tumour with mutations on PIK3CA. CA125 responses were also observed in three patients with ovarian cancer including one with known high PIK3CA gene copy number.	[234]
GDC-041	Single	Pan-PI3K	I	Diverse (including ovary)	42 patients	2/42 PR	One of the PR was an ovarian tumour with PTEN loss.	[235]
Pilaralisib	Single	Pan-PI3K	II	Endometrium	67 patients	2/67 CR; 2/67 PR	No association was made between the molecular alterations of the PI3K pathway.	[236]
BYL719	Single	PIK3CA	I	Diverse (including ovary and endometrium)	36 patients PIK3CA mutants	7/36 PR	Among the PR, one from cervical, one from endometrium and one from the ovary.	[237]
Buparlisib	Combined with Trametinib	Pan-PI3K and MEK	Ib	Diverse (including ovary)	113 patients (21 ovarian cancer)	All cancer patients: ORR of 6% Ovarian cancer patients: 1/21 CR; 5/21 PR; 10/21 SD ORR of 29%	19 ovarian cancer patients were KRAS mutated demonstrating an efficient way to overcome this mutation. Buparlisib was efficient almost exclusively in ovarian cancer, the exception being a PR observed in a KRAS mutated NSCLC patient.	[240]
BYL719	Combined with binimetinib	PIK3CA and MEK	Ib	Diverse (including ovary and endometrium)	58 patients with RAS and BRAF mutations	5/58 PR; 18/58 SD	Four patients with ovarian cancer had KRAS mutation and 3 of these had a PR. A patient with endometrial cancer and KRAS mutation also had a PR.	[241]

MK-2206	Single	AKT	II	Endometrium	36 patients (9 PIK3CA mutants and 27 PIK3CA WT)	2/36 PR	Results were independent of the PIK3CA status.	[252]
Perifosine	Combined with docetaxel	AKT and mitosis	I	Ovary	21 patients taxane-resistant	1/21 PR; 3/21 SD	The patient with a PR was PTEN mutant. Among the patients with SD, two were PIK3CA mutant and 1 WT. Patients with KRAS mutation had a rapid tumor progression.	[253]
AZD5363	Single	AKT	I	Diverse (including ovary and endometrium)	92 patients	2/92 PR; 1/92 SD	Among the PR, one endometrioid cancer of the ovary and one cervical cancer with either PIK3CA or AKT1 mutation. The patient with a SD was an endometrioid cancer of the ovary with PIK3CA mutations.	[254]
GSK2141795	Single	AKT	I	Ovary	12 patients platinum-resistant	8/12 SD	The four patients left had a progressive disease.	[255]
GSK2141795	Single	AKT	I	Diverse (including endometrium)	66 patients (12 endometrial cancer)	Endometrial cancer patients: 2/12 SD	The two patients with SD were PIK3CA mutant and/or PTEN loss.	[256]
GSK2141795	Combined with GSK1120212	AKT and MEK	I	Diverse (including ovary and endometrium)	13 patients	3/13 had weak tumour regression	The patients with SD were two patients with ovarian cancer and one with endometrial cancer.	[257]
Gefitinib	Single	EGFR	II	Endometrium	26 patients	1/26 CR; 7/26 PR 4/26 patients had a PFS > 6 months		[260]
Gefitinib	Single	EGFR	II	Ovary	24 patients	9/24 SD > 2 months		[261]
Gefitinib	Single	EGFR	II	Ovary or peritoneum	27 patients	1/27 ORR 4/27 patients had a PFS > 6 months		[262]
Gefitinib	Combined with tamoxifen	EGFR and ER	II	Ovary	56 patients platinum- and taxane-resistant	16/56 SD		[263]
Gefitinib	Combined with paclitaxel and carboplatin	EGFR and mitosis	II	Ovary, fallopian tube or peritoneum	68 patients (26 platinum-resistant and 42 platinum-sensitive)	Platinum-resistant: ORR of 19.2% and CBR of 60.7% Platinum-sensitive: ORR of 61.9% and CBR of		[264]
Gefitinib	Combined with oxaliplatin and vinorelbine	EGFR and mitosis	I/II	Ovary	33 patients (23 platinum-resistant and 10 platinum-sensitive)	Platinum-resistant: ORR of 23.8% (3/26 CR; 2/26 PR) Platinum-sensitive: ORR of 90% (4/10 CR; 5/10 PR)		[265]
Erlotinib	Single	EGFR	II	Endometrium	32 patients	4/32 PR; 15/32 SD		[266]
Erlotinib	Single	EGFR	II	Ovary	34 patients	2/34 PR; 14/34 SD		[267]

Erlotinib	Combined with carboplatin and docetaxel	EGFR and mitosis	Ib	Ovary	23 patients chemo-naïve	ORR of 52% (5/23 CR; 7/23 PR)		[268]
Erlotinib	Combined with carboplatin	EGFR and mitosis	II	Ovary	50 patients (17 platinum-resistant and 33 platinum-sensitive)	Platinum-resistant: 1/17 PR Platinum-sensitive: 14/33 PR		[269]
Matuzumab	Single	EGFR	II	Ovary	37 patients platinum-resistant	7/37 SD		[270]
Cetuximab	Single	EGFR	II	Ovary or peritoneum	25 patients platinum-resistant	1/25 PR; 9/25 SD		[271]
Cetuximab	Combined with carboplatin and paclitaxel	EGFR and mitosis	II	Ovary	40 patients chemo-naïve	No increase of PFS by adding Cetuximab		[272]
Cetuximab	Combined with carboplatin	EGFR and mitosis	II	Ovary	28 patients platinum-sensitive	9/28 ORR (3/28 CR; 6/28 PR); 6/28 SD	26 patients had EGFR-positive tumors.	[273]
Anastrozole	Single	Aromatase	II	Endometrium	23 patients	2/23 PR; 2/23 SD		[275]
Anastrozole	Single	Aromatase	II	Ovary, fallopian tube or peritoneum	53 patients (43 ovarian cancer)	1/53 PR; 36/53 SD		[276]
Anastrozole	Combined with gefitinib	Aromatase and EGFR	II	Ovary, fallopian tube or peritoneum	35 patients (30 ovarian cancer) 23 patients were evaluable	1/23 CR; 14/23 SD		[277]
Letrozole	Single	Aromatase	II	Endometrium	28 patients chemo-naïve	1/28 CR; 2/28 PR; 11/28 SD	Different markers including the hormone receptors were screened but were not correlated with response to letrozole.	[278]
Letrozole	Single	Aromatase	II	Ovary	50 patients	10/50 SD	They observed a correlation between the response to letrozole and high estrogen receptor level.	[279]
Letrozole	Single	Aromatase	II	Ovary	21 patients	1/21 CR; 2/21 PR; 4/21 SD	No association was found between hormone receptors and response to letrozole.	[280]
Letrozole	Single	Aromatase	II	Ovary	33 patients expressing ER	3/33 PR; 14/33 SD		[281]
Letrozole	Single	Aromatase	II	Ovary	31 patients platinum- and taxane-resistant; expressing ER	7/31 SD		[282]
Exemestane	Single	Aromatase	II	Ovary	24 patients platinum- and taxane-treated	8/24 SD		[283]
Fulvestrant	Single	Estrogen receptor	II	Endometrium	53 patients (31 ER positive and 22 ER negative)	ER positive: 1/31 CR; 4/31 PR; 9/31 SD ER negative: 4/22 SD		[284]
Fulvestrant	Single	Estrogen receptor	II	Ovary	26 patients	1/26 CR; 1/26 PR; 9/26 SD	Response rate was positively correlated with ER status.	[285]

Arzoxifene	Single	Estrogen receptor	II	Endometrium	66 patients (35 progesterone sensitive and 31 progesterone refractory)	ORR of 25% (ORR of 34% in the progesterone sensitive group)		[287]
Arzoxifene	Single	Estrogen receptor	II	Endometrium	34 patients	ORR of 31%		[287]
Arzoxifene	Single	Estrogen receptor	II	Endometrium	29 patients chemo-naïve; expressing ER	ORR of 31% (1/29 CR; 8/29 PR)		[288]
Toremifene	Single	Estrogen receptor		Ovary or uterus	8 patients	3/8 PR; 3/8 SD	The other 2 patients had progressive disease.	[289]
P53-SLP	Single	P53	II	Ovary	20 patients	2/20 SD	Well tolerated, stimulated T-Cell responses.	[292]
P53-SLP	Single, pre-treated with cyclophosphamide	P53	II	Ovary	10 patients	2/10 SD	Higher number of IFN- γ -producing T cells when compared to their previous study.	[293]
P53-SLP	Single	P53	II	Ovary	20 patients	2/20 SD (before chemotherapy)	P53-SLP did not enhance the efficiency of chemotherapy treatments, thus was not able to overcome the chemoresistance of advanced ovarian cancer patients.	[294]
SCH-58500	Single	P53	I/II	Ovary	24 patients	8/16 had at least 50% decrease of CA125	Patient who received a single dose of SCH-58500 had a median survival of 5 months versus 13 months for those who received multiple doses of SCH-58500.	[295, 296]
					16 patients evaluable			
ONYX-015	Single	P53	I	Ovary	16 patients	No response		[298]
MK-1775	Combined with carboplatin and paclitaxel	WEE1 and mitosis	I	Ovary	14 patients platinum-sensitive	11 PR; 3 SD		[302]
MK-1775	Combined with carboplatin and paclitaxel	WEE1 and mitosis	II	Ovary	121 patients platinum-sensitive (59 treated with MK-1775+chemo)	Combined treatment: ORR of 81% Chemotherapy only: ORR of 74%	Progression-free survival was greater with the addition of MK-1775.	[303]
MK-1775	Combined with carboplatin	WEE1 and mitosis	II	Ovary	22 patients platinum-resistant	6/22 PR; 9/22 SD PFS of 11 months		[304]

S.table 1: Clinical trials of targeted therapies in ovarian and endometrial cancers.

The table summarizes all the clinical trials discussed in the manuscript. The different column indicates the treatment, if it has been combined with a chemotherapeutic agent, the target, the clinical trial phase, the tissues studied, the number of patients evaluated, the responses observed, additional comments as well as the bibliographical reference to the clinical trial.