

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	vi
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	vii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Utérus.....	1
1.1.1 Anatomie et histologie.....	1
1.1.2 Le cycle menstruel.....	2
1.2 Développement d'un cancer.....	4
1.3 Cancer de l'utérus.....	6
1.3.1 Généralités.....	6
1.3.2 Facteurs de risque.....	7
1.3.3 Signes et symptômes.....	8
1.3.4 Stadification.....	9
1.3.5 Traitements.....	10
1.3.5.1 Doxorubicine.....	12
1.3.5.2 Paclitaxel.....	12
1.3.5.3 Cisplatine.....	13
1.4 Résistance à la chimiothérapie.....	14
1.5 Mort cellulaire.....	16
1.5.1 Nécrose.....	16
1.5.2 Apoptose.....	17
1.5.2.1 Voie extrinsèque.....	19
1.5.2.2 Voie intrinsèque.....	19
1.5.3 Caspases.....	20
1.6 Voie de signalisation de la PI3K.....	21
1.6.1 La protéine Akt.....	22
1.6.2 Les différents isoformes d'Akt.....	26

1.6.3 Akt et cancer	27
1.6.4 Akt et chimiorésistance.....	28
1.7 Inhibition de la voie PI3K/Akt	28
1.8 Hypothèse et objectifs	30
CHAPITRE II	
ARTICLE SCIENTIFIQUE	32
2.1 Résumé	32
2.2 Contributions des auteurs	32
2.3 Article scientifique	34
CHAPITRE III	
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	61
3.1 Discussion.....	61
3.2 Perspectives de recherche.....	68
3.3 Conclusion.....	71
RÉFÉRENCES.....	73

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure		Page
1.1	Représentation de l'utérus et des structures adjacentes	2
1.2	Le cycle reproducteur de la femme.....	4
1.3	Croissance tumorale et métastases.....	6
1.4	Représentation de la structure de la doxorubicine	12
1.5	Représentation de la structure du taxol.....	13
1.6	Représentation de la structure du cisplatine.....	14
1.7	Comparaison des changements morphologiques qui apparaissent dans l'apoptose et la nécrose.....	18
1.8	Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	20
1.9	Activation et régulation d'Akt	24
1.10	Akt régule la survie cellulaire par phosphorylation de multiples substrats ...	25
1.11	Représentation des trois isoformes d'Akt	26
1.12	Le clivage de l'ARN messager par l'ARN interférence	30
3.1	Représentation du vecteur pTRE-Tight	63
 Tableau		
1.1	Description des stades de cancer.....	9
1.2	Description des grades de cancer.....	10

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

α	alpha
AF-1	Fonction hormono-indépendante d'activation de transcription 1
AF-2	Fonction hormono-dépendante d'activation de transcription 2
Ago	argonaute
Apaf-1	« apoptosis activating factor 1 »
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
β	bêta
Bad	« Bcl-2 antagonist of cell death »
Bak	« Bcl-2 antagonist killer 1 »
Bax	« Bcl-2 associated X protein »
Bcl-2	« B-cell lymphoma 2 »
Bcl-xL	« B-cell lymphoma extra-large »
CA	constitutivement actif
Cdk2	« cycline dependent kinase 2 »
cIAP	« cellular inhibitor of apoptosis protein »
DISC	« death inducing silencing complex »
ER	récepteur à l'œstrogène
ERK	« extracellular signal regulated kinase »
FADD	« fas-associated death domain »
FIGO	Fédération de gynécologie et d'obstétrique
FOXO	« forkhead box O »
GSK-3	« glycogen synthase kinase 3 »
HDM2	« human double minute 2 »
IAP	protéines inhibitrices d'apoptose

IκB	« inhibitor κ-B »
ILK	« integrin-like kinase »
κ	kappa
LH	hormone lutéinisante
γ	gamma
MCL-1	« myeloid cell leukemia sequence 1 »
MDM 2	« murine double minute 2 »
MEK	« mitogen-activated protein kinase/ERK kinase »
mTOR	« mammalian target of rapamycin »
mTORC2	« mammalian target of rapamycin complex 2 »
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NFAT	« nuclear factor of activated T-cell 1 »
NFκB	« nuclear factor κ-B »
PARP	« poly adenosine diphosphate ribose polymerase »
PKD1	« phosphoinositide-dependent kinase »
PH	« pleckstrin homology »
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol (4, 5)-biphosphate
PIP3	phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PKA	protéine kinase A
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PARP	Poly ADP-Ribose Polymérase
PTEN	« phosphatase and tensin homologue »
P70S6K	« 70-kDa ribosomal protein S6 kinase »
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RISC	« RNA-induced silencing complex »
RTK	récepteur tyrosine kinase
shRNA	« short hairpin RNA »
siRNA	« small interfering RNA »
Smac/Diablo	« second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI »

TNFR	« tumor necrosis factor receptor »
TRAIL-R	« TNF-related apoptosis inducing ligand receptor »
XIAP	« X-linked inhibitor of apoptosis protein »
4E-BP1	« 4E binding protein 1 »

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Utérus

L'utérus est un organe faisant partie du système reproducteur de la femme. En plus d'être le siège de la menstruation, il a comme principales fonctions de recevoir l'embryon et de permettre le développement du fœtus, de l'implantation embryonnaire jusqu'à l'accouchement [1, 2].

1.1.1 Anatomie et histologie

L'utérus est un organe musculaire, piriforme et creux, situé au centre de la cavité pelvienne, entre la vessie et le rectum [3]. D'un point de vue anatomique, il est divisé en trois parties : (a) le fondus, la partie supérieure et arrondie reliée aux trompes utérines, (b) le corps, la portion centrale et effilée et (c) le col, la partie inférieure étroite s'ouvrant dans le vagin [1] (Figure 1.1). En absence de grossesse, l'utérus a une longueur de 7,5 cm, une largeur de 5 cm et une épaisseur de 2,5 cm [3].

Du point de vue histologique, la paroi de l'utérus est constituée de trois couches tissulaires distinctes : (a) le périmètre, qui constitue la couche externe et qui est reliée au péritoine, (b) le myomètre, qui est constitué de muscles lisses qui se contractent lors de l'accouchement et (c) l'endomètre, qui est le revêtement interne de l'utérus [1]. L'endomètre est lui-même constitué d'un épithélium prismatique, d'un tissu conjonctif (stroma) hautement spécialisé, d'une vascularisation importante ainsi que de nombreuses glandes utérines [2]. Durant toute la période d'activité génitale, l'endomètre est constamment soumis à différentes variations hormonales qui sont responsables des nombreuses modifications morphologiques et fonctionnelles du tissu.

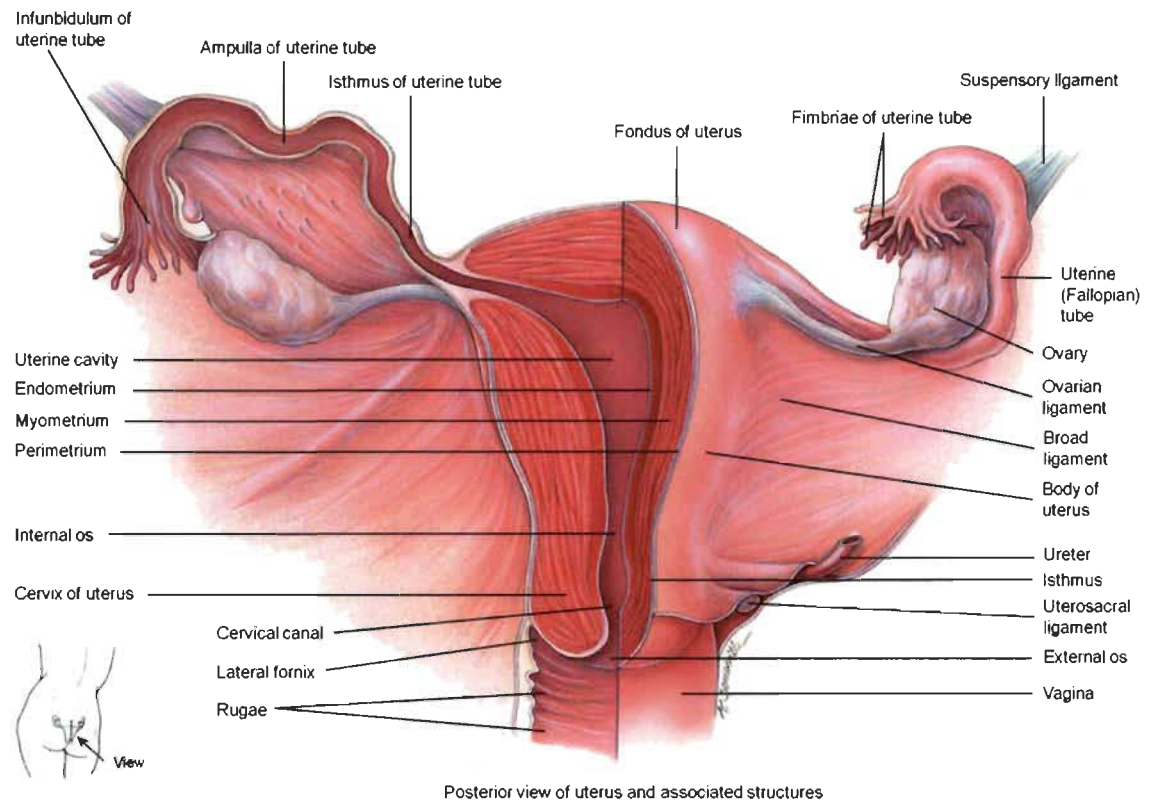


Figure 1.1 Représentation de l'utérus et des structures adjacentes, tirée de [1].

1.1.2 Le cycle menstruel

Le cycle menstruel est sous le contrôle d'un cycle mensuel de sécrétions hormonales hypothalamiques, pituitaires et ovariennes. Chaque mois, celui-ci aboutit à la production d'un gamète femelle (ovule) et à un utérus apte à recevoir un œuf fécondé [4]. Par convention, le cycle menstruel est de 28 jours et comprend quatre phases : la phase menstruelle, la phase proliférative, l'ovulation et la phase sécrétoire [5] (Figure 1.2).

La phase menstruelle débute au premier jour des règles et marque, par convention, le premier jour du cycle. Également appelée menstruation, cette phase s'étend du jour 1 au jour 4 du cycle. En absence d'implantation, c'est au cours de cette période que la couche fonctionnelle de l'endomètre se desquame peu à peu et s'écoule avec le flux menstruel [5].

La reconstruction de l'endomètre est amorcée durant la phase proliférative. Cette phase, d'une durée plus variable, s'étend en moyenne du jour 5 au jour 14. En réponse à l'augmentation des sécrétions œstrogéniques par les follicules ovariens, les cellules de la couche basale de l'endomètre prolifèrent. Elles produisent une nouvelle couche fonctionnelle dans laquelle des glandes utérines courtes et droites se forment à mesure que l'endomètre s'épaissit [5].

L'ovulation se produit généralement au jour 14 du cycle. Elle est déclenchée par un pic de sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) par la glande hypophysaire [5]. C'est à ce moment que le follicule mûr se rompt et que l'ovule est libéré dans la cavité pelvienne. Le follicule ayant été libéré par l'ovaire se transforme alors en corps jaune [4].

La phase sécrétoire constitue la période qui s'étend du jour 14 au jour 28 du cycle. La croissance et l'enroulement des glandes utérines sont alors favorisés par la production de progestérone et d'œstrogène par le corps jaune. La vascularisation de la couche superficielle de l'endomètre, son épaissement et l'augmentation de la quantité de liquide dans les tissus sont également favorisés et culminent environ une semaine après l'ovulation, moment qui correspond à l'arrivée possible d'un ovule fécondé. Dans le cas où aucun ovule n'est fécondé, le corps jaune dégénère et la chute des taux circulants d'œstrogène et de progestérone provoque de nouvelles menstruations [5].

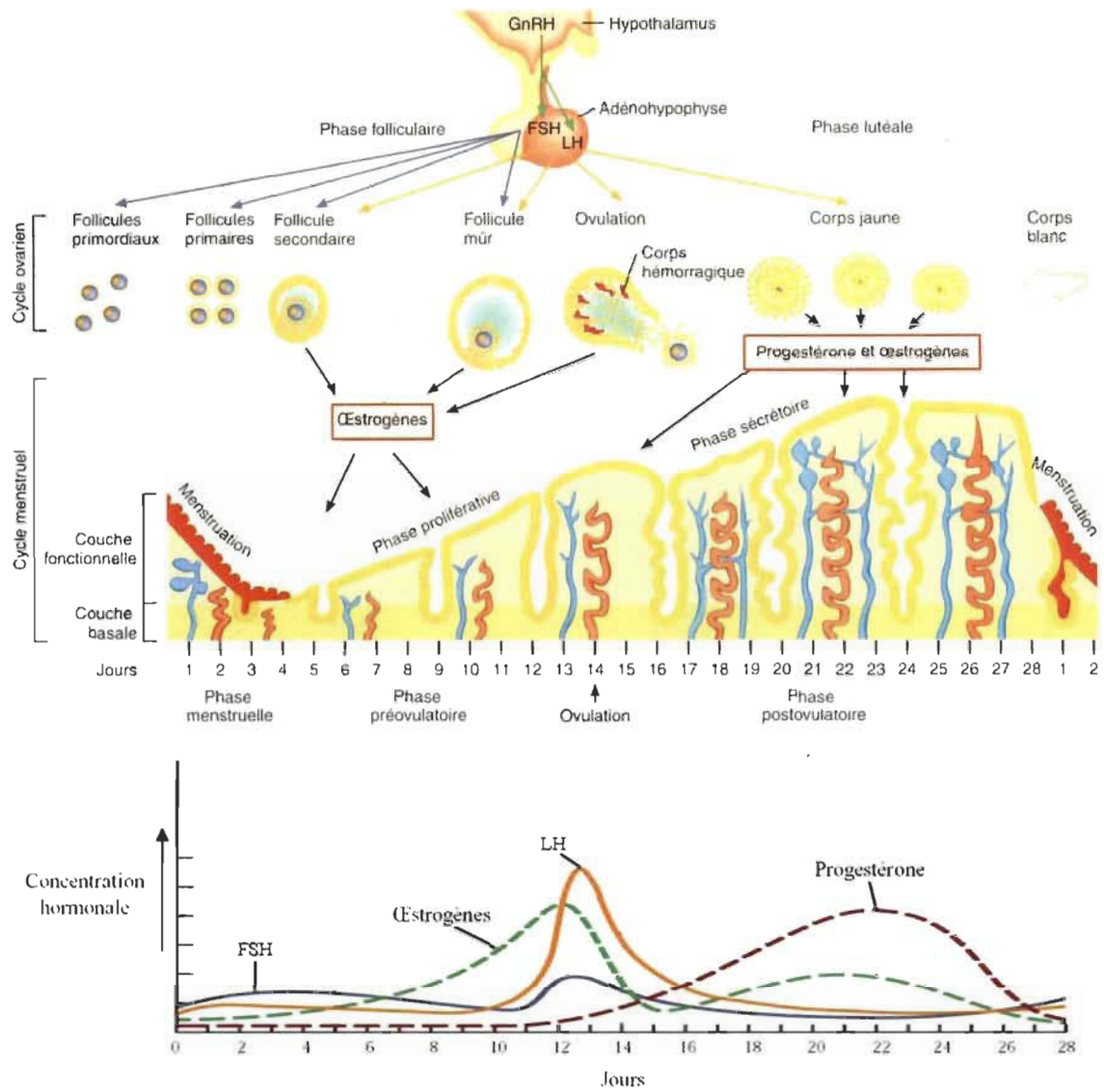


Figure 1.2 Le cycle reproducteur de la femme, tirée de [1].

1.2 Développement d'un cancer

Le cancer est actuellement considéré comme une maladie génétique [6]. En 1929, le biologiste allemand Theodor Boveri proposait que le cancer résultait d'un déséquilibre entre les régulateurs négatifs et positifs de la croissance cellulaire [7]. En effet, l'architecture normale d'un tissu sain est contrôlée par un état d'équilibre dynamique entre le niveau de survie et de mort cellulaire. La rupture de cet équilibre provoque la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. La progression tumorale est

donc le résultat des altérations génétiques et épigénétiques provoquant la division excessive et incontrôlée des cellules cancéreuses.

Deux types de gènes régissent ensemble le cycle cellulaire et interviennent dans le développement d'un cancer : les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les proto-oncogènes codent pour des protéines qui ont pour rôle de favoriser le cycle cellulaire, que ce soit des protéines qui contrôlent positivement (activent) le cycle cellulaire ou qui contrôlent négativement (bloquent) l'apoptose [8]. La transformation d'un proto-oncogène en oncogène résulte de modifications géniques, aussi infimes soient-elles, qui provoquent son activation constitutive [9]. Ces modifications peuvent être l'amplification génique, la mutation ponctuelle et la délétion ou la translocation chromosomique [10]. Les gènes suppresseurs de tumeurs ont pour rôle de bloquer le cycle cellulaire en codant pour des protéines qui interrompent ce dernier ou encore qui induisent l'apoptose. À l'inverse des proto-oncogènes, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs se traduit par une prolifération non-régulée qui les mène à la transformation tumorale [11].

D'une part, certaines tumeurs demeurent circonscrites et de petite taille. Incapables d'envahir les tissus environnants, ces tumeurs dites bénignes sont sans risque majeur et ne font pas référence au cancer. D'autre part, les cellules tumorales qui se divisent anormalement vite ou qui survivent trop longtemps forment des tumeurs malignes et constituent ce que l'on appelle un cancer. Parfois, ces cellules gardent un rythme de division normal, mais sont capables de se disséminer par le sang ou la lymphe pour envahir d'autres parties du corps. Les tumeurs secondaires ainsi formées sont appelées métastases [9] (Figure 1.3).

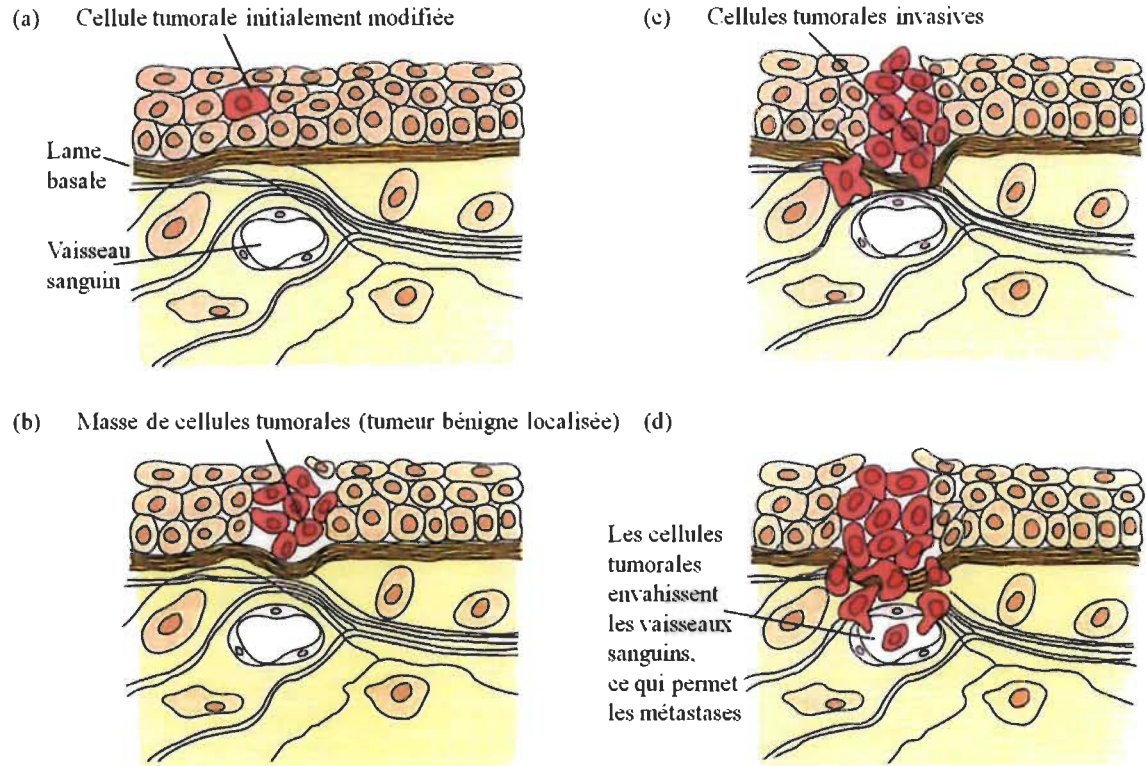


Figure 1.3 Croissance tumorale et métastases, tirée de [11].

1.3 Cancer de l'utérus

Le cancer de l'utérus, aussi appelé cancer de l'endomètre, est le cancer gynécologique le plus répandu en Amérique du Nord et il figure au quatrième rang des cancers les plus communs chez la femme. Il est précédé par les cancers du sein, du poumon et colorectaux [12, 13]. La Société canadienne du cancer estime qu'en 2012, 5300 femmes seront diagnostiquées avec un cancer de l'utérus et 900 en mourront [12].

1.3.1 Généralités

La majorité des cancers endométriaux sont d'origine épithéliale et se développent à partir de la couche cellulaire interne de l'utérus, l'endomètre. Les carcinomes endométriaux peuvent être classés selon deux types : endométrioïde (type I) ou non-endométrioïde (type II). Le premier type représente 85 % des cas; il est généralement bien différencié et peu agressif [14]. Il survient chez les femmes obèses,

souffrant d'hyperlipidémie ou montrant des signes d'hyperœstrogénie. La majorité de ces tumeurs sont de stade 1 ou 2 et ont un pronostic favorable. Le deuxième type représente des tumeurs peu différenciées, invasives et hautement métastatiques. Les caractéristiques du cancer endométrial de type II ne sont pas clairement définies, mais les femmes atteintes de ce type de cancer ne présentent aucun signe du type I et ont un pronostic moins favorable [15].

Dans 90 % des cas, les cancers de l'endomètre de type I sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'ils se développent à partir de cellules glandulaires qui infiltrant la lumière utérine [16]. Les cancers qui se développent au niveau du stroma endométrial ou de la couche musculaire de l'utérus sont des sarcomes et sont beaucoup moins répandus [17].

1.3.2 Facteurs de risque

Le cancer endométrial n'est pas attribuable à une cause unique, quoique la majorité des facteurs pouvant favoriser son développement soient associés à une contribution accrue de l'œstrogène. Cette hormone agit sur l'endomètre pour stimuler la croissance des cellules épithéliales [18-20]. Cependant, lorsque présente en quantité excessive, l'œstrogène peut créer un déséquilibre propice à la prolifération incontrôlée de cellules de l'endomètre [21].

De ce fait, l'hormonothérapie substitutive à base d'œstrogène seulement (sans progestérone) visant à contrer les effets de la ménopause présente un risque de développer un adénocarcinome endométrial [22, 23]. Entre 75 % et 80 % des femmes diagnostiquées avec un cancer de l'endomètre sont postménopausées et l'âge moyen de ces femmes au moment du diagnostic est de 60 ans [23].

L'obésité figure également parmi les facteurs qui favorisent le cancer endométrial. Bien que l'œstrogène soit connu pour être sécrété par les ovaires, d'autres tissus de l'organisme participent également à augmenter les taux d'œstrogène circulant. En effet,

chez les personnes obèses, les cellules adipeuses (adipocytes) sécrètent de l'œstrogène en quantité excessive [24]. Ainsi, le cancer de l'endomètre est fortement associé à l'obésité [25].

Le diabète de type I peut également être associé à un risque de cancer endométrial; une association entre le diabète de type I et l'augmentation de l'expression du récepteur à l'œstrogène (ER) de type α a d'ailleurs été observée chez le rat. En revanche, l'exercice physique semble prévenir les risques et aurait tendance à inverser ce phénomène [26].

La ménarche précoce, la ménopause tardive et la nulliparité augmentent aussi les risques de développer un cancer endométrial [27]. C'est en fait la durée d'exposition de l'utérus aux cycles menstruels et par le fait même l'exposition à l'œstrogène, qui influence le développement du cancer.

Les femmes traitées au Tamoxifène pour un cancer du sein sont également plus à risque de développer un cancer endométrial [28]. En effet, cette molécule agit à titre d'antioestrogène au niveau des tissus mammaires, alors qu'elle possède un effet proœstrogénique au niveau des cellules de l'endomètre [29]. Ceci est dû au fait qu'en se liant au récepteur à l'œstrogène, le Tamoxifène et inhibe la fonction hormono-dépendante d'activation de transcription 2 (AF-2) et non la fonction hormono-indépendante d'activation de transcription 1 (AF-1). Cependant, au niveau des cellules de l'utérus, AF-2 n'est pas essentielle à l'activation de la transcription dépendante des œstrogènes et, ne pouvant inhiber AF-1, le Taxoxifène agit plutôt sur ces cellules comme un agoniste partiel des récepteurs à l'œstrogène.

1.3.3 Signes et symptômes

Des saignements vaginaux anormaux hors des périodes de règles (métorragie) ou encore chez les femmes postménopausées sont l'un des symptômes les plus courants lors d'un cancer endométrial [30]. Il est cependant important de mentionner que ces

symptômes peuvent concerner n'importe quel trouble du système reproducteur de la femme, et ne sont donc pas propres au cancer de l'endomètre. Des douleurs au bas-ventre ou encore des douleurs lors de relations sexuelles peuvent également être associées avec la présence d'un cancer de l'endomètre.

1.3.4 Stadification

Une fois que le diagnostic de cancer de l'endomètre est tombé, le stade du cancer est déterminé afin de choisir le plan de traitement adéquat. C'est la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) qui a déterminé les normes selon lesquelles les tumeurs sont classées.

Chaque tumeur se voit attribuer un stade, allant du stade 1 au stade 4, selon sa taille ainsi que la présence, ou non, de cellules cancéreuses qui se seraient propagées à l'extérieur de l'utérus (Tableau 1.1).

Tableau 1.1
Description des stades de cancer, tiré de [31]

Stade	Description
1	Le cancer est localisé uniquement dans l'utérus.
2	Le cancer s'est propagé de l'utérus au col de l'utérus. La tumeur s'est propagée au col de l'utérus.
3	Le cancer est présent dans les ganglions lymphatiques voisins et/ou dans les tissus environnants (au-delà du col de l'utérus, mais pas à l'extérieur du bassin). La tumeur s'est propagée au-delà du col jusqu'aux tissus environnants, mais demeure localisée dans le bassin.
4	Le cancer s'est propagé à l'extérieur du bassin dans une autre partie du corps, par exemple la vessie. Des cellules cancéreuses se sont développées à l'extérieur du bassin, dans une autre partie du corps.

Un grade, allant du grade 1 au grade 3, est ensuite attribué à chaque cancer, selon sa classification histologique (Tableau 1.2). Un examen microscopique est alors effectué sur un échantillon prélevé lors d'une biopsie, puis le cancer est gradé selon l'apparence et le comportement des cellules cancéreuses par rapport à des cellules normales.

Tableau 1.2
Description des grades de cancer, tiré de [31]

Grade	Description
1	Bas grade – croissance lente, risques de propagation moins élevés.
2	Grade modéré.
3	Haut grade – croissance plutôt rapide, plus de risques de propagation.

1.3.5 Traitements

Il y a quatre traitements différents qui servent à traiter les cancers de l'endomètre : (a) la chirurgie, (b) la radiothérapie, (c) l'hormonothérapie et (d) la chimiothérapie. Le choix du traitement varie selon le type et le stade du cancer. La chirurgie est le traitement de première ligne pour enrayer les cancers endométriaux de stades précoces (stade 1 ou stade 2) et cette intervention se veut généralement curative [16, 32]. L'intervention chirurgicale pratiquée est l'hystérectomie (ablation de l'utérus et du col de l'utérus), et celle-ci est couramment combinée avec une salpingo-ovariectomie bilatérale (ablation des ovaires et des trompes de Fallope), éliminant ainsi toute source d'hormones sexuelles naturelles (œstrogène, progestérone, testostérone). Souvent, lorsque le cancer est de stade plus avancé, la chirurgie est suivie d'un traitement adjuvant, que ce soit la radiothérapie, l'hormonothérapie ou la chimiothérapie.

La radiothérapie consiste en l'utilisation de radiation ionisante pour détruire localement les cellules cancéreuses. Celle-ci peut être réalisée par curiethérapie vaginale

ou par radiothérapie externe de la région pelvienne. Le volume d'irradiation dépend alors de l'expansion de la tumeur.

Pour les cancers de stade avancé ou récidivant, l'hormonothérapie ou la chimiothérapie sont administrées [16, 33]. L'hormonothérapie est l'administration d'hormones stéroïdiennes pouvant bloquer l'effet œstrogénique au niveau des cellules cancéreuses. Les hormones les plus utilisées dans le traitement du cancer de l'endomètre sont l'acétate de médroxyprogestérone et l'acétate de mégéstron, toutes deux apparentées à la progestérone. En effet, l'endomètre est un tissu qui répond aux hormones et qui prolifère en réponse à l'exposition aux œstrogènes, tandis que l'arrêt de prolifération de l'endomètre au cours du cycle menstruel est gouverné par la progestérone. L'hormonothérapie est donc un traitement qui utilise la progestérone pour balancer les effets de l'œstrogène au niveau de l'endomètre et peut ainsi réduire la croissance tumorale. D'autres hormones sont également utilisées afin d'inhiber sélectivement les récepteurs à l'œstrogène et de freiner la croissance tumorale. L'Arzoxifène est d'ailleurs un antiœstrogène ayant démontré son efficacité contre le cancer endométrial au cours des dernières années. Il se lie au récepteur à l'œstrogène et bloque toute stimulation de croissance œstrogénique au niveau du tissu endométrial [34, 35]. L'efficacité de ce traitement dépend cependant de la présence de récepteurs à la progestérone ou de récepteurs à l'œstrogène au niveau de l'endomètre.

La chimiothérapie consiste en l'administration de composés chimiques qui ciblent les cellules à division rapide. La majorité de ces agents induisent la mort cellulaire en causant des dommages irréparables à l'ADN qui mènent ultimement à l'apoptose [36]. Les agents qui ont la meilleure efficacité pour traiter les cancers endométriaux sont la doxorubicine, le paclitaxel et le cisplatine, bien que si ces derniers sont administrés individuellement, seulement 20 % à 35 % des patients répondent au traitement [37-39]. Lorsqu'administrés en combinaison, ces agents antinéoplasiques démontrent cependant une efficacité plus élevée. Dans la majorité des cas de cancer endométrial, une drogue à base de platine est jumelée à la doxorubicine ou au paclitaxel. De plus, une étude menée par le « Gynecologic Oncology Group » a démontré qu'une combinaison de paclitaxel-

doxorubicine-cisplatine est d'autant plus efficace qu'une combinaison doxorubicine-cisplatine seulement, mais la neurotoxicité de la triple combinaison est un élément limitant pour son utilisation [40].

1.3.5.1 Doxorubicine

La doxorubicine est un antibiotique antinéoplasique qui appartient à la famille des anthracyclines [41] (Figure 1.4). Bien que cette molécule soit utilisée pour traiter le cancer depuis plus de 30 ans, son mode d'action demeure incertain et plusieurs mécanismes ont été proposés. L'un des premiers mécanismes à avoir été décrit relate la capacité de cette drogue à s'intercaler dans l'ADN des cellules et d'en inhiber la biosynthèse [42]. La doxorubicine peut également interférer avec les fonctions normales de la topoisomérase II, une enzyme qui contrôle la structure spatiale de l'ADN. En effet, la molécule chimiothérapeutique stabilise le complexe formé par la topoisomérase II et l'ADN, arrêtant ainsi le processus de réplication [42]. Finalement, la doxorubicine peut activer la voie mitochondriale de l'apoptose en induisant la formation de radicaux libres et de peroxyde d'hydrogène [43].

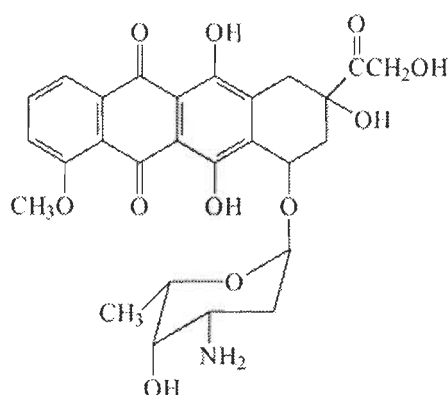


Figure 1.4 Représentation de la structure de la doxorubicine, tirée de [41].

1.3.5.2 Paclitaxel

Le paclitaxel (taxol) est une molécule naturelle ayant été isolée de l'If du Pacific, *Taxus brevifolia*, en 1971 [44] (Figure 1.5). Cet agent, appartenant à la famille des

taxanes, interfère avec les fonctions normales des microtubules cytoplasmiques. Les microtubules, formées de tubuline α et β , font partie intégrante du cytosquelette. Elles sont indispensables à certains mouvements cellulaires, ainsi qu'au transport intracellulaire des différents organites [9]. De plus, les microtubules jouent un rôle majeur dans l'initiation de la synthèse d'ADN et dans la division cellulaire [45]. En se liant préférentiellement et réversiblement à la sous-unité β de la tubuline, le paclitaxel favorise l'assemblage des microtubules et empêche leur dépoléarisation. En effet, cet agent antinéoplasique promeut la polymérisation de la tubuline et ce, même en absence d'énergie. Ainsi, cette drogue a pour effet de rompre la formation des fuseaux mitotiques normaux et d'inhiber la réplication cellulaire [46]. De plus, la désorganisation du réseau de microtubules provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et résulte en l'induction de mort cellulaire par apoptose [47].

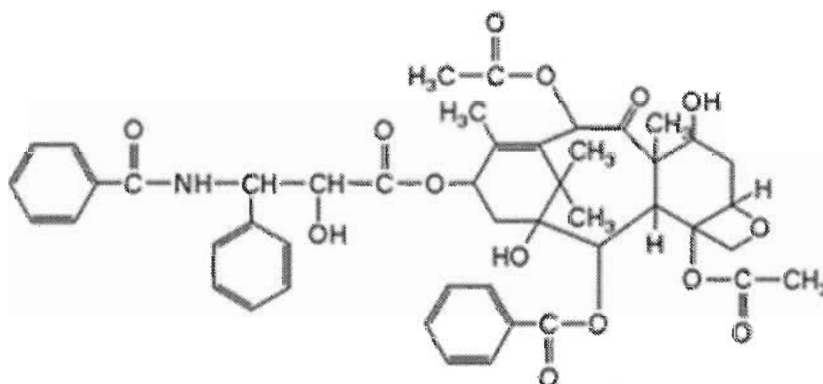


Figure 1.5 Représentation de la structure du taxol, tirée de [48].

1.3.5.3 Cisplatine

Le cisplatine (*cis*-diamminedichloroplatinum) est un dérivé des composés platine qui appartient à la famille des agents alkylants. Il est formé d'un noyau de platine avec deux atomes de chlore et deux atomes de nitrate en position *cis* (Figure 1.6). Une fois en contact avec l'environnement aqueux de la cellule, l'action du cisplatine est précédée par la dissociation des ions chlorides, qui seront remplacés par des molécules d'eau. Cette hydrolyse génère une charge positive sur la molécule de cisplatine, facilitant sa liaison avec l'ADN [49]. Cet agent largement utilisé dans le traitement des cancers agit donc en

se liant de façon covalente aux bases puriques de l'ADN. Il réagit avec celui-ci en se liant à deux guanines consécutives sur un même brin (65 % des cas) ou sur deux brins différents (5 à 10 % des cas), ou encore en se liant à une guanine et une adénine du même brin (25 % des cas) [50]. Ainsi, le cisplatine engendre un pontage entre les brins d'ADN, empêchant la séparation de ceux-ci et provoquant l'inhibition de la réplication de l'ADN [51] et de la transcription de l'ARN [52] ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [53] et la mort cellulaire par apoptose [54].

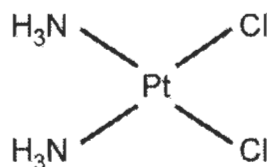


Figure 1.6 Représentation de la structure du cisplatine, tirée de [50].

1.4 Résistance à la chimiothérapie

Pour les patients atteints d'un cancer de stade avancé, la chimiothérapie est considérée comme un outil essentiel afin de limiter la progression et la dissémination des cellules cancéreuses [55]. Son efficacité est cependant limitée par les phénomènes de résistance aux médicaments. En effet, la plupart des cancers qui répondent initialement bien au traitement acquièrent la possibilité de contourner les mécanismes d'action des drogues. Ainsi, les cancers échappent au traitement de chimiothérapie et deviennent résistants. La chimiorésistance est le nom utilisé pour faire référence à ce phénomène et a d'ailleurs été identifiée comme étant la raison la plus commune pour la cessation de l'utilisation d'une drogue [56]. La résistance des cellules aux différentes drogues peut être intrinsèque, c'est-à-dire que les cellules sont déjà résistantes et ne répondront jamais au traitement, ou encore acquise, dans le cas où les cellules deviennent résistantes à la suite d'une pression de sélection par les drogues [57]. Plusieurs mécanismes peuvent mener à la résistance des cellules, en voici un bref aperçu.

L'altération du transport membranaire des drogues est l'un des mécanismes les plus couramment observés dans la résistance à la chimiothérapie. Cette réduction du

niveau intracellulaire de molécules anticancéreuses peut être le résultat d'une diminution de l'entrée (influx) des drogues dans la cellule ou, plus fréquemment, une augmentation de leur sortie (efflux) [58]. Ainsi, la concentration intracellulaire en drogue demeure inférieure à la concentration létale. Les cellules possèdent, à leur surface, des protéines membranaires permettant à différentes molécules (drogues, stéroïdes, métabolites) d'atteindre le cytosol par transport transmembranaire facilité. Afin de devenir résistantes aux drogues, les cellules peuvent modifier la structure de ces récepteurs membranaires afin de les rendre non-fonctionnels ou, simplement, d'en diminuer l'expression [59, 60].

D'autres protéines de surface ayant été identifiées comme ayant un rôle central dans le développement de la résistance aux drogues appartiennent à la superfamille des ATP-binding cassette (ABC) [55]. En effet, ces protéines ayant pour rôle la désintoxication du milieu intracellulaire sont de véritables pompes ayant la capacité de rejeter les drogues hors de la cellule [61]. L'une des protéines les plus couramment associées avec le phénomène de chimiorésistance due à l'altération du transport membranaire est la glycoprotéine P (P-gp), codée par le gène MDR1 [62, 63]. Cette protéine membranaire utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) pour agir en tant que pompe et expulser les drogues hors de la cellule [64]. La doxorubicine et le taxol font partie de l'ensemble des drogues étant expulsées hors de la cellule par la glycoprotéine P [65]. De plus, un groupe de chercheurs a pu démontrer que cette protéine est l'un des mécanismes utilisés par les cellules pour échapper à l'activation de la caspase-3 et à la mort cellulaire induite par chimiothérapie [66]. D'ailleurs, dans différents types cellulaires, le niveau d'expression de la glycoprotéine P corrèle avec le degré de résistance aux drogues [58].

Afin de devenir résistantes aux agents anticancéreux, les cellules ont également le potentiel de désintoxiquer le milieu intracellulaire. L'un des systèmes utilisés par les cellules pour réduire la cytotoxicité des drogues est celui du glutathione/glutathione-S-transférase (GSH/GST) [64, 67]. La famille enzymatique du GST catalyse la formation d'un conjugué entre le GSH et les toxines électrophiles telles que les agents alkylants et les drogues à bases de platine [68]. Les composés ainsi formés sont moins toxiques et

plus facilement excrétables. Certaines études ont d'ailleurs démontré la corrélation entre le niveau intracellulaire de GSH et de GST et le niveau de résistances au cisplatine [69-71].

L'altération des molécules cibles peut également avoir un impact sur l'efficacité des drogues chimiothérapeutiques. Les cellules qui deviennent résistantes aux drogues développent la capacité de porter un gène muté qui produit toujours la protéine nécessaire à leur survie. Pour des raisons stéréochimiques, les drogues ne peuvent plus lier cette protéine et la drogue devient inefficace [65].

La capacité des cellules à augmenter leur efficacité de réparation de l'ADN est un autre processus par lequel les cellules peuvent devenir chimiorésistantes. Certaines drogues, comme le cisplatine, endommagent directement l'intégrité de l'ADN, ce qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Par contre, si la cellule développe la capacité de réparer son ADN, la cellule résiste à la drogue et survie. Le mécanisme le plus utilisé par les cellules pour réparer les adduits causés par le cisplatine est le « nucleotide excision repair » (NER). Il a d'ailleurs été démontré qu'une défectuosité dans ce processus résulte en une hypersensibilité au cisplatine [60, 72].

1.5 Mort cellulaire

La mort cellulaire est un processus essentiel au développement et à l'homéostasie des organismes multicellulaires. Les différents types de mort cellulaire, soit l'apoptose, la nécrose, l'autophagie, la catastrophe mitotique et la sénescence sont définis selon leurs caractéristiques morphologiques [73]. Afin de bien discerner la nécrose de l'apoptose, voici un bref aperçu de chacun (Figure 1.7).

1.5.1 Nécrose

La nécrose est le type de mort cellulaire résultant d'une lésion tissulaire ou d'une autre pathologie impliquant un groupe de cellules [74, 75]. Il s'agit d'une mort

accidentelle et incontrôlée qui se caractérise par un gonflement de la cellule suivi de son éclatement. Le déversement du contenu cellulaire engendre une réaction inflammatoire importante [75]. Bien que leur noyau demeure intact, les cellules nécrotiques présentent également une fragmentation de la chromatine. En plus de ces changements morphologiques, la nécrose est caractérisée par un épuisement énergétique, une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), un mauvais contrôle de l'homéostasie Ca^{2+} et l'activation de protéases non-apoptotiques [76].

1.5.2 Apoptose

L'apoptose doit son nom à l'équipe de Kerr, Wyllie et Currie qui, en 1972, ont décrit ce mot pour la toute première fois [77]. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus hautement régulé qui permet non seulement la destruction de toutes cellules dont l'intégrité est affectée, mais aussi l'élimination de cellules superflues durant l'embryogénèse ou le remodelage des tissus. En effet, l'apoptose est essentielle au maintien de l'équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire, permettant ainsi un contrôle de l'homéostasie tissulaire. Kerr et ses collaborateurs l'ont décrite comme un processus survenant en deux étapes : la première étant la formation de corps apoptotiques et la deuxième étant la phagocytose [77]. La mort cellulaire par apoptose survient selon l'une des deux voies suivantes : (1) la voie extrinsèque, déclenchée par l'activation de récepteurs de mort cellulaire, ou encore (2) la voie intrinsèque, stimulée en réponse à un stress intracellulaire (Figure 1.8).

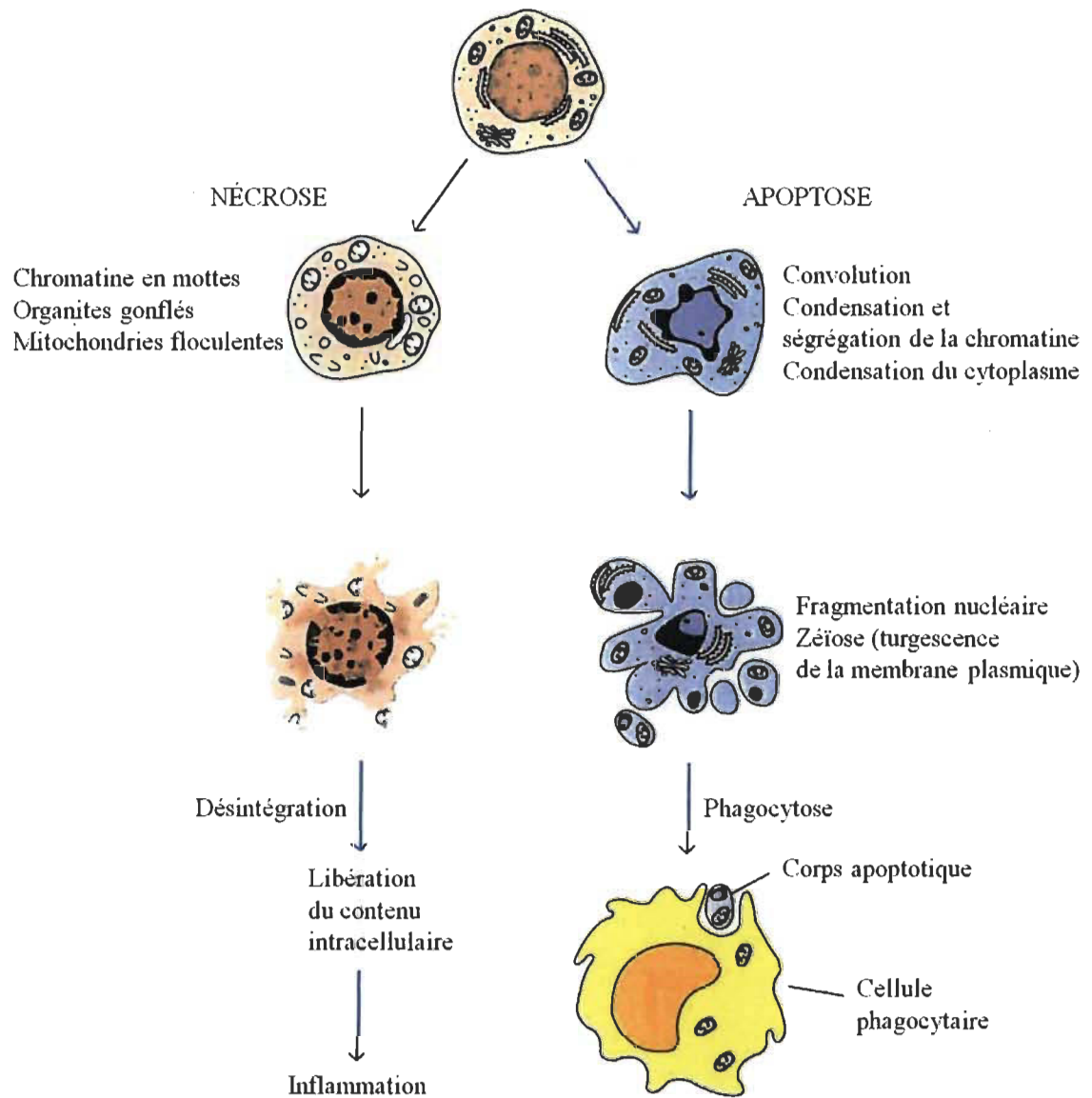


Figure 1.7 Comparaison des changements morphologiques qui apparaissent dans l'apoptose et la nécrose, tirée de [11].

1.5.2.1 Voie extrinsèque

L'induction de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait à la suite de l'activation d'un sous-groupe de récepteurs de mort cellulaire appartenant à la superfamille des « Tumor Necrosis Factor receptors » (TNFR) qui inclue TNFR, Fas et « TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor » (TRAIL-R) [73]. La formation du « death inducing signaling complex » (DISC) est enclenchée par le recrutement et l'activation de caspases initiatrices, telles que la caspase-8 et -10. En effet, à la suite de l'activation de récepteurs de mort cellulaire, tels que Fas, la molécule adaptatrice « Fas-associated death domain » (FADD) interagit avec la région intracellulaire de ces récepteurs. Le signal apoptotique est ensuite transduit à la caspase-8 qui s'auto-active et qui, à son tour, transmet le signal aux caspases effectrices 3 et 7 [78] (Figure 1.8).

1.5.2.2 Voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose est activée par une variété de stimulus intra- ou extra-cellulaires tels que les dommages à l'ADN, les hauts taux de ROS, les rayons ultra-violet ou la chimiothérapie [79]. Cette voie est contrôlée par les membres de la famille « B-cell lymphoma 2 » (Bcl-2), qui agissent au niveau de la mitochondrie [80]. En condition homéostatique, les membres antiapoptotiques de cette famille maintiennent l'intégrité de la mitochondrie [73]. En réponse aux signaux apoptotiques, les membres proapoptotiques « Bcl-2 associated X protein » (Bax) et « Bcl-2 antagonist killer 1 » (Bak) forment un oligodimère sur la membrane externe de la mitochondrie, permettant ainsi le relargage du cytochrome *c* dans le cytosol. Le cytochrome *c* s'associe ensuite avec l'« apoptosis activating factor-1 » (Apaf-1) pour former, en présence d'adénosine triphosphate (ATP), une plateforme permettant le recrutement et l'activation de la procaspase-9. Le complexe ainsi formé est appelé apoptosome [81]. Une fois activée, la caspase-9 active à son tour les procaspases-3, -6 et -7, possédant elles aussi un rôle crucial dans l'activation de l'apoptose [73]. D'autres molécules proapoptotiques, telles que « second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI » (Smac/Diablo), sont relâchées de la mitochondrie suite aux signaux de mort cellulaire et contribuent à l'induction de l'apoptose [82]. En effet, cette protéine

antagonise l'action d'autres protéines membres de la famille des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP) comme « X-linked inhibitor of apoptosis protein » (XIAP), « cellular inhibitor of apoptosis protein » (cIAP) 1 et cIAP2 [83]. En se liant à XIAP, Smac/Diablo lui retire ses capacités d'inhiber certaines caspases et ainsi, assure l'activation complète de l'apoptosome et le déclenchement de l'apoptose (Figure 1.8).

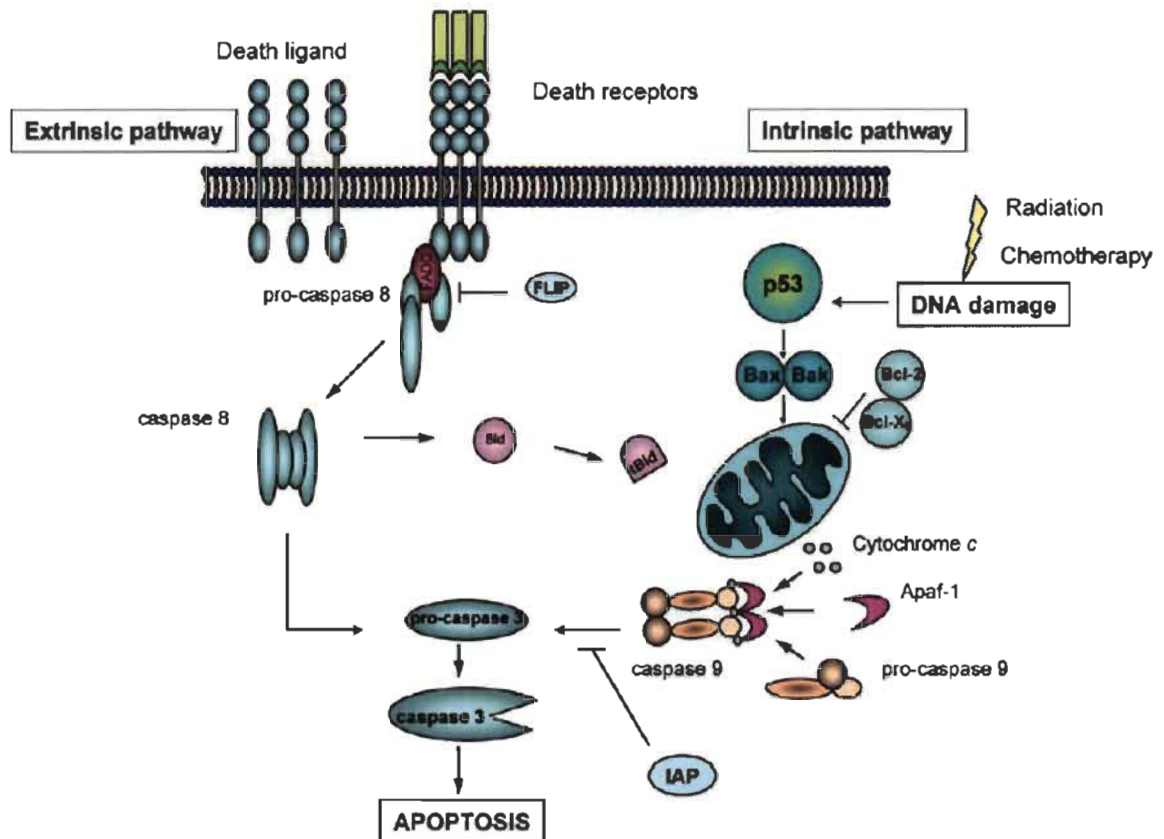


Figure 1.8 Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose, adaptée de [84].

1.5.3 Caspases

La famille des caspases compte à ce jour 14 protéases, dont au moins huit qui possèdent un rôle important dans les mécanismes hautement conservés régissant l'apoptose [85, 86] (Figure 1.8). Les caspases sont synthétisées dans les cellules sous forme de précurseurs, les procaspases formées de quatre domaines distincts : un domaine aminoterminal (N-terminal), une petite-sous-unité, une grande sous-unité et une région

de liaison. Suite au clivage protéolytique de ces procaspases, le retrait du domaine N-terminal, ainsi que du peptide de liaison résulte en l'assemblage de la petite et de la grande sous-unité, formant ainsi un complexe enzymatique actif [86, 87].

Les caspases impliquées dans les processus d'apoptose sont séparées en deux classes, selon la longueur de leur prodomaine N-terminal. Ainsi, les caspases-1, -2, -8, -9, et -10, dont le domaine N-terminal est plus long, font partie des caspases initiatrices, alors que les caspases-3, -6, et -7, possédant un petit prodomaine, sont appelées caspases effectrices [78].

1.6 Voie de signalisation de la PI3K

L'importance de la molécule phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) a été démontrée dans la croissance d'une variété de types cellulaires [88]. Plusieurs évidences suggèrent également le rôle préminent de la voie de signalisation de la PI3K dans le développement de divers cancers. Son activation met en œuvre une cascade de transduction qui promeut la croissance et la survie des cellules cancéreuses [89, 90]. La voie de la PI3K est activée par phosphorylation via les récepteurs tyrosine kinase (RTK) à la suite de la liaison de facteurs de croissance, d'insuline, de cytokines ou de différents oncogènes tels que Ras [91]. Une fois activée, la PI3K phosphoryle à son tour les lipides membranaires phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) afin de générer du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP₃), un important second messager intracellulaire [92]. Le niveau de PIP₃ est régulé par la « phosphatase and tensin homologue » (PTEN) qui a pour rôle de retirer le groupe phosphate en position 3-OH des PIP₃ et ainsi antagoniser la signalisation de la PI3K [93]. La protéine PTEN dérive du gène suppresseur de tumeur portant le même nom. Certaines mutations dans ce gène résultent en la suractivation de la PI3K, ce qui est observé dans de nombreux types de cancer. Il s'agit d'ailleurs de l'altération génétique la plus fréquemment observée à ce jour dans les cancers endométriaux. En effet, des études ont démontré qu'environ 50 % des cancer endométriaux présentent un gène PTEN portant une ou plusieurs mutations sur chacun de ses allèles [94]. Il a également été démontré que l'insertion du gène PTEN

sauvage dans des cellules de cancer endométrial ayant un gène PTEN muté a pour effet de diminuer le niveau de pAkt, d'inhiber la croissance cellulaire et d'induire l'apoptose [95]. La sous-unité catalytique de la PI3K, appelée p110 α , est également dysfonctionnelle dans de nombreux cas de cancer de l'endomètre. Des mutations somatiques gain de fonction dans le gène PI3KCA sont à l'origine de cette dysfonction et représentent environ 30 % des cancers endométriaux [96]. De récentes études ont démontré qu'en plus d'être oncogéniques, des mutations dans le gène PI3KCA promouvaient la croissance cellulaire et l'invasion *in vitro* et *in vivo* [97]. De plus, la coexistence de mutations dans les gènes PTEN et PI3KCA dans les cancers endométriaux a été démontrée dans de nombreuses études [98-100].

1.6.1 La protéine Akt

Akt est l'une des protéines effectrices majeures activées directement par la voie de la PI3K. Aussi connue sous le nom de protéine kinase B (PKB), il s'agit d'une protéine sérine/thréonine kinase impliquée dans plusieurs processus cellulaires tels que la survie, le métabolisme, la prolifération, la croissance et l'angiogenèse (revu dans [101]). La régulation aberrante de l'un ou l'autre de ces processus peut mener au développement tumoral, ce qui fait de cette protéine une cible thérapeutique importante dans la recherche sur le cancer [91, 102, 103].

La protéine Akt est formée d'un domaine d'homologie pleckstrine (PH) en position N-terminale, d'un domaine kinase central et d'un domaine régulateur hydrophobe en position C-terminale [104, 105]. C'est le domaine kinase, au centre de la protéine, qui lui confère un haut degré de similarité avec les protéines kinases A et C (PKA et PKC) [104]. Akt est une protéine cytosolique, maintenue dans un état inactif par une liaison intramoléculaire entre son domaine PH et son domaine kinase [106, 107]. Suite à l'activation de la PI3K, Akt est recrutée à la membrane plasmique et se lie aux phospholipides membranaires via son domaine PH, long d'environ 100 acides aminés. Cette liaison provoque un changement de conformation de la protéine qui entraîne

l'exposition de ses deux sites de phosphorylation, soit la thréonine 308 (Thr309 chez Akt3) et la sérine 473 (Ser474 chez Akt2 et Ser472 chez Akt3) [108].

La « phosphoinositide-dependent kinase-1 » (PDK1) est responsable de l'activation partielle d'Akt par phosphorylation de la Thr308, mais l'activation complète de la protéine requiert également la phosphorylation de la Ser473 [109]. Le mécanisme par lequel la Ser473 est phosphorylée demeure aujourd'hui controversé. Plusieurs candidats ont été proposés dont la protéine par Akt elle-même, la PDK2, l'« integrin-like kinase » (ILK) et la PKC [110-113]. De récentes évidences suggèrent cependant que la kinase la plus susceptible de phosphoryler la Ser473 serait la « mammalian target of rapamycin complex 2 » (mTORC2) [114, 115]. Ce complexe est formé de la sous-unité catalytique de mTOR et de cinq protéines accessoires. Rictor, mSIN1, GβL sont des composants essentiels pour maintenir l'intégrité structurale du complexe, tandis que les protéines Protor, et Deptor ont une activité régulatrice et ne sont pas essentielles [116]. À la suite de son activation, Akt se dissocie de la membrane plasmique et transloque vers le cytoplasme ou le noyau, où elle phosphoryle à son tour de multiples protéines pro ou antiapoptotiques [107, 117] (Figure 1.9).

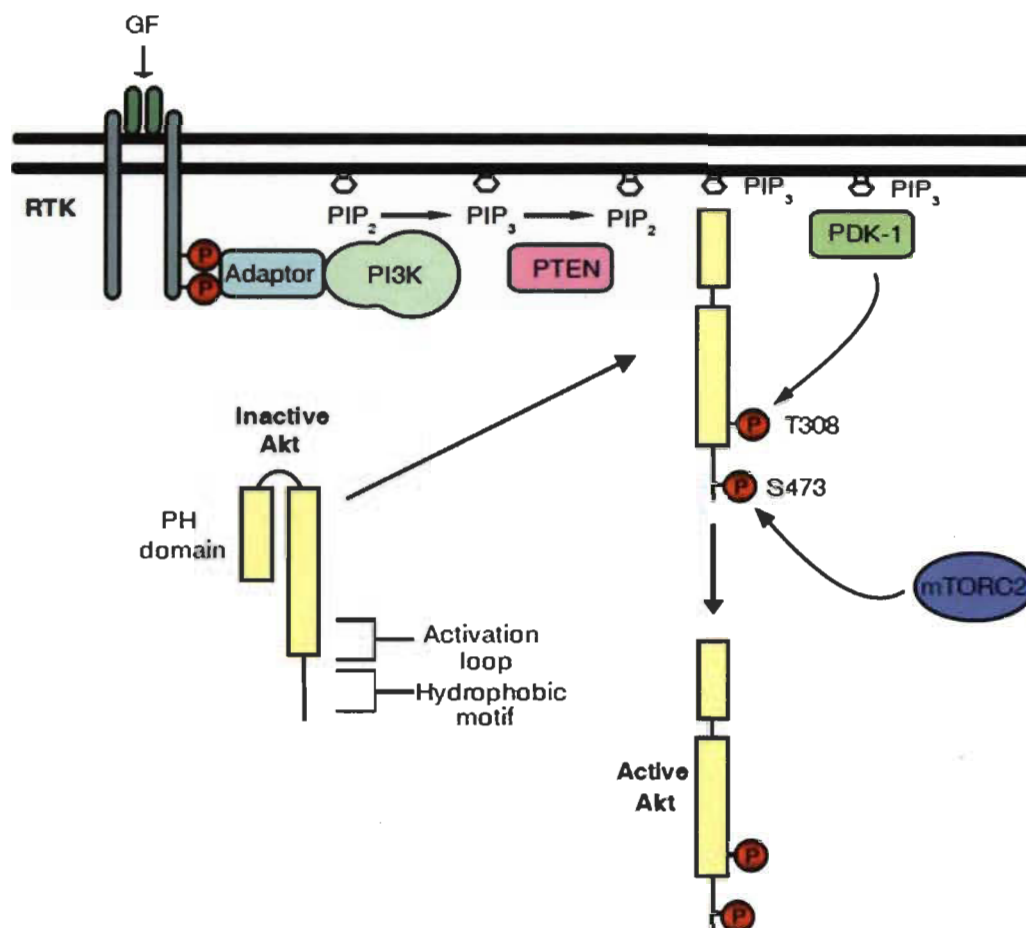


Figure 1.9 Activation et régulation d'Akt, tirée de [107].

C'est entre autres en prévenant le relargage du cytochrome *c* hors de la mitochondrie qu'Akt exerce son activité antiapoptotique [118]. Elle peut aussi phosphoryler et inactiver « Bcl-2 antagonist of cell death » (Bad), une protéine proapoptotique de la famille Bcl-2, la rendant ainsi incapable de bloquer l'action des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et « B-cell lymphoma extra large » (Bcl-xL). Akt phosphoryle et inactive également la procaspase-9 et le facteur de transcription « Forkhead box O » (FOXO), régulant l'expression de gènes critiques au déclenchement de l'apoptose [119, 120]. Akt induit également la transcription de survie cellulaire en activant l'« inhibiteur kappa-B » (IκB), une kinase qui régule l'expression du « nuclear factor kappa-B » (NF-κB) [121]. Le contrôle du cycle cellulaire par p53 est aussi influencé par Akt. Celle-ci agit en phosphorylant « murine double minute 2 » (Mdm2),

qui transloque ensuite vers le noyau et provoque l'ubiquitination et la dégradation de p53 [122] (Figure 1.10).

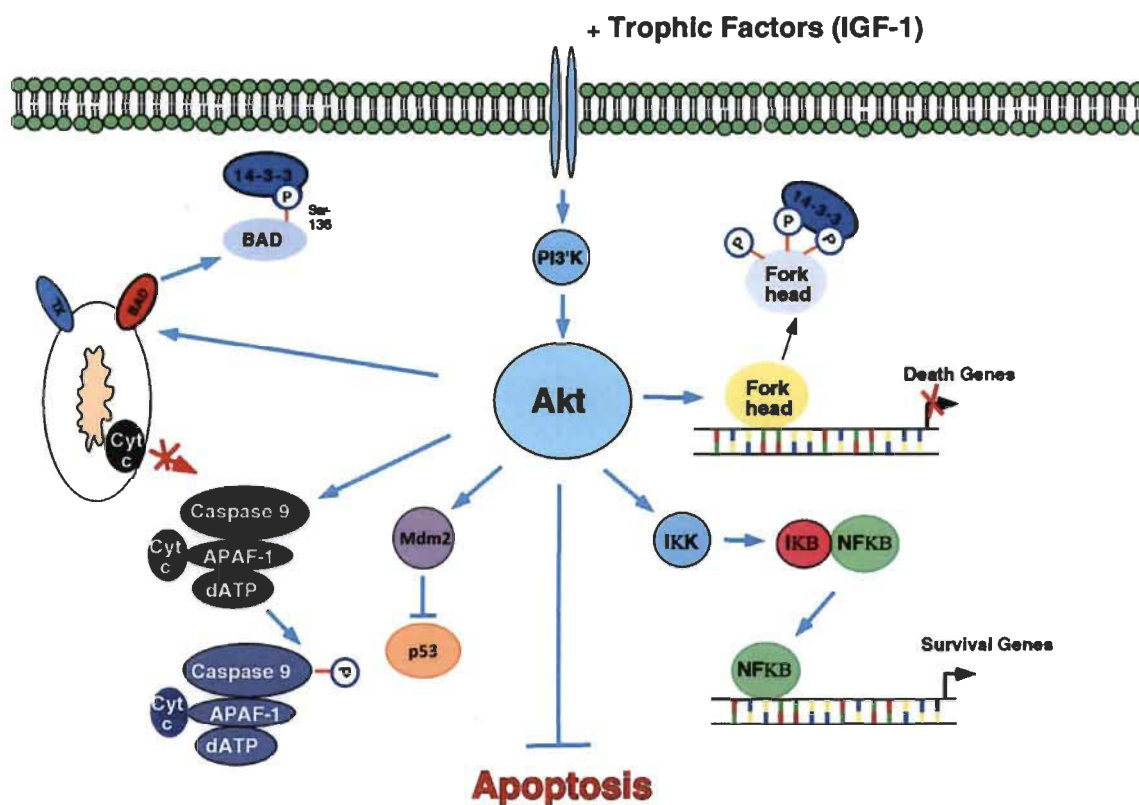


Figure 1.10 Akt régule la survie cellulaire par phosphorylation de multiples substrats, adaptée de [108].

L'activation d'Akt régule aussi la progression du cycle cellulaire. Elle agit en inactivant la « glycogen synthase kinase-3 » (GSK-3) par phosphorylation. Cette protéine a d'abord été identifiée comme une enzyme qui régule la synthèse du glucose en réponse à l'insuline, et son implication dans la survie cellulaire a ensuite été démontrée dans une étude menée sur des cellules murines Rat-1 et PC12. La surexpression de GSK-3 dans ces cellules induit l'apoptose, tandis que son inactivation bloque la mort cellulaire par apoptose [123]. En effet, la protéine GSK-3 aurait pour rôle de perturber les fonctions mitochondriales et de moduler l'expression de différentes protéines pro ou antiapoptotiques. Bien que les molécules cibles de GSK-3 ne soient toujours pas clairement identifiées, des études ont démontré que l'apoptose induite par

cette kinase nécessite l'activation des caspases et est modulée par des protéines faisant partie des familles de p53 et de Bcl-2 [123, 124].

L'implication d'Akt dans la croissance et la prolifération cellulaire a également été démontrée. Suite à son activation, Akt active la kinase mTOR, une protéine connue pour stimuler la synthèse protéique [125]. Suite à son activation, cette dernière phosphoryle à son tour deux molécules effectrices : « 70-kDa ribosomal protein S6 kinase » (p70S6K) et « 4E-binding protein 1 » (4E-BP1). p70S6K est responsable de l'augmentation de la biogénèse des ribosomes, tandis que la phosphorylation de 4E-BP1 permet la traduction de l'ARNm. Une étude a d'ailleurs démontré que l'activation constitutive d'Akt dans des cellules cancéreuses de la prostate coïncide avec une augmentation du niveau de phosphorylation de mTOR [126].

1.6.2 Les différents isoformes d'Akt

La famille d'Akt est formée de trois protéines : Akt1, Akt2 et Akt3 aussi connues sous le nom PKB α , PKB β et PKB γ (Figure 1.11) [104]. Chez l'homme, les trois isoformes hautement conservés d'Akt sont le produit de trois gènes différents et ont une grande homologie de séquence dans leurs acides aminés. En effet, Akt2 et Akt3 démontrent respectivement 81 % et 83 % d'homologie avec Akt1 [127]. Les isoformes d'Akt sont exprimés différemment dans les tissus du corps humain de telle sorte que Akt1 et Akt2 sont présents presque partout, tandis que la distribution de Akt3 est plus restrictive [104, 128].

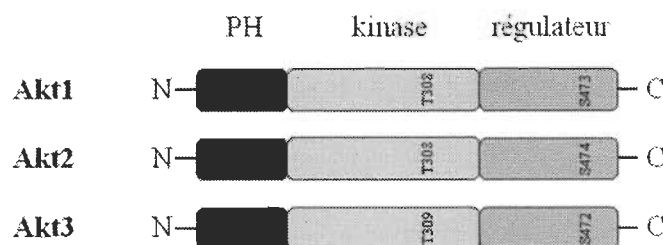


Figure 1.11 Représentation des trois isoformes d'Akt, adaptée de [105].

Bien qu'ils soient semblables en termes de séquence, différentes études menées sur des souris déficientes en Akt1, Akt2 ou Akt3 ont montré qu'il existe des différences claires dans les fonctions biologiques et physiologiques de chaque isoforme. Les trois phénotypes murins sont viables, mais les souris Akt1^{-/-} expriment un retard de croissance ainsi qu'une augmentation du niveau d'apoptose et de la mortalité néonatale [129-131]. D'autres études, portées sur des souris Akt2^{-/-}, ont démontré que celles-ci sont résistantes à l'insuline et qu'elles développent des syndromes du diabète type 2 en plus de subir une perte de tissu adipeux [132, 133]. Finalement, il a été démontré que les souris Akt3^{-/-} ont un cerveau de plus petite taille que les souris de type sauvage. Ceci serait dû non seulement à un plus petit nombre de cellules, mais aussi à la formation de cellules de plus petite taille [134, 135]. Ces résultats suggèrent donc que différents processus cellulaires sont régulés par différents isoformes d'Akt, si bien que Akt1 est particulièrement important pour la survie cellulaire, Akt2 est essentiel à l'homéostasie du glucose et Akt3 a un rôle capital dans le développement du cerveau [136]. Par ailleurs, des études menées sur des souris « double knockout » ont démontré que pour de multiples fonctions cellulaires, les isoformes d'Akt peuvent compenser les uns pour les autres. L'absence simultanée d'Akt1 et d'Akt2 provoque la mort des souris peu après leur naissance. Ces souriceaux montrent des troubles de développement de la peau et des os, une atrophie sévère des muscles et une réduction de tissu adipeux [137]. Une autre étude montre que l'absence des isoformes Akt1 et Akt3 induit la létalité embryonnaire due à de sévères défauts de développement des systèmes nerveux et cardiovasculaire [138]. Les souris déficientes en Akt2 et Akt3, exprimant un seul isoforme fonctionnel de Akt1, sont viables malgré des anomalies de croissance et d'homéostasie du glucose [139]. Cette étude suggère donc qu'Akt1 est suffisant pour assurer toutes les fonctions essentielles d'Akt dans la survie postnatale.

1.6.3 Akt et cancer

La surexpression de la protéine Akt1 a été rapportée dans environ 40 % des cancers du sein et de l'ovaire, dans plus de 50 % des carcinomes de la prostate et dans environ 20 % des adénocarcinomes gastriques [140]. Une augmentation de l'expression

de Akt2 a été démontrée dans 25 % des carcinomes primaires du sein, dans 30 % des cancers ovariens et pancréatiques et dans 40 % des cancers hépatocellulaires [141-143]. Une activité accrue de Akt3 a été identifiée dans le cancer du sein ER négatif (sans récepteur à l'œstrogène) et dans les cellules cancéreuses de la prostate insensibles à l'androgène [144]. Ceci suggère que l'isoforme Akt3 pourrait contribuer à l'agressivité des carcinomes insensibles aux hormones stéroïdiennes [120].

1.6.4 Akt et chimiorésistance

Une étude a démontré que la surexpression d'Akt1 dans les cellules du cancer du poumon était suffisante pour rendre ces cellules résistantes au cisplatine et que l'inhibition de cet isoforme renversait le phénotype résistant de ces cellules [145, 146]. L'inhibition de Akt2 dans les cellules du cancer du sein qui surexpriment le facteur de survie cellulaire Twist sensibilise ces cellules à la mort cellulaire à la suite d'un traitement au paclitaxel [147]. Akt2 favorise également la résistance au docetaxel des cellules du cancer du sein et de l'ovaire [148]. L'expression constitutive d'Akt2 dans les cellules du cancer de l'ovaire prévient les cellules contre l'apoptose en réponse au cisplatine [149, 150]. Finalement, la diminution d'expression de Akt3 dans les cellules de mélanome favorise le clivage de la caspase-3 à la suite de l'exposition des cellules à la staurosporine et les cellules de cancer du sein qui expriment Akt3 sont résistantes à l'apoptose induite par le Tamoxifène [151, 152].

1.7 Inhibition de la voie PI3K/Akt

L'une des voies de signalisation les plus étudiées dans le développement de la résistance aux drogues est celle de la PI3K/Akt. Dans de nombreux types de cancer, celle-ci est la voie de signalisation la plus fréquemment activée par différentes aberrations génomiques [153]. Afin de réduire les taux de survie cellulaire à la suite d'un traitement chimiothérapeutique et ainsi contrer le phénomène de chimiorésistance, l'inhibition de cette voie est une option très prometteuse. Différentes méthodes peuvent être employées afin de réduire le niveau d'activité de certaines protéines bien

spécifiques dans les cellules. Plusieurs petites molécules inhibitrices de la voie de la PI3K/Akt sont d'ailleurs en développement clinique. Ces molécules peuvent cibler directement PI3K ou Akt, mais aussi d'autres acteurs moléculaires importants de cette voie comme la protéine mTOR [89].

Une autre approche pouvant être utilisée afin de bloquer l'expression d'une protéine est l'ARN interférence. Ayant été identifiée en 1998 par deux chercheurs s'étant mérité un prix Nobel en 2006, il s'agit aujourd'hui de l'une des découvertes les plus prometteuses en biologie moléculaire. Le terme ARN interférence fait référence à l'utilisation d'ARN double-brin (ARNdb) afin de cibler un ARN messager (ARNm) spécifique pour la dégradation et ainsi, en inhiber l'expression (revu dans [154] et [155]).

Les ARNdb peuvent être administrés dans la cellule sous forme de petits ARN interférents (siRNA pour « small interfering RNA ») afin d'inhiber un gène de façon transitoire ou sous forme de « short hairpin RNA » (shRNA), qui seront incorporés au génome de la cellule afin d'inhiber un gène de façon stable.

Une fois entrés dans le cytoplasme de la cellule, les ARNdb sont reconnus par une enzyme appelée Dicer, dont le rôle est de cliver les ARNdb afin de former de siRNA long de 21 à 23 nucléotides [156]. Les molécules siRNA sont ensuite incorporées à un complexe protéique nommé « RNA-induced silencing complex » (RISC), puis les deux brins d'ARN sont séparés. Le brin antisens demeure lié avec RISC et guide le complexe actif vers son transcrite cible, l'ARNm lui correspondant [157]. Une fois la cible liée, elle sera coupée au niveau du site de reconnaissance par l'endonucléase Argonaute (Ago), faisant partie du complexe RISC. Finalement, la cible sera rapidement dégradée par les exonucléases présentes dans la cellule (Figure 1.12).

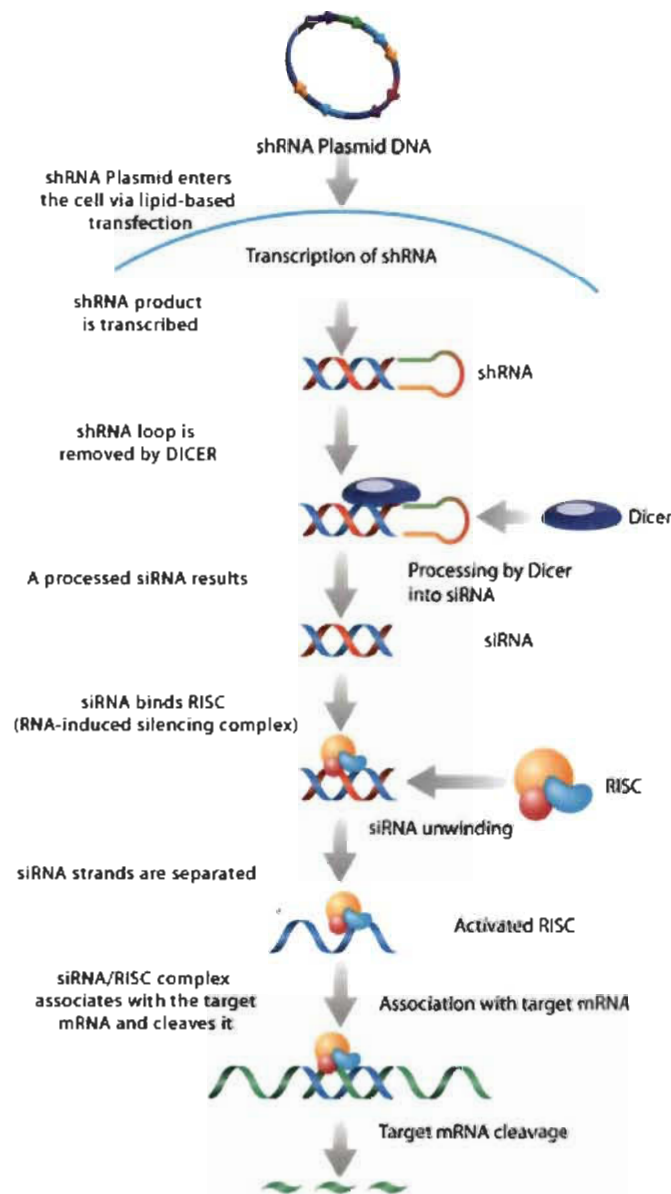


Figure 1.12 Le clivage de l'ARN messager par l'ARN interférence, tirée de [158].

1.8 Hypothèse et objectifs

L'implication de la protéine Akt dans le phénomène de résistance à la chimiothérapie de nombreux types de cancer est aujourd'hui bien démontrée dans la littérature. Le rôle que joue chacun des isoformes d'Akt dans la chimiorésistance des cancers endométriaux est cependant encore inconnu.

Notre hypothèse de travail est que dans les cellules humaines de cancer endométrial, la résistance à la chimiothérapie est gouvernée par l'activité de la protéine Akt de façon spécifique à chaque isoforme et spécifique à la drogue chimiothérapeutique utilisée afin d'induire l'apoptose.

L'objectif principal de notre étude était donc de déterminer le rôle de chaque isoforme de la protéine Akt dans la résistance à la chimiothérapie des cellules du cancer endométrial. Deux objectifs spécifiques ont été fixés pour réaliser ce travail :

- Objectif spécifique 1 : Déterminer l'effet d'une perte de fonction des différents isoformes d'Akt sur la résistance à la chimiothérapie.
- Objectif spécifique 2 : Déterminer l'effet d'un gain de fonction des différents isoformes d'Akt sur la résistance à la chimiothérapie.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

2.1 Résumé

Dans certaines tumeurs, la régulation d'Akt est affectée par divers évènements oncogéniques qui mènent à l'activation constitutive de la protéine et qui promeuvent ainsi la survie cellulaire. Étant donné que certaines études ont démontré que les trois isoformes d'Akt (Akt1, Akt2 et Akt3) ont des fonctions physiologiques distinctes, nous croyons que ces isoformes pourraient contribuer différemment dans la résistance à la chimiothérapie. Dans le but de déterminer le rôle de chaque isoforme dans la chimiorésistance des cancers endométriaux, nous avons stablement transfecté des cellules provenant de cancers endométriaux avec des shRNAs spécifiques à chaque isoforme d'Akt ou encore avec des vecteurs constitutivement actifs codant spécifiquement pour Akt1, Akt2 ou Akt3. Nous avons démontré que la perte d'expression d'Akt1 ou d'Akt2 par ARN interférence sensibilise fortement les cellules à la chimiothérapie alors que la surexpression de ceux-ci favorise la survie cellulaire à la suite d'un traitement chimiothérapeutique. Nous avons aussi montré que la perte d'expression d'Akt2 a un impact majeur sur la prolifération et sur la migration des cellules cancéreuses. Alternativement, l'expression constitutive de cet isoforme ralentit considérablement le processus de migration des cellules. Nos résultats démontrent l'implication d'Akt1 et d'Akt2 dans les mécanismes moléculaires qui confèrent aux cellules cancéreuses la résistance à la chimiothérapie.

2.2 Contributions des auteurs

L'article a été publié dans la revue « Gynecological oncology » au mois de novembre 2012.

Marie-Judith Lafleur :

- Production de la lignée cellulaire Hec-1-A surexprimant le vecteur CA-Akt3 de façon stable (vecteur construit par Julie Girouard).
- Expérimentations pour les figures 1, 2 (en entier), 4 (en entier), 5B, 6 (A et C) et 7 (en entier).
- Conception et analyse de toutes les expérimentations.
- Écriture de l'article (introduction, matériel et méthodes, discussion).

Julie Girouard :

- Production des lignées cellulaires KLE exprimant un shRNA control, un shRNA Akt1, un shRNA Akt2 ou un shRNA Akt3 et des lignées Hec-1-A exprimant le vecteur vide, CA-Akt1 ou CA-Akt2 de façon stable.
- Expérimentations pour les figures 2 (A et C), 3, 4 (en entier) et 7B.
- Conception et analyse des expérimentations.
- Écriture de l'article (résultats, discussion).

Valérie Leblanc :

- Expérimentations pour les figures 5A, 6 (B et D).

Sophie Parent :

- Planification de l'ensemble des stratégies de clonage pour l'expression des isoformes d'Akt.

Éric Asselin :

- Conception et analyse de toutes les expérimentations
- Révision de l'article et du mémoire.

2.3 Article scientifique

INVOLVEMENT OF AKT ISOFORMS IN CHEMORESISTANCE OF ENDOMETRIAL CARCINOMA CELLS

Julie Girouard*, Marie-Judith Lafleur*, Sophie Parent, Valérie Leblanc, Eric Asselin[†]

Canada Research Chair in Molecular Gyneco-Oncology, Research Group in Molecular Oncology and Endocrinology, Department of Chemistry and Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Key Words: Akt, Protein kinase B; Cisplatin; Endometrial cancer; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase.

* Co-first authors, equal contribution.

[†] **Corresponding author:** Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 Boulevard des Forges, Casier Postal 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7. E-mail: eric.asselin@uqtr.ca. Tel: (819)376-5011 ext. 3317, Fax: (819)376-5084.

ABSTRACT

In tumors, upstream regulation of Akt is affected by oncogenic events which lead to its constitutive activation and promote cell survival. Since studies have demonstrated that the three Akt isoforms exhibit different physiological functions, Akt isoforms may contribute differently in chemoresistance. OBJECTIVE of the study was to determine the role of each Akt isoforms in chemoresistance. METHODS: We stably transfected the chemoresistant KLE endometrial carcinoma cells with specific shRNAs for Akt1, Akt2 or Akt3. Alternatively, we stably transfected the chemosensitive Hec-1-A endometrial carcinoma cells, in which no Akt activity is detected, with constitutively active Akt expression vectors for each isoform. RESULTS: We demonstrated that Akt1 and Akt2 down regulation by RNAi highly sensitizes KLE cells to cisplatin by inducing the activation of pro-apoptotic factors such as the cleavage of caspases -3, -6, -9 and PARP; down regulation of all Akt isoform lead to increase sensitivity to doxorubicin while only Akt1-2 down regulation increase taxol sensitivity. Proliferation of Akt1, and mostly Akt2 deficient cells was affected by cisplatin treatment. Constitutive Akt1 or Akt2 expression led to an increased resistance to apoptosis. Akt isoforms have been shown to influence migration in other cancer cell. We showed that Akt2 blocks cell motility, while Akt1-3 had less effect on our endometrial cancer cell models. CONCLUSION: Our findings highlight the contribution of Akt1 and Akt2 in the molecular mechanisms that govern chemoresistance of endometrial carcinomas. Furthermore, Akt isoform-specific transfectants will provide a strong model to determine the involvement of each Akt isoform in tumor progression and metastasis.

INTRODUCTION

In the Western world, endometrial cancer is the most prevalent gynecological cancer and it is the fourth in importance among all types of cancer in women [1]. Uterine tumors are often considered as being poorly chemosensitive and this is a major hurdle in cancer treatment. It is increasingly recognized that resistance to chemotherapy and the pathogenesis of numerous cancer types, including endometrial cancer, involves early deregulation of apoptosis [2]. Thus, to circumvent the problem of chemoresistance, the underlying anti-apoptotic mechanisms need to be identified.

Akt, also known as protein kinase B (PKB), is an inactive cytosolic serine/threonine kinase that plays a crucial role in cell fate by promoting cellular survival [3]. It also acts as a key regulator of numerous cellular phenotypes associated with cancer, such as cell proliferation, growth, metabolism, angiogenesis and malignant transformation [4]. In mammals, three highly related homologous members of the Akt family have been identified [5]. Akt1/PKB α , Akt2/PKB β and Akt3/PKB γ are products of distinct genes, exhibiting more than 80% homology at the amino acid level [6]. All isoforms are activated by a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) in response to growth factors. Recruitment of Akt to the plasma membrane allows its full activation through phosphorylation of the kinase at two sites. A threonine residue (T308 on Akt1, T309 on Akt2 and T305 on Akt3) is phosphorylated in the catalytic domain, and a serine residue (S473 on Akt1, S474 on Akt2 and S472 on Akt3) is phosphorylated in the C-terminus domain [3].

Studies were conducted in mice deficient for Akt1, Akt2 or Akt3 in order to show the specific physiological functions of the Akt isoforms. All three phenotypes are viable, but mice lacking Akt1 demonstrate growth retardation and increased perinatal mortality [7,8]. Disruption of Akt2 caused a diabetes-like syndrome with insulin resistance [9] and in contrast, Akt3-deficient mice exhibit a reduction in brain size, without growth retardation or altered glucose homeostasis [10].

Increasing evidence suggests that hyperactivation of Akt signalling plays a central role in a variety of human cancers [11]. Indeed, increased Akt1 kinase activity was observed in approximately 40% of breast and ovarian cancers, and more than 50% of prostate cancer [12]. Moreover, 25% of primary breast carcinomas and in approximately 30% of ovarian and pancreatic cancers exhibited hyperactivation of Akt2 isoform [13-15]. It was also showed that elevated levels of Akt2 induced invasion and metastasis in breast and ovarian cancers [16]. Increased Akt3 kinase activity was observed in estrogen receptor-deficient breast cancer and androgen-insensitive prostate cancer cell lines [17]. Furthermore, our laboratory showed that simultaneous down-regulation of Akt1 and Akt2 restores cisplatin-induced apoptosis in resistant endometrial cancer cells [18].

Despite the importance of Akt signaling in cancer, the role of individual Akt isoforms in the resistance of uterine cancer cells to chemotherapeutic drugs remains to be elucidated. The present study was undertaken to determine the relative involvement of the specific Akt isoforms in the resistance of endometrial cancer cells to three commonly used chemotherapeutic drugs, cisplatin, doxorubicin and taxol. The first model used for our experimentations is the endometrial adenocarcinoma cell line KLE. These cells are known to express all three Akt isoforms, both at the mRNA and protein level, as well as the phosphorylated (active) form of the protein [18]. Moreover, these Akt expressing cells are resistant to apoptosis induced by chemotherapeutic drugs [19]. Using RNA interference technology, we produced stable clones in which the expression of specific Akt isoforms is down regulated. In contrast to this model, we used a second endometrial carcinoma cell line, Hec-1-A, in which the expression and activation of the three Akt isoforms is undetectable. In this cell model, we stably and individually overexpressed the three constitutive active Akt isoforms. Results gained from this study suggest that each isoform has a distinct impact on resistance to apoptosis induced by a given drug.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Cisplatin, Hoechst 33258, Giemsa stain, and MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) were purchased from Sigma (St-Louis, MO). Doxorubicin, Taxol, Alexa Fluor[®] 488 annexin-V and propidium iodide (PI) were purchased from Invitrogen (San Diego, CA). McCoy's 5A, fetal bovine serum (FBS) and gentamycin were obtained from HyClone (South Logan, Utah) and DMEM/F12 was purchased from Gibco. Akt shRNAs were obtained from SuperArray Bioscience Corporation (Frederick, MD). Constitutively active (CA) Akt1 vector was generously provided by Dr. Zhenguo Wu (Hong Kong University of Science and Technology), CA-Akt2 vector was generously provided by Dr. Joseph R. Testa (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). CA-Akt3 vector were construct in the lab. To amplify the coding sequence of Akt3 from KLE cells we have used forward primers 5'-TTATGCGAATTCATGAGCGATGTTACCATTGTG-3' and reverse primer 5'-CGCGGATCCGCGAGAATGAAAGAGACTTATTCTCGTCCACTTGC-3'. PCR products were inserted into pcDNA vectors containing a myristoylation sequence. Eugene 6 transfection reagent was purchased from Roche (Indianapolis, IN). All primary antibodies were purchased from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA), except for anti-Akt3 (Millipore; Billerica, MA) and for beta-tubulin (Abcam; Cambridge, MA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were obtained from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada).

Cell culture and transfection

Human endometrial cancer cells KLE (derived from a poorly differentiated endometrial carcinoma) and Hec-1-A (derived from a stage IA endometrial cancer) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). KLE transfectants were maintained in DMEM/F12 medium (without HEPES), supplemented with FBS (10%), gentamycin (50 µg/ml) and G418 (100 µg/ml). Hec-1-A transfectants were maintained in McCoy's 5A medium supplemented with FBS (5 %), gentamycin (50 µg/ml), G418

(100 $\mu\text{g/ml}$) and hygromycin (150 $\mu\text{g/ml}$). All cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. shRNA plasmids targeting different Akt isoforms (SuperArrays, Bioscience Corporation) were transfected into KLE cells using Fugene 6 reagent. Scrambled shRNA plasmid was transfected in KLE cells as a negative control. We used *Tet-On Advanced* inducible gene expression system (Clontech) to overexpress each Akt isoform. Stable clones were selected using G418. CA-Akt sequence in pcDNA vectors was inserted into the inducible pTRE-Tight vector before it was transfected into Hec-1-A tet-on cells. Akt expression and activation were induced by treatment of transfectants with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline for 48h.

Apoptotic index (Hoechst nuclear staining)

Following 24h or 48h treatment with cisplatin, both adherent and floating cells were collected centrifuged for 5 minutes at 1250 rpm. Subsequently, cells were resuspended in a solution of 10% formalin and 1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 for 24h at 4°C. Hoechst nuclear staining was viewed using an Olympus BX60 fluorescence microscope. A minimum of 200 cells were counted for each sample by blind counts, using randomly selected fields. The percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells (with typical apoptotic nuclear morphology such as nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) to total cell count.

Cell death analysis by flow cytometry

After treatment, 0.7×10^6 cells were trypsinized, resuspended in medium collected from the matching sample containing the dead cells, and centrifuged for 5 min at 1250 rpm. After centrifugation, cells were washed once in PBS and resuspended in 100 μl 1X annexin-V binding buffer. Cells were then stained with Alexa Fluor[®] 488 annexin-V and PI (1 $\mu\text{g/ml}$). After 15 minutes of incubation, 100 μl of 1X annexin-V binding buffer was added to each sample and analysis was performed by fluorescence activated cell sorting (FACScan, Cytomics FC500; Beckman Coulter; Brea, CA).

Protein extraction and Western analysis

After 48h-treatment with cisplatin (KLE; 10 μ M, Hec-1-A; 20 μ M, 72 h), doxorubicin (1 μ M), or taxol (0.05 μ M), cells were lysed in RIPA buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 % NP-40 in PBS, protease complete inhibitor; Roche) followed by three freeze-thaw cycles. Protein content was determined with the Bio-Rad DC protein assay. Equal amounts of protein extracts was resolved by SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were probed with primary antibody directed against Akt isoforms (Akt1, Akt2, Akt3), phospho-Akt (Ser 473), p-mTOR as well as cleaved caspase-3, cleaved caspase-6, cleaved caspase-9, cleaved PARP, Bcl-2 and XIAP. Membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Detection of peroxidase activity was performed using SuperSignal West Femto™ substrate (Thermo Fisher Scientific; Nepean, On, Canada), as described by the manufacturer instructions.

MTT proliferation assay

24h before the assay, stable transfectants were seeded in 96-well plates. Cells were then cultured for 48h in the presence of increasing concentrations of cisplatin (0 μ M to 10,0 μ M), doxorubicin (0 μ M to 1,00 μ M) or taxol (0 μ M to 0,050 μ M) in a total volume of 100 μ l per well. After 44h of incubation, 10 μ l of MTT (5 mg/ml) was added to each well. After 4h of incubation with MTT, 100 μ l of solubilization solution (10% SDS in 0.01M HCl) was added and the microplate was incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The optical density was read with a Fluostar OPTIMA BMG spectrophotometer (BMG Labtech inc; Durham, NC) at 550 nm.

Colony forming assay

KLE cells were plated and led to adhere for 24h before they were treated for one hour with 10 μ M cisplatin. 24h after the beginning of the treatment, cells were trypsinized and replated in 6-well plates containing complete medium, which was changed every 7 days.

After 3 weeks, cells were washed with PBS and fixed in methanol (100%) for 10 minutes. After fixation, colonies were coloured with Giemsa Stain 0.4% for 5 minutes. Plates were then washed with running water and colonies were photographed.

Wound healing assay

Cells were seeded into 24-well plates and allowed to grow in complete medium until they reached confluence. Cells monolayers were then scratch in a line using a standard p200 pipet tip and dislodged cells were washed away with PBS. Cells were then incubated in complete medium for 30h (KLE) or 48h (Hec-1-A) and the degree of cell migration was viewed using an Olympus microscope. Migration of cells into the wound was quantified as the percentage of recovered area using Image J software.

Statistical analysis

All experiments were repeated a minimum of three times. Densitometric analyses were performed using Quantity One software (Bio-Rad). Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 5.0; GraphPad; San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

RESULTS

Individual Akt isoforms were downregulated in KLE endometrial carcinoma cell line.

In order to investigate the functional role of each Akt isoform in chemoresistance of endometrial carcinoma cells, we used RNA interference to specifically knockdown Akt1, Akt2 or Akt3 expression in KLE cell line. Stable transfectants were generated by transfection with short hairpin RNA (shRNA) directed specifically against Akt1, Akt2 or Akt3. Isoform specificity of the shRNA vectors used in this study was confirmed by western blot and no cross-reactivity was observed (figure 1A). Our data demonstrates that Akt expression and phosphorylation/activation is isoform-specifically down regulated in each transfectants. In order to confirm the results obtained with all experiments performed in the present study, we tested 3 different clones for each KLE and Hec-1-A stable transfectants. Similar results were obtained for all overexpressed or down regulated Akt clones and only one representative clone was presented for each situation.

Loss of Akt1 or Akt2 expression sensitizes KLE cells to cisplatin-induced apoptosis.

To determine the role of each Akt isoform in resistance to apoptosis, each KLE transfectant was treated with 10 μ M cisplatin for 48h. Following treatment, cells were stained with Hoestch 33258 nuclear dye and the level of apoptosis for each KLE transfectant was observed (figure 2A). The level of cell death was significantly increased by 50% in Akt1-deficient cells and by 30% in Akt2-deficient cells, as compared to the control cells. Cisplatin-induced cell death was further confirmed by flow cytometry analysis in cells double stained with annexin-V and propidium iodide (figure 2B). Our data shows that level of cisplatin-induced cell death is higher in Akt1- and Akt2-deficient cells (14% and 40%, respectively), as compared to the control or Akt3-deficient cells, which are completely resistant to cisplatin.

Moreover, we have confirmed that apoptosis is induced in Akt1- and Akt 2-deficient cells through detection of the activated pro-apoptotic factors caspase-9, caspase-6, caspase-3 and PARP by western blot analysis. Cleavage of pro-apoptotic factors was strongly induced in Akt1- and Akt2-deficient cells following cisplatin treatment (figure 2C).

Overexpression of individual Akt isoforms in Hec-1-A endometrial carcinoma cell line.

To further investigate the contribution of each Akt isoform in cisplatin resistance of endometrial carcinoma, constitutively active Akt isoforms were individually overexpressed in the endometrial carcinoma cell line Hec-1-A. As shown by western blot analysis, the expression of each Akt isoform was induced in the respective transfectant (figure 1B). Moreover, each Akt isoform is phosphorylated/activated and has the capacity to activate the downstream target mTOR.

Akt1 or Akt2 overexpression confers cisplatin resistance to Hec-1-A endometrial carcinoma cells.

In order to determine the effect of the overexpression of Akt isoforms in cisplatin-induced apoptosis, Hec-1-A transfectants were treated with 20 μ M cisplatin for 72h. Apoptosis level after treatment was determined for each transfectant and the cleavage of pro-apoptotic factors was detected. Our data indicates the overexpression of Akt1 or Akt2 isoform confers cisplatin resistance to Hec-1-A cells. Our result show that overexpression of Akt1 or Akt2 had a similar impact on the level of apoptosis, which was decreased by 22% and 20% respectively, as compared to the control cells (figure 3A-B). Moreover, western blot analysis showed an increase in the cleavage of pro-apoptotic factors after cisplatin treatment in these cells (figure 3C).

Loss of Akt1 or Akt2 decreased cell proliferation following cisplatin treatment.

Chemoresistant cancer cells have the ability to proliferate despite chemotherapy. In order to investigate the involvement of each Akt isoform in cell growth, the proliferation level of each KLE transfectant was determined after treatment with increasing doses of cisplatin. At the end of the treatment, MTT assay was performed. Our data shows that control cells expressing the three Akt isoforms are more resistant to cisplatin in term of proliferation (figure 4A). The proliferation level of Akt2-deficient cells considerably decreased after cisplatin treatment while this treatment had a weaker impact on KLE Akt1- or Akt3-depleted cells.

In addition, we performed colony formation assays to determine whether specific Akt isoform knockdown in KLE cells altered clonal growth (figure 4B). Control cells, as well as Akt-deficient cells were assessed for the ability to form colonies after cisplatin treatment. Our data indicates that cisplatin treatment resulted in the inhibition of colony formation in all Akt-deficient cells. These results suggest that the three Akt isoforms are involved in anchorage-independent cell growth in our model.

Loss of Akt1 or Akt2 sensitizes cells to doxorubicin and taxol treatment.

Involvement of Akt isoforms in resistance to apoptosis after chemotherapy was also investigated using other chemotherapeutic drugs. Doxorubicin and taxol are used in the treatment of a large range of cancer including endometrial carcinoma. Akt-deficient transfectants were treated with doxorubicin for 48h. After treatment, the activation of pro-apoptotic factors was detected by western blot analysis. As shown in figure 5A, pro-apoptotic factors are highly activated in Akt2-deficient cells as compared to control cells. Pro-apoptotic factors are also activated in Akt1- and Akt3- deficient cells, however, detection of the cleavage of those factors is lower than in Akt2-deficient cells, showing that these isoforms are implicated in doxorubicin resistance to a lesser extent compared to Akt2. Doxorubicin treatment also affects cell proliferation, but not in an isoform-specific manner. Our data show that down regulation of all Akt isoform had a

similar impact on cell proliferation, which is decreased by approximately 20% as compared to control cells (figure 5B).

Akt-deficient transfectants were also treated with taxol for 48h. Western blot analysis indicates that the cleavage of pro-apoptotic factors is increased in Akt1- and Akt2-deficient cells, compared to control cells (figure 5C). Proliferation assay confirm that Akt1 and Akt2-deficient cells are more sensitive to taxol than control or Akt3-deficient cells (figure 5D).

Akt 2 activation in endometrial carcinoma cells blocks cell motility.

Beside drug resistance, Akt is also known to regulate processes that promote cancer cell migration, leading to invasiveness and metastasis. Since the mechanisms involving Akt in promoting the migration/invasion of endometrial carcinoma are still unknown, we used our two cell models of endometrial carcinoma to investigate the implication of Akt isoforms in cell migration. Wound healing assays were performed using KLE and Hec-1-A transfectants. Our data indicates that knockdown of each Akt isoform significantly increases cell migration as compared to the control cells. The highest increase in migration is observed in Akt2-deficient cell, which had the capacity to close the wound after 30 hours (figure 6A). Consistent with this observation, we also demonstrated that overexpression of Akt2 significantly inhibits cell migration in Hec-1-A cancer cells. No significant inhibition of cell migration was observed in the transfectants overexpressing Akt1 or Akt3 (figure 6B).

DISCUSSION

Although chemotherapeutic agents are widely used for the treatment of endometrial cancer, success of anticancer therapies is limited by cellular resistance to these agents. In human cancers, oncogenic events may affect the upstream regulation of Akt, leading to the constitutive activation of the protein and promoting cell survival as well as tumor development and chemoresistance. Although the three Akt isoforms are structurally homologous and share the same mechanisms of activation, several studies established that they exhibit distinct functions in the regulation of cell cycle progression, migration and invasion. These processes are differentially modulated by Akt isoforms and might regulate tumor development and metastasis.

Since Akt isoforms have distinct effects on cell survival and proliferation, we explored the impact of differential expression and activation of Akt isoforms in the acquisition of chemoresistance. We used different endometrial carcinoma cell line models, KLE and Hec-1-A, to study the mechanisms involved in chemoresistance. We have previously reported that KLE cell line is highly resistant to cisplatin, doxorubicin and taxol [19]. In this cell line, the three Akt isoforms are constitutively activated by an unknown mechanism. Using shRNA plasmid approach, we specifically knocked down each Akt isoform in order to evaluate for the first time their specific requirement in the resistance of endometrial cancer cells to anticancer treatment. In contrast to this model, our second endometrial carcinoma cell line, Hec-1-A, does not show any Akt activity and is more sensitive to cisplatin. In this model, the impact of each isoform was evaluated by induction of the activation of individual Akt isoforms.

In KLE cells, we established that the activation of both Akt1 and Akt2 isoforms is required to induce chemoresistance. Down regulation of these Akt isoforms induced cell death and caspases cleavage after chemotherapy treatment. These results were confirmed in our opposite cell model, Hec-1-A. The presence of cleaved fragments of caspase-9 in treated cells demonstrates that the drug activates mitochondrial (intrinsic) pathway of apoptosis in endometrial cancer cells [20] and this pathway is also activated in other cancer cell type [21,22]. In both our models, Akt3 isoform did not show any impact on

resistance to cisplatin chemotherapy but down regulation of Akt3 was sufficient to impact on doxorubicin sensitivity. These results are also supported in other clones of both our cell line models. Overexpression of constitutively active Akt isoforms in cervical cancer cell line HeLa induced isoform-specific sensitivity to chemotherapeutic drug-induced apoptosis [19]. Moreover, in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, in which Akt isoforms are constitutively induced, inhibition of Akt 1 or Akt2 isoforms by siRNA increased apoptotic cell death [23]. Interestingly, this study showed that Akt1 and Akt2 contribute to cell survival via different mechanisms. Akt1 down regulation decreases MEK/ERK1/2 activity, leading to NF- κ B activation, while Akt2 down regulation resulted in the cleavage the anti-apoptotic Bcl-2 family protein MCL-1, the collapse of mitochondrial membrane potential, cytochrome *c* release and activation of the caspase cascade [23]. However, down regulation of Akt1 in KLE endometrial carcinoma does not decrease MEK/ERK1/2, neither does down regulate Akt2 or Akt3 (data not shown). However, down regulation of both Akt1 and Akt2 induces caspase cleavage. These data indicate that apoptosis is induced by a different mechanism in KLE endometrial carcinoma cell line. In this context, our previous studies demonstrated that overexpression of Akt2 in Akt2-deficient endometrial carcinoma cells Ishikawa led to an increase in Bcl-2 expression after cisplatin treatment [24]. Cheng and coworkers also observed that cisplatin-sensitive ovarian cancer cells transfected with constitutively active Akt2 became resistant to cisplatin, showing the important role of this isoform in cisplatin-resistance [25].

As demonstrated by MTT and colony forming assays, down regulation of Akt1 or Akt2 also affected cell proliferation after cisplatin treatment. These results also show that Akt3-deficient cells are less affected by cisplatin treatment than Akt1- and Akt2-deficient cells. Since the impact of the loss of Akt2 is highly pronounced in these cells, our result suggests that the action of cisplatin on cell proliferation precisely depends on the expression level of Akt2 isoform. These data are in accordance with a study that established that Akt2 augments cell proliferation by facilitating cell cycle progression through the up regulation of the cell cycle engine [26].

We also demonstrated that Akt1 and Akt2 are involved in cell chemoresistance independently of the drug used for treatment. Instead of cisplatin, we treated each KLE transfectants with doxorubicin and taxol. These two drugs are also widely used in endometrial cancer therapy. Cisplatin inhibits replication by forming cisplatin-DNA adducts causing G1 arrest [27], doxorubicin inhibits replication by acting on topoisomerase II complex [28] and generates free radicals and hydrogen peroxide which activate mitochondria-induced apoptosis [29] and taxol inhibits cell replication by disrupting normal mitotic spindle formation [30]. Although the mode of action of these drugs are different, cisplatin as well as doxorubicin and taxol treatment increased cell death and induced caspase cleavage in Akt 1- and Akt2-deficient cells.

Akt isoforms also contribute differently in other cancer cell processes, such as migration. We demonstrated that Akt2 significantly blocks cell motility in our endometrial carcinoma cell models. In our KLE model, ablation of this isoform accelerated cell migration through the wound. Depletion of Akt1 or Akt3 also showed increased cell migration but their overexpression did not have any impact on Hec-1-A cell migration. These results suggest that in each tumor, the degree of cell migration depends not only on the presence of Akt but more precisely, in the presence of specific isoforms.

Conclusion

In this study, we observed for the first time that Akt isoforms have a distinct impact on endometrial cancer cell resistance to a given drug. Akt isoforms might be involved in chemoresistance to cisplatin, doxorubicin and taxol and these specific isoform could be putative candidates for gene therapy. It may be necessary to inhibit two or all three Akt isoforms simultaneously to achieve maximum tumor inhibition, but with different degrees of inactivation to preserve crucial levels of isoform activities to reduce side effects.

Acknowledgements

This work has been supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (MOP-66987). E.A. holds a Canadian Research Chair in Molecular-Gynecology. M.J.L. is a holder of a master fellowship from the Canadian Institutes for Health Research and J.G. holds a FRSQ postdoctoral fellowship.

Conflict of interest statement:

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

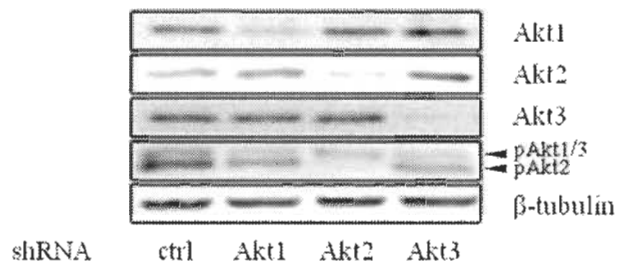
- [1] Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011;61:212-36.
- [2] Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991;32:223-54.
- [3] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13:2905-27.
- [4] Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* 2009;21:470-6.
- [5] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002;14:381-95.
- [6] Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000;346 Pt 3:561-76.
- [7] Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 2001;15:2203-8.
- [8] Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 2001;276:38349-52.
- [9] Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 2001;292:1728-31.
- [10] Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A, et al. Role for Akt3/protein kinase B γ in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* 2005;25:1869-78.

- [11] Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005;94:29-86.
- [12] Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tschlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT1/PKB α kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 2001;159:431-7.
- [13] Sun M, Paciga JE, Feldman RI, Yuan Z, Coppola D, Lu YY, Shelley SA, Nicosia SV, Cheng JQ. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ER α) via interaction between ER α and PI3K. *Cancer Res* 2001;61:5985-91.
- [14] Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, Wang G, Ma X, Jiang C, Coppola D, Nicosia SV, Cheng JQ. Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 2000;19:2324-30.
- [15] Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Skele KL, Hoffman JP, Testa JR. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem* 2002;87:470-6.
- [16] Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ. Overexpression of AKT2/protein kinase B β leads to up-regulation of β 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:196-206.
- [17] Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 1999;274:21528-32.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.

- [21] 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 Res* 2006;66:3126-36.
- [22] Alexia C, Bras M, Fallot G, Vadrot N, Daniel F, Lasfer M, Tamouza H, Groyer A. Pleiotropic effects of PI-3' kinase/Akt signaling in human hepatoma cell proliferation and drug-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1090:1-17.
- [23] Lee MW, Kim DS, Lee JH, Lee BS, Lee SH, Jung HL, Sung KW, Kim HT, Yoo KH, Koo HH. Roles of AKT1 and AKT2 in non-small cell lung cancer cell survival, growth, and migration. *Cancer Sci* 2011;102:1822-8.
- [24] 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. *Int J Cancer* 2012;130:1755-67.
- [25] 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 Resist Updat* 2002;5:131-46.
- [26] Santi SA, Lee H. Ablation of Akt2 Induces Autophagy through Cell Cycle Arrest, the Downregulation of p70S6K, and the Deregulation of Mitochondria in MDA-MB231 Cells. *PLoS One* 2011;6:e14614.
- [27] Un F. G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers. *Anticancer Drugs* 2007;18:411-7.
- [28] Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57:727-41.
- [29] Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci* 2005;76:1439-53.
- [30] Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1561-5.

Figure 1

A



B

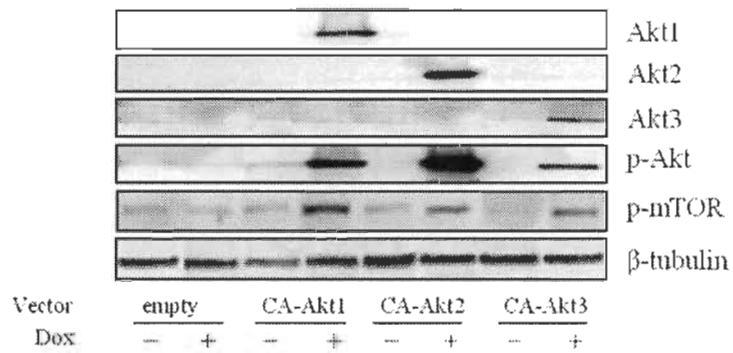
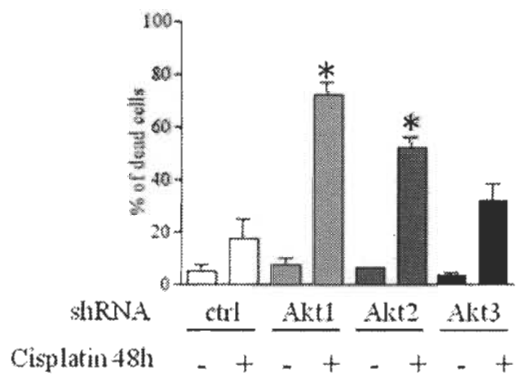
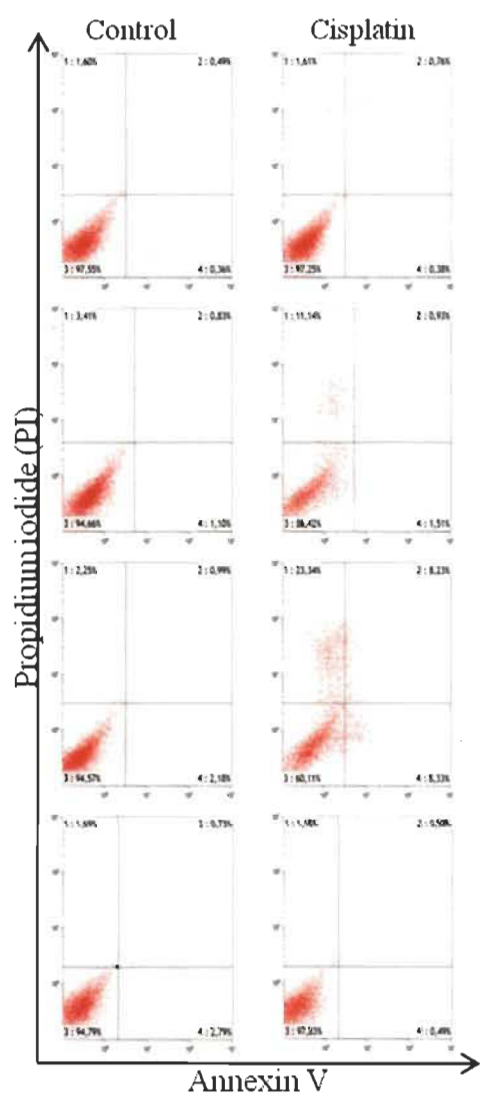


Figure 2

A



B



C

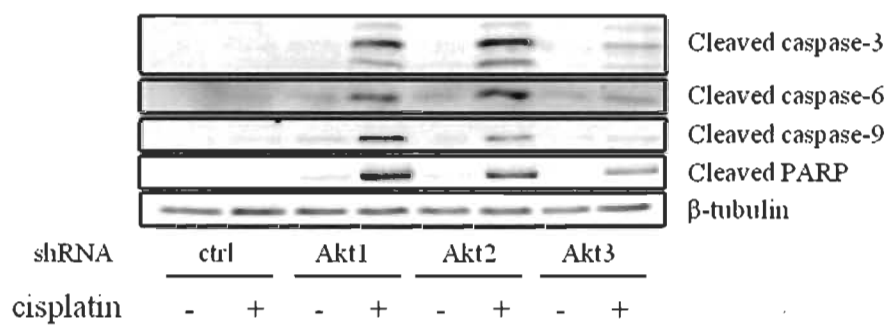
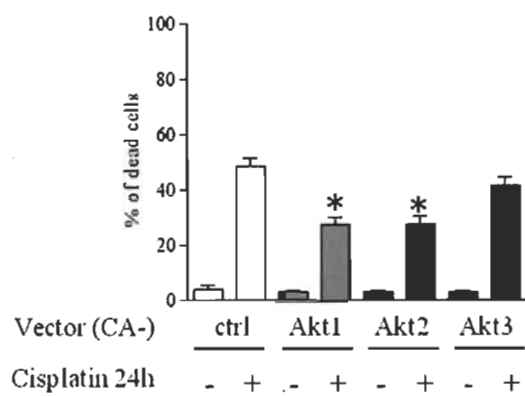
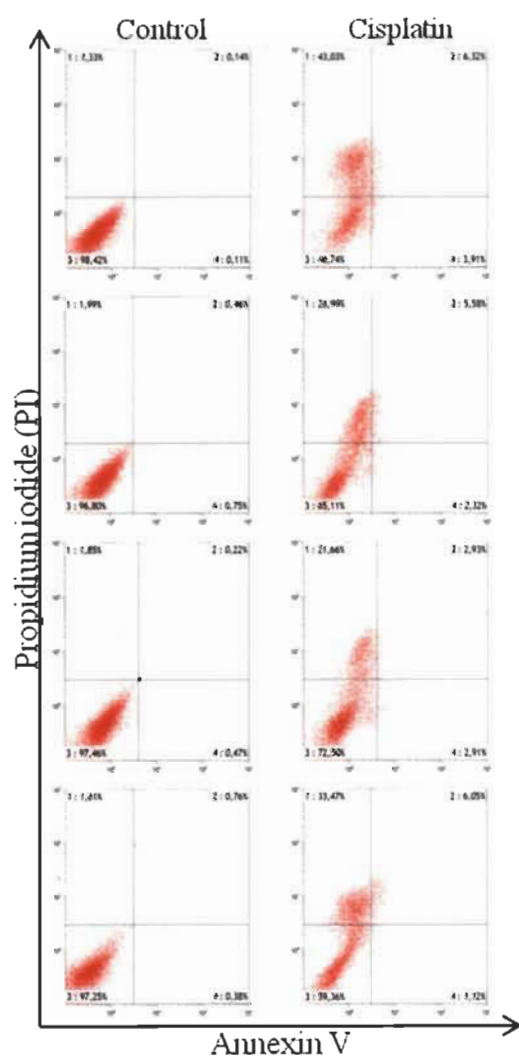


Figure 3

A



B



C

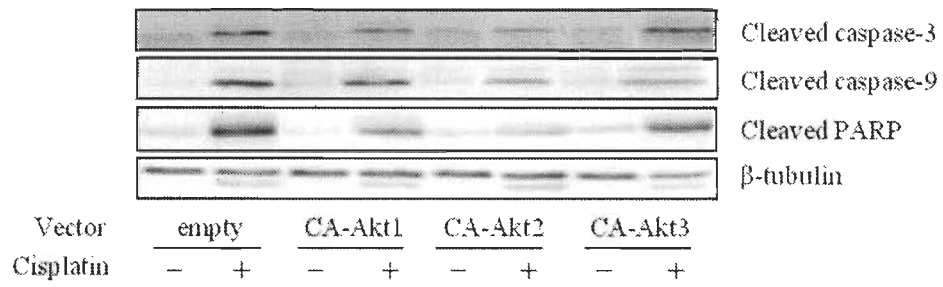
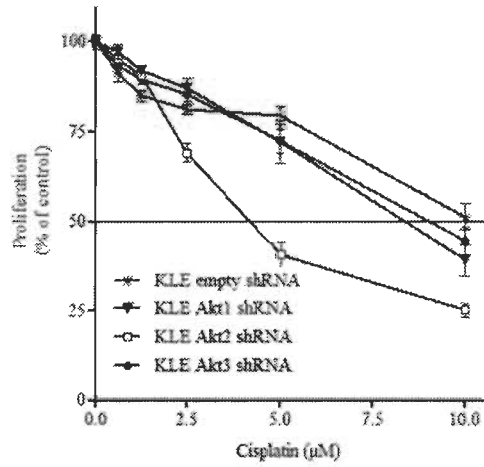


Figure 4

A



B

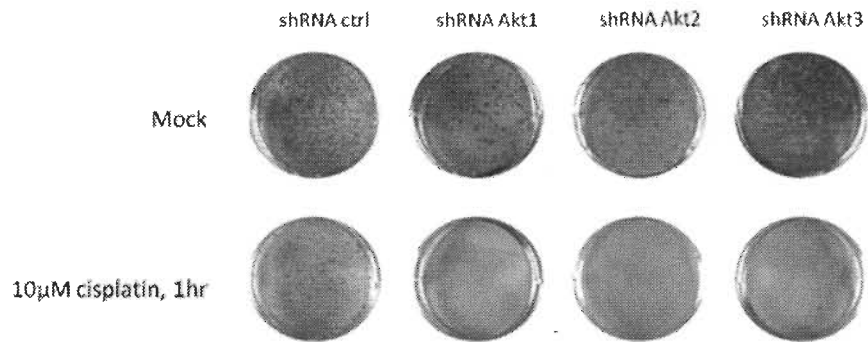
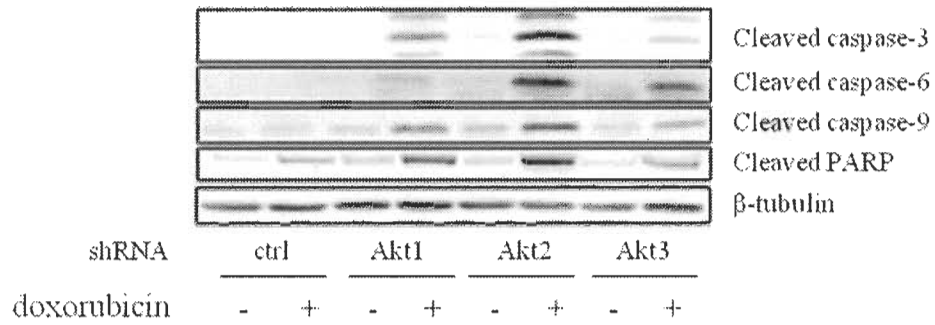
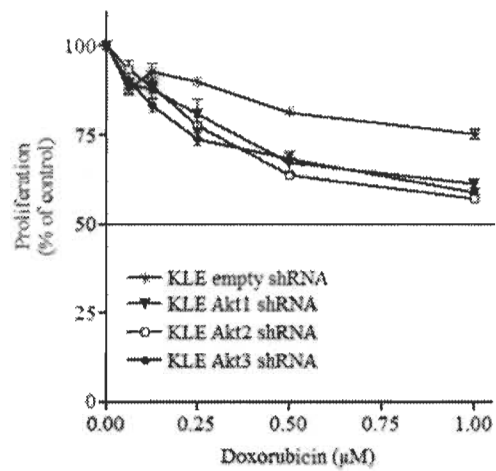


Figure 5

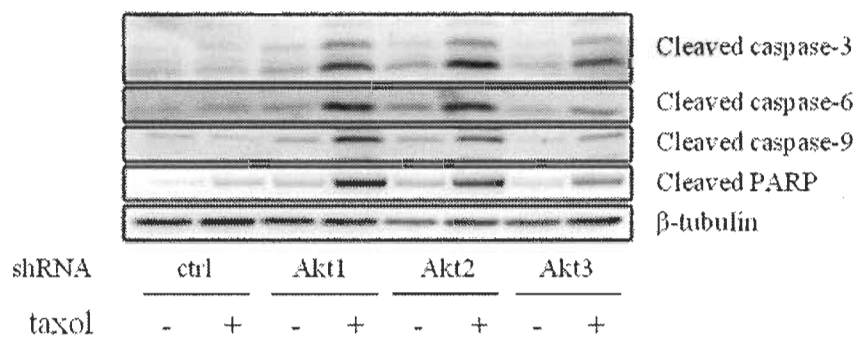
A



B



C



D

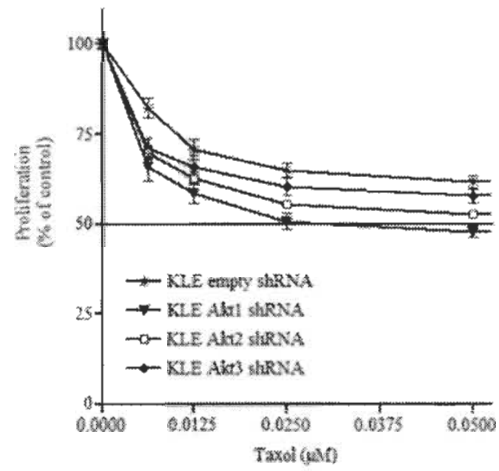
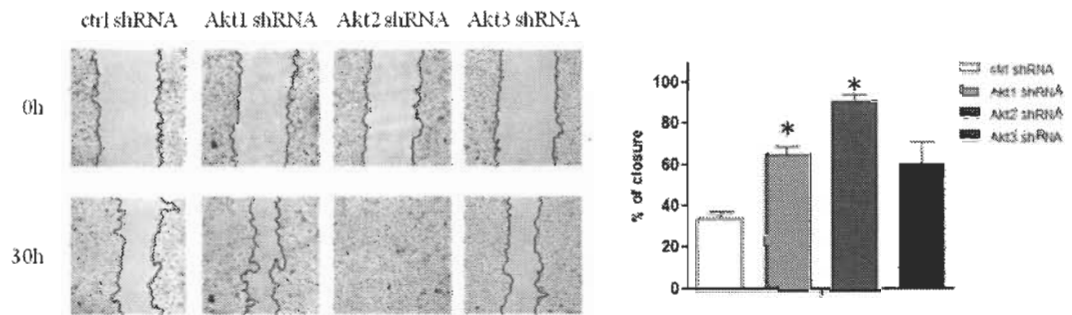


Figure 6

A



B

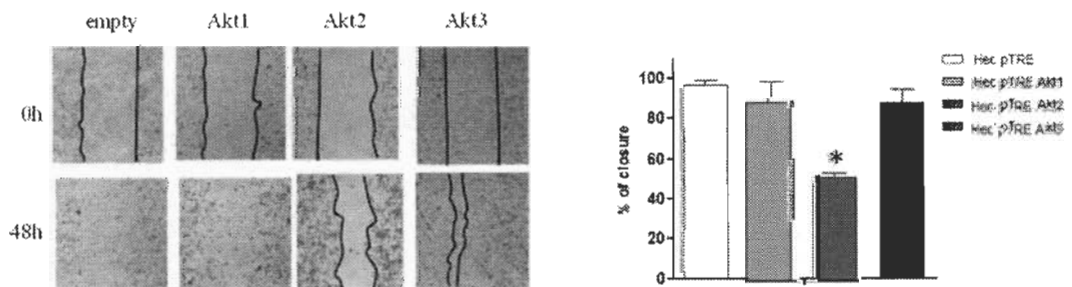


FIGURE LEGENDS

Figure 1. A) Down regulation of individual Akt isoforms in KLE endometrial carcinoma cells. Western blot analysis of each Akt isoform and Akt phosphorylation (Ser 473) in KLE cells stably expressing scrambled, Akt1, Akt2 or Akt3 shRNA vectors. Double arrowheads indicate slight differences in the mobility of the three Akt isoforms detected by phosphor-Akt antibodies. β -tubulin was used as loading control. **B) Overexpression of each Akt isoform in Hec-1-A cells.** Hec-1-A transfectants were incubated for 48h with doxycycline in order to induce expression of Akt isoforms. Western blot analysis of each Akt isoform and Akt phosphorylation (Ser 473) in Hec-1-A cells stably overexpressing empty, Akt1, Akt2 or Akt3 vectors. Detection of downstream target mTOR in order to confirm the activation of Akt. β -tubulin was used as loading control.

Figure 2. Differential sensitivity of KLE cells to cisplatin-induced apoptosis. Akt-deficient transfectants were treated for 48 hours with cisplatin (10 μ M). Following treatment, cells were **(A)** stained with Hoechst 33258 dye and cells with typical apoptotic nuclear morphology were identified and numbered to determine the percentage of cell death or **(B)** stained with annexin-V Alexa and propidium iodide (PI) and the levels of cell death were measured by fluorescence activated cell sorting. The percentage of the cells that stained positively with annexinV-Alexa and/or PI was combined to determine cell death levels. **(C)** Activation of pro-apoptotic factors (cleaved caspase-9, caspase-6, caspase-3 and PARP) was analyzed by western blot. Results are representative of three independent experiments. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. *P<0.05 compared to cisplatin control.

Figure 3. Resistance of Hec-1-A cells overexpressing Akt isoforms to cisplatin-induced apoptosis. Hec-1-A transfectants overexpressing Akt isoforms were treated for 72h with cisplatin (20 μ M). Following treatment, cells were **(A)** stained with Hoechst 33258 dye and cells with typical apoptotic nuclear morphology were identified and numbered to determine the percentage of cell death or **(B)** stained with annexin-V Alexa and propidium iodide (PI) and levels of cell death were measured by fluorescence activated cell sorting. The percentage of the cells that stained positively with annexinV-Alexa and/or PI was combined to determine cell death levels. **(C)** Cells were lysed after cisplatin treatment and then analyzed by western blot to detect the levels of activation of pro-apoptotic (cleaved caspase-9, caspase-6, caspase-3 and PARP). β -tubulin was used as loading control. Results are representative of three independent experiments. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. *P<0.05 compared to cisplatin control.

Figure 4. Effect of individual Akt isoform knockdown in cell proliferation after cisplatin treatment. **(A)** Each KLE transfectant was treated for 48h with increasing doses of cisplatin and MTT proliferation assay were performed. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. **(B)** KLE transfectants were incubated with 10 μ M cisplatin for 1 hour and then cultured for 3 weeks. The colonies were stained with giemsa and photographed.

Figure 5. Differential sensitivity of KLE cells to doxorubicin or taxol-induced apoptosis. Akt-deficient transfectants were treated for 48h with (A) doxorubicin (1 μ M) or (C) taxol (0.05 μ M). Following treatment, cleavage of pro-apoptotic factors (caspase-3, caspase-6, caspase-9 and PARP) and expression of anti-apoptotic factors (XIAP and Bcl-2) was analyzed by western blot. β -tubulin was used as loading control. Each KLE transfectants were also treated for 48h with increasing doses of (B) doxorubicin or (D) taxol and MTT proliferation assays were performed. Results are representative of three independent experiments. (B-D) Data are mean \pm SEM of three independent experiments.

Figure 6. Effect of Akt isoforms expression in cell migration. Wound healing assay was performed by plating (A) Akt-deficient KLE cells or (B) Hec-1-A transfectants overexpressing Akt in 24-well culture dish. After cells were allowed to attach and reach 100% confluence, a scratch was made through culture dish with a sterile plastic 200 μ l micropipette tip to generate a wound. The wound widths were measured under microscope using an ocular grid (magnification, \times 100). Data are mean \pm SEM of three independent experiments. *P<0.05 compared to control.

CHAPITRE III

DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1 Discussion

Le cancer est une maladie bien présente dans notre société. Il s'agit, à l'heure actuelle, de la principale cause de décès prématuré au Canada. La Société canadienne du cancer estime qu'en 2012, en moyenne 500 Canadiens apprendront, chaque jour, qu'ils sont atteints du cancer [12].

Plusieurs traitements sont disponibles pour les personnes diagnostiquées avec un cancer. La chirurgie et la radiothérapie sont les traitements de première ligne lorsque la tumeur est localisée, mais quand ceux-ci sont inefficaces la chimiothérapie doit être administrée. Cette administration de molécules chimiques servant à détruire les cellules cancéreuses n'est cependant pas sans faille. La chimiothérapie est imparfaite et, pour des raisons que les scientifiques ignorent encore, chez certains patients le traitement démontre une bonne efficacité alors que chez d'autres, il ne fonctionne pas. En effet, certaines cellules cancéreuses possèdent (ou développent) des mécanismes de résistance aux drogues utilisées en chimiothérapie. C'est ce phénomène que l'on appelle chimiorésistance. Afin de faire le point sur ce traitement et de sauver plus de vies, les mécanismes moléculaires qui gouvernent la résistance à la chimiothérapie doivent être identifiés.

Au laboratoire du Dr Éric Asselin, une attention particulière est portée sur la protéine Akt, impliquée dans une multitude de processus biologiques. Un rôle général pour la protéine Akt dans la résistance à l'apoptose est désormais bien établi dans la littérature. Dans les cancers humains, certains événements oncogéniques peuvent affecter la régulation de cette protéine. L'avancement des connaissances sur Akt nous permet d'ailleurs de constater qu'elle est impliquée dans la résistance des cellules à la

mort induite par chimiothérapie. Suite à l'analyse de différentes observations sur la protéine Akt et sur ses trois isoformes (Akt1, Akt2 et Akt3), nous avons orienté nos recherches sur le rôle de chaque isoforme d'Akt dans la chimiorésistance des cellules de cancer endométrial humain. Malgré que les trois isoformes d'Akt aient une structure homologue et qu'ils partagent les mêmes mécanismes d'activation, plusieurs études ont démontré qu'ils exercent des fonctions distinctes dans la progression du cycle cellulaire, la migration et l'invasion. Peu d'études ont cependant été portées sur le rôle spécifique à chaque isoforme dans la résistance des cancers endométriaux à la chimiothérapie.

Dans cette étude, nous avons exploré l'impact différentiel de l'expression et de l'activation des isoformes d'Akt dans la chimiorésistance. Nous avons construit deux excellents modèles afin d'étudier les mécanismes impliqués dans l'acquisition de la résistance à la chimiothérapie. Deux lignées cancéreuses endométriales, KLE et Hec-1-A, ont servi de base à notre modèle d'étude. Nous avons transformé ces lignées cellulaires de façon à en modifier l'expression de chaque isoforme d'Akt. L'équipe du Dr Asselin a démontré précédemment que dans la lignée KLE, les trois isoformes d'Akt sont activés constitutivement et que cette lignée est hautement résistante au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol [128, 159]. Dans cette lignée, nous avons induit une perte de fonction stable et spécifique à chacun des isoformes d'Akt par l'utilisation de shRNAs. À l'inverse, dans la lignée Hec-1-A, le niveau de phosphorylation d'Akt (forme active de la protéine) est très bas, voire inexistant, et cette lignée est plus sensible au cisplatine [128]. Dans ce second modèle, l'impact de chaque isoforme d'Akt a été évalué par l'induction de l'activation de chacun en utilisant des vecteurs constitutivement actifs codant pour chaque isoforme de la protéine. Avec ces modèles, nous avons pu évaluer, pour la première fois, la contribution de chaque isoforme d'Akt dans la chimiorésistance des cancers endométriaux.

Avant le début des expériences, nous avons validé par Western blot nos modèles expérimentaux. Les résultats ont confirmé que dans les cellules KLE transformées, l'inhibition de chaque isoforme d'Akt est spécifique à Akt1, Akt2 ou Akt3 et qu'il n'y a pas de réaction croisée « off-target » entre les shRNAs. Dans les cellules Hec-1-A,

l'activation de chaque isoforme d'Akt est gouvernée par le vecteur pTRE-Tight. Ce vecteur est constitué d'un promoteur P_{Tight} suivi d'un site de multiclonaage (MCS) dans lequel est inséré le gène d'intérêt. Le promoteur P_{Tight} contient lui-même un élément de réponse Tet modifié (TRE_{mod}) contenant sept répétitions de la séquence de l'opérateur *tet* (*tetO*) et un promoteur CMV minimal ($P_{minCMV\Delta}$) dépourvu d'amplificateur. Conséquemment, P_{Tight} est silencieux en absence du transactivateur *Tet-on Advanced*, lui-même sous le contrôle de la tétracycline (Figure 3.1). Afin de générer chaque isoforme de la protéine Akt de façon constitutivement active, une séquence de myristylation a été ajoutée en amont de la séquence de l'un ou l'autre des isoformes d'Akt dans le MCS du vecteur d'expression. Cette séquence permet à la protéine d'être transcrite à partir du vecteur et d'être continuellement transloquée à la membrane plasmique pour être constitutivement activée. Dans notre modèle, en présence de doxycycline, le transactivateur se lie au vecteur pTRE-Tight et induit la transcription du gène d'Akt1, Akt2 ou Akt3, le cas échéant. Nous avons donc validé que, suite à l'ajout de doxycycline, chacun des isoforme d'Akt est spécifiquement activé dans les cellules Hec-1-A. De plus, nous avons analysé l'expression de mTOR phosphorylée, une protéine en aval d'Akt, afin de valider que cette dernière possède bien la capacité de phosphoryler cette molécule cible.

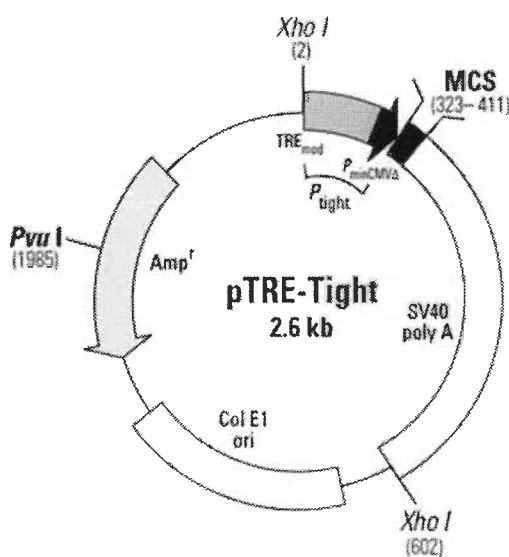


Figure 3.1 Représentation du vecteur pTRE-Tight, tirée de [160].

Dans le modèle KLE, nous avons établi que l'activation des isoformes Akt1 ou Akt2 est nécessaire pour induire la chimiorésistance. En effet, tel que vérifié par cytométrie en flux, la diminution d'expression spécifique à chacun de ces isoformes induit une augmentation de la mort cellulaire après un traitement au cisplatine. Afin de comparer ces niveaux de mort cellulaire avec les niveaux d'apoptose induite par cette drogue dans notre modèle, nous avons coloré au Hoechst les noyaux cellulaires et procédé au décompte des cellules apoptotiques. Ces résultats confirment que la mort cellulaire observée dans les cellules déficientes pour Akt1 ou Akt2 est effectivement de l'apoptose. La présence de fragments clivés des caspases-3, -6, -9 et de la « poly adenosine diphosphate ribose polymerase » (PARP) détectée par Western blot à la suite de l'exposition des cellules au cisplatine confirme que dans la lignée KLE, cette drogue active la voie mitochondriale de l'apoptose. En comparant les résultats obtenus à la suite de 24 heures d'exposition au cisplatine, nous pouvons constater que dans les cellules déficientes pour Akt2, le niveau de mort cellulaire détecté par cytométrie en flux est plus élevé que le niveau d'apoptose détecté par coloration au Hoechst. Ces résultats suggèrent que les cellules pourraient mourir par un autre procédé que l'apoptose. Parmi ces autres procédés, notons la mort cellulaire par nécrose, par sénescence ou par autophagie, qui sont tous différents, tant au niveau morphologique qu'au niveau biochimique. D'autres expériences seraient cependant nécessaires afin de faire le point sur ces autres formes de mort cellulaire.

Les mêmes expériences ont été portées sur les cellules de la lignée Hec-1-A transformées. Comme observé précédemment, les isoformes Akt1 et Akt2 sont les plus impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. Ainsi, la surexpression de chacun d'entre eux dans notre modèle avait pour effet de diminuer les niveaux de mort cellulaire induite par le cisplatine. Une fois de plus, l'analyse de facteurs proapoptotiques tels que les caspases-3, -9 et PARP clivés indiquent que la voie mitochondriale de l'apoptose est induite dans les cellules traitées au cisplatine. La surexpression d'Akt1 ou d'Akt2 dans ce modèle a pour effet de diminuer les niveaux d'expression de ces facteurs, démontrant l'implication de chacun dans la résistance des cellules au cisplatine. L'activation d'Akt3 ne démontre cependant aucun impact sur la résistance des cellules au cisplatine puisque

dans chacun de nos modèles, ni son inhibition ni son activation ne montrent un effet significatif sur la résistance des cellules à la chimiothérapie.

Ces résultats sont également supportés dans d'autres modèles de lignées cancéreuses. La surexpression constitutive des isoformes d'Akt sensibilise les cellules du cancer cervical HeLa à l'apoptose induite par chimiothérapie et ce, de manière isoforme-spécifique [159]. De plus, dans les cellules du cancer du poumon dans lesquelles chaque isoforme d'Akt est constitutivement activé, l'inhibition d'Akt1 ou d'Akt2 par siRNA sensibilise les cellules à la mort cellulaire par apoptose [161]. Cette étude montre également que les isoformes Akt1 et Akt2 contribuent à la survie cellulaire par des mécanismes distincts. Dans ces cellules, la perte d'expression d'Akt1 provoque une baisse dans l'activité de MEK/ERK1/2, menant à l'activation de NF- κ B. L'inhibition d'Akt2, quant à elle, mène au clivage de la protéine « myeloid cell leukemia sequence 1 » (MCL-1), un membre antiapoptotique de la famille de Bcl-2, à un effondrement du potentiel membranaire de la mitochondrie, au relargage du cytochrome *c* et à l'activation de la cascade des caspases [161]. Cependant, l'inhibition d'aucun isoforme d'Akt dans la lignée KLE n'influence l'expression de MEK/ERK1/2 alors que la perte d'expression d'Akt1 ou Akt2 induit le clivage des caspases. Ces résultats montrent que des mécanismes d'activation de l'apoptose différents sont impliqués dans les cellules du cancer endométrial. D'autres études ont démontré que la surexpression d'Akt2 dans les cellules de cancer de l'endomètre Ishikawa, déficientes pour cet isoforme, mène à une expression accrue de l'expression de Bcl-2, une protéine antiapoptotique, après un traitement au cisplatine. L'implication d'Akt1 et d'Akt3 dans la régulation de Bcl-2 est toutefois moins élevée [162].

La diminution d'expression d'Akt1 ou d'Akt2 affecte aussi la prolifération des cellules en présence de cisplatine, ce que nous avons démontré par un test de prolifération cellulaire au 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT) et un test de formation de colonies. Il est important de noter que le test MTT permet de déterminer le pourcentage des cellules en prolifération active et non le pourcentage de cellules vivantes. Après l'ajout d'un sel de tétrazolium aux cellules,

celui-ci est réduit en formazan bleu par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules en prolifération. Une mesure de la densité optique est alors réalisée afin de déterminer le pourcentage de cellules toujours actives à la suite d'un traitement comparativement aux cellules non-traitées. De son côté, le test de formation de colonies permet d'évaluer la capacité des cellules à reformer des colonies après avoir été exposées à un traitement de chimiothérapie. En extrapolant les résultats, le test permet ainsi de voir si les cellules tumorales ayant résisté au traitement auraient la capacité de former de nouveaux foyers de cellules cancéreuses chez les personnes atteintes.

Nos résultats suggèrent que l'isoforme Akt2 est le plus important dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses de l'endomètre. L'inactivation de cet isoforme provoque une baisse marquée de la prolifération cellulaire suite à un traitement au cisplatine. Ces résultats concordent avec une étude établissant que l'isoforme Akt2 favorise la prolifération cellulaire et facilite la progression du cycle cellulaire par la régulation de ses composants. Chez les cellules de cancer du sein MDA-MB231, l'ablation d'Akt2 provoque une baisse de prolifération due à la régulation à baisse de la « cycline dépendent kinase 2 » (Cdk2) et de la cycline D ainsi que l'augmentation d'expression de p27, différents composants du cycle cellulaire [163].

Les résultats obtenus suite aux tests de formation de colonies confirment que chaque isoforme d'Akt est nécessaire aux cellules KLE afin de poursuivre leur division à la suite d'un traitement au cisplatine. En effet, aucune colonie n'est visible à la suite du traitement des cellules KLE/shRNA Akt1 et KLE/shRNA Akt2 et très peu de colonies sont visibles pour les cellules KLE/shRNA Akt3. Les isoformes d'Akt ne sont donc pas en mesure de compenser les uns pour les autres en ce qui concerne la formation de colonies après un traitement.

Pour déterminer si l'implication des isoformes d'Akt dans la chimiorésistance varie selon la drogue utilisée, nous avons également conduit nos expériences en utilisant de la doxorubicine et du taxol, deux autres drogues antinéoplasiques largement utilisées pour traiter les cancers endométriaux. Bien qu'elles entraînent toutes la mort cellulaire

par apoptose, les trois drogues utilisées pour nos études ne le font pas selon le même mécanisme. Le cisplatine engendre un pontage entre les brins d'ADN [54], la doxorubicine, en plus de stabiliser le complexe ADN-topoisomérase II [42], induit la formation de radicaux libres et de peroxyde d'hydrogène [43], tandis que le taxol interfère avec les fonctions normales des microtubules cytoplasmiques [46]. Nous avons démontré qu'Akt1 et Akt2 sont impliqués dans la chimiorésistance, indépendamment de la drogue utilisée. Bien que leur mode d'action soit bien différent, le cisplatine, la doxorubicine et le taxol induisent l'apoptose par la voie de la mitochondrie dans les cellules déficientes en Akt1 ou Akt2. En effet, en analysant les résultats, on note une augmentation de l'expression des facteurs proapoptotiques caspases-3, -6, -9 et PARP clivés. La perte d'expression d'Akt1 ou d'Akt2 augmente donc l'efficacité autant du cisplatine que de la doxorubicine et du taxol. La prolifération cellulaire est également ralentie en réponse à un traitement chimiothérapeutique par la doxorubicine ou le taxol, bien qu'aucune variation notable ne soit observée entre les isoformes.

Bien que la résistance à la chimiothérapie soit la première cause d'échec du traitement, d'autres phénomènes peuvent également faire obstacle à l'élimination du cancer. Nous nous sommes penchés sur la motilité des cellules cancéreuses, un phénotype clé des cellules invasives et métastatiques. Le rôle d'Akt dans la migration cellulaire est bien documenté dans la littérature, mais peu d'informations sont disponibles sur le rôle que joue chaque isoforme dans ce processus [164]. La protéine Akt a la capacité de bloquer la motilité des cellules cancéreuses via différentes voies de signalisation intracellulaires [165]. Une étude menée sur des cellules de cancer du sein a d'ailleurs rapporté l'implication de la voie de la protéine « nuclear factor of activated T-cell » (NFAT) dans ce processus. Akt réduit le niveau d'expression de NFAT, un facteur de transcription pour divers gènes de motilité cellulaire, via la phosphorylation de « human double minute 2 » (HDM2), l'homologue humain de l'oncogène viral MDM2. Cette E3 ubiquitine ligase induit donc l'ubiquitination et la dégradation de NFAT dans le protéasome [165]. Une étude menée par un autre groupe a cependant démontré que l'isoforme Akt2 a la capacité d'induire, plutôt que de bloquer, l'invasion des cellules du cancer du sein [166]. D'un autre côté, un groupe a démontré que

l'inhibition d'Akt1 par ARN interférence favorise la migration des cellules de cancer du sein [167]. Ainsi, parmi la même famille de protéine kinase, différents isoformes pourraient avoir des rôles distincts, voire complètement opposés, selon le type de cancer étudié. Dans notre modèle de cancer endométrial, nous avons démontré que les isoformes d'Akt contribuent différemment au processus de migration des cellules. Des tests de fermeture de la brèche nous ont permis de démontrer que l'isoforme Akt2 bloque significativement la migration des cellules, alors qu'Akt1 et Akt3 ont un impact plus modéré à ce niveau. En effet, la perte d'expression d'Akt2 dans les cellules KLE induit une augmentation de la migration alors que la surexpression de cet isoforme dans les cellules Hec-1-A ralentit considérablement le mouvement des cellules. Le mécanisme par lequel Akt2 régule négativement la motilité cellulaire nous est cependant encore inconnu et d'autres expériences seront nécessaires à ce niveau. Ces résultats suggèrent tout de même que dans chaque tumeur, le degré de migration des cellules dépend non seulement de la présence de la protéine Akt mais, plus précisément, de la présence spécifique de chaque isoforme.

3.2 Perspectives de recherche

Afin de déterminer si de multiples isoformes d'Akt sont impliqués simultanément dans les mécanismes de résistance à la chimiothérapie, différents clones stables devraient être produits. Dans chacun, deux ou trois isoformes d'Akt seraient inhibés afin d'évaluer si la baisse d'expression simultanée de plusieurs isoformes pourrait avoir un effet synergique sur la sensibilité aux différentes drogues. Dans le même ordre d'idées, nous pourrions évaluer si la surexpression de plusieurs isoformes à la fois diminue davantage l'efficacité des drogues, comparativement à la surexpression d'un seul isoforme. Ainsi, pour une meilleure compréhension de l'implication des isoformes d'Akt dans la chimiorésistance, les combinaisons des isoformes Akt1/Akt2, Akt1/Akt3, Akt2/Akt3 et Akt1/2/3 devraient être simultanément inhibés ou surexprimés de façon stable, selon le modèle utilisé. L'équipe du laboratoire du docteur Asselin a démontré récemment que l'inhibition transitoire d'Akt1 et d'Akt2 sensibilise les cellules KLE au cisplatine [128]. De plus, une autre équipe a démontré que l'inhibition simultanée de ces

deux mêmes isoformes dans différents types de cellules cancéreuses augmente l'efficacité de la doxorubicine comparativement à l'inhibition d'un seul isoforme à la fois [168]. Nous voulons donc, dans les cellules de cancer endométrial, évaluer l'effet des différentes combinaisons d'isoformes sur l'efficacité du cisplatine, de la doxorubicine et du taxol.

Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro* dans un modèle physiologique plus pertinent, un modèle de xénogreffes sur des souris immunodéficientes nu/nu devra être établi. Préalablement transfectées avec le vecteur rapporteur luminescent PGL4-luc2 pour permettre l'expression constitutive de l'enzyme luciférase, les cellules tumorales endométriales KLE ou Hec-1-A transformées seront injectées dans le flanc des souris. Après deux à trois semaines, les cellules cancéreuses dans lesquelles l'expression de chaque isoforme d'Akt est inhibée ou augmentée de façon spécifique formeront des tumeurs palpables dans les souris. La doxycycline sera alors ajoutée à l'eau des animaux afin d'induire l'expression du transgène approprié (shRNA Akt ou vecteur constitutivement actif (CA) Akt, selon le modèle). La journée suivante, de la saline stérile (groupes contrôles), du cisplatine, de la doxorubicine ou du taxol seront administrés aux souris tous les trois jours. La croissance tumorale sera alors mesurée régulièrement à l'aide d'un appareil d'imagerie très précis qui mesure l'intensité de lumière émise dans chaque animal. La lumière, dont l'intensité est proportionnelle à la grosseur de la tumeur sera quantifiée et analysée afin de déterminer l'impact de l'inhibition ou de la surexpression de chaque isoforme d'Akt sur la réponse au traitement de chimiothérapie. Selon notre hypothèse et si nos résultats *in vivo* concordent avec les résultats obtenus en culture cellulaire, les tumeurs dérivées des cellules KLE/shRNA Akt vont croître plus lentement, tandis que les tumeurs dérivées des cellules Hec-1-A CA-Akt vont croître plus rapidement que les tumeurs dérivées de cellules contrôles en réponse aux différentes drogues. À la fin de l'expérimentation, les souris seront sacrifiées et des échantillons de tumeurs seront prélevés et conservés afin de vérifier la modulation de l'expression de diverses protéines en aval d'Akt en réponse au traitement.

Pour valider la pertinence de notre modèle au niveau de la résistance à la chimiothérapie chez la femme, nous avons à notre disposition un « tissue microarray » de 30 cancers endométriaux dont nous connaissons le grade et le stade. Les analyses d'immunofluorescence sur ces « microarray » nous permettront de déterminer lequel ou lesquels des isoformes d'Akt sont régulés au cours de la progression tumorale. Des tissus provenant de patientes dont la tumeur a résisté à la chimiothérapie seront également à notre disposition et nous pourrions comparer la présence de chaque isoforme d'Akt avec la résistance des tumeurs à la chimiothérapie. Nous prévoyons trouver un niveau de l'un ou l'autre des isoformes d'Akt plus élevé chez les tumeurs chimiorésistantes que chez les tumeurs sensibles à la chimiothérapie.

Mise à part la résistance à la chimiothérapie, le développement de métastases complique également le travail des oncologues. Afin de mieux comprendre le rôle de chaque isoforme d'Akt dans la formation de métastases, les protéines en aval d'Akt dans la voie de signalisation devront être étudiées. Notons, entre autres, les protéines palladin, NFAT et ERK qui ont toutes un rôle plus ou moins direct dans la motilité cellulaire [165, 169, 170]. D'autres tests de migrations pourraient aussi être effectués afin de confirmer les résultats obtenus avec les tests de fermeture de la brèche. Le laboratoire du Dr Asselin dispose d'un appareil permettant de suivre le mouvement des cellules en temps réel. Ce même appareil permet également de faire des tests d'invasion avec les cellules cancéreuses endométriales. Ainsi, il nous serait possible de déterminer lequel des isoformes d'Akt favorise l'invasion des cellules tumorales et le développement de métastases.

Finalement, un résultat pour le moins surprenant a été obtenu avec le test de prolifération cellulaire MTT à la suite de l'exposition des cellules KLE au cisplatine. Les cellules KLE exprimant le shRNA Akt2 subissent une forte baisse de prolifération comparativement aux autres cellules. De plus, cette baisse de prolifération ne concorde pas directement avec le taux de mort cellulaire par apoptose observé par Western blot et par le décompte des cellules au Hoechst. Cependant, le taux de mort cellulaire observé par cytométrie en flux est très élevé (40 %) et nous invite à croire que la baisse de

prolifération cellulaire est effectivement due à la mort des cellules, mais pas à la mort par apoptose. De ce fait, différentes expériences pourraient être effectuées afin de savoir par quel mécanisme les cellules meurent. Est-ce de l'autophagie, de la nécrose, de la sénescence ou encore, une catastrophe mitotique?

3.3 Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois que les isoformes d'Akt ont un impact distinct sur la résistance des cellules de cancer endométrial à la chimiothérapie. Nous avons d'abord montré que la perte d'expression individuelle d'Akt1 ou d'Akt2 sensibilise les cellules de cancer endométrial KLE à la chimiothérapie par le cisplatine, la doxorubicine et le taxol. Nous avons ensuite confirmé les résultats obtenus à la suite d'un traitement au cisplatine dans une autre lignée cellulaire provenant d'un adénocarcinome de l'endomètre. La surexpression d'Akt1 ou d'Akt2 dans les cellules Hec-1-A diminue l'efficacité de la drogue et rend les cellules plus résistantes à la chimiothérapie. Nous avons également analysé la prolifération des cellules cancéreuses en réponse à une exposition à des doses croissantes de drogues. Ces tests nous ont permis de démontrer que l'isoforme Akt2 est le plus impliqué au niveau de la prolifération cellulaire suite à un traitement au cisplatine. Le rôle individuel des deux autres isoformes, Akt1 et Akt3, dans la prolifération des cellules à la suite d'un traitement au cisplatine est cependant plus discret. En ce qui concerne la doxorubicine, la perte d'expression de l'un ou l'autre des isoformes a sensiblement le même effet sur la prolifération cellulaire et il en est de même pour le taxol. Par contre, des tests de formation de colonies nous ont permis d'affirmer que chacun des trois isoformes d'Akt est nécessaire aux cellules cancéreuses endométriales afin de reformer des colonies après un traitement visant à détruire les tumeurs. Finalement, nos deux modèles cellulaires nous ont permis de déterminer que l'isoforme Akt2 est particulièrement impliqué au niveau de la motilité des cellules cancéreuses endométriales puisque son inactivation favorise le mouvement des cellules alors que la surexpression de celui-ci ralentit considérablement le mouvement.

Bien que les agents chimiothérapeutiques comme le cisplatine, la doxorubicine et le taxol soient largement utilisés pour traiter les cancers endométriaux, le succès des thérapies anticancéreuses est limité par la résistance des cellules à ces drogues. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la chimiorésistance sont encore aujourd'hui peu connus et une meilleure compréhension de ceux-ci pourrait aider à identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour contourner la résistance et induire la mort des cellules cancéreuses de façon sélective.

En modulant l'expression de chacun des isoformes d'Akt, il nous est possible d'augmenter la mort cellulaire induite par le cisplatine, la doxorubicine ou le taxol en culture cellulaire. Ainsi, nous pouvons conclure que les isoformes d'Akt pourraient devenir des candidats intéressants pour la thérapie génique, bien qu'il soit avant tout nécessaire de confirmer nos résultats *in vivo*. Il pourrait cependant être nécessaire de bloquer simultanément deux ou trois isoformes d'Akt pour atteindre de meilleurs résultats d'inhibition tumorale, mais à quel prix? La perte d'expression d'Akt2, par exemple, peut sensibiliser les cellules à la chimiothérapie et, simultanément, favoriser la motilité des cellules cancéreuses. La recherche des cibles intracellulaires sur lesquelles agit chacun des isoformes nous offrira une meilleure compréhension de ce phénomène.

RÉFÉRENCES

- 1 Tortora, G.J., Grabowski, S.R., Boudreault, F., Imbach, A., Ferron, A., and Desorcy, M.C. (2001). Principes d'anatomie et de physiologie, (De Boeck).
- 2 Dubuis-Grieder, C. (2005). Embryologie Humaine. (Lausanne: Campus Virtuel Suisse).
- 3 Gray, H. (1918). Anatomy of the Human Body, 20th edition, (Philadelphia: Bartleby.com).
- 4 Bleyl, S.B., Brauer, P.R., Francis-West, P.H., Larsen, W., and Schoenwolf, G.C. (2011). Embryologie humaine, 3e édition.
- 5 Stevens, A., and Lowe, J. (1997). Histologie Humaine, 2e édition, (Paris, Bruxelles: De Boeck).
- 6 Stella Pelengaris, M.K. (2006). The Molecular Biology of Cancer, (Blackwell Publishing).
- 7 Chopin, D., Cappellen, D., Fradvanyi, F., and Gattegno, B. (2001). [Fundamental bases of urothelial carcinogenesis]. *Prog Urol* 11, 879-924.
- 8 Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., and Gelbart, W.M. (2006). Introduction à l'Analyse Génétique, 4e édition, (Bruxelles: De Boeck).
- 9 Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., and Matsudaira, P. (2008). Molecular Cell Biology, 6th edition, (New York: Freeman).
- 10 Esteller, M., Xercavins, J., and Reventos, J. (1999). Advances in the molecular genetics of endometrial cancer (Review). *Oncol Rep* 6, 1377-1382.
- 11 Kindt, T., Goldsby, R., and Osborne, B. (2008). Immunologie, 6e édition, (Paris: Dunod).

- 12 Comité directeur de la Société canadienne du cancer (2012). Statistiques canadiennes sur le cancer 2012. Société canadienne du cancer (Toronto).
- 13 Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., and Jemal, A. (2011). Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* *61*, 212-236.
- 14 Creasman, W.T., Odicino, F., Maisonneuve, P., Quinn, M.A., Beller, U., Benedet, J.L., Heintz, A.P., Ngan, H.Y., and Pecorelli, S. (2006). Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* *95 Suppl 1*, S105-143.
- 15 Bokhman, J.V. (1983). Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* *15*, 10-17.
- 16 Fiorica, J.V. (2002). Update on the treatment of cervical and uterine carcinoma: focus on topotecan. *Oncologist* *7 Suppl 5*, 36-45.
- 17 Moxley, K.M., and McMeekin, D.S. (2010). Endometrial carcinoma: a review of chemotherapy, drug resistance, and the search for new agents. *Oncologist* *15*, 1026-1033.
- 18 Baranda-Avila, N., Mendoza-Rodriguez, C.A., Morimoto, S., Langley, E., and Cerbon, M. (2009). Molecular mechanism of cell proliferation in rodent uterus during the estrous cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* *113*, 259-268.
- 19 Quarmby, V.E., and Korach, K.S. (1984). The Influence of 17 β -Estradiol on Patterns of Cell Division in the Uterus. *Endocrinology* *114*, 694-702.
- 20 Koos, R.D. (2011). Minireview: Putting Physiology Back into Estrogens' Mechanism of Action. *Endocrinology* *152*, 4481-4488.
- 21 Martin, L., Finn, C.A., and Trinder, G. (1973). Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study. *Journal of Endocrinology* *56*, 133-NP.
- 22 Furness, S., Roberts, H., Marjoribanks, J., Lethaby, A., Hickey, M., and Farquhar, C. (2009). Hormone therapy in postmenopausal women and risk of endometrial hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000402.

- 23 Cavanagh, D., Marsden, D.E., and Ruffolo, E.H. (1984). Carcinoma of the endometrium. *Obstet Gynecol Annu* 13, 211-260.
- 24 Nelson, L.R., and Bulun, S.E. (2001). Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 45, S116-124.
- 25 Fader, A.N., Arriba, L.N., Frasure, H.E., and Von Gruenigen, V.E. (2009). Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecol Oncol* 114, 121-127.
- 26 Al-Jarrah, M., Matalka, I., Aseri, H.A., Mohtaseb, A., Smirnova, I.V., Novikova, L., Stehno-Bittel, L., and Alkhateeb, A. (2010). Exercise training prevents endometrial hyperplasia and biomarkers for endometrial cancer in rat model of type 1 diabetes. *J Clin Med Res* 2, 207-214.
- 27 Karageorgi, S., Hankinson, S.E., Kraft, P., and De Vivo, I. (2010). Reproductive factors and postmenopausal hormone use in relation to endometrial cancer risk in the Nurses' Health Study cohort 1976-2004. *Int J Cancer* 126, 208-216.
- 28 Brennan, M.E., and Houssami, N. (2011). Overview of long term care of breast cancer survivors. *Maturitas* 69, 106-112.
- 29 Van Leeuwen, F.E., Benraadt, J., Coebergh, J.W., Kiemeney, L.A., Gimbrere, C.H., Otter, R., Schouten, L.J., Damhuis, R.A., Bontenbal, M., Diepenhorst, F.W., et al. (1994). Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer. *Lancet* 343, 448-452.
- 30 Amant, F., Moerman, P., Neven, P., Timmerman, D., Van Limbergen, E., and Vergote, I. (2005). Endometrial cancer. *The Lancet* 366, 491-505.
- 31 Société canadienne du cancer (2011). Stadification et classification histologique du cancer de l'utérus. p. Société canadienne du cancer.
- 32 Rauh-Hain, J.A., and Del Carmen, M.G. (2010). Treatment for advanced and recurrent endometrial carcinoma: combined modalities. *Oncologist* 15, 852-861.
- 33 Pectasides, D., Pectasides, E., and Economopoulos, T. (2007). Systemic therapy in metastatic or recurrent endometrial cancer. *Cancer Treat Rev* 33, 177-190.

- 34 Carlson, J.A., Jr., Allegra, J.C., Day, T.G., Jr., and Wittliff, J.L. (1984). Tamoxifen and endometrial carcinoma: alterations in estrogen and progesterone receptors in untreated patients and combination hormonal therapy in advanced neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 149, 149-153.
- 35 Burke, T.W., and Walker, C.L. (2003). Arzoxifene as therapy for endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 90, S40-46.
- 36 Chaudhry, P., and Asselin, E. (2009). Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 16, 363-380.
- 37 Thigpen, J.T., Brady, M.F., Homesley, H.D., Malfetano, J., DuBeshter, B., Burger, R.A., and Liao, S. (2004). Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 22, 3902-3908.
- 38 Ball, H.G., Blessing, J.A., Lentz, S.S., and Mutch, D.G. (1996). A phase II trial of paclitaxel in patients with advanced or recurrent adenocarcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 62, 278-281.
- 39 Thigpen, J.T., Blessing, J.A., Homesley, H., Creasman, W.T., and Sutton, G. (1989). Phase II trial of cisplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 33, 68-70.
- 40 Fleming, G.F., Brunetto, V.L., Cella, D., Look, K.Y., Reid, G.C., Munkarah, A.R., Kline, R., Burger, R.A., Goodman, A., and Burks, R.T. (2004). Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 22, 2159-2166.
- 41 Cutts, S.M., Nudelman, A., Rephaeli, A., and Phillips, D.R. (2005). The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life* 57, 73-81.
- 42 Gewirtz, D.A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57, 727-741.
- 43 Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., and Kawanishi, S. (2005). Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci* 76, 1439-1453.

- 44 Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., and McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* *93*, 2325-2327.
- 45 Kumar, S., Mahdi, H., Bryant, C., Shah, J.P., Garg, G., and Munkarah, A. (2010). Clinical trials and progress with paclitaxel in ovarian cancer. *Int J Womens Health* *2*, 411-427.
- 46 Schiff, P.B., Fant, J., and Horwitz, S.B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* *277*, 665-667.
- 47 Bhalla, K.N. (2003). Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* *22*, 9075-9086.
- 48 Storrie, B., and Lodish, H.F. (2000). Working with Molecular cell biology: a study companion, 4th edition.
- 49 Davies, M.S., Berners-Price, S.J., and Hambley, T.W. (2000). Rates of platination of -AG- and -GA- containing double-stranded oligonucleotides: effect of chloride concentration. *J Inorg Biochem* *79*, 167-172.
- 50 Kartalou, M., and Essigmann, J.M. (2001). Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* *478*, 1-21.
- 51 Salles, B., Butour, J.L., Lesca, C., and Macquet, J.P. (1983). *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂ and *trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂ inhibit DNA synthesis in cultured L1210 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* *112*, 555-563.
- 52 Mello, J.A., Lippard, S.J., and Essigmann, J.M. (1995). DNA adducts of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and its *trans* isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. *Biochemistry* *34*, 14783-14791.
- 53 Un, F. (2007). G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers. *Anticancer Drugs* *18*, 411-417.
- 54 Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* *7*, 573-584.

- 55 Fodale, V., Pierobon, M., Liotta, L., and Petricoin, E. (2011). Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer J* 17, 89-95.
- 56 Hurley, L.H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2, 188-200.
- 57 Chapal, N., Molina, L., Molina, F., Laplanche, M., Pau, B., and Petit, P. (2004). Pharmacoproteomic approach to the study of drug mode of action, toxicity, and resistance: applications in diabetes and cancer. *Fundam Clin Pharmacol* 18, 413-422.
- 58 Gerlach, J.H., Kartner, N., Bell, D.R., and Ling, V. (1986). Multidrug resistance. *Cancer Surv* 5, 25-46.
- 59 Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53, 615-627.
- 60 Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205, 275-292.
- 61 Rees, D.C., Johnson, E., and Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 218-227.
- 62 Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2, 48-58.
- 63 Gottesman, M.M., Pastan, I., and Ambudkar, S.V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 6, 610-617.
- 64 Tolis, C., Ferreira, C.G., Pinedo, H.M., and Giaccone, G. (2000). Principles of Molecular Oncology, (Humana Press Inc).
- 65 Luqmani, Y.A. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 14 Suppl 1, 35-48.
- 66 Smyth, M.J., Krasovskis, E., Sutton, V.R., and Johnstone, R.W. (1998). The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7024-7029.

- 67 Sovak, M.A. (2006). Cancer Chemotherapy. In *Cancer Drug Resistance*, H. Press, ed. (Springer), pp. 543-557.
- 68 Meijer, C., Mulder, N.H., Timmer-Bosscha, H., Sluiter, W.J., Meersma, G.J., and de Vries, E.G.E. (1992). Relationship of Cellular Glutathione to the Cytotoxicity and Resistance of Seven Platinum Compounds. *Cancer Research* *52*, 6885-6889.
- 69 Kelland, L.R. (1993). New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol* *15*, 191-219.
- 70 Sakamoto, M., Kondo, A., Kawasaki, K., Goto, T., Sakamoto, H., Miyake, K., Koyamatsu, Y., Akiya, T., Iwabuchi, H., Muroya, T., et al. (2001). Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Hum Cell* *14*, 305-315.
- 71 Green, J.A., Robertson, L.J., and Clark, A.H. (1993). Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumours. *Br J Cancer* *68*, 235-239.
- 72 Chaney, S.G., and Sancar, A. (1996). DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst* *88*, 1346-1360.
- 73 Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., and Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection* *11*, 1050-1062.
- 74 Harvey Lodish, A.B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, S. Laurence Zipursky, James Darnell (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*, 3rd edition.
- 75 Weinberg, R.A. (2007). *The biology of cancer, Volume 2*, (Garland Science).
- 76 Martinet, W., Schrijvers, D.M., and De Meyer, G.R. (2011). Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* *106*, 749-760.
- 77 Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* *26*, 239-257.
- 78 Shi, Y. (2009). Structural Biology of Programmed Cell Death. In *Essentials of Apoptosis*, H. Press, ed. (Springer), pp. 95-118.

- 79 Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell* *116*, 205-219.
- 80 Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 47-59.
- 81 Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 405-413.
- 82 Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* *102*, 43-53.
- 83 LaCasse, E.C., Mahoney, D.J., Cheung, H.H., Plenchette, S., Baird, S., and Korneluk, R.G. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* *27*, 6252-6275.
- 84 Crijns, A.P., Duiker, E.W., de Jong, S., Willemsse, P.H., van der Zee, A.G., and de Vries, E.G. (2006). Molecular prognostic markers in ovarian cancer: toward patient-tailored therapy. *Int J Gynecol Cancer* *16 Suppl 1*, 152-165.
- 85 Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* *9*, 459-470.
- 86 Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., and Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* *17*, 3237-3245.
- 87 Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.* *326*, 1-16.
- 88 Panayotou, G., and Waterfield, M.D. (1993). The assembly of signalling complexes by receptor tyrosine kinases. *Bioessays* *15*, 171-177.
- 89 Engelman, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* *9*, 550-562.
- 90 Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* *2*, 489-501.

- 91 Testa, J.R., and Tsichlis, P.N. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene* 24, 7391-7393.
- 92 Liang, J., and Slingerland, J.M. (2003). Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2, 339-345.
- 93 Martelli, A.M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P.L., Cappellini, A., Billi, A.M., and Cocco, L. (2005). Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias. *Histol Histopathol* 20, 239-252.
- 94 Tashiro, H., Blazes, M.S., Wu, R., Cho, K.R., Bose, S., Wang, S.I., Li, J., Parsons, R., and Ellenson, L.H. (1997). Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 57, 3935-3940.
- 95 Sakurada, A., Hamada, H., Fukushige, S., Yokoyama, T., Yoshinaga, K., Furukawa, T., Sato, S., Yajima, A., Sato, M., Fujimura, S., et al. (1999). Adenovirus-mediated delivery of the PTEN gene inhibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer. *Int J Oncol* 15, 1069-1074.
- 96 Cheung, L.W., Hennessy, B.T., Li, J., Yu, S., Myers, A.P., Djordjevic, B., Lu, Y., Stemke-Hale, K., Dyer, M.D., Zhang, F., et al. (2011). High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. *Cancer Discov* 1, 170-185.
- 97 Samuels, Y., Diaz, L.A., Jr., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., Delong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., et al. (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7, 561-573.
- 98 Oda, K., Stokoe, D., Taketani, Y., and McCormick, F. (2005). High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 65, 10669-10673.
- 99 Catusus, L., Gallardo, A., Cuatrecasas, M., and Prat, J. (2008). PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters. *Mod Pathol* 21, 131-139.
- 100 Velasco, A., Bussaglia, E., Pallares, J., Dolcet, X., Llobet, D., Encinas, M., Llecha, N., Palacios, J., Prat, J., and Matias-Guiu, X. (2006). PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Hum Pathol* 37, 1465-1472.

- 101 Bellacosa, A., Kumar, C.C., Di Cristofano, A., and Testa, J.R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 94, 29-86.
- 102 Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- 103 Morgensztern, D., and McLeod, H.L. (2005). PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 16, 797-803.
- 104 Nicholson, K.M., and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381-395.
- 105 Osaki, M., Oshimura, M., and Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9, 667-676.
- 106 Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B.A., Downward, J., Parker, P.J., and Larijani, B. (2007). Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol* 5, e95.
- 107 Hers, I., Vincent, E.E., and Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23, 1515-1527.
- 108 Datta, S.R., Brunet, A., and Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- 109 Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541-6551.
- 110 Toker, A., and Newton, A.C. (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275, 8271-8274.
- 111 Hodgkinson, C.P., Sale, E.M., and Sale, G.J. (2002). Characterization of PDK2 Activity Against Protein Kinase B γ . *Biochemistry* 41, 10351-10359.
- 112 Lynch, D.K., Ellis, C.A., Edwards, P.A., and Hiles, I.D. (1999). Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene* 18, 8024-8032.

- 113 Partovian, C., and Simons, M. (2004). Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase C α in endothelial cells. *Cellular Signalling* 16, 951-957.
- 114 Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- 115 Bozulic, L., and Hemmings, B.A. (2009). PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 256-261.
- 116 Sparks, C.A., and Guertin, D.A. (2010). Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene* 29, 3733-3744.
- 117 Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11211-11216.
- 118 Whang, Y.E., Yuan, X.J., Liu, Y., Majumder, S., and Lewis, T.D. (2004). Regulation of sensitivity to TRAIL by the PTEN tumor suppressor. *Vitam Horm* 67, 409-426.
- 119 Downward, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15, 177-182.
- 120 Altomare, D.A., and Testa, J.R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455-7464.
- 121 Pommier, Y., Sordet, O., Antony, S., Hayward, R.L., and Kohn, K.W. (2004). Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23, 2934-2949.
- 122 Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25-27.
- 123 Pap, M., and Cooper, G.M. (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273, 19929-19932.

- 124 Beurel, E., and Jope, R.S. (2006). The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79, 173-189.
- 125 Astrinidis, A., and Henske, E.P. (2005). Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene* 24, 7475-7481.
- 126 Sekulic, A., Hudson, C.C., Homme, J.L., Yin, P., Otterness, D.M., Karnitz, L.M., and Abraham, R.T. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 60, 3504-3513.
- 127 Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561-576.
- 128 Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., and Asselin, E. (2004). AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol* 94, 785-795.
- 129 Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., et al. (2001). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 15, 2203-2208.
- 130 Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M.J. (2001). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 276, 38349-38352.
- 131 Yang, Z.Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., and Hemmings, B.A. (2003). Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem* 278, 32124-32131.
- 132 Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, Kaestner, K.H., Bartolomei, M.S., Shulman, G.I., and Birnbaum, M.J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728-1731.
- 133 Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., et al. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112, 197-208.

- 134 Easton, R.M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D.W., Mizrahi, M., Forman, M.S., Lee, V.M., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., et al. (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* 25, 1869-1878.
- 135 Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B.A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943-2954.
- 136 Gonzalez, E., and McGraw, T.E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502-2508.
- 137 Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G., et al. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* 17, 1352-1365.
- 138 Yang, Z.Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dummler, B., Wahli, W., and Hemmings, B.A. (2005). Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Mol Cell Biol* 25, 10407-10418.
- 139 Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.Z., Dirnhofer, S., and Hemmings, B.A. (2006). Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol* 26, 8042-8051.
- 140 Sun, M., Wang, G., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z.Q., Ma, X.L., Shelley, S.A., Jove, R., Tschlis, P.N., Nicosia, S.V., et al. (2001). AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 159, 431-437.
- 141 Sun, M., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z., Coppola, D., Lu, Y.Y., Shelley, S.A., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2001). Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res* 61, 5985-5991.

- 142 Yuan, Z.Q., Sun, M., Feldman, R.I., Wang, G., Ma, X., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2000). Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* *19*, 2324-2330.
- 143 Altomare, D.A., Tanno, S., De Rienzo, A., Klein-Szanto, A.J., Skele, K.L., Hoffman, J.P., and Testa, J.R. (2002). Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem* *87*, 470-476.
- 144 Nakatani, K., Thompson, D.A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R.J., and Roth, R.A. (1999). Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* *274*, 21528-21532.
- 145 Liu, L.Z., Zhou, X.D., Qian, G., Shi, X., Fang, J., and Jiang, B.H. (2007). AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway. *Cancer Res* *67*, 6325-6332.
- 146 Lee, M.W., Kim, D.S., Min, N.Y., and Kim, H.T. (2008). Akt1 inhibition by RNA interference sensitizes human non-small cell lung cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer* *122*, 2380-2384.
- 147 Cheng, G.Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C.D., and Wang, L.H. (2007). Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res* *67*, 1979-1987.
- 148 Xing, H., Weng, D., Chen, G., Tao, W., Zhu, T., Yang, X., Meng, L., Wang, S., Lu, Y., and Ma, D. (2008). Activation of fibronectin/PI-3K/Akt2 leads to chemoresistance to docetaxel by regulating survivin protein expression in ovarian and breast cancer cells. *Cancer Lett* *261*, 108-119.
- 149 Fraser, M., Leung, B.M., Yan, X., Dan, H.C., Cheng, J.Q., and Tsang, B.K. (2003). p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* *63*, 7081-7088.
- 150 Yuan, Z.Q., Feldman, R.I., Sussman, G.E., Coppola, D., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2003). AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance. *J Biol Chem* *278*, 23432-23440.

- 151 Faridi, J., Wang, L., Endemann, G., and Roth, R.A. (2003). Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsiveness of these cells in vivo. *Clin Cancer Res* 9, 2933-2939.
- 152 Madhunapantula, S.V., Sharma, A., and Robertson, G.P. (2007). PRAS40 deregulates apoptosis in malignant melanoma. *Cancer Res* 67, 3626-3636.
- 153 Brugge, J., Hung, M.C., and Mills, G.B. (2007). A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell* 12, 104-107.
- 154 Zamore, P.D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 8, 746-750.
- 155 Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 457-467.
- 156 Campbell, T.N., and Choy, F.Y. (2005). RNA interference: past, present and future. *Curr Issues Mol Biol* 7, 1-6.
- 157 Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- 158 Santa Cruz Biotechnology (2012). « RNAi Gene Silencers ».
- 159 Gagnon, V., Van Themsche, C., Turner, S., Leblanc, V., and Asselin, E. (2008). Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 13, 259-271.
- 160 Clontech Laboratories, Inc. (2010). « pTRE-Tight Vector Information », Mountain View, CA, pp. 2.
- 161 Lee, M.W., Kim, D.S., Lee, J.H., Lee, B.S., Lee, S.H., Jung, H.L., Sung, K.W., Kim, H.T., Yoo, K.H., and Koo, H.H. (2011). Roles of AKT1 and AKT2 in non-small cell lung cancer cell survival, growth, and migration. *Cancer Sci* 102, 1822-1828.
- 162 Rouette, A., Parent, S., Girouard, J., Leblanc, V., and Asselin, E. (2012). Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells. *Int J Cancer* 130, 1755-1767.

- 163 Santi, S.A., and Lee, H. (2011). Ablation of Akt2 Induces Autophagy through Cell Cycle Arrest, the Downregulation of p70S6K, and the Deregulation of Mitochondria in MDA-MB231 Cells. *PLoS One* *6*, e14614.
- 164 McKenna, L.B., Zhou, G.L., and Field, J. (2007). Isoform-specific functions of Akt in cell motility. *Cell Mol Life Sci* *64*, 2723-2725.
- 165 Yoeli-Lerner, M., Yiu, G.K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S., and Toker, A. (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* *20*, 539-550.
- 166 Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., and Slamon, D.J. (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* *63*, 196-206.
- 167 Toker, A., and Yoeli-Lerner, M. (2006). Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* *66*, 3963-3966.
- 168 DeFeo-Jones, D., Barnett, S.F., Fu, S., Hancock, P.J., Haskell, K.M., Leander, K.R., McAvoy, E., Robinson, R.G., Duggan, M.E., Lindsley, C.W., et al. (2005). Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members. *Mol Cancer Ther* *4*, 271-279.
- 169 Chin, Y.R., and Toker, A. (2010). The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Mol Cell* *38*, 333-344.
- 170 Irie, H.Y., Pearline, R.V., Grueneberg, D., Hsia, M., Ravichandran, P., Kothari, N., Natesan, S., and Brugge, J.S. (2005). Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* *171*, 1023-1034.