

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
ALEXANDRE ROUETTE

UN INHIBITEUR INTRACELLULAIRE DE L'APOPTOSE :
SON IMPLICATION DANS LA CHIMIORÉSISTANCE

JUIN 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

À l'automne 2006, alors que j'étais étudiant au baccalauréat en Biologie Médicale, Éric Asselin, le professeur du cours de Biologie Moléculaire, avait annoncé à ses étudiants qu'il recrutait des stagiaires d'été dans son laboratoire de recherche. Je me rappelle très bien lui avoir envoyé un courriel lui signifiant mon intérêt pour la recherche, non sans nervosité. La seule idée que j'avais en tête à ce moment, c'était de pouvoir goûter à l'expérience du travail de laboratoire. Un stage d'été, un stage de fin de baccalauréat et une maîtrise plus tard (tous au laboratoire du Dr. Asselin), je peux affirmer que j'adore la recherche et que je prévois maintenant en faire une carrière professionnelle. Tout cela n'aurait pas été possible sans les personnes que j'ai côtoyées pendant ces trois dernières années et qui m'ont grandement influencé et qui continueront de m'influencer. Tout d'abord, il y a eu Steve Turner, un étudiant à la maîtrise qui m'a appris la plupart des techniques courantes utilisées en laboratoire lors de mon premier stage d'été. Céline Van Themsche m'a beaucoup aidé avec ses conseils et suggestions pour mon projet de recherche. Lyne Lafontaine, Marie-Claude Déry, Mohan Singh, Parvesh Chaudry, Anne-Marie Fortier, Dimitri Carrabin et Marie-Judith Lafleur ont tous été merveilleusement agréables à côtoyer au quotidien. Julie Girouard, en plus de son sourire resplendissant, a aussi donné un bon coup de pouce à mon projet avec les clones shRNA d'Akt. Kevin Brasseur m'a beaucoup aidé dans la vie de « party » universitaire et il va prendre le rôle de mâle-alpha du labo maintenant que je quitte. Valérie Leblanc et Sophie Parent, mes deux « super-women » préférées, ont été d'une aide précieuse au quotidien avec leurs mille et un conseils. Finalement, je tiens à remercier Éric Asselin pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses précieux conseils et son appui, pour sa disponibilité et pour tous les congrès et autres activités, scientifiques ou non, auxquelles il m'a fait participer.

Merci Éric.

Merci à tous.

RÉSUMÉ

Chez la femme, le cancer de l'endomètre de stade avancé est très résistant à la chimiothérapie par le cisplatine, limitant la survie des patientes atteintes. La protéine anti-apoptotique Bcl2 a été associée à la résistance à l'apoptose dans plusieurs cancers. Cependant, il n'y a pas de données concernant son implication dans la résistance au cisplatine et la régulation de son expression dans les carcinomes endométriaux. Le facteur de transcription P53, un suppresseur de tumeurs, est fréquemment muté dans le cancer. Toutefois, l'impact des mutations sur l'activité de P53 est peu étudié. Les objectifs du projet de recherche sont de : (1) clarifier le rôle des protéines de la famille Bcl2 dans la résistance au cisplatine, (2) étudier le mécanisme de régulation de la protéine Bcl2 en réponse au cisplatine et son impact sur la résistance, et (3) mesurer l'impact de différentes mutations dans le gène P53 dans la résistance au cisplatine, chez les cellules cancéreuses endométriales. Les méthodologies employées pour répondre à ces objectifs sont : (a) la culture de lignées cancéreuses endométriales montrant une sensibilité différentielle à l'apoptose, (b) l'analyse de protéines par immunobuvardage Western, (c) l'analyse de l'expression génique par RT-PCR et (d) l'analyse de l'apoptose cellulaire par microscopie. Donc, les résultats montrent que Bcl-2 et p53 sont associés à la résistance au cisplatine dans les cellules cancéreuses endométriales et nous décrivons la régulation de l'expression de Bcl-2 en réponse au cisplatine. De plus, nous démontrons que le cisplatine active l'expression de Bcl-2 par les voies de PKC et d'Akt2 et que cette régulation a un impact important sur l'apoptose induite par le cisplatine dans les cellules cancéreuses de l'endomètre. Finalement, nous avons montré comment les mutations dans le gène de P53 modulent son activité pro-apoptotique.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	II
RESUME	III
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	X
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 L'UTÉRUS.....	1
1.1.1 Anatomie et histologie	1
1.1.2 Physiologie de l'utérus	2
1.1.3 Le cycle menstruel	3
1.1.4 Les hormones stéroïdiennes	3
1.2 LE CANCER ENDOMÉTRIAL.....	5
1.2.1 Statistiques	6
1.2.2 Facteurs de risque.....	6
1.2.3 Types	7
1.2.4 Traitements.....	8
1.2.5 La résistance au cisplatine	10
1.3 L'APOPTOSE.....	11
1.3.1 Activation.....	12

1.3.2	Apoptose caspase-dépendante.....	12
1.3.3	Apoptose caspase-indépendante.....	16
1.4	FAMILLE BCL-2	17
1.4.1	Membres pro-apoptotiques.....	19
1.4.2	Membres anti-apoptotiques.....	19
1.4.3	Résistance à la chimiothérapie	21
1.4.4	Expression dans l'endomètre	21
1.5	LES PROTÉINES KINASES C.....	23
1.5.1	Régulation	23
1.5.2	PKC et Cancer.....	23
1.6	AKT.....	24
1.6.1	Régulation	24
1.6.2	Akt et Cancer.....	27
1.7	P53.....	27
1.7.1	Régulation	27
1.7.2	P53 et Cancer	29
1.8	OBJECTIFS	31
1.9	APPROCHES EXPÉRIMENTALES	33

CHAPITRE 2	ARTICLE	40
2.1	RÉSUMÉ.....	40
2.2	CONTRIBUTIONS.....	40
2.3	ARTICLE	42
CHAPITRE 3	ANALYSE DE MUTATIONS DE P53	59
3.1	NIVEAUX DE P53 ET MDM2	60
3.2	RÉGULATION DIFFÉRENTIELLE DE L'ACTIVITÉ DE P53	60
3.3	ACTIVATION DES PROCESSUS APOPTOTIQUES	62
CHAPITRE 4	DISCUSSION ET CONCLUSION	68
4.1	DISCUSSION	68
4.2	PERSPECTIVES DE RECHERCHE	77
4.3	CONCLUSION	79
BIBLIOGRAPHIE.....		81

LISTE DES FIGURES

1.1	Anatomie de l'utérus ¹	2
1.2	Le cycle reproducteur de la femme ¹	4
1.3	Mécanisme d'action du cisplatine sur l'ADN ²⁸	10
1.4	Morphologie des cellules apoptotiques ³¹	11
1.5	Voies d'activation des caspases ³¹	13
1.6	Les caspases coordonnent la destruction de structures cellulaires importantes ³¹	15
1.7	Famille des IAPs : suppresseurs d'apoptose ⁴⁰	16
1.8	Voies d'apoptose dépendante et indépendante des caspases ⁴⁴	17
1.9	Bcl-2 family of proteins ³¹	18
1.10	La voie de l'apoptose et les protéines de la famille Bcl-2 ⁵⁴	20
1.11	La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase-AKT dans les cancers humains ⁹⁸	25
1.12	La voie P53 dans le cancer ¹¹⁵	28
2.1	Endometrial cancer cells show differential sensitivity to apoptosis induced by cisplatin	53
2.2	Cisplatin increases Bcl-2 content in resistant cells	54
2.3	Bcl-2 overexpression confers resistance to apoptosis induced by cisplatin in endometrial cancer cells.....	55
2.4	Cisplatin increases Bcl-2 content by de-novo mRNA synthesis.....	56

2.5	PKC is involved in cisplatin-dependant increase in Bcl-2 mRNA in endometrial cancer cells	57
2.6	Akt2 is involved in cisplatin-dependant upregulation of Bcl-2 content in endometrial cancer cells	58
3.1	P53 est augmentée et Mdm2 est diminuée lorsque le gène P53 est muté	64
3.2	Les mutations dans le gène p53 influence son activité et sa localisation	65
3.3	Les mutations dans le gène P53 augmentent l'apoptose induite par le cisplatine	66
3.4	P53 sauvage augmente l'apoptose induite par le cisplatine	67

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Caractéristiques des lignées cellulaires à l'étude	35
-----	--	----

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ADN.....	Acide désoxyribonucléique
AIF.....	Apoptosis-Inducing factor
Akt.....	Protéine kinase B
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
BGS.....	Bovine growth serum
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2-like protein 11
BRUCE	baculovirus inhibitor of apoptosis repeat [BIR] repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme
Ca ²⁺	Calcium
cIAP1/2.....	Cellular inhibitor of apoptosis protein ½
DAG.....	Diacylglycérol
ERE.....	Estrogen response element
FBS.....	Fetal bovine serum
GSK-3.....	Glycogène synthétase kinase 3
IAPs.....	Inhibitor of apoptosis protein

I-kB.....	Inhibitor kappa-B
JNK.....	C-jun N-terminal kinase
LH	Hormone lutéinisante
MAPK.....	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
Mdm2	Murine double minute 2
MTORC2.....	Mammalian target of rapamycin complex 2
NAIP.....	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
Nf-kB.....	Nuclear factor-kappa B
PARP.....	Poly ADP-Ribose Polymérase
PCR.....	Polymerase chain reaction
PDK1	Phosphoinositide-dependant protein kinase 1
PIP3.....	Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
PKC.....	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PTEN.....	Phosphatase and tensin homolog
Rb.....	Rétinoblastome
TNF.....	Facteur de nécrose tumoral
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 L'UTÉRUS

L'utérus est un organe participant aux fonctions reproductrices chez la femme. Il est le siège de l'implantation de l'embryon, ainsi que du développement du fœtus au cours de la grossesse jusqu'à l'accouchement. Il est situé au niveau du petit bassin¹.

1.1.1 Anatomie et histologie

L'utérus est un organe creux et possède une forme de poire renversée avec une longueur de 7,5 cm, une largeur de 5 cm et une épaisseur de 2,5 cm. Il est situé entre la vessie et le rectum dans le bassin et est divisé en : (a) le fundus, la partie supérieure arrondie reliée aux trompes de Fallope, (b) le corps, la portion centrale, et (c) le col, la partie inférieure étroite reliée au vagin (Figure 1.1)¹. Après la fécondation, l'ovule, qui a initié les premières divisions cellulaires et qui devient un embryon, entre dans l'utérus par le fundus pour s'implanter dans la muqueuse utérine. Lors de l'accouchement, le fœtus, qui devient l'enfant, est expulsé de l'utérus au niveau du col par de violentes contractions¹.

Histologiquement, l'utérus est composé de trois couches principales : (a) le périmétrium, qui constitue la couche externe de l'utérus reliée au péritoine, (b) le myomètre, la portion interne constituée de muscles lisses servant à la contractilité lors de l'accouchement, et (c) l'endomètre, qui constitue la couche interne très vascularisée et qui est lui-même constitué d'un épithélium, d'un stroma sous-jacent ainsi que de glandes utérines (Figure 1.1). L'endomètre subit de profondes modifications histologiques pendant le cycle menstruel¹.

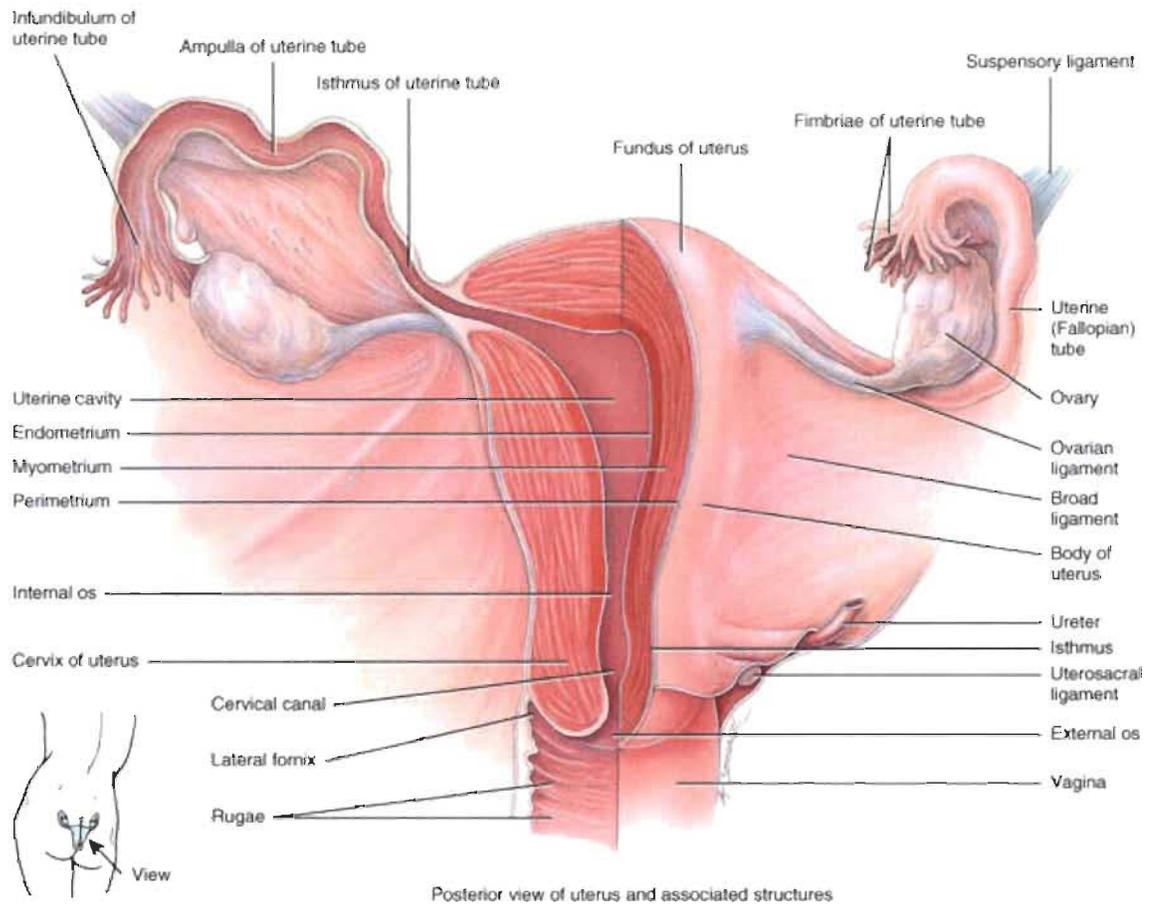


FIGURE 1.1

Anatomie de l'utérus ¹

1.1.2 Physiologie de l'utérus

Sous l'action des stéroïdes, l'endomètre utérin manifeste plusieurs modifications fonctionnelles de façon cyclique. À chaque cycle, il se prépare à recevoir l'embryon provenant des trompes utérines. La durée du cycle menstruel varie habituellement entre 24 et 35 jours et elle comprend 4 phases : la phase régénérative/proliférative, l'ovulation, la phase sécrétoire et la phase menstruelle (Figure 1.2).

1.1.3 Le cycle menstruel

Par convention, la durée du cycle est établie à 28 jours et commence par la phase menstruelle, qui s'étend des jours J1 à J4. Ensuite la phase régénérative/proliférative s'étend des jours J5 à J14 et l'ovulation a lieu au 14^e jour. La phase sécrétoire, quant à elle, prend place des jours J15 à J28.

Pendant la phase proliférative, de l'œstrogène est libérée dans le sang par les follicules ovariens et stimule la prolifération et la croissance des cellules de l'épithélium endométrial, qui s'épaissit pendant que des glandes s'y forment. L'augmentation de la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) par la glande hypophysaire conduit à l'ovulation, qui correspond à la libération d'un ovule mature dans l'utérus par l'ovaire. L'ovaire qui a mûri pour libérer un ovule se transforme en corps jaune, ou « corpus luteum ». Pendant la phase sécrétoire, de l'œstrogène et de la progestérone produite par le corps jaune favorisent la croissance et l'enroulement des glandes utérines, la vascularisation de la couche superficielle et l'épaississement de l'endomètre. La phase menstruelle correspond à l'affaissement de l'épithélium endométrial sécrétoire et sa mort cellulaire par apoptose à cause de l'abolition du soutien stéroïdien^{1, 2} (Figure 1.2).

1.1.4 Les hormones stéroïdiennes

Les œstrogènes sont un groupe d'hormones stéroïdiennes impliquées dans les fonctions sexuelles féminines, dont le cycle menstruel. Les œstrogènes sont produits par les follicules en développement des ovaires, le corps jaune et le placenta. La sécrétion des œstrogènes par le follicule ovarien permet d'initier la phase proliférative du cycle menstruel en « » la prolifération massive des cellules endométriales. La sécrétion des œstrogènes par le corps jaune permet la croissance des glandes de l'endomètre. L'hormone lutéinisante (LH) stimule la production d'œstrogènes par les ovaires^{1, 3} (Figure 1.2). Les œstrogènes entrent dans la cellule par diffusion passive et se lient au récepteur des œstrogènes. Une fois lié à un œstrogène, le récepteur des œstrogènes

forme un homo-dimère qui se relocalise au noyau et pouvant lier l'ADN pour agir en tant que facteur de transcription.

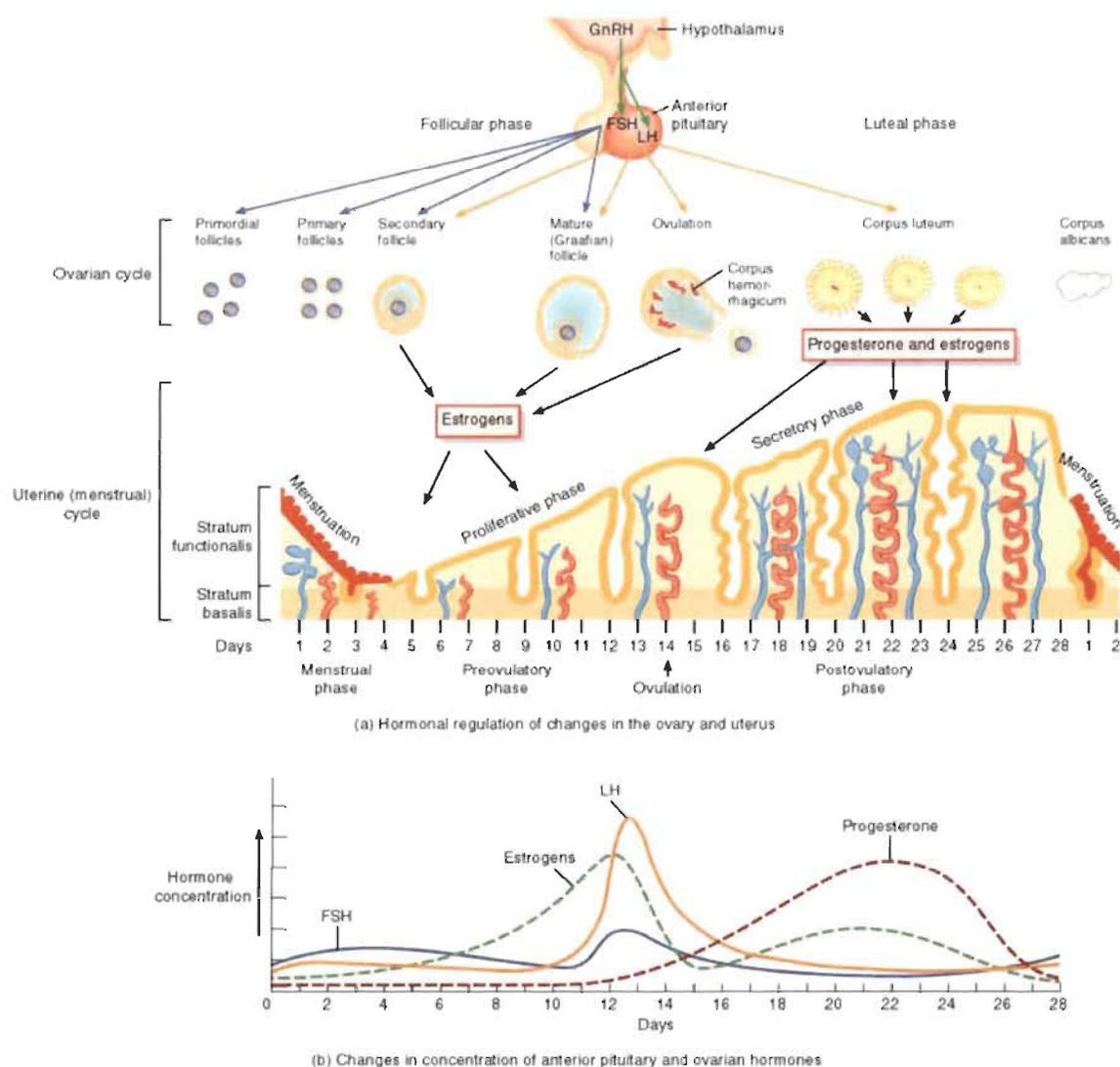


FIGURE 1.2

Le cycle reproducteur de la femme¹

Les complexes Œstrogène-Récepteur se lient à des séquences d'ADN spécifiques appelées « Estrogen Response Element » (ERE) pour potentiellement moduler l'activité transcriptionnelle d'une centaine de gènes. L'expression de ces gènes permet de stimuler

la croissance et la prolifération cellulaires. Puisque l'œstrogène entre dans toutes les cellules, son action dépend de la présence du récepteur dans des tissus spécifiques, telles que l'utérus, l'ovaire et le sein^{1,4}.

La progestérone est une hormone stéroïdienne impliquée dans le cycle menstruel féminin et la grossesse. Elle est sécrétée principalement par le corps jaune des ovaires à partir du 14^e jour du cycle menstruel (correspondant à l'ovulation) (Figure 1.2). Elle permet la croissance et l'enroulement des glandes utérines, la vascularisation de la couche superficielle et l'épaississement de l'endomètre. Également, la progestérone permet de bloquer un excès de prolifération causé par les œstrogènes en les inactivant. La progestérone entre dans la cellule par diffusion passive et se lie au récepteur de la progestérone¹.

1.2 LE CANCER ENDOMÉTRIAL

Le cancer le plus fréquent au niveau du corps de l'utérus est l'adénocarcinome, qui englobe 95% des cancers totaux de l'utérus et se développe à partir de la couche cellulaire interne de l'utérus, l'endomètre. Les autres formes de cancers de l'utérus sont des sarcomes développés au niveau du stroma endométrial ou du muscle lisse de l'utérus et comprennent 5% des cas totaux⁵⁻⁷. L'endomètre est très dynamique et subit de multiples transformations tout le long du cycle menstruel. La prolifération et la croissance des cellules endométriales pendant le cycle menstruel est un processus finement régulé par l'organisme. Cependant, comme dans tous les tissus possédant un index prolifératif élevé, une stimulation excessive des cellules endométriales avec des signaux de prolifération peut causer des mutations dans l'Acide désoxyribonucléique (ADN), pouvant mener à la transformation tumorale.

1.2.1 Statistiques

Selon la société canadienne du cancer, on estime qu'en 2010, il y aura 4 500 nouveaux cas de cancer de l'utérus au Canada, et 790 décès. La probabilité pour une femme d'être un jour atteinte d'un cancer de l'utérus au Canada est de 1 sur 42 alors que la probabilité d'en mourir est de 1 sur 175. Aux États-Unis, on estime qu'en 2009, il y a eu 42 160 nouveaux cas de cancer de l'utérus, et 7780 décès, ce qui en fait le 4^e cancer en importance parmi tous les cancers et le 1^{er} parmi les cancers gynécologiques⁸ (Société Canadienne du Cancer).

1.2.2 Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risques pouvant favoriser le développement du cancer endométrial ont été énoncés dans la littérature. La plupart de ces facteurs possèdent un dénominateur commun : ils apportent une contribution excessive d'œstrogènes. Les œstrogènes présents en quantité trop importante stimulent la prolifération des cellules endométriales de façon anormale. Il y a deux types de facteurs de risque : les facteurs endogènes, caractérisés par un excès d'œstrogènes interne et les facteurs exogènes, caractérisés par un excès d'œstrogènes provenant d'une source extérieure au corps. L'obésité et le diabète sont deux facteurs de risque endogènes. Chez la personne obèse, les adipocytes vont sécréter des quantités excessives d'œstrogènes. Une étude récente chez le rat suggère que le diabète est associé à une augmentation de l'expression du récepteur des œstrogènes⁹. Les facteurs exogènes comprennent l'hormonothérapie aux œstrogènes (administrée aux femmes pour la réduction des symptômes post-ménopause), le tamoxifène (anti-œstrogène utilisé contre le cancer du sein, mais possédant un effet pro-œstrogénique au niveau du tissu utérin), l'alcool et les agents antidépresseurs¹⁰⁻¹³.

Également, la durée d'exposition de l'utérus au cycle menstruel pendant la vie d'une femme influence les risques de développement d'un cancer endométrial. En effet, la nulliparité, l'apparition précoce des menstruations et l'apparition tardive de la ménopause sont des facteurs de risque importants¹⁴. De ce fait, entre 75% et 80% des femmes diagnostiquées avec un cancer de l'endomètre sont post-ménopausées, et l'âge moyen au moment du diagnostic est de 60 ans¹⁵. Inversement, une bonne alimentation, de l'activité physique et la production de mélatonine, qui stimule la production de progestérone menant à l'inhibition des effets œstrogéniques, semble réduire le risque de développement du cancer de l'endomètre¹¹.

Lorsque des lésions précancéreuses sont détectées, il est possible de prévenir l'apparition d'un cancer de l'endomètre en administrant de la progestérone, qui agit en bloquant l'effet prolifératif des œstrogènes¹⁶. De plus, l'hormonothérapie à base d'œstrogènes pour les femmes post-ménopausées possédant un utérus intact devrait être additionnée de progestérones, qui réduisent le risque d'hyperplasie causé par l'effet prolifératif des œstrogènes sur les cellules endométriales¹².

1.2.3 Types

Les carcinomes endométriaux peuvent être classés en deux types relativement distincts d'un point de vue pathogénique, moléculaire et pronostique. Le premier type (Type I) survient chez les femmes aux prises avec de l'obésité, de l'hyperlipidémie et des signes d'hyper-œstrogénie et d'exposition prolongée aux œstrogènes. Ces caractéristiques conduisent au développement de tumeurs hautement et moyennement différenciées, montrant une invasion superficielle du myomètre, une grande sensibilité aux progestatifs, et le pronostic favorable (85% de taux de survie à 5 ans). Ces cancers surviennent le plus souvent chez les femmes pré-ménopausées. Le second type (Type II) survient chez les femmes ne présentant aucun des signes du type I et le mécanisme exact est moins bien connu. Ce type de cancer survient surtout chez les femmes post-ménopausées et plus âgées. Il est caractérisé par des tumeurs mal différenciées, une

grande tendance à l'invasion de la tumeur dans le myomètre, une fréquence élevée de dissémination métastatique dans les ganglions pelviens, la diminution de la sensibilité aux progestatifs, et un mauvais pronostic (58% de taux de survie après 5 ans)⁷.

1.2.4 Traitements

Lorsqu'un cancer de l'endomètre est détecté, il y a plusieurs traitements disponibles. Parmi ceux-ci, il y a la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. La chirurgie est le traitement de première ligne le plus efficace lorsque la tumeur est localisée à l'utérus. Le chirurgien procède à l'ablation totale de l'utérus (hystérectomie). Lorsque la tumeur est de stade plus avancé, la chirurgie est pratiquée avec un traitement adjuvant, comprenant : (a) la radiothérapie, (b) l'hormonothérapie, et (c) la chimiothérapie (revue dans¹⁷⁻²⁰, (Société Canadienne du Cancer).

La radiothérapie est un traitement localisé utilisant des radiations ionisantes ciblées sur la tumeur. Elle provoque des bris de type double-brins dans l'ADN, ce qui mène à l'activation du point de contrôle mitotique bloquant le cycle cellulaire et à l'activation de la réparation par recombinaison homologue. Si le dommage est trop grand, l'apoptose est induite chez les cellules ciblées. Toutefois, une des principales limitations de l'utilisation de la radiothérapie est l'environnement faible en oxygène des cellules cancéreuses, qui les rendent plus résistantes à cette thérapie. Ce n'est pas clair comment l'hypoxie entraîne la résistance des cellules cancéreuses à la radiothérapie (revue dans²¹).

Dans les cas de cancer de l'utérus au stade avancé ou récidivant ayant déjà été opérés et traités avec de la radiothérapie, l'hormonothérapie ou la chimiothérapie est administrée¹⁷. L'hormonothérapie consiste en l'administration de composés pouvant bloquer l'effet œstrogénique au niveau des cellules cancéreuses et est efficace dans les tumeurs de grade non-élevés possédant les récepteurs de progestérone et d'œstrogène. La progestérone, qui induit un arrêt de la division des cellules endométriales durant le

cycle menstruel, a été la première hormone utilisée dans le traitement du cancer endométrial. Cependant, l'efficacité de ce traitement dépend de la présence du récepteur de la progestérone (revue dans ²²). Un inhibiteur sélectif des récepteurs aux œstrogènes a été mis au point récemment, l'Arzoxifene, et montre une activité importante contre le cancer de l'endomètre ²³. Cependant, son action reste limitée aux tumeurs endométriales dépendantes des œstrogènes (type I).

La chimiothérapie est une thérapie systémique qui consiste en l'administration de composés chimiques qui ciblent les cellules à division rapide, dont font partie les cellules cancéreuses. Elle est utilisée dans les cas de cancer de l'utérus au stade avancé ou récidivant. Le cisplatine, la doxorubicine et le paclitaxel sont les agents de chimiothérapie utilisés dans le traitement des cancers endométriaux. Ils sont souvent utilisés en combinaison cisplatine-doxorubicine ou cisplatine-doxorubicine-paclitaxel pour une efficacité accrue^{24, 25}. La doxorubicine est un antibiotique de type anthracycline. C'est un agent intercalant capable d'inhiber la topo-isomérase de type II, qui déroule normalement l'ADN, ce qui inhibe la transcription et la réplication de l'ADN²⁶. Le paclitaxel cible les microtubules en hyperpolarisant leur structure. Ceci a pour effet de nuire à la flexibilité naturelle du cytosquelette et d'empêcher la division cellulaire²⁷. Parmi ces agents, le cisplatine est le plus efficace et a été le plus fréquemment utilisé dans plusieurs types de cancer autres que le cancer de l'endomètre, dont l'ovaire et les testicules. Le cisplatine est constitué d'une molécule de platine entouré de 2 groupements azotés et de deux groupements chlorés. Il entre dans la cellule par diffusion passive grâce à ses groupements chlorés attirés par la faible concentration intracellulaire d'ions de chlore. Une fois à l'intérieur de la cellule, ses deux groupements chlorés sont remplacés successivement par des groupements aqueux. Ceux-ci possèdent une réactivité pour l'ADN et permettent au cisplatine de lier principalement les bases adénines ou guanines de façon covalente. Ces adduits causent une distorsion de l'ADN, menant à l'inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN ainsi qu'à l'activation de protéines de stress répondant aux dommages à l'ADN (Figure 1.3). Le

résultat final est généralement l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort par apoptose (revue dans^{28, 29}).

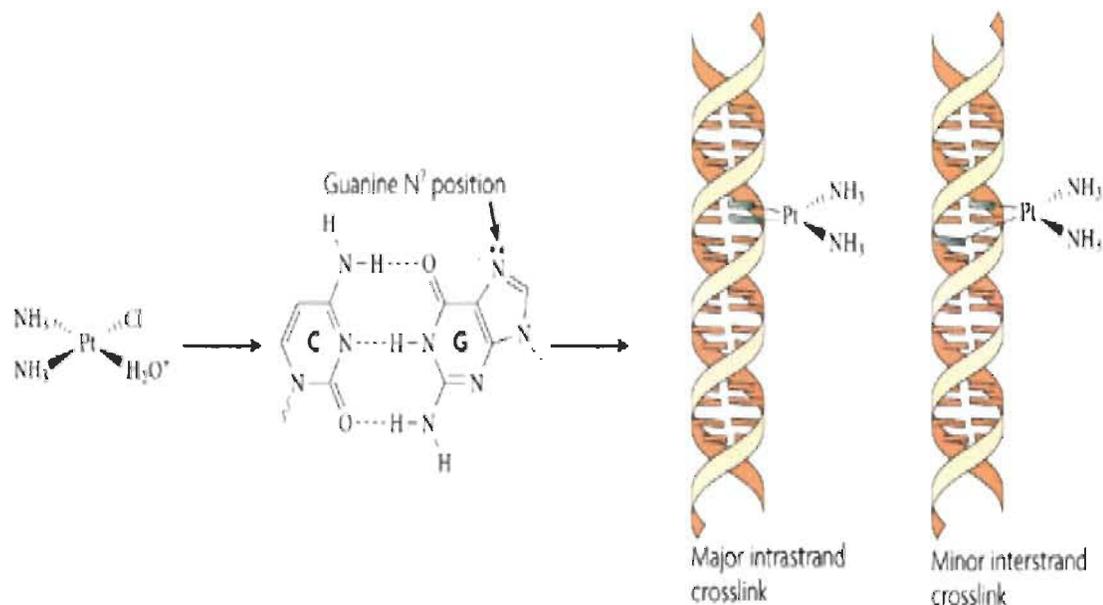


FIGURE 1.3

Mécanisme d'action du cisplatine sur l'ADN²⁸

1.2.5 La résistance au cisplatine

Le taux de résistance des cancers gynécologiques au cisplatine est très élevé. En effet, selon la « Gynecologic Cancer Foundation » (GCF), 25% des femmes traitées avec le cisplatine verront leur cancer régresser, comparativement à 26% pour la doxorubicine et 37% pour le paclitaxel (The Gynecologic Cancer Foundation). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette résistance. Des auteurs suggèrent que les mécanismes suivants sont impliqués dans la résistance au cisplatine : (a) inactivation de la molécule par les thiols et expulsion, (b) augmentation de la réparation de l'ADN par excision nucléotidique, (c) contournement des adduits ADN-cisplatine par la polymérase, (d) diminution de la réparation par mésappariements, ainsi que (e) des défauts dans les mécanismes apoptotiques^{28, 30}. L'inhibition de l'apoptose est un

mécanisme essentiel dans la chimiorésistance car non seulement il est la dernière ligne de défense avant la mort cellulaire mais il est aussi un mécanisme de résistance commun à plusieurs autres agents de chimiothérapie.

1.3 L'APOPTOSE

L'apoptose, aussi appelée « mort cellulaire programmée », est une forme de mort cellulaire et correspond à une séquence d'événements intracellulaires menant à la mort de la cellule de façon ordonnée, contrôlée et réversible. C'est un mécanisme nécessaire dans plusieurs conditions physiologiques et pour l'homéostasie de plusieurs types tissulaires chez les organismes pluricellulaires. C'est également ce type de mort qui est activé par le cisplatine dans les cellules endométriales cancéreuses.

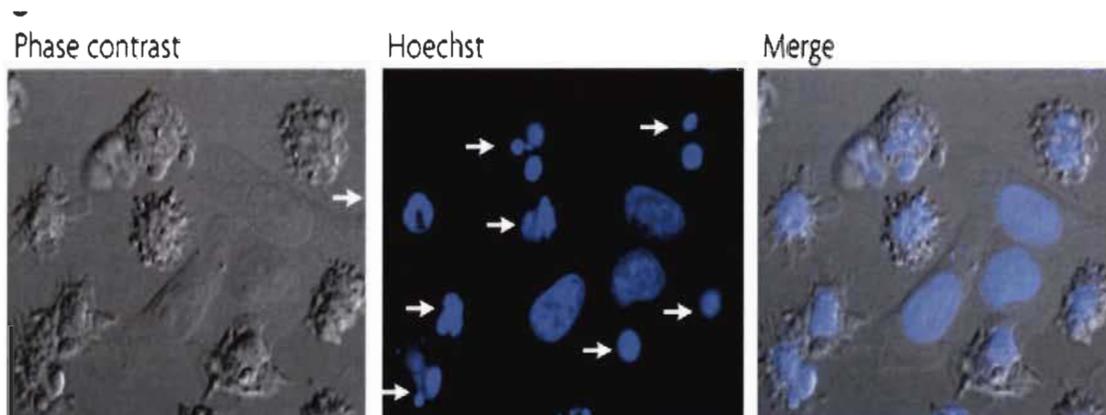


FIGURE 1.4

Morphologie des cellules apoptotiques³¹.

Les cellules ont été induits à entrer en apoptose suivie d'une coloration des noyaux (bleu) avec le colorant Hoechst. A titre de comparaison, un mélange de cellules viables et apoptotique est représenté. Les cellules apoptotiques (flèches) montrent une disruption

de la membrane plasmique et contiennent des noyaux qui sont condensés et / ou fragmentée en plusieurs morceaux.

1.3.1 Activation

Le processus apoptotique est déclenché par une grande variété de signaux, pouvant être d'origine extracellulaire ou intracellulaire, tels que des toxines, des hormones, des cytokines, de la chaleur, des radiations, un manque de nutriments, une infection virale, une hypoxie et divers agents de chimiothérapie³²⁻³⁴. L'activation de l'apoptose est divisée en deux voies cellulaires convergentes : la voie extracellulaire, caractérisée par l'activation de récepteurs à la surface de la cellule et la voie intracellulaire, caractérisée par la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome c (Figure 1.5).

Suite à l'activation du processus apoptotique, plusieurs changements morphologiques caractéristiques se produisent au niveau de la cellule. Ceux-ci comprennent le retrait cytoplasmique, le bourgeonnement de la membrane, la fragmentation nucléaire, la fragmentation de l'ADN intranucléosomal, l'exposition de la phosphatidylsérine et la fragmentation de la membrane en corps apoptotiques. Ceux-ci sont ensuite éliminés par phagocytose par des macrophages^{31,35} (Figure 1.4).

1.3.2 Apoptose Caspase-dépendante

L'exécution de l'apoptose, qu'elle soit activée par l'une ou l'autre des voies, est gouvernée par une famille de protéases, les caspases, présentes dans la cellule sous forme inactive et devant être clivées pour être activées. Une fois activées, elles déclenchent une cascade signalétique dépendante de leur activité protéase.

Au niveau de la voie extrinsèque, les caspases initiatrices 8 et 10 sont activées suite à une liaison d'un ligand au niveau des récepteurs de surface de la cellule. Elles activent

ensuite les caspases exécutoires 3 et 7. Le Granzyme B est une molécule libérée par les lymphocytes T qui pénètre dans la cellule par un pore membranaire composé de perforines et qui active la caspase-3 une fois à l'intérieur de la cellule. Il existe aussi un mécanisme de relai entre les deux voies. En effet, les caspases 8 et 10 ainsi que le Granzyme B sont également capables de cliver la protéine Bid, ce qui induit le relargage de cytochrome c^{31,36} (Figure 1.5).

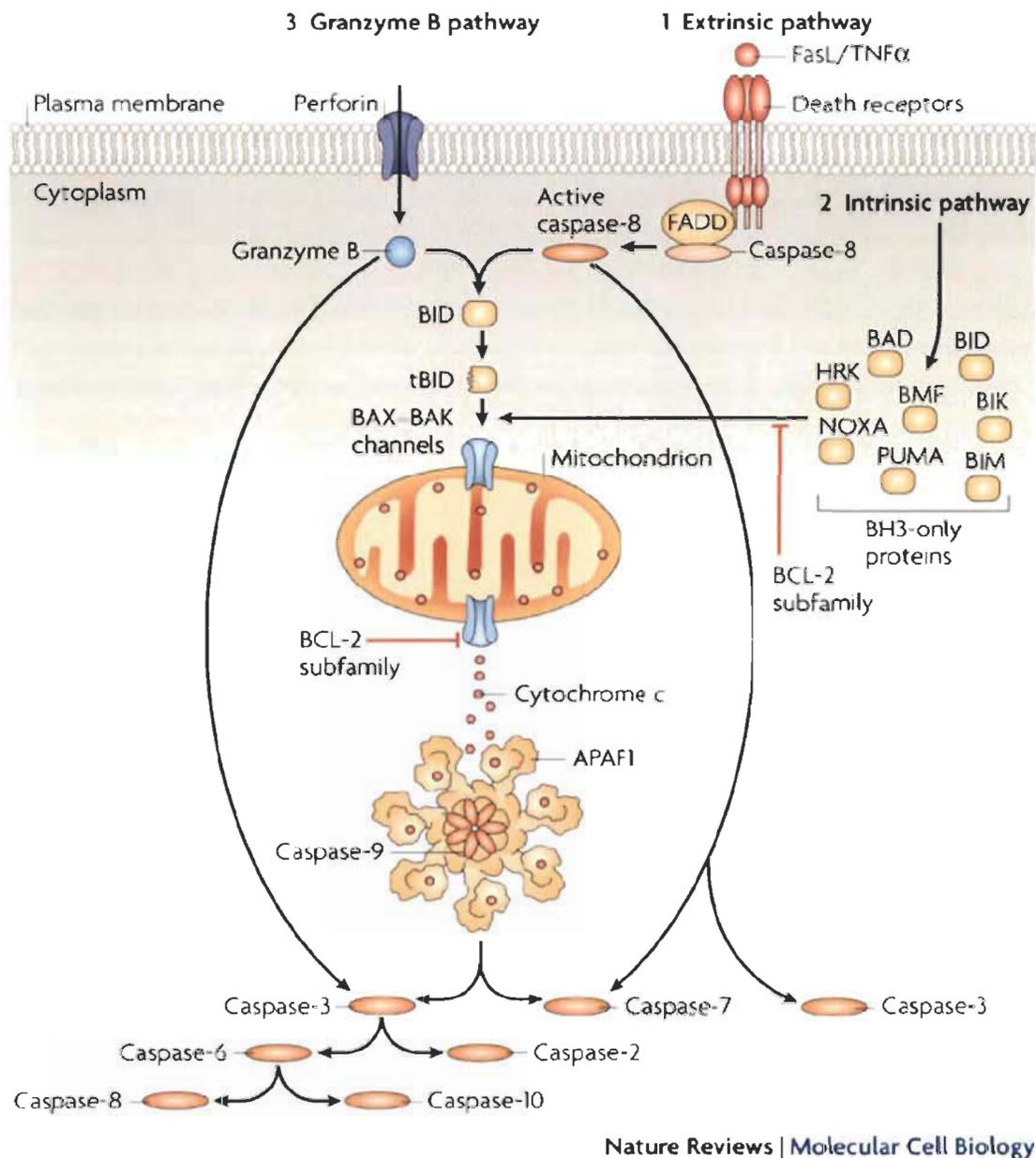


FIGURE 1.5

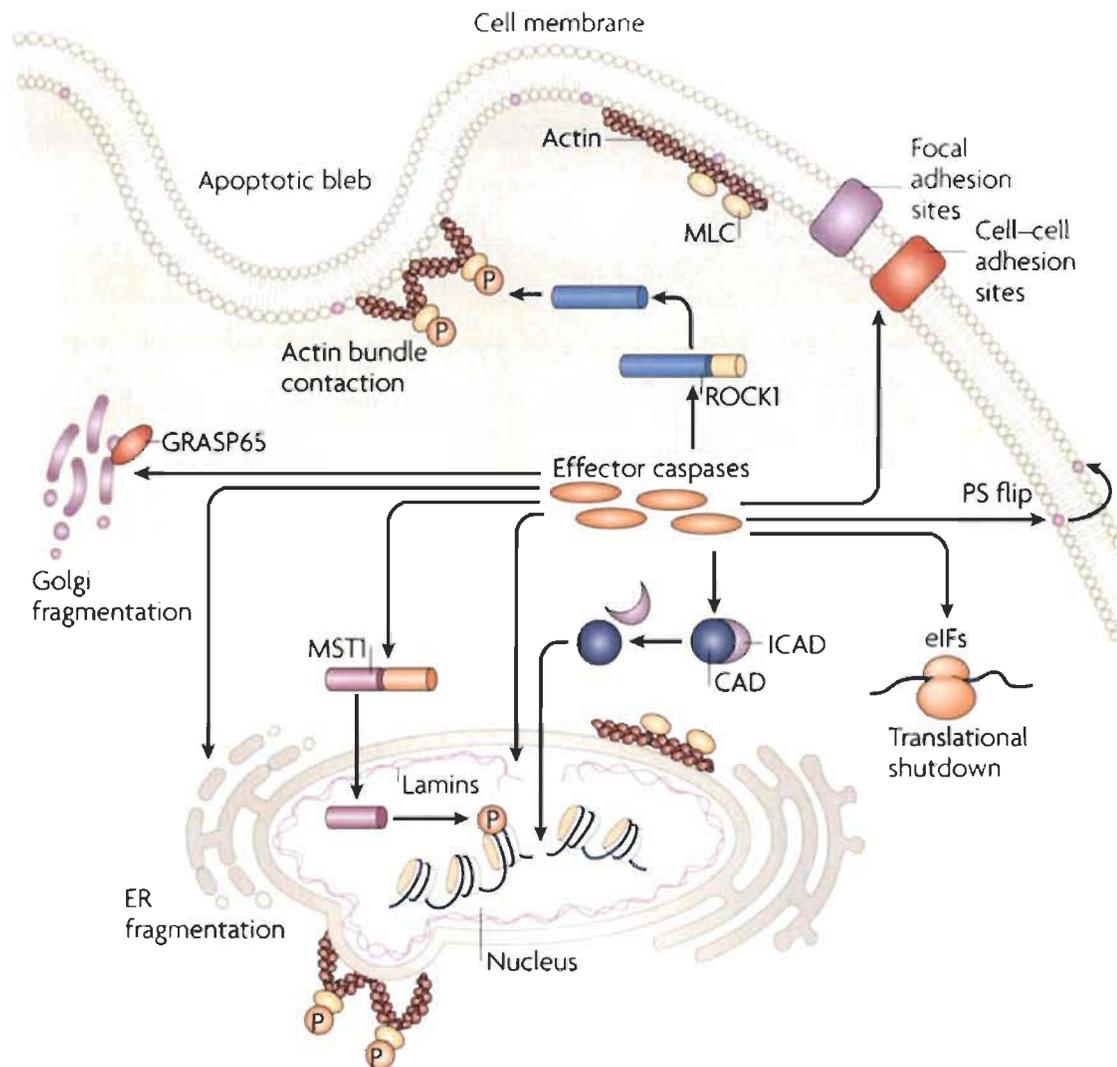
Voies d'activation des caspases³¹

Plusieurs signaux activateurs intracellulaires de l'apoptose mènent à la formation de pores dans la mitochondrie, ce qui entraîne une perte du potentiel mitochondrial. Ce phénomène caractérise la voie intrinsèque de l'apoptose. La perte du potentiel mitochondrial entraîne le relargage de plusieurs molécules de la mitochondrie vers le cytosol, dont le cytochrome c, qui mène à la formation du complexe de l'apoptosome et qui active la caspase initiateur 9. Celle-ci peut ensuite activer les caspases exécutrices 3, 6 et 7³¹ (Figure 1.5).

Peu importe la route empruntée, tous les voies d'activation de l'apoptose mènent à l'activation des caspases 3, 6 et 7. Les caspases exécutrices 3, 6 et 7 activent le processus apoptotique en clivant plusieurs substrats (dont l'effet peut être activateur ou inhibiteur) et les cibles des caspases peuvent être divisées en 5 catégories : (1) des protéines directement impliquées dans la régulation de l'apoptose qui sont inactivées, ou plusieurs endonucléases qui sont activées (dégradation de l'ADN), (2) des protéines kinases régulant la transduction de signaux apoptotiques (3) des protéines de structure et à fonctions essentielles, dont les composantes du cytosquelette et de l'enveloppe nucléaire, (4) des protéines impliquées dans la réparation cellulaire et (5) des protéines régulant le cycle cellulaire^{31, 37-39} (Figure 1.6).

Il existe plusieurs inhibiteurs de l'activation des caspases qui sont regroupés dans la famille des « Inhibitor of Apoptosis Proteins » (IAPs), qui inhibe l'apoptose en inactivant principalement les caspases 3, 7 et 9 activées. À ce jour, six membres de la famille IAP ont été identifiés chez l'homme: « Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein » (NAIP), « Cellular inhibitor of apoptosis protein 1 » (c-IAP1), « Cellular inhibitor of apoptosis protein 2 » (c-IAP2), « X-linked inhibitor of apoptosis protein » (XIAP), survivine, et « baculovirus inhibitor of apoptosis repeat [BIR] repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme » (BRUCE) (Figure 1.7). Il a été démontré que La surexpression de XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, ou de la survivine supprime l'apoptose

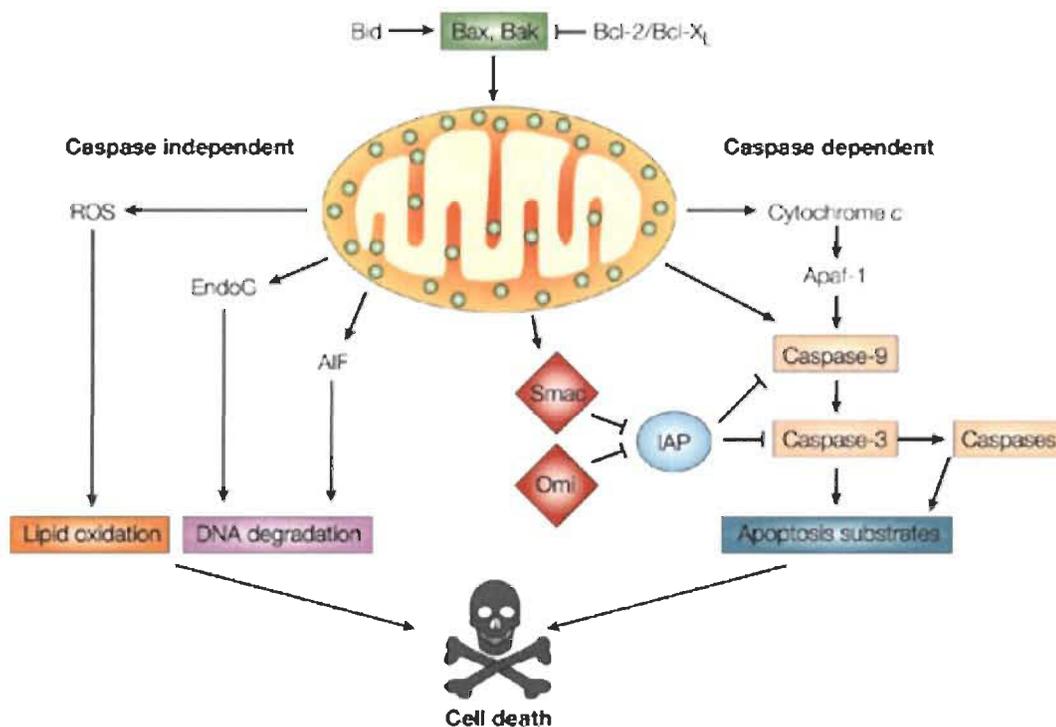
induite par une grande variété de stimuli dont le facteur de nécrose tumorale (TNF), Fas, la staurosporine, l'étoposide et le Taxol⁴⁰. XIAP est surexprimé dans une grande proportion de cancers endométriaux et est impliqué dans la résistance au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol dans ces cancers⁴¹.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

FIGURE 1.6

Les caspases coordonnent la destruction de structures cellulaires importantes³¹



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

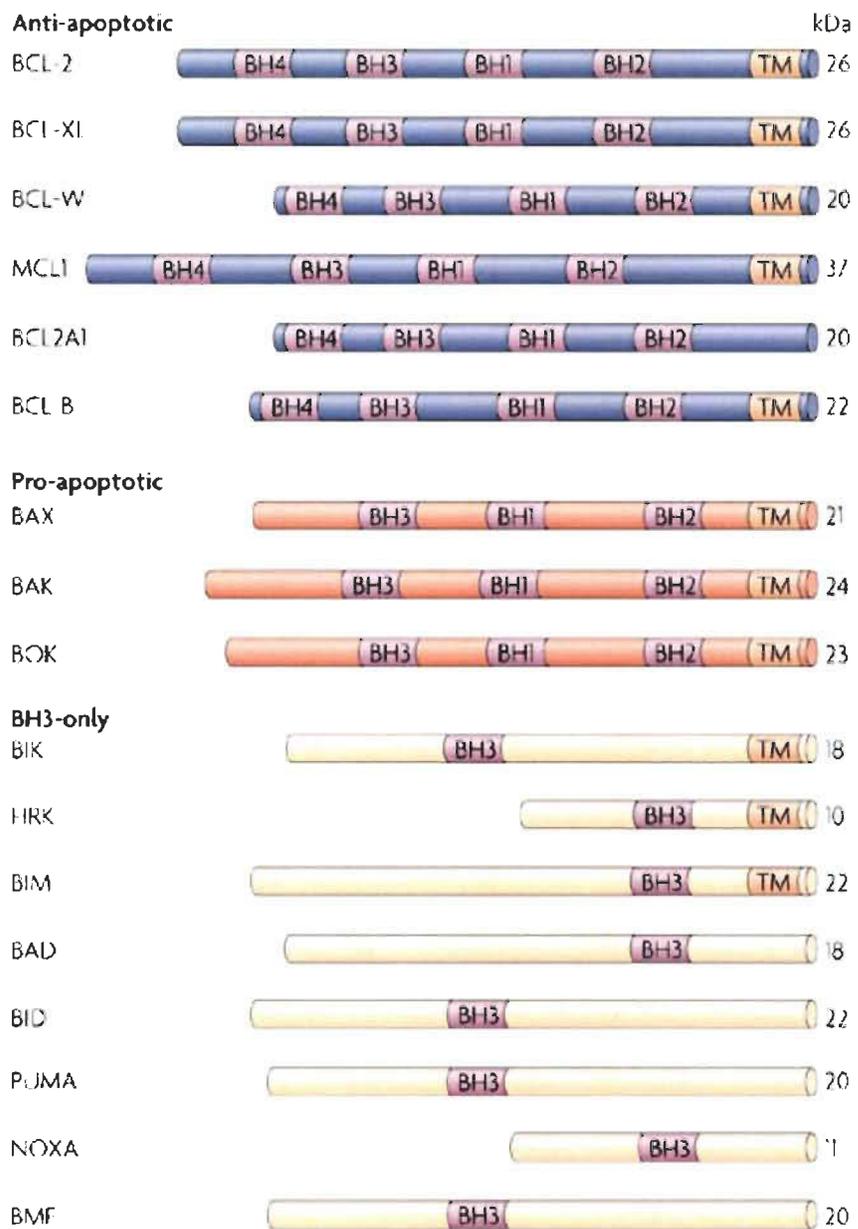
FIGURE 1.8

Voies d'apoptose dépendante et indépendante des caspases⁴⁴

1.4 FAMILLE Bcl-2

La famille de protéines « B-cell lymphoma 2 » (Bcl2) est une famille de protéines jouant un rôle important dans la survie cellulaire. Elle est principalement localisée au niveau de la mitochondrie et régule l'induction de l'apoptose mitochondriale en contrôlant la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie. Elle comprend des membres pro- et anti-apoptotiques qui possèdent plusieurs domaines d'homologie (BHs) entre eux. Ces domaines d'homologie sont impliqués dans les interactions entre

les membres de la famille Bcl-2 (Figure 1.9). L'expression de plusieurs des membres de la famille Bcl-2 est altérée dans les cancers humains.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

FIGURE 1.9

Bcl-2 family of proteins³¹

1.4.1 Membres pro-apoptotiques

« Bcl-2-associated X protein » (Bax) et « Bcl-2 antagonist killer 1 » (Bak), deux membres pro-apoptotiques, sont normalement présents dans la cellule sous forme de monomères inactifs. Suite à la transduction d'un signal pro-apoptotique, ils forment des homo-dimères qui peuvent s'insérer dans la membrane mitochondriale via leur domaine transmembranaire. Cette insertion entraîne une perméabilisation de la membrane mitochondriale favorisant le relargage de molécules, dont le cytochrome c, de la mitochondrie vers le cytosol (Figure 1.10)^{45, 46}.

Également, il existe une catégorie de membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (comprenant « Bcl-2 antagonist of cell death » (Bad), « BH3-interacting domain death agonist » (Bid), et « Bcl-2-like protein 11 » (Bim)) qui ne s'insèrent pas dans la membrane mitochondriale mais qui favorisent l'activation de Bax et Bak. Bid et Bim sont capables d'activer Bax et Bak directement, par interaction avec ceux-ci, ou indirectement, par séquestration des membres anti-apoptotiques (voir ici-bas). Bad peut seulement activer Bax et Bak indirectement (Figure 1.10) (revue dans ⁴⁷).

1.4.2 Membres anti-apoptotiques

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl2 (comprenant Bcl-2, « B-cell lymphoma-extra large » (Bcl-xL) et « Myeloid cell leukemia sequence 1 » (Mcl-1)) interfèrent avec l'engagement de la machinerie apoptotique mitochondriale en inhibant la formation des homo-dimères de Bax et Bak. Bcl-2 fut le premier membre de la famille Bcl-2 à être découvert à cause de la translocation fréquente du chromosome 18 observé chez les lymphomes B ⁴⁸. Les deux autres membres, Bcl-xL et Mcl-1, possédant une forte homologie avec Bcl-2, furent découvert peu de temps après^{49, 50}. Plus spécifiquement, Bcl2, Bcl-xL et Mcl-1 peuvent former des complexes d'hétéro-dimères

avec Bax et Bak, ce qui a pour effet de bloquer la formation d'homo-dimères actifs Bax-Bax et Bak-Bak^{51, 52}. Bcl-2 et Bcl-xL peuvent aussi séquestrer et inactiver d'autres molécules pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bad et Bid). Ces molécules peuvent activer directement Bax et Bak lorsqu'elles ne sont pas séquestrées par Bcl-2 et Bcl-xL (Figure 1.10)⁵³.

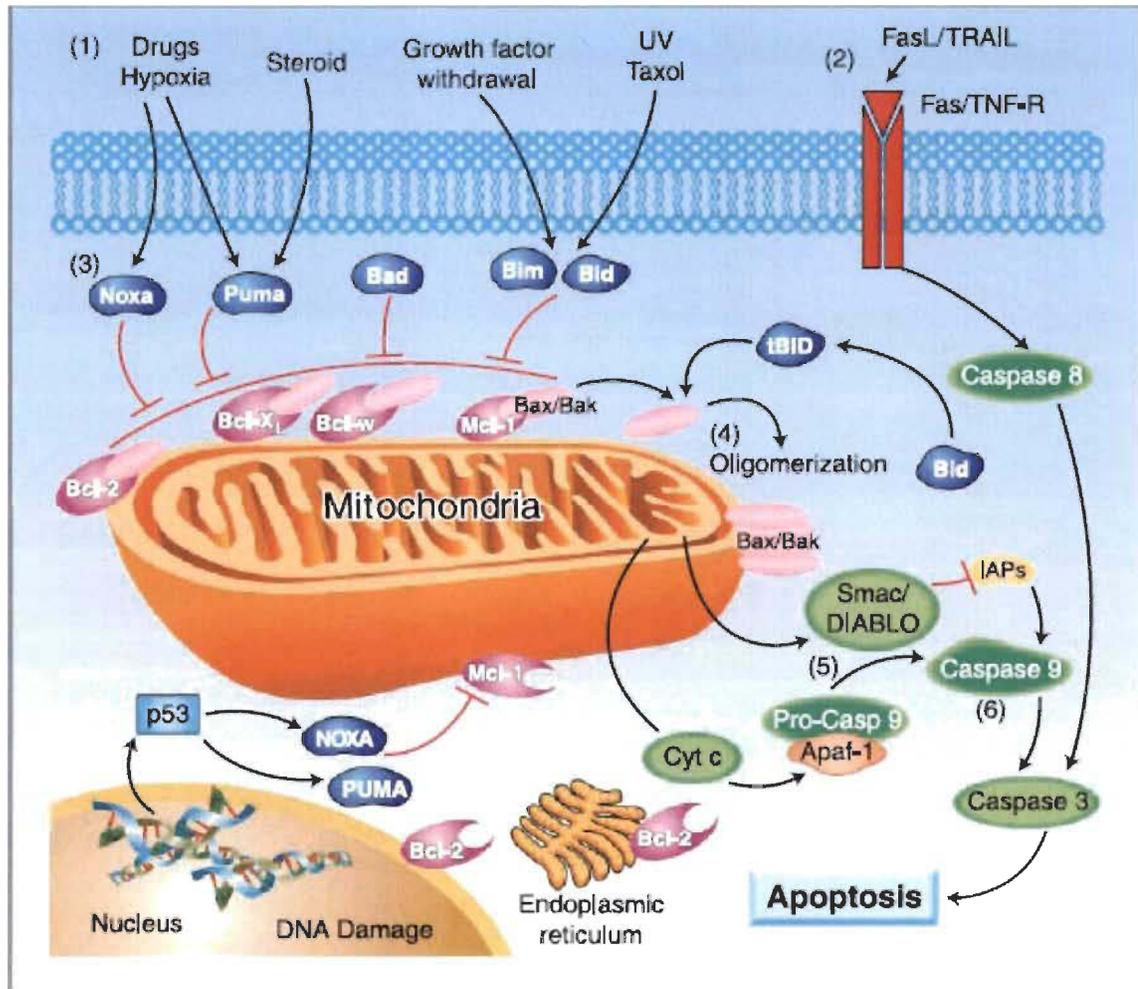


FIGURE 1.10

La voie de l'apoptose et les protéines de la famille Bcl-2⁵⁴.

1.4.3 Résistance à la chimiothérapie

Ce qui rend les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 si intéressantes comme cibles potentielles anticancéreuses, c'est leur capacité à inhiber la mort cellulaire induite par une grande variété d'agents de chimiothérapie. Indépendamment du mode d'action (que ce soit par bris simples- ou doubles-brins dans l'ADN, par altération de la dynamique des microtubules ou par activation de récepteurs hormonaux nucléaires), l'efficacité de pratiquement tous les agents de chimiothérapie semblent être influencée par des mécanismes impliquant la famille Bcl-2^{55, 56}. En effet, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 semblent réguler la sensibilité de plusieurs types de cancers, dont les lymphomes⁵⁷ et la prostate⁵⁸, à plusieurs types de chimiothérapie. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 semblent aussi réguler la sensibilité au cisplatine. En effet, la surexpression de Bcl-2 au niveau du cancer ovarien diminue l'apoptose induite par le cisplatine⁵⁹ et la diminution de Bcl-xL et Mcl-1 augmente l'apoptose induite par le cisplatine⁶⁰. Au niveau du cancer du sein, la diminution et l'inhibition de Bcl-2 semble potentialiser l'apoptose induite par le cisplatine, bien que la surexpression de Bcl-2 ne module pas la sensibilité au cisplatine^{61, 62}.

1.4.4 Expression dans l'endomètre

Plusieurs études d'immunohistochimie ont bien établi le rôle de Bcl-2 dans la pathogénèse du cancer de l'endomètre. Dans l'endomètre normal non-pathologique, Bcl-2 est fortement exprimée de façon diffuse pendant la phase proliférative du cycle menstruel, tandis que son expression est diminuée de façon drastique pendant les phases sécrétoires précoce et médiane du cycle menstruel. L'expression réapparaît dans la phase sécrétoire tardive du cycle menstruel⁶³. Les niveaux de Bcl-2 sont augmentés dans les cas d'hyperplasie de l'endomètre en comparaison avec le tissu sain, suggérant un rôle dans l'initiation du cancer. Par contre, l'expression de Bcl-2 est diminuée au niveau du carcinome endométrial en comparaison avec l'hyperplasie endométriale⁶³⁻⁶⁷. Ceci

pourrait suggérer que Bcl-2 n'est pas requis pour l'évolution vers les stades plus avancés du cancer de l'endomètre. Cependant, l'expression de Bcl-2 semble corrélée avec un faible taux de cellules apoptotiques selon certaines études⁶⁸. En effet, il y a très peu de cellules apoptotiques au niveau de l'hyperplasie endométriale tandis que ce nombre augmente de façon importante au niveau de l'adénocarcinome, suggérant que Bcl-2 confère aux cellules néoplasiques une survie prolongée lorsqu'il est exprimé.

Une étude suggère que la surexpression de Bcl-2 exerce une fonction d'inhibition du cycle cellulaire chez les cellules cancéreuses de l'endomètre de stade avancé, en plus de sa fonction d'inhibition de l'apoptose induite par le cisplatine⁶⁹. Aussi, une étude a démontré que Bcl-2 pouvait bloquer la potentialisation, par le sodium butyrate, de l'apoptose induite par des radiations⁷⁰. Pourtant, il n'y a aucune étude qui étudie le rôle de l'inhibition ou de la diminution d'expression de Bcl-2 dans la résistance à l'apoptose au niveau du cancer de l'endomètre. Pour ce qui est de Bcl-xL, il montre un degré d'expression similaire à Bcl-2 pendant les phases proliférative et sécrétoire. Son expression est augmentée dans les cas d'hyperplasie et d'adénocarcinomes en comparaison avec l'endomètre normal⁶³. De plus, une étude suggère que l'expression de Bcl-xL, et non celle de Bcl-2, corrèle avec la résistance à l'apoptose chez des lignées cancéreuses de l'endomètre⁷¹. Il n'existe toutefois aucune information à propos de Mcl-1 au niveau du cancer de l'endomètre. De façon globale, le rôle précis des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 au niveau de la résistance à l'apoptose induite par le cisplatine chez les cellules cancéreuses de l'endomètre a besoin d'être clarifié.

La régulation de l'expression de Bcl-2 peut dépendre de plusieurs signaux, selon le type de cellule et le contexte. Plusieurs études ont suggéré que les voies d'Akt, de PKC et des « Mitogen-activated protein kinase » (MAPK) peuvent réguler l'expression de Bcl-2⁷²⁻⁷⁷. Également, il a été démontré que le cisplatine peut moduler les niveaux de Bcl-2 à la baisse par l'activation de la caspase-3⁷⁸.

1.5 LES PROTÉINES KINASES C

Les protéines kinases C (PKCs) sont une famille de kinases pouvant réguler une multitude de protéines et sont impliquées dans une grande variété de processus cellulaires. Une douzaine d'isoformes ont été identifiés à ce jour et ils ont été classés en quatre sous-familles différentes : (a) « Classique », comprenant les isoformes α , β I, β II et γ , (b) « Nouvelles », comprenant les isoformes η , ϵ , δ et θ , (c) « Atypique », comprenant les isoformes ι et ζ , et (d) « PRKs », comprenant les isoformes PRK1 et PRK2 (revue dans⁷⁹).

1.5.1 Régulation

La régulation de PKC est complexe. En conditions basales, PKC est dans une conformation inactive par liaison d'un pseudo-substrat avec le domaine catalytique. La liaison de cofacteurs au domaine de régulation, tels que le Ca^{2+} , le diacylglycérol (DAG) ou les esters de phorbol, induit un changement conformationnel de l'enzyme, exposant ainsi le site de liaison du substrat à l'activité catalytique. L'activation de PKC est généralement associée à la translocation membranaire et une exposition cellulaire prolongée aux activateurs de PKC peut provoquer sa dégradation. La phosphorylation de PKC promeut l'activation de celle-ci par les cofacteurs. Enfin, certains signaux peuvent activer PKC de façon constitutive en dissociant par protéolyse le domaine de régulation du domaine catalytique⁸⁰.

1.5.2 PKC et Cancer

Il a été démontré que les membres de la famille PKC régulent l'apoptose et la survie cellulaire. En effet, l'activation de PKC par des esters de phorbols comme le PMA (ou TPA) peut mener à la formation de tumeurs, suggérant que la majorité des isoformes de PKC promeuvent la survie cellulaire⁸¹. Des isoformes de PKC, dont PKC- ϵ et PKC- δ , sont des cibles pour le clivage par les caspases effectrices ce qui entraîne leur

activation^{82, 83}. Des études suggèrent que PKC- α , PKC- ϵ et les PKC atypiques (PKC- ι et PKC- ζ) sont impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires (revue dans⁸⁴). De plus, PKC- α est impliqué dans la résistance au cisplatine^{72, 85}. L'inhibition des familles « Classic » et « Novel » de PKC par la bryostatine est associée à une augmentation de l'apoptose induite par le cisplatine chez des cellules cancéreuses⁸⁶. Une étude récente suggère que la calphostine c (une molécule inhibant les isoformes θ et η en plus de PKC α , β , δ , ϵ , γ) induit l'apoptose de cellules tumorales par la dégradation de la structure du cytosquelette nucléaire des cellules⁸⁷. Cependant, ce ne sont pas tous les isoformes de PKC qui promeuvent la survie cellulaire. En effet, les isoformes PKC- δ et PKC- θ sont impliqués dans l'induction de l'apoptose^{83, 88}.

Plusieurs études ont démontré que PKC peut moduler l'expression endogène de Bcl-2. En effet, PKC α est capable de stabiliser Bcl-2, entraînant une résistance à l'apoptose induite par le cisplatine. Une autre étude suggère qu'un ester de phorbol peut augmenter directement l'expression de Bcl-2, via PKC. Enfin, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire peut également augmenter l'expression de Bcl-2 par un mécanisme dépendant de PKC^{72, 73, 86, 89-91}.

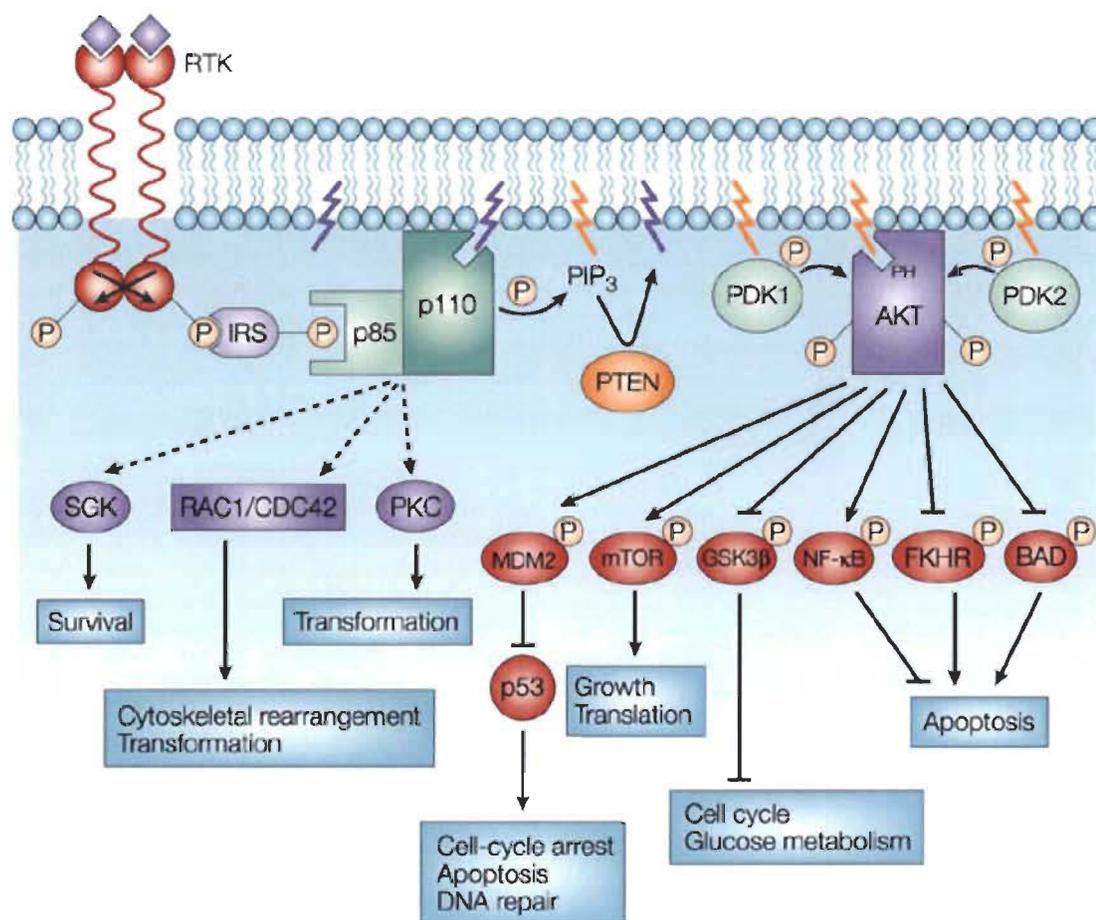
1.6 AKT

Akt (protéine kinase B) est une serine-thréonine kinase possédant une homologie avec les protéines kinases A et C et qui est impliquée dans une très grande variété de processus cellulaire, dont le métabolisme du glucose, le cycle cellulaire, l'apoptose, l'angiogénèse, la croissance cellulaire, la transcription et la migration cellulaire.

1.6.1 Régulation

Akt est une protéine kinase ayant besoin d'être phosphorylée pour être active. Une fois recrutée à la membrane cellulaire, Akt est phosphorylée par « Pyruvate

dehydrogenase kinase isozyme 1 » (PDK1), une kinase dépendante du phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate (PIP3) et par « mammalian target of rapamycin complex 2 » (mTORC2). La protéine PDK1 est activée par des facteurs de croissance, dont l'insuline, de façon dépendante de la PI3-Kinase⁹²⁻⁹⁴. mTORC est impliquée dans la détection des niveaux de nutriments et du statut énergétique de la cellule. Deux sites pouvant être phosphorylés sont présents sur Akt : un site dans la boucle d'activation, la thréonine 308, et l'autre site au niveau de la portion c-terminale, la sérine 473⁹⁵. Une fois activé, Akt peut agir sur plusieurs voies cellulaires en aval, dont la survie et le cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogénèse, l'invasion et le métabolisme du glucose (revue dans ^{96,97}).



Nature Reviews | Cancer

FIGURE 1.11

La voie de la phosphatidylinositol 3-kinase-AKT dans les cancers humains⁹⁸

Akt peut favoriser la survie cellulaire en phosphorylant BAD, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, la rendant ainsi incapable d'inhiber les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, ainsi qu'en phosphorylant les facteurs de transcription « Forkhead »⁹⁴. Akt peut aussi activer « Nuclear factor-kappa B » (NF-kB) en inactivant « Inhibitor kappa-B » (IkB), le régulateur négatif de NF-kB, menant à la transcription de gènes associés à la survie cellulaire. De plus, Akt peut augmenter l'affinité de la « Murine double minute 2 » (Mdm2) pour P53 par phosphorylation de Mdm2, ce qui augmente la dégradation de P53. La glycogène synthétase kinase 3 (GSK-3) peut être inhibée lorsque phosphorylé par Akt, qui se traduit par la promotion de la synthèse du glycogène (revue dans⁹⁷) (Figure 1.11).

L'activation d'Akt est régulée négativement par « Phosphatase and tensin homolog » (PTEN), une protéine phosphatase. PTEN convertit le PIP3 en PIP2, ce qui limite l'activation de PDK1 et donc d'Akt (Figure 1.11). L'importance biologique de PTEN pour la suppression tumorale est illustrée par le fait que son gène est muté dans environ 50% des cancers humains. Récemment, une étude du laboratoire du Dr. Asselin a montré que XIAP est impliqué dans l'activation de la voie Akt par l'ubiquitination et la dégradation de PTEN⁹⁹.

Trois isoformes d'Akt (Akt1, Akt2 et Akt3) ont été identifiés à ce jour chez l'homme^{93, 100}. Les trois isoformes possèdent 85 % d'homologie entre eux¹⁰¹. Cependant, leurs fonctions biologiques et physiologiques diffèrent beaucoup. Les souris déficientes pour Akt1 montrent une mortalité infantile élevée et une importante réduction de masse corporelle^{102, 103}. Les souris déficientes pour Akt2 montrent une croissance normale, avec cependant des symptômes diabétiques élevés¹⁰⁴. Enfin, les souris déficientes pour Akt3 montrent une réduction du poids du cerveau découlant d'une réduction du volume et du nombre de cellules¹⁰⁵.

1.6.2 Akt et cancer

La surexpression d'Akt2 a été démontrée au niveau des cancers de l'ovaire, du sein et du pancréas^{94, 101, 106, 107}. Une étude récente suggère qu'Akt3 contribue au phénotype agressif de cellules cancéreuses du sein^{94, 100}. Dans le cancer du sein, il a été montré que la surexpression d'Akt1 diminue l'invasion cellulaire¹⁰⁸, tandis que la surexpression d'Akt2, au contraire, augmente l'invasion cellulaire¹⁰⁹. Akt3, quant à lui, a un effet minime sur l'induction de ces tumeurs¹⁰⁹. Le laboratoire du Dr. Asselin a démontré que la diminution simultanée par siRNA d'Akt1 et d'Akt2 augmente l'apoptose induite par le cisplatine chez les cellules cancéreuses endométriales¹¹⁰. De plus, une étude a montré qu'Akt peut réguler l'expression de Bcl-2 positivement⁷⁴.

1.7 P53

Le suppresseur de tumeurs P53 est un facteur de transcription qui coordonne un réseau complexe de protéines cellulaires et qui protège les cellules de la transformation oncogénique (Figure 1.12) (revue dans¹¹¹).

1.7.1 Régulation

En réponse à divers facteurs de stress, P53 induit l'activation d'une panoplie de gènes menant à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose, à la réparation de l'ADN et à la sénescence^{112, 113}. Parmi les gènes dont la transcription est dépendante de P53, il y a Bax, qui favorise l'apoptose par la voie intrinsèque, p21, qui bloque l'entrée en phase mitotique du cycle cellulaire, Fas Récepteur, un récepteur de mort cellulaire et Mdm2, qui régule négativement P53¹¹⁴.

En conditions normales, la stabilité de la protéine P53 est régulée par Mdm2, une enzyme ayant une activité E3 ligase. Celle-ci ubiquitine P53, favorisant son exportation

du noyau pour limiter son activité de facteur de transcription et favorisant également sa dégradation par le protéasome¹¹⁵ (Figure 1.12). De plus, P53 active la transcription de l'ARNm de Mdm2, enclenchant ainsi une boucle de rétro-inhibition pour éviter une trop grande activation. Ceci étant dit, la demi-vie de P53 est généralement très courte et cette régulation négative par Mdm2 est cruciale pour empêcher P53 d'activer l'apoptose ou la sénescence de façon constante en en absence de stress¹¹⁶.

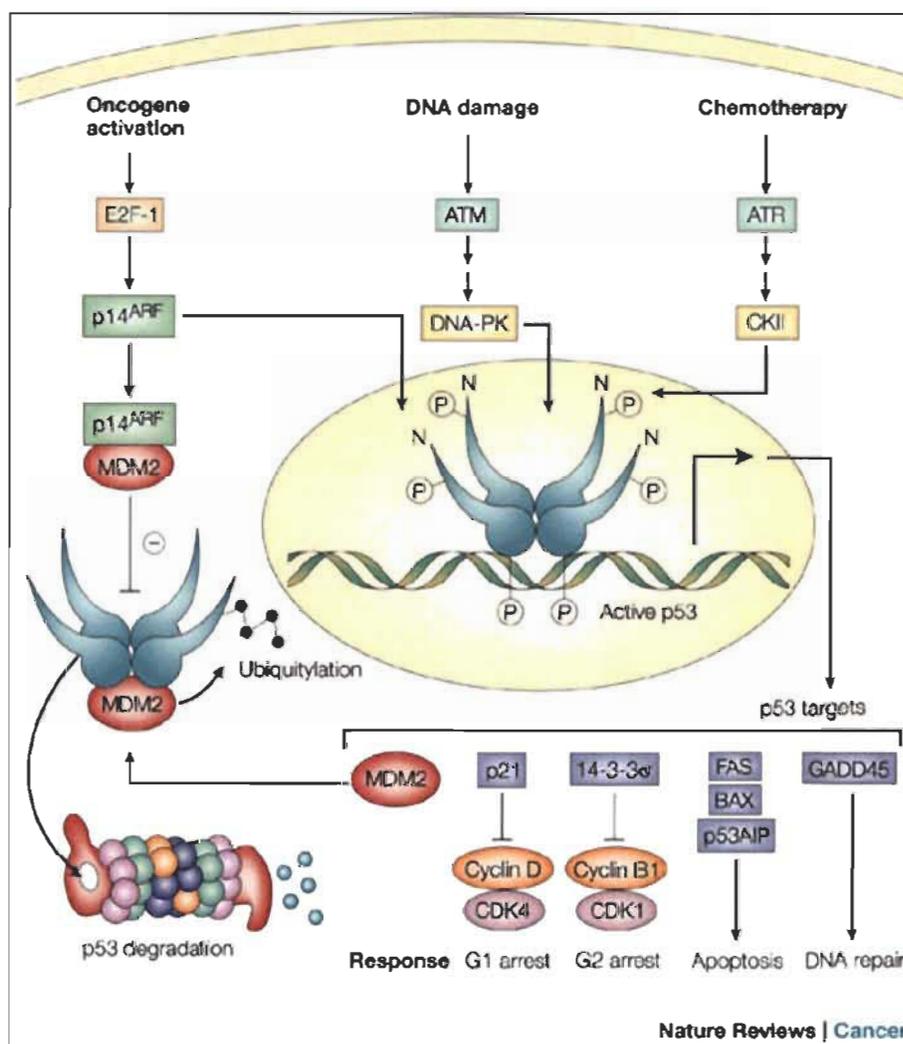


FIGURE 1.12

La voie P53 dans le cancer¹¹⁷

En réponse au stress, il est nécessaire de perturber l'interaction P53-Mdm2 pour permettre à P53 de se diriger vers le noyau et de s'associer aux facteurs nécessaires pour la transcription de ses gènes-cibles. Il existe une panoplie de modifications post-traductionnelles possibles et des régulateurs cellulaires peuvent modifier plusieurs sites sur P53 par phosphorylation, acétylation et sumoylation (revue dans ¹¹⁸). La phosphorylation de P53 est le phénomène qui a été le plus étudié parmi les modifications sur P53 et plusieurs études ont suggéré qu'elle joue un rôle crucial pour l'inhibition de l'interaction de P53 avec Mdm2 et la stabilisation de P53. Une grande variété de résidus sérines (6, 9, 15, 20, 33, 37, 46, 315, 371, 376, 378 et 392) et thréonines (18, 55, 81) peuvent être phosphorylés sur P53 (revue dans ¹¹⁹), par une grande variété de protéines kinases activées par plusieurs types de stress cellulaires, dont le dommage à l'ADN et la sur-activation oncogénique, peuvent phosphoryler P53 (Figure 1.12). Des études ont démontré que la phosphorylation sur certains résidus régulent l'attachement de p53 à Mdm2, tels les sérines 15, 20 et 37. (revue dans ¹²⁰). Cependant, il semble que la phosphorylation sur la plupart de ces sites ne soit pas nécessaire pour l'activité transcriptionnelle et l'apoptose induite par P53 ¹²¹.

1.7.2 P53 et cancer

P53 est muté dans environ 50% de tous les cancers, principalement dans le domaine qui se lie à l'ADN, ce qui en fait l'un des gènes les plus étudiés dans tous les cancers et il a été suggéré que l'inactivation de P53 est un événement essentiel dans la genèse du cancer ¹²². Les cancers possédant un gène fonctionnel pour P53 montrent souvent une expression très élevée de Mdm2, ce qui abroge l'activité de P53 ¹²³.

Récemment, un inhibiteur spécifique de l'interaction P53-Mdm2 a été développé, la Nutlin-3a, qui active la voie P53 dans les cellules cancéreuses, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose et à l'inhibition de croissance de tumeurs xénotransplantées chez la souris ¹²⁴. De plus, il a été suggéré que la phosphorylation de plusieurs sites sur

P53 n'était pas nécessaire à son activité car une protéine P53 stabilisée par la Nutlin-3a sans être phosphorylée peut activer la transcription de ses gènes-cibles¹²¹.

Si on le compare aux autres gènes qui sont mutés les plus fréquemment dans les cancers humains, P53 possède un ratio mutations par substitution / mutations par délétion beaucoup plus élevé que la normale^{122, 125}. En effet, dans les cellules cancéreuses, une protéine P53 mutée par substitution et possédant un acide aminé différent a une conformation différente, empêchant en principe sa liaison à l'ADN¹²⁶. Il y a quelques codons, qualifiés de « hot-spots », qui sont mutés à une fréquence plus élevée que les autres : les codons 175, 248, 273 et 282^{126, 127}. En général, une protéine P53 mutante est beaucoup plus stable qu'une protéine P53 sauvage, ce qui se traduit par une augmentation du temps de demi-vie¹²⁸. De plus, des études de surexpression d'un vecteur P53 mutant pour les codons « hot-spots » dans divers modèles de cancer P53-/- ont suggéré que P53 mutant pouvait interférer avec l'activité des membres pro-apoptotiques de sa famille, p63 et p73, et qu'elle pouvait promouvoir la résistance aux agents de chimiothérapie des cellules cancéreuses via, entre autres, l'augmentation de MDR1¹²⁹, (revue dans^{130, 131}). Fait intéressant à noter, la transfection avec un vecteur d'expression pour P53 sauvage chez des cellules possédant une protéine P53 mutée ne modifie pas la résistance à la chimio- et radiothérapie au niveau du cancer du poumon¹³². Cependant, l'impact de chaque mutation sur l'affinité de P53 pour l'ADN est peu étudié à ce jour.

1.8 OBJECTIFS :

En lien avec la problématique soulevée (l'absence de données concernant le rôle de Bcl-2 dans la réponse au cisplatine au niveau du cancer de l'endomètre ainsi que le taux de mutation élevé dans le gène P53 au niveau du cancer de l'endomètre) trois objectifs spécifiques ont été fixés dans le cadre de ce travail de recherche :

#1

Clarifier le rôle des protéines de la famille Bcl2 dans la résistance au cisplatine chez les cellules cancéreuses endométriales.

Sous objectif #1 : Comparer les niveaux d'expression de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 entre les modèles au niveau basal et en réponse au cisplatine.

Sous objectif #2 : Déterminer l'impact de la suppression sur l'apoptose induite par le cisplatine

#2

Étudier le mécanisme de régulation de la protéine Bcl2 en réponse au cisplatine chez les cellules cancéreuses endométriales et son impact sur la résistance.

Sous objectif #1 : Clarifier le mode de régulation de l'expression de Bcl-2

Sous objectif #2 : Déterminer les voies cellulaires régulant l'expression de Bcl-2 et l'impact sur l'apoptose.

#3

Mesurer l'impact des différentes mutations dans le gène P53 dans la résistance au cisplatine chez les cellules cancéreuses endométriales.

Sous objectif #1 : Comparer l'expression, l'activité transcriptionnelle et la localisation d'une protéine P53 mutante avec une protéine P53 sauvage.

Sous objectif #2 : Comparer la réponse au cisplatine entre des cellules exprimant P53 mutant et des cellules exprimant la protéine de type sauvage. P53

1.9 APPROCHES EXPÉRIMENTALES

Réactifs

Le cisplatine, le cycloheximide, l'actinomycine D et le Hoechst 33258 ont été obtenus chez Sigma (St-Louis, MO). DMEM-F12, « Bovine growth serum » (BGS), « Fetal Bovine serum » (FBS) et la gentamicine ont été obtenus chez HyClone (Sud Logan, Utah). Le vecteur constitutivement actif (CA) Akt2 a été généreusement offert par M. Joseph R. Testa (Fox Chase Cancer Center, Philadelphie, PA). Le plasmide Bcl-2 a été obtenu à partir de Addgene (Addgene plasmide 8768). Les shRNAs d'Akt (Akt1 shRNA (5'-CGGAGAC TGACACCAGGTATT-3'), Akt2 shRNA (5'-GTTCCCTCACTGCGCTGAAGTA-3'), Akt3 shRNA (5'-CAGCTCAGACTATT ACAATAA-3') ou contrôle shRNA (5'-GGAATCTCATTTCGATGCATAC-3') (tous les shRNAs sont inséré dans un plasmide pGeneClip (SABiosciences, Frederick, MD)) ont été obtenus à partir de SABiosciences (Frederick, MD). Les inhibiteurs de PKC chelerythrin chloride (qui inhibe la PKC α , β , δ , γ) et calphostine C (qui inhibe la PKC θ η et en plus de la PKC α , β , δ , ϵ , γ), l'inhibiteur de Bcl-2 HA14-1 et l'inhibiteur de Mdm2 Nutlin-3a ont été obtenus auprès de Sigma. Tous ont été solubilisés dans le DMSO et stocké sous forme d'aliquots à -20°C . Tous les anticorps ont été achetés chez Cell Signaling Technology à l'exception de PKC, (SantaCruz biotechnology, Santa Cruz, CA), glycéraldéhyde-3-phosphate (GAPDH) (Abcam, Cambridge, MA), les anticorps secondaire anti-lapin et anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Le Sulfate G418 a été obtenu à partir d'InvivoGen (San Diego, CA). L'agent de transfection pour plasmide Fugene 6 a été obtenu à partir de Roche (Indianapolis, IN) et l'agent de transfection TransIT-TKO a été obtenu à partir de Mirus (Milwaukee, WI). L'iodure de propidium (PI) a été obtenu chez Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Le kit d'immunoprécipitation (protéine A) a été acheté auprès de Roche (Laval, QC)

Culture Cellulaire

La culture de lignées cancéreuses utérines a été utilisée à cause de son utilisation simple, peu coûteuse et reproductible. Les lignées employées sont des adénocarcinomes endométriaux peu différenciés (HEC-1-A et KLE) et moyennement différenciés (Ishikawa et RL-95). La lignée MCF-7 est un adénocarcinome du tissu glandulaire du sein. KLE, HEC-1-A, RL-95 et MCF-7 ont été obtenus de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules Ishikawa ont été généreusement fournies par le Dr Sylvie Mader (Université de Montréal, Qc, Canada). Les cellules KLE ont été maintenues dans du DMEM-F12 (sans HEPES) supplémenté avec du FBS (10%), les cellules Ishikawa ont été maintenues dans du DMEM-F12 supplémenté par du BGS (2%), les cellules RL-95 ont été maintenues dans du DMEM-F12 supplémenté par du BGS (10%) et de l'insuline (2.5 µg/ml), les cellules Hec-1A ont été maintenues dans du McCoy's-5A supplémenté par du BGS (5%) et les cellules MCF-7 ont été maintenues dans du milieu RPMI-1640 supplémenté avec du BGS (10%). Tous les milieux ont été supplémentés avec de la gentamycine (50 pg / ml) comme antibiotique contre les contaminations. Toutes les cellules ont été maintenues à 37 ° C dans des incubateurs CO₂ de 5%. Avant chaque expérimentation, les cellules ont étéensemencées dans des plaques de six-puits (Corning sciences de la vie; Lowell, MA) à une densité de 0,25 x 10⁶ (KLE), 0,35 x 10⁶ (HEC-1-A), 0,6 x 10⁶ (Ishikawa et RL-95) ou 0,8 x 10⁶ (MCF-7) cellules par puits et admises à adhérer à 24h. Les cellules ont ensuite été incubées avec du milieu frais et le produit indiqué pour l'heure indiquée et la concentration.

Immunobuvardage western

Les cellules traitées ont été lysées dans un tampon RIPA froid contenant des inhibiteurs de protéase (Complete de Roche, Laval, Québec, Canada), suivi par trois cycles de gel-dégel. Les protéines furent quantifiées à l'aide du réactif de Bradford (Bio-Rad) et des quantités égales de lysats cellulaires ont été séparées sur gels de polyacrylamide 10-15%, puis transférés sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad). Les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4 ° C et incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort pendant 45 min. La détection a

été effectuée à l'aide du substrat SuperSignal West Femto (Pierce, Arlington Heights, IL), tel que décrit par le fabricant.

Protéine	HEC-1-A	KLE	Ishikawa	RL-95	MCF-7
Bcl-2	+++	+++	+	ND	+++
Bcl-xL	+++	+++	-	ND	ND
Mcl-1	-	+++	+++	ND	ND
Bax	+	+	+	+	+
XIAP	+++	+++	+++	ND	ND
PKC	ND	+++	+	ND	ND
AKTs	ND	1 / 2 / 3	1 / 3	ND	ND
P53	R248Q / +++	R175H / +++	ND	V218del / +	WT / -
Sensibilité au cisplatine	Résistante	Résistante	Sensible	ND	Résistante

Tableau 1.1 Caractéristiques des lignées cellulaires à l'étude

Le niveau d'expression des protéines dans les lignées cellulaires à l'étude est montré à partir de données obtenues précédemment au laboratoire. +++ : Fortement exprimé, + : Faiblement exprimé, - : Non-déecté, ND : Non-pertinent pas pour cette étude. Pour la protéine Akt, les isoformes (Akt1, 2 ou 3) actifs (phosphorylés) présent dans la lignée sont montrés. Pour la protéine P53, le statut du gène est montré ainsi que le niveau d'expression de la protéine (Statut / Expression). WT : gène sauvage, Mutation : AA original/position/AA muté (ex : R175H). La sensibilité au cisplatine est définie qualitativement par l'apoptose induite par le cisplatine, à partir de données obtenues précédemment au laboratoire.

Analyse de l'apoptose

I. Décompte apoptotique au Hoechst :

Les cellules adhérentes ont été traitées à la trypsine puis remises en suspension dans le milieu recueillie auprès de l'échantillon contenant les cellules mortes correspondant, et centrifugées pendant 5 min à 1200 tr / min. Par la suite, les cellules furent remises en suspension dans une solution de formol à 10% avec 1µg/ml de Hoechst 33258 et incubées pendant 24 h à 4 ° C. Puis, le colorant nucléaire Hoechst a été visualisé en utilisant un microscope Olympus BX60 fluorescence. Au moins 200 noyaux de cellule ont été comptés pour chaque échantillon de façon aveugle, et le pourcentage de cellules apoptotiques a été calculé comme le rapport des cellules apoptotiques (avec une morphologie caractéristique de l'apoptose comme la condensation de l'ADN et la formation des corps apoptotiques) au total le nombre de cellules.

II. Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux :

Après le traitement avec le cisplatine, 0.7×10^6 cellules ont été traitées à la trypsine, remises en suspension dans un milieu recueillies auprès de l'échantillon contenant les cellules mortes correspondant, et centrifugées pendant 5 min à 1200 tr / min. Les cellules ont été marquées avec de l'iodure de propidium selon les instructions du fabricant. Les analyses ont été effectuées par cytométrie de flux (FACScan, Cytomics FC500, Beckman Coulter).

Semi-quantitative PCR

L'ARN total a été isolé à partir de cellules traitées à l'aide du réactif Trizol (Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada)) selon les instructions du fabricant. Le premier brin d'ADNc a été synthétisé à partir de 0,4 pg d'ARN en utilisant l'enzyme « Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase» (Invitrogen). Les amorces pour l'amplification de Bcl-2 sont 5'-CCCAGCCTCCGTTATCCT-3 '(sens) et 5'-GAGGATTGTGGC CTTCTTTG-3' (anti-sens). Les amorces pour GAPDH étaient 5'-ACCCCTTCATTGACCTCA ACTACATGG-3 '(sens) et 5'-TCTCGCTCCTGGAAG ATGGTGATG-3' (anti-sens). Les PCR se déroulèrent dans un cycleur thermique PTC-

100 de MJ Research (Ramsey, MI), en utilisant l'ADN polymérase Taq (New England Biolabs, Pickering, ON) et en utilisant les paramètres suivants pour Bcl-2: 30 sec à 94 ° C , 30 sec à 62 ° C et 30 sec à 72 ° C pendant 34 cycles et les paramètres suivants pour GAPDH: 30 sec à 94 ° C, 30 sec à 58 ° C et 30 sec à 72 ° C pendant 25 cycles. Le mélange réactionnel est de taille séparés sur un gel d'agarose 1% et visualisés sur transillumination UV à l'aide de la coloration SYBR-Safe (Invitrogen).

Transfection avec un plasmide et sélection stable

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6-puits à la densité nécessaire pour atteindre la confluence ~ 75% après 24 h. Le jour de la transfection, les shRNA Akt ou les vecteurs d'expression (Bcl-2, Akt2constitutivement actif (CA) ou vecteur vide pcDNA3) ont été ajoutés aux cellules en utilisant un rapport de 3.6µl de FuGENE: 1.2µg d'ADN / puits et le milieu a été changé après 6 heures.

Pour la sélection stable, les plaques ont été incubées pendant 42 heures supplémentaires (pour un total de 48 h) à 37 ° C puis le G418 (400µg/ml pour Ishikawa, 100 µg / ml pour KLE) a été ajouté et la sélection des clones stables a été réalisée. Les expériences subséquentes avec les clones stables ont été réalisées en utilisant la moitié de la concentration de G418 utilisés pour la sélection.

Transfection de petit ARN interférant (siRNA)

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6-puits à la densité nécessaire pour atteindre la confluence ~ 75% après 24 h (0,25 x 10⁶ (KLE), 0,35 x 10⁶ (HEC-1-A)). Le jour de la transfection, 200nanomole/Litre de siRNA dirigé contre P53 ou une séquence contrôle (Compagnie Ambion, Austin, TX, # de catalogue : AM16704, siRNA ID : 2714) furent ajoutées aux cellules avec 8µl d'agent de transfection TransIT-TKO (Mirus (Milwaukee, WI)) et le milieu a été changé après 6 heures.

Immunoprécipitation

La protéine P53 a été immunoprécipitée à l'aide du kit d'immunoprécipitation (protéine A) selon les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules ont été lysées dans un

tampon de lyse RIPA (pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% de désoxycholate de sodium, 1% NP-40 dans du PBS et supplémenté avec un cocktail d'inhibiteur de protéases de la compagnie Roche). Le lysat a été transféré dans une seringue pré-refroidis sur la glace et homogénéisé 10 fois. Pour enlever les débris, la suspension homogénéisée fut centrifugée 10 min à 4 °C. Une suspension de protéineA-agarose a été ajouté au surnageant et incubé pendant au au moins 3 h à 4 °C sur une plate-forme à agitatrice pour enlever les liaisons non-spécifiques. Le Pré-lysate clarifié a été centrifugé et les anticorps spécifiques (P53 dilué 1/50 ; HA dilué 1/50) ont été ajouté au surnageant et doucement agité pendant 1 h à 4 °C. Ensuite, 50µl de la suspension protéineA-agarose a été ajouté aux échantillons et doucement agité toute la nuit à 4 °C. Les complexes billes agarose - anticorps ont été recueillies par centrifugation et lavées trois fois avec du PBS froid. Du tampon réducteur SDS a été ajouté aux complexes et la suspension fut bouillie pendant 3 min à 100 °C. La suspension fut centrifugé et le surnageant fut recueilli pour charger sur gel SDS-PAGE.

Immunofluorescence

Les lamelles cultivées avec les cellules adhérentes ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes. Après une perméabilisation pendant 6 min dans une solution de citrate (citrate de sodium 0,1%, 0,1% Triton X-100 dans l'eau), les lames ont été lavées deux fois dans du PBS à température ambiante. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués par incubation de 1 h avec du sérum de chèvre dans une chambre humide à la température ambiante, et les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-p53 pendant 2 heures à température ambiante. Les lames ont été lavées deux fois dans du PBS, et les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin conjugué avec le fluorochrome Alexa Fluor 488 pendant 1 h à température ambiante dans une chambre humide à l'abri de la lumière. Les lames ont été lavées une fois dans du PBS et incubées avec le colorant nucléaire Hoechst suivi de deux rinçages à l'eau. Les cellules ont ensuite été visualisées par microscopie à fluorescence.

Analyses statistiques

Les analyses densitométriques ont été effectuées à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad). Les données ont été soumis à une analyse de variance ou le T-test (version 4.0 du logiciel PRISM; GraphPad, San Diego, CA). Les différences entre les groupes expérimentaux ont été déterminées par le test de Tukey.

CHAPITRE 2

ARTICLE

2.1 RÉSUMÉ

Chez la femme, le cancer de l'endomètre de stade avancé est très résistant à la chimiothérapie par le cisplatine, ce qui limite la survie des patientes atteintes. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 a été associée à la résistance à l'apoptose dans plusieurs types cellulaires. Cependant, il n'y a pas de données concernant son implication dans la résistance au cisplatine et la régulation de son expression dans les carcinomes endométriaux. Dans cette étude, nous avons montré que Bcl-2 est associé à la résistance au cisplatine dans les cellules cancéreuses endométriales. Nous avons décrit le mécanisme d'action du cisplatine sur l'expression de l'ARNm et de la protéine Bcl-2. De plus, nous avons démontré que le cisplatine active l'expression de Bcl-2 par les voies de PKC et d'Akt2 et que cette régulation a un impact important sur l'apoptose induite par le cisplatine dans les cellules cancéreuses de l'endomètre.

2.2 CONTRIBUTIONS

L'article a été publié dans le journal « International Journal of Cancer » au mois de mai 2011¹³³.

Alexandre Rouette :

- Expérimentations pour les Figures 2, 3 et 4 en entier.
- Expérimentations pour la Figure 2.1 (A à C, G à I), la Figure 2.5 (A, D, E et F) et la Figure 2.6 (D et E)

- Expérimentations pour la Figure 2.6 (C) avec les lignées cellulaires (KLE shRNA Control et KLE shRNA Akt2) produites par Julie Girouard.
- Conception et Analyse de toutes les expérimentations
- Écriture de l'article

Julie Girouard :

- Production de lignées cellulaires KLE exprimant un shRNA Control ou un shRNA Akt2 de façon stable.
- Expérimentations pour la Figure 2.6 (A)

Sophie Parent :

- Expérimentations pour la Figure 2.1 (D à F).
- Expérimentations pour la Figure 2.5 (B et C) avec les lignées cellulaires (Ishikawa Vide et Ishikawa Bcl-2) produites par Alexandre Rouette.
- Expérimentations pour la Figure 2.6 (B) avec les lignées cellulaires (KLE shRNA Control et KLE shRNA Akt2) produites par Julie Girouard.

Éric Asselin :

- Conception et Analyse de toutes les expérimentations
- Révisions critiques et éclairés de l'article et du mémoire.

2.3 ARTICLE

CISPLATIN INCREASES B-CELL LYMPHOMA 2 EXPRESSION VIA ACTIVATION OF PROTEIN KINASE C AND AKT2 IN ENDOMETRIAL CANCER CELLS.**Alexandre Rouette, Sophie Parent, Julie Girouard, Valérie Leblanc and 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*

Human carcinomas often show resistance to cisplatin and Bcl-2 is associated with resistance to cisplatin. However, Bcl-2 regulation upon cisplatin treatment in human cancers is unknown. Here we show a novel mechanism by which cisplatin treatment promotes resistance by increasing the expression of Bcl-2 mRNA. Bcl-2 mRNA and protein expression was increased in cisplatin-resistant endometrial cancer cell lines (KLE and HEC-1-A), but not in cisplatin-sensitive cell line (Ishikawa). Cisplatin-mediated increase in Bcl-2 expression was blocked by combination with either actinomycin D or cycloheximide. In addition, Bcl-2 inhibition by HA14-1 led to increased cisplatin-induced apoptosis in KLE and HEC-1-A, while Bcl-2 overexpression in Ishikawa led to decreased cisplatin-induced apoptosis. Inhibition of PKC activity prevented cisplatin-dependant increase in Bcl-2 mRNA, and induced apoptosis in KLE cells. Furthermore, PKC inhibition was associated with decreased Akt and NF- κ B activity. Cells stably expressing shRNA for Akt isoforms revealed that Akt2 was involved in cisplatin-dependant increase in Bcl-2 and apoptosis. Overexpression of Akt2 in Akt2-deficient cells led to increased Bcl-2 expression upon cisplatin treatment. our data suggest a novel regulation pathway of Bcl-2 by cisplatin, via the activation of PKC and Akt2, which has a profound impact on resistance to cisplatin-induced apoptosis in endometrial cancer cells.

Endometrial cancer is the most common gynecological cancer. It ranks as the fourth most common neoplasm and the eighth leading cause of death from cancer in women⁸. Uterine tumors are often refractive to chemotherapy and this involves inhibition of apoptosis¹³⁴. To circumvent the problem of chemoresistance, the underlying anti-apoptotic mechanisms need to be identified. Cisplatin is the most effective anti-cancer agent in treating late-stage endometrial carcinomas. Cisplatin can covalently bind to DNA and form adducts with guanines and adenine bases. These adduct cause distortions in DNA, leading to impaired DNA replication. The final outcome is generally cell death by apoptosis activation (reviewed in²⁸). Cisplatin has also been shown to decrease Bcl-2 content via caspase-3 activity⁷⁸.

Key Words: BCL-2, b-cell-lymphoma-2; BCL-XL, b-cell-lymphoma extra-large; BAK, Bcl-2 antagonist killer 1; BAX, Bcl-2-associated x protein; DAG, diacylglycerol; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCL-1, myeloid cell leukemia sequence 1; Erk1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase.

† 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

Following the transduction of a proapoptotic signal, Bax is displaced from its inactive monomeric state to promote cell death. Following homodimerization, subsequent insertion into mitochondrial membrane and pore formation, cytochrome c is released into the cytosol⁴⁶. Antiapoptotic Bcl-2 proteins

(Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) interfere with engagement of mitochondrial apoptotic machinery by inhibiting oligomerization of Bax and Bak. To exert this antiapoptotic function, they either directly sequester Bax and Bak to prevent their oligomerization or sequester activator BH3-only proteins to block the activation of Bax and Bak⁵¹⁻⁵³. Therefore, anti-apoptotic Bcl-2 family of proteins has been shown to block apoptosis induced by various death stimuli in several cancers⁴⁷. However, their role in cisplatin resistance of endometrial cancer is poorly documented.

Protein Kinase C (PKC) is a family of phospholipid-dependant kinases involved in regulation of several cellular proteins through phosphorylation. They can be activated by phosphatidylserine and diacylglycerol (DAG) in a Ca²⁺-dependant manner⁸¹. Most of PKC isoforms promote cell proliferation and survival and interfere with apoptosis⁸⁴. Consequently, inhibition of PKCs has been associated with increased apoptosis induced by cisplatin^{72, 86}. Additionally, some reports have suggested that PKCs can modulate Bcl-2 expression^{72, 73, 86, 90}.

Akt is a serine or threonine protein kinase with homology to protein kinase A and C⁹³. To date, three isoforms of Akt have been identified: Akt1, Akt2 and Akt3. Gene amplification and overexpression of Akt2 in human ovarian, breast, and pancreatic carcinomas have been reported^{101, 106, 107}. A recent report suggests also a contribution of Akt3 to the aggressive phenotype of human breast cancer^{94, 100}. Furthermore, it has been reported that Akt pathway can regulate the expression of Bcl-2⁷⁴.

In the present study, we have enlightened a novel mechanism by which cisplatin treatment promotes resistance by increasing the expression of Bcl-2 mRNA.

Material and methods

Reagents

Cisplatin, cycloheximide, actinomycin D and Hoechst 33258 were obtained from Sigma (St-Louis, MO). DMEM-F12, BGS, FBS and gentamycin were obtained from HyClone (South Logan, Utah), constitutively active (CA) Akt2 vector was generously provided by Dr. Joseph R. Testa (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). Plasmid Bcl-2 was obtained from Addgene (Addgene plasmid 8768). Akt shRNAs were obtained from SABiosciences (Frederick, MD). PKC inhibitors chelerytrine chloride (which inhibits PKC α , β , δ , γ) and calphostin C (which inhibits PKC η and θ in addition to PKC α , β , δ , ϵ , γ) and Bcl-2 inhibitor HA14-1 were obtained from Sigma. All were solubilised in DMSO and stored as aliquots at -20°C. All antibodies were purchased from Cell Signaling Technology except for PKC, (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Abcam, Cambridge, MA), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). G418 sulfate was obtained from InvivoGen (San Diego, CA). Fugene 6 reagent was obtained from Roche (Indianapolis, IN). PI was obtained from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada)

Cell Culture

KLE, Hec-1-a and MCF-7 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). Ishikawa cells were generously provided by Dr. Sylvie Mader (Université de Montréal, Qc, Canada). KLE cells were maintained in DMEM-F12 (without HEPES) supplemented with FBS (10%) and gentamycin (50 μ g/ml), Ishikawa cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with BGS (2%) and gentamycin (50 μ g/ml), and Hec-1A cells were maintained in McCoy's 5A supplemented with BGS (5%) and gentamycin (50 μ g/ml). MCF-7 cells were maintained in RPMI-1640 supplemented with

BGS (10%) and gentamycin (50 µg/ml). All cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ incubators. Before each experimentation, cells were seeded in six-well plates (Corning life sciences; Lowell, MA) at a density of 0.25 x 10⁶ (KLE), 0.35 x 10⁶ (HEC-1-A), 0.6 x 10⁶ (Ishikawa) or 0.8 x 10⁶ (MCF-7) cells per well and allowed to adhere for 24h. Cells were then incubated with fresh medium and the indicated product for the indicated time and concentration.

Protein extraction and Western Blot Analysis

Treated cells were disrupted in cold RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete from Roche, Laval, Quebec, Canada) followed by three freeze-thaw cycles. Equal amounts of cell lysates were separated onto 10–15% polyacrylamide gels and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The membranes were probed with primary antibody overnight at 4 °C and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 45 min. Detection was performed using SuperSignal West Femto substrate (Pierce, Arlington Heights, IL), as described by the manufacturer.

Apoptotic Index (Hoechst nuclear staining)

Treated cells were trypsinized, resuspended in medium collected from the matching sample containing the dead cells, and centrifuged for 5 min at 1200 rpm. Subsequently, cells were resuspended in a solution of 10% formalin and 1µg/ml Hoechst 33258 and incubated for 24 h at 4°C. Then, Hoechst nuclear staining was viewed using Olympus BX60 fluorescence microscope. At least 200 cells were counted for each sample by blind cell counts, and the percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells (with characteristic apoptotic morphology such as nuclear shrinkage and condensation, as revealed by fluorescence microscopy) to total cell count.

Cell death analysis by Flow Cytometry

After treatment with cisplatin, 0.7x10⁶ cells were trypsinized, resuspended in medium collected from the matching sample containing the dead cells, and centrifuged for 5 min at 1200 rpm. Cells were stained with PI according to the manufacturer's instructions. Analysis were performed by fluorescence activated cell sorting (FACScan, Cytomics FC500, Beckman Coulter).

Semi-quantitative PCR

Total RNA was isolated from treated cells using Trizol Reagent (Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada)) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 0.4 µg RNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Primers for amplification of B-cell-leukemia-2 (Bcl-2) were 5'-CCCAGCCTCCGT TATCCT-3' (Sense) and 5'-GAGGATTGTGGC CTTCTTTG-3' (Anti-Sense). Primers for 44lyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were 5'-ACCCCTTCATTGACCTCA ACTACATGG-3' (Sense) and 5'-TCTCGCTCCTGGAAG ATGGTGATG-3' (Anti-Sense). PCRs were conducted in a MJ Research (Ramsey, MI) Thermal cycler (model PTC-100), using Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Pickering, ON) and using the following parameters for Bcl-2: 30 sec at 94°C, 30 sec at 62°C, and 30 sec at 72°C for 34 cycles and the following parameters for GAPDH: 30 sec at 94°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 72°C for 25 cycles. The reaction mixture was size-separated on a 1% agarose gel and visualized using SYBR-Safe (Invitrogen) staining upon UV transillumination.

Transfection with plasmids and stable selection

Cells were seeded in 6-well plates at the required density to reach ~75% confluency after 24 h. On the day of transfection, shRNAs (Akt1 shRNA (5'-CGGAGAC TGACACCAGGTATT-3'), Akt2 shRNA (5'-GTTCCCTCACTGCGCTGAAGTA-3'), Akt3

shRNA (5'-CAGCTCAGACTATTACAATAA-3') or control (scrambled) shRNA (5'-GGAATCTCATTTCGATGCATAC-3') (all shRNAs inserted into pGeneClip (SABiosciences, Frederick, MD)) or expression vectors (Bcl-2, constitutively active (CA) Akt2 or empty pcDNA3 vector) were added to cells using a ratio of 3.6 μ l of FuGENE:1.2 μ g of DNA/well. Medium was changed after 6 hours. For stable selection, plates were incubated for 42 additional hours (total: 48 h) at 37 °C before G418 (400 μ g/ml for Ishikawa, 100 μ g/ml for KLE) was added and selection of stable clones was carried out. Further experiments with stable clones were carried out using half the concentration of G418 used for selection.

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 or T test (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

Results

To examine the effect of cisplatin on Bcl-2 expression in endometrial cancer, we used two cell lines resistant to cisplatin (KLE and HEC-1-A) and a cell line sensitive to cisplatin (Ishikawa). We then characterized the pathways involved in Bcl-2 regulation by cisplatin using different RNAi and specific pathways inhibitors.

Endometrial cancer cells show differential sensitivity to apoptosis induced by cisplatin.

We have examined the ability of cisplatin to induce apoptosis in KLE, HEC-1-A and Ishikawa, three model endometrial cancer cell lines. In Ishikawa cells, cisplatin induced caspase-9, caspase-3 and Parp cleavage after 24 hours (Fig. 2.1H). Cisplatin induced 30% (after 48h) and 60% (after 72h) apoptosis as measured by nuclear staining with Hoechst

(Fig. 2.1B) or by PI staining (Fig. 2.1E). In KLE (Fig. 2.1I) and HEC-1-A (Fig. 2.1G) cells, cisplatin induced a weak cleavage of caspase-9, caspase-3 and Parp after 24 hours. In line with this result, total cell apoptosis was 10% (after 48h) and 20% (after 72h) in KLE cells as measured by nuclear staining with Hoechst (Fig. 2.1C) or by PI staining (Fig. 2.1F). Cisplatin induced apoptosis (10%) only after 72h in HEC-1-A cells as measured by nuclear staining with Hoechst (Fig. 2.1A) or by PI staining (Fig. 2.1D).

Cisplatin increases Bcl-2 content in resistant cells.

Low cleavage of caspase-9 in KLE and HEC-1-A suggests that activation of mitochondrial pathway of apoptosis is impaired in response to cisplatin. Therefore, we have investigated the expression of anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1) and pro-apoptotic (Bax) proteins of the Bcl-2 family and XIAP. Levels of Bcl-2 and Bcl-xL were high in KLE and HEC-1-A as compared to Ishikawa cells. Levels of Mcl-1 were comparable in KLE and Ishikawa but undetectable in HEC-1-A cells. Levels of Bax were comparable in all cell lines. Levels of XIAP were low in KLE and HEC-1-A compared to Ishikawa (Fig. 2.2A). We then treated endometrial cancer cells with cisplatin to measure the impact of the treatment on total cellular content of Bcl-2. We found that Bcl-2 content was significantly increased in KLE cells at 24h in response to cisplatin, but not in Ishikawa (Fig. 2.2B,C). At 72h, levels of Bcl-2 were significantly increased in KLE and HEC-1-A, but not in Ishikawa (Fig. 2.2D). Interestingly, the delay in Bcl-2 increase in response to cisplatin in HEC-1-A cells corresponds to the delay in apoptotic induction in these cells. Then, we investigated if Bcl-2 was the sole member of a variety of anti-apoptotic molecules to be increased upon cisplatin treatment in cisplatin-resistant cells. XIAP levels were unchanged in response to cisplatin in all cell lines. Bcl-xL levels were decreased in KLE and Ishikawa, but unchanged in HEC-1-A (Fig. 2.2B). Bax levels were increased in HEC-1-A and Ishikawa, but not in KLE, in

response to cisplatin. In KLE cells, cisplatin treatment had no impact on levels of cIAP-1, cIAP-2, Mcl-1, Bad and PUMA (data not shown). Furthermore, MCF-7 breast cancer cell line was treated with cisplatin for 24h, and low apoptotic index was observed (data not shown). Bcl-2 content was increased in response to cisplatin in these cells (Fig. 2.2E). Overall, these results suggest that Bcl-2 is increased upon cisplatin treatment in cisplatin-resistant endometrial cancer cells. We next investigated if this phenomenon was of physiological relevance in our model.

Bcl-2 overexpression confers sensitivity to cisplatin-induced apoptosis in endometrial cancer cells.

To determine if the increase in Bcl-2 content in endometrial cancer cell lines is physiologically relevant, we performed Bcl-2 inhibition and overexpression/gain of function assays. We inhibited Bcl-2 protein with HA14-1, a BH3-pocket binding molecule¹³⁵ before treatment with cisplatin in KLE and HEC-1-A cells. Treatment with HA14-1 alone induced apoptosis at the same level as cells treated with cisplatin. However, combination of HA14-1 with cisplatin significantly increased apoptosis by 20% in KLE (Fig. 2.3A) cells and 10% in HEC-1-A (Fig. 2.3B) cells as compared with cisplatin alone or HA14-1 alone. Consequently, cleavage of caspase-9, caspase-3 and Parp was higher in cells treated with HA14-1 combined with cisplatin as compared with cisplatin alone or HA14-1 alone in KLE (Fig. 2.3A) and HEC-1-A (Fig. 2.3B) cells.

In addition, we stably overexpressed Bcl-2 in Ishikawa sensitive cells. Treatment of Ishikawa cells encoding empty vector with cisplatin increased apoptosis by more than 40% as compared to control treatment, whereas treatment of cells encoding Bcl-2 vector with cisplatin increased apoptosis by only 15% as compared to control treatment (Fig. 2.3C). Moreover, Bcl-2-expressing cells showed almost complete loss of caspase-9, caspase-3 and Parp cleavage after cisplatin treatment (Fig. 2.3C).

Cisplatin increases Bcl-2 content by de-novo mRNA and protein synthesis.

To find out if the increase in Bcl-2 protein in KLE cells was due to increased transcription of Bcl-2 gene, we amplified Bcl-2 mRNA by semi-quantitative RT-PCR after treatment with cisplatin. Treatment with cisplatin significantly increased Bcl-2 mRNA expression after 12 hours and this effect was blocked by combination with Actinomycin D, an inhibitor of transcription (Fig. 2.4A). Furthermore, the increase in Bcl-2 protein content was blocked by cycloheximide, an inhibitor of protein translation, supporting the idea that Bcl-2 regulation by cisplatin was attributable only to de-novo mRNA synthesis (Fig. 2.4B).

PKC and Akt2 are involved in cisplatin-dependant upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells.

It has been shown that Akt, MAPK and PKC pathways can regulate the expression of Bcl-2 in response to different stimuli^{72-74, 76, 77}. We looked at basal activation of these pathways in KLE and Ishikawa cells. Probing with an antibody recognizing phosphorylation on PKC α , β , δ , ϵ , η and θ revealed that PKC was strongly activated in KLE cells but not in Ishikawa cells at basal levels (data not shown). Blotting with an antibody recognizing phosphorylation on Erk1/2 revealed that MAPK pathway was strongly activated in Ishikawa cells but not in KLE cells at basal levels (data not shown). Akt isoforms 1 and 3 are active in both cell lines, whereas Akt isoform 2 is active only in KLE cells, as shown by Gagnon *et al*⁴¹. In light of these results, we thus hypothesized that PKC and Akt2 pathway were involved in cisplatin-dependant regulation of Bcl-2 in our cells. Therefore, we used large spectrum PKC inhibitor calphostin c to eliminate potential functional redundancy of PKC isoforms. Also, calphostin c used at 1 μ M does not target other kinases. Inhibition of PKC, as seen by decreased levels of phosphorylated (active) PKC, prevented cisplatin-dependant increase in Bcl-2 protein content. (Fig.2.5A).

Moreover, cisplatin-dependant increase in Bcl-2 mRNA was blocked by combination either with calphostin c or actinomycin D (Fig. 2.5B).

Previous reports showed that PKC can regulate Akt activity¹³⁶. Therefore, to investigate whether Akt and PKC were functionally linked, we treated KLE cells with calphostin c. Inhibition of PKC by calphostin c led to a time-dependant decrease in Akt phosphorylation. This effect was more pronounced for the lower band, which corresponds to Akt2⁴¹ (Fig. 2.5D). Akt has been shown to promote Nf- κ B activation¹³⁷. Also, cisplatin has been shown to promote NF- κ B DNA-binding activity in Hela cells¹³⁸. Therefore, we measured phosphorylation and total levels of I κ B and Akt in cisplatin-treated KLE cells. Phosphorylation of I κ B and Akt was increased in response to cisplatin, and this was blocked by combination with calphostin c (Fig. 2.5C). To confirm the results obtained with calphostin c, we used chelerythrine chloride, another large spectrum PKC inhibitor. Treatment with chelerythrine chloride prevented cisplatin-dependant increase in Bcl-2 protein cellular content (Fig. 2.5E). P-akt levels were decreased in response to 10 μ M of chelerythrine chloride treatment alone, or in combination with cisplatin (Fig.2.5E), and ratio of p-akt/akt were also decreased (data not shown).

In order to determine if regulation of Bcl-2 mRNA by PKC upon cisplatin treatment is physiologically relevant, we measured apoptosis induced by treatment of cisplatin and calphostin c. Cells treated with calphostin c alone showed a significant increase in apoptosis and cleavage of parp as compared to control. Combination of PKC inhibition and cisplatin treatment increased apoptosis and cleavage of parp as compared to cisplatin, but not calphostin c alone, suggesting a role for PKC in basal cell survival (Fig. 2.5F). Notably, insertion of Bcl-2 by transient transfection partially blocked apoptosis induced by calphostin C alone or in combination with cisplatin, as well as

cleavage of Parp (Fig. 2.5F). Ishikawa cells show

Ishikawa cells show low basal pkc activity (data not shown). To further confirm the role of PKC in Bcl-2 regulation and cisplatin-induced apoptosis, we treated Ishikawa cells stably overexpressing Bcl-2 with the PKC inhibitor calphostin c. Inhibition of PKC had no impact on apoptosis and cleavage of parp induced by cisplatin in empty cells. Bcl-2-overexpressing Ishikawa cells treated with combination of cisplatin and calphostin c showed no difference in apoptosis as compared with empty-vector expressing Ishikawa treated with combination of cisplatin and calphostin c (Fig. 2.5G). These results indicates that apoptosis induced by calphostin c is related to pkc activity in endometrial cancer cells.

Regulation of Akt, mainly Akt2, by calphostin c suggests that Akt might be involved in cisplatin-dependant increase in Bcl-2 mRNA (Fig. 2.5D). In order to study the impact of Akt isoforms on regulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells, KLE cells stably expressing control (scrambled) or Akt 1, 2, or 3 shRNAs were established. Downregulation of each Akt isoforms by shRNA was confirmed by western blot (Fig. 2.6A). Treatment of cells expressing control shRNA with cisplatin increased Bcl-2 content. This increase was partially blocked in cells expressing Akt1 and Akt3 shRNA, and completely blocked in cells expressing Akt2 shRNA (Fig. 2.6B).

In order to determine if regulation of Bcl-2 mRNA by Akt2 upon cisplatin treatment is physiologically relevant, we measured apoptosis induced by treatment of cisplatin in shRNA-Akt2 expressing cells. In fact, Akt2-shRNA-expressing cells treated with cisplatin showed significantly higher apoptosis and cleavage of caspases and parp than control-shRNA-expressing cells treated with cisplatin. Bcl-2 transient transfection in Akt2-shRNA-expressing cells treated with cisplatin was able to partially block cleavage of caspases

and parp. However, total apoptosis was unchanged (Fig. 2.6C). To further confirm the role of Akt2 in cisplatin-induced increase in Bcl-2, we overexpressed Akt2 in Ishikawa cells by transient transfection. Cisplatin or Akt2 alone had no impact on Bcl-2 protein levels after 24 hours, whereas combination of both condition increased Bcl-2 content in these cells (Fig. 2.6D). Akt2 expression in Ishikawa cells led to decreased cleavage of Parp as compared to cisplatin treatment alone (Fig. 2.6E).

Together, our results demonstrate that cisplatin activates PKC, which acts through Akt2 to induce transcription of Bcl-2 mRNA. This leads to an increase in total Bcl-2 cellular content and resistance to apoptosis (Fig. 2.6F).

Discussion

Endometrial cancers often show intrinsic or acquired cellular resistance, thus limiting the success of cisplatin treatment, the common drug used in chemotherapy. In the present study, we have shown for the first time that cisplatin can activate transcription of Bcl-2 mRNA, in a PKC/Akt-dependant manner in endometrial cancer cells.

Cisplatin-resistance mediated by Bcl-2.

KLE and HEC-1-A endometrial adenocarcinoma cell lines constitute two excellent models to study the mechanisms involved in chemoresistance: we had previously reported that these cells were highly resistant to cisplatin^{41, 110}. We have compared the pro-apoptotic mechanisms activated by cisplatin in these cells with sensitive Ishikawa endometrial carcinoma cell line. We found that cisplatin could activate caspase signaling in all cell lines, and cleavage of caspase 9 demonstrates that cisplatin activates mitochondrial pathway of apoptosis¹³⁹. However, fragments of cleaved caspase 9 were present in low amounts in HEC-1-A and KLE as compared to Ishikawa upon cisplatin treatment, strongly suggesting

that cytochrome c release and apoptosome complex formation was inhibited. Bcl-2 family of anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) have been shown to inhibit the release of cytochrome c from mitochondria^{49, 51, 52}. We found that Bcl-2 and Bcl-xL, but not Mcl-1, XIAP and Bax, basal levels correlated with apoptotic response to cisplatin in all cell lines. Also, the increase in Bcl-2 content in response to cisplatin in KLE and HEC-1A further suggested a key role for Bcl-2 over Bcl-xL, IAPs and others Bcl-2 family members in resistance to cisplatin-induced apoptosis, although previous work enlightened Bcl-xL as predictor of chemoresistance over Bcl-2 in endometrial cancer cells⁷¹. Although the implication of Bcl-xL, Mcl-1, IAPs, Bax, Bad and PUMA in response to apoptosis induced by cisplatin might be relevant, we hypothesized that Bcl-2 is the main factor involved in chemoresistance in our condition. Also, it is the sole anti-apoptotic member tested in our study for which levels were upregulated by cisplatin in cisplatin-resistant KLE and HEC-1-A cells. To our knowledge, this is the first time an increase in Bcl-2 content by a DNA-targeting chemotherapeutic agent is described.

In our model, we show that Bcl-2 inhibits apoptosis induced by cisplatin. Indeed, Bcl-2 inhibition by HA14-1 sensitized KLE and HEC-1-A cells to cisplatin-induced apoptosis while Bcl-2 overexpression rendered Ishikawa cells resistant to cisplatin. Bcl-2 is known to block Bax from going to mitochondria, which inhibits cytochrome c release and activation of caspases⁵². Indeed, inhibition of Bcl-2 significantly increased cleavage of caspase-9, caspase-3 and Parp induced by cisplatin, leading to increased caspase-dependant apoptosis. Furthermore, overexpression of Bcl-2 in Ishikawa cells strongly inhibited cleavage of caspase-9, caspase-3 and Parp induced by cisplatin. Collectively, our results show that Bcl-2 plays a key role in inhibiting cisplatin-induced apoptosis in endometrial carcinoma cells, similarly to other cell types^{47, 61}. Furthermore, Bcl-2 expression correlates with weak apoptotic index in endometrial

carcinoma, suggesting a role in endometrial cancer cells survival⁶⁶.

Regulation of Bcl-2 by mRNA synthesis.

RT-PCR analysis revealed that Bcl-2 mRNA is upregulated in response to cisplatin, and this effect is blocked by combination with actinomycin D. This suggests that activation occurs via de-novo mRNA synthesis, and not through mRNA stabilization. Along with this result, protein synthesis inhibitor cycloheximide could completely block increase in Bcl-2 content due to cisplatin in KLE cells. This ruled out the possibility of post-translational mechanism acting on Bcl-2, although Akt has been shown to increase Bcl-2 stability via neutralization of Bad¹⁴⁰.

Regulation of Bcl-2 by PKC activation.

Importantly, we found that PKC is strongly activated in KLE cells in comparison with Ishikawa cells. PKC inhibition by calphostin C had no impact on basal levels of Bcl-2, but blocked cisplatin-induced increase in Bcl-2 mRNA and protein content. These data suggest that cisplatin increases Bcl-2 mRNA via PKC pathway. Moreover, chelerythrine chloride treatment also prevented increase in Bcl-2. This suggests that blockage of cisplatin-dependant increase in Bcl-2 mRNA by calphostin c is likely due to PKC inhibition, and not to some off target effects. However, PKC inhibition does not seem to have any direct impact on Bcl-2, contrarily as seen in prostate and neuroblastoma cancer cells^{72, 73}.

To identify factors acting downstream of PKC for Bcl-2 regulation, we looked at Akt activation in the cells. Previous reports showed that PKC can regulate Akt activity¹³⁶ and that Akt can regulate Bcl-2 mRNA expression⁷⁴. Also, we found that PKC inhibition could decrease phosphorylation of Akt in a time-dependant manner. The decrease in phosphorylation was more pronounced on Akt2, suggesting a major role for this isoform in regulating cisplatin-induced increase in Bcl-2 content. Akt has

been shown to promote Nf- κ B activation¹³⁷. Also, cisplatin has been shown to promote NF- κ B DNA-binding activity in Hela cells¹³⁸. The increase in I κ B phosphorylation in response to cisplatin, which is blocked by PKC inhibition and Akt2 shRNA, suggests a role for NF- κ B pathway in regulation of cisplatin-dependant increase of Bcl-2 mRNA.

We found that PKC inhibition sensitized KLE cells, but not Ishikawa cells. This suggests that PKC is important for basal cell survival. Inhibition of apoptosis by overexpression of Bcl-2 in calphostin c-treated KLE cells suggests that calphostin c induces apoptosis by mitochondrial pathway⁵². The fact that cisplatin treatment fails to increase calphostin c-dependant apoptosis in a synergic manner indicates that calphostin c treatment alone is sufficient to induce massive apoptosis in KLE cells. This result may provide two explanations. The first possibility implies a non-specific toxicity of the inhibitor due to high dose. However, it was ruled out because of the absence of apoptosis induced by calphostin c in Ishikawa cells (expressing lower levels of active PKC). The second possibility, which seems more likely, is that PKC is important for basal cell survival in KLE cells. Many reports have directly targeted PKC as a key regulator of apoptosis (reviewed in⁸⁴). We recently reported that inhibition of PKC sensitized endometrial carcinoma cells to Tumor Necrosis Factor α -induced apoptosis¹⁴¹. Some reports also suggested that PKC inhibition sensitized cancer cells to apoptosis induced by cisplatin in other tumor cell types^{72, 86}.

Due to the fact that PKC inhibitors act on several PKC isoforms, it is impossible to know at this point which specific PKC isoforms are involved in regulation of Bcl-2 expression in KLE cells. Interestingly, some reports have suggested that PKC-alpha, -delta and -epsilon are associated to both cell survival and regulation of Bcl-2 protein^{73, 77, 142-145}. However, due to the fact that Ishikawa express high levels of PKC-alpha, we can hypothesize that this isoform is not involved

in regulation of Bcl-2⁸⁵. The identification of the isoform(s) involved in Bcl-2 regulation will be the subject of another study.

Regulation of Bcl-2 by Akt2 activation.

We found that Akt, mostly Akt2, was required for cisplatin to induce Bcl-2 expression in KLE cells. Although the involvement of Akt isoforms 1 and 3 in regulation of Bcl-2 content and resistance to cisplatin may be biologically relevant, we chose to focus on Akt isoform 2 solely because of the more pronounced impact observed on Bcl-2 content in response to cisplatin.

Furthermore, Akt2 downregulation by shRNA in KLE cells was associated with increased cisplatin-induced apoptosis. We confirmed that cisplatin-induced increase in Bcl-2 was not a cell-specific event by showing that cisplatin increases Bcl-2 content in Ishikawa cells in the presence of Akt2. Moreover, Akt2 overexpression leads to reduced cisplatin-induced cleavage of Parp, confirming the role of Akt2 in cisplatin resistance in endometrial cancer cells, as we already showed⁴¹.

How cisplatin can activate transcription of Bcl-2 through PKC-Akt-Nf-κB is unknown. The formation of cisplatin-DNA adducts results in the activation of several cellular pathways of stress that culminates in the activation of apoptosis or cell cycle arrest²⁹. However, some studies have shown that cisplatin can also activate cell survival pathways that make cells resistant to cisplatin, like MAPK/ERK/JNK¹⁴⁶ and c-fos^{147, 148}. Notably, the increase in c-fos transcription by

cisplatin in transformed thyroid cells is dependent on the activation of PKC¹⁴⁹. Other studies have shown that treatment with cisplatin can activate PKC, resulting in increased resistance to cisplatin^{150, 151}. In line with these results, we hypothesize that cisplatin activates PKC in our cell models.

Conclusion

In his study, we observe for the first time that cisplatin, a chemotherapeutic agent used in the treatment of several types of cancers, can lead to increased Bcl-2 mRNA synthesis. We show that Bcl-2 is associated with resistance to cisplatin in endometrial cancer cells. We describe how cisplatin can increase expression of Bcl-2 protein, by de-novo mRNA synthesis. In addition, we demonstrate that cisplatin-dependant increase in Bcl-2 mRNA is regulated by PKC and Akt2. We also show that PKC can regulate Akt activity. Finally, we show how modulation of PKC and Akt2 pathways has an impact on cisplatin-induced apoptosis in endometrial cancer cells.

Acknowledgements

This work has been supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (MOP-66987). A.R. is a holder of a master fellowship from the Canadian Institutes for Health Research. E.A. holds a Canadian Research Chair in Molecular-Gynecology-Oncology. The authors would like to thank Dr. Stanley Korsmeyer for the Bcl-2 plasmid¹⁵².

FIGURE LEGENDS

Fig. 2.1. Endometrial cancer cells show differential sensitivity to apoptosis induced by cisplatin.

HEC-1-A (**A,D,G**), Ishikawa (**B,E,H**) and KLE (**C,F,I**) cells were treated with cisplatin (10μM) for the indicated time, followed by staining with Hoechst, or PI using flow cytometry, and measurement of apoptotic index or followed by monitoring of cleavage of caspase-9, caspase-3 and PARP using western blot. Gapdh was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments. Data are mean ± SEM of three independent experiments. Columns with (*) are significantly different from their respective control (P<0.05).

Fig. 2.2. Cisplatin increases Bcl-2 content in cisplatin-resistant cells. **(A)** Lysates of HEC-1-A, Ishikawa and KLE cells were collected and levels of Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bax and XIAP were monitored using western blot. Gapdh was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments. KLE, HEC-1-A and Ishikawa cells were treated for 24h **(B,C)** or 72h **(D)** with cisplatin (10 μ M) and levels of Bcl-2, Bcl-xL, Bax and XIAP were monitored using western blot. **(E)** Mcf7 cells were treated for 24h with cisplatin (10 μ M) and levels of Bcl-2 were monitored using western blot. Gapdh was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with (*) are significantly different from their respective control (P<0.05).

Fig. 2.3. Bcl-2 overexpression confers resistance to apoptosis induced by cisplatin in endometrial cancer cells. KLE **(A)** and HEC-1-A **(B)** cells were pre-treated with HA14-1 (30 μ M) for 1h, then treated with cisplatin (10 μ M) for 48h, followed by staining with Hoechst and measurement of apoptotic index, or followed by monitoring of cleavage of caspase-9, caspase-3 and PARP using western blot. **(C)** Ishikawa cells stably expressing Bcl-2 or empty plasmid were treated with cisplatin (10 μ M) for 48h, followed by staining with Hoechst and measurement of apoptotic index or followed by monitoring of cleavage of caspase-9, caspase-3 and PARP using western blot. Gapdh was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with (*) are significantly different from their respective control (P<0.05).

Fig. 2.4. Cisplatin increases Bcl-2 content by de-novo mRNA synthesis. **(A)** KLE cells were treated with cisplatin (10 μ M) and actinomycin D (5 μ g/ml) or their respective control for 12h before the levels of Bcl-2 mRNA were monitored using semi-quantitative RT-PCR. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with different letters are significantly different (P<0.05). **(B)** KLE cells were transfected with vector encoding Bcl-2 and then treated with cisplatin (10 μ M) and cycloheximide (50 μ g/ml) or their respective control for 12h. Levels of Bcl-2 were monitored using western blot. Gapdh was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments.

Fig. 2.5. PKC is involved in cisplatin-dependant increase in Bcl-2 mRNA in endometrial cancer cells. **(A)** KLE cells were pre-treated with Calphostin C (1 μ M) for 1h, then treated with cisplatin (10 μ M) for 24h, followed by monitoring of Bcl-2, Pkc and P-Pkc levels using western blot. KLE cells were pre-treated with Calphostin C (1 μ M) for 1h, then treated with cisplatin (10 μ M) and actinomycin D (5 μ g/ml) or their respective control for 12h before **(B)** monitoring of Bcl-2 mRNA using semi-quantitative RT-PCR or **(C)** monitoring of Bcl-2, I κ B and P-I κ B using western blot. **(D)** KLE cells were treated with Calphostin C (1 μ M) for the indicated time and levels of P-Akt and Akt were monitored using western blot. **(E)** KLE cells were pre-treated with the indicated concentration of Chelerythrine Chloride for 1h, then treated with cisplatin (10 μ M) for 24h, followed by monitoring of Bcl-2, Pkc, P-Pkc, P-Akt and Akt levels using western blot. Results are representative of three independent experiments. **(F)** KLE cells were transfected with vectors encoding Bcl-2 or control (empty) vector for 24h, then pre-treated with Calphostin C (1 μ M) for 1h, then treated with cisplatin (10 μ M) for 24h, followed by staining with Hoechst and measurement of apoptotic index or followed by monitoring of levels of Bcl-2 and cleavage of PARP using western blot. **(G)** Ishikawa cells were transfected with vectors encoding Bcl-2 or control (empty) vector, then pre-treated with Calphostin C (1 μ M) for 1h, then treated with cisplatin (10 μ M) for 24h, followed by staining with Hoechst nuclear dye and measurement of

apoptotic index or followed by monitoring of levels of Bcl-2, Pkc, P-Pkc, P-Akt and Akt and cleavage of PARP using western blot. Gapdh was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with (*) are significantly different ($P < 0.05$).

Fig. 2.6. Akt2 is involved in cisplatin-dependant upregulation of Bcl-2 content in endometrial cancer cells. **(A)** Lysates from KLE cells stably expressing Akt1, Akt2, Akt3 or scramble shRNA plasmids were collected and levels of Akt isoforms were monitored using western blot. **(B)** KLE cells stably expressing Akt1, Akt2, Akt3 or scramble shRNA plasmids were treated with cisplatin ($10\mu\text{M}$) and actinomycin D ($5\mu\text{g/ml}$) or their respective control for 12h before monitoring of Bcl-2, I κ B and P-I κ B using western blot. **(C)** KLE cells stably expressing Akt1, Akt2, Akt3 or scramble shRNA plasmids were transfected with vectors encoding Bcl-2 or control (empty) vector for 24h, then treated with cisplatin ($10\mu\text{M}$) for 48h, followed by staining with Hoechst and measurement of apoptotic index, or followed by monitoring of cleavage of caspase-9, caspase-3 and PARP using western blot. Ishikawa cells were transfected with vectors encoding Akt2 or control (empty) vector for 24h, then treated with cisplatin ($10\mu\text{M}$) for 24h **(D)** or 48h **(E)** and levels of Bcl-2, Akt2, P-Akt and cleavage of PARP were monitored using western blot. **(F)** Model of Bcl-2 regulation by cisplatin. Treatment with cisplatin leads to activation of PKC and Akt2, likely through cisplatin-induced DNA damage, which in turn leads to an elevation in transcription of Bcl-2 gene. Increased synthesis of Bcl-2 protein leads to resistance to apoptosis induced by cisplatin in endometrial cancer cells. Gapdh was used as a control to correct for loading and results are representative of three independent experiments. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with (*) are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2.1

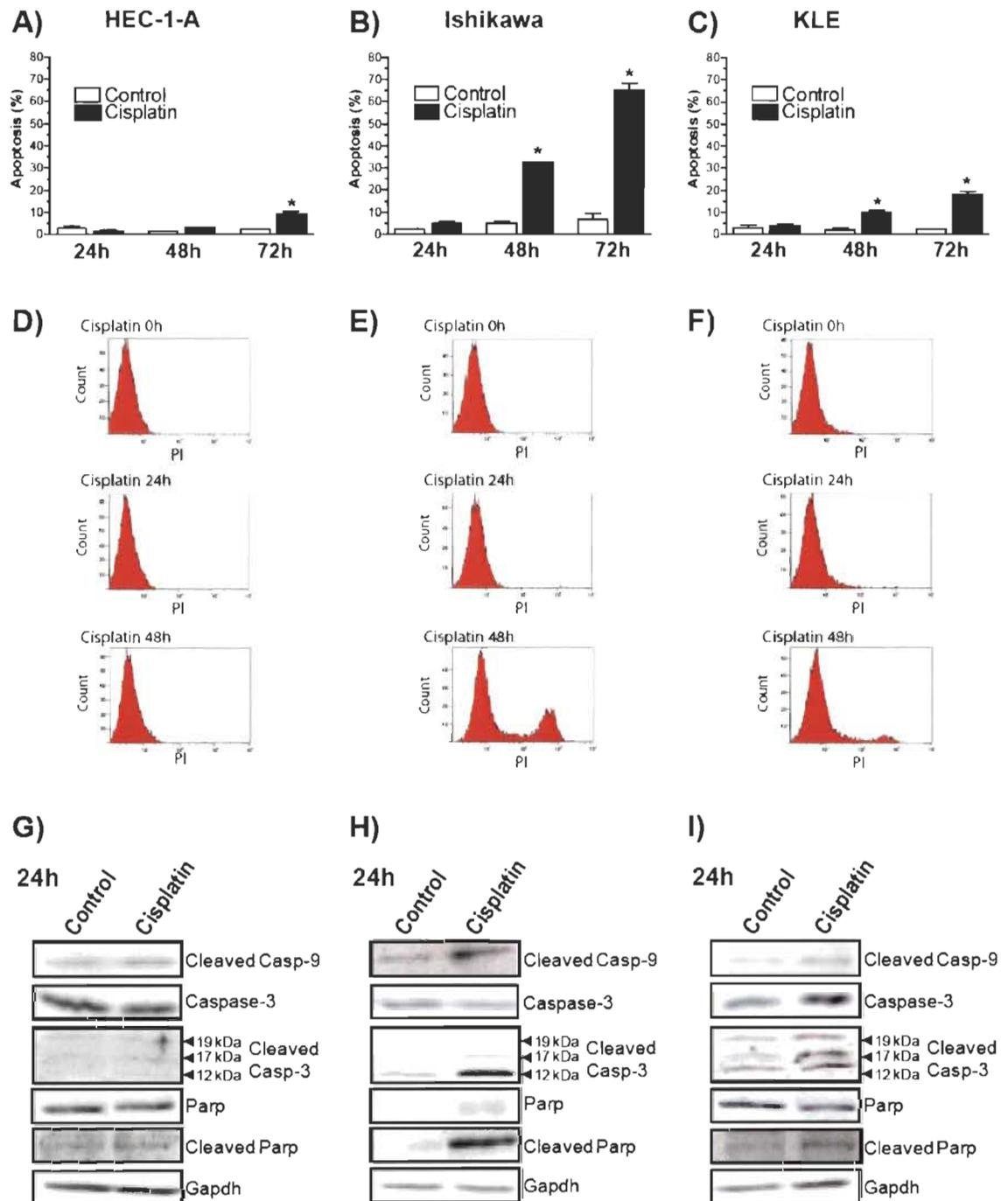


Figure 2.2

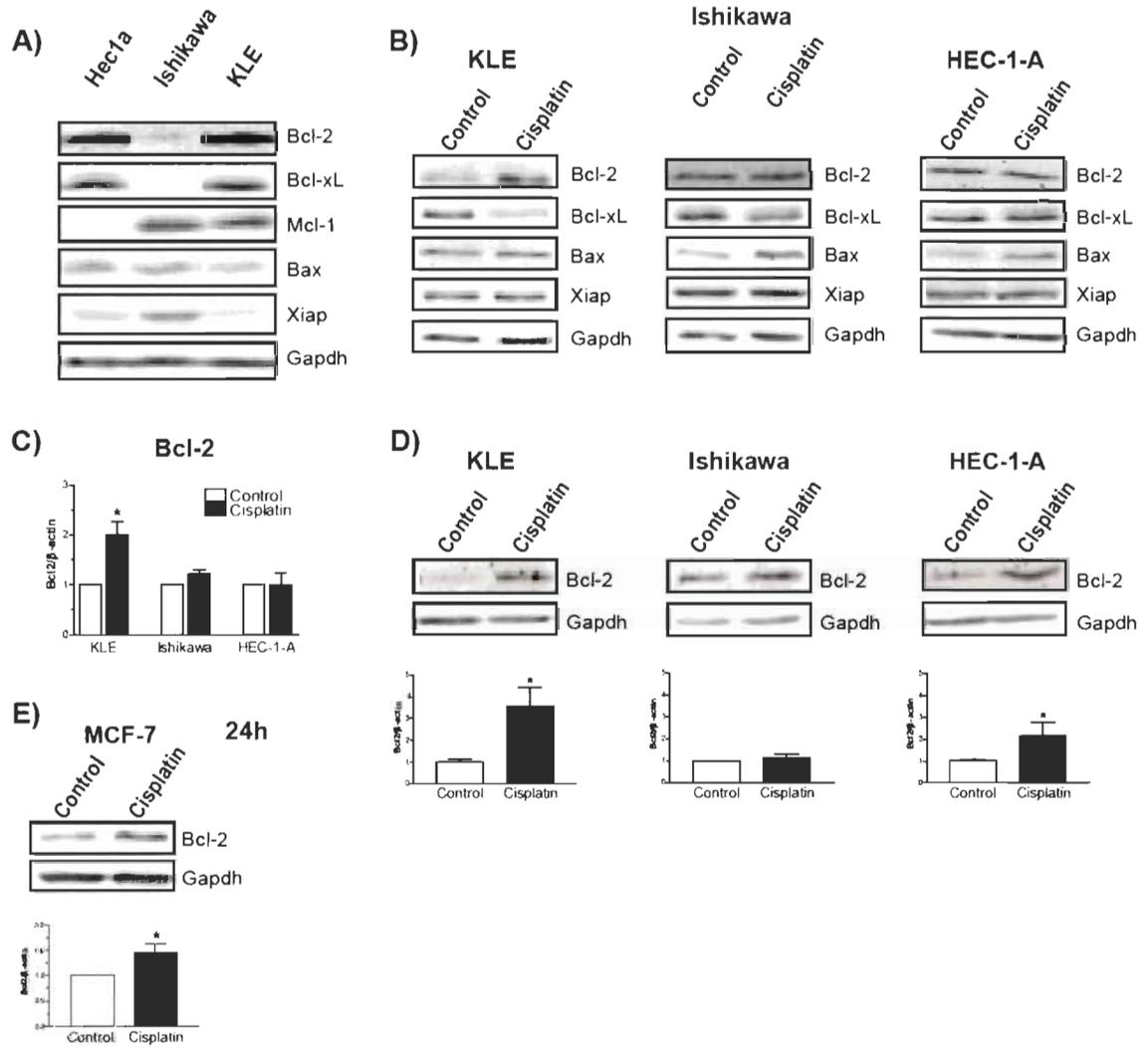


Figure 2.3

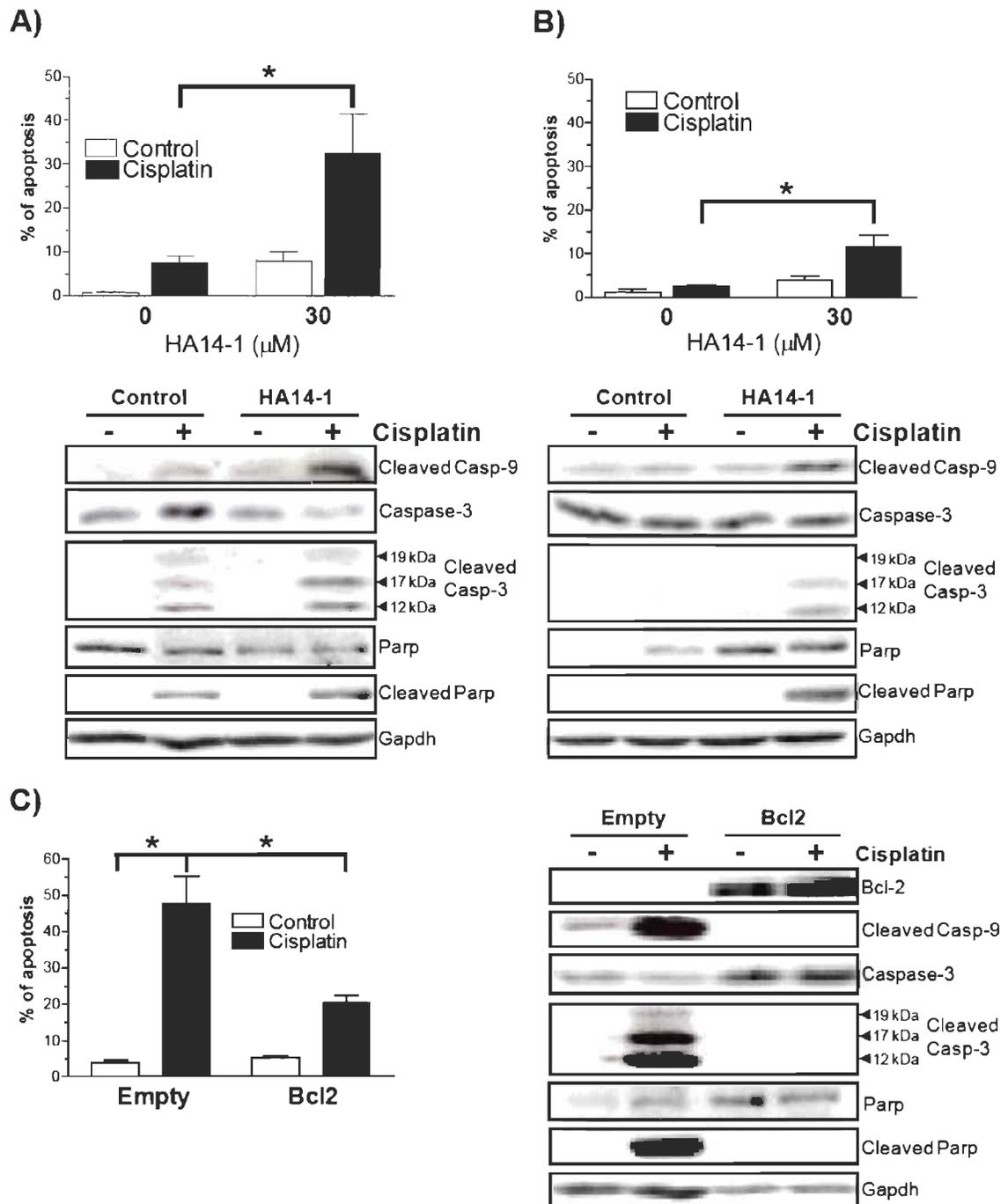


Figure 2.4

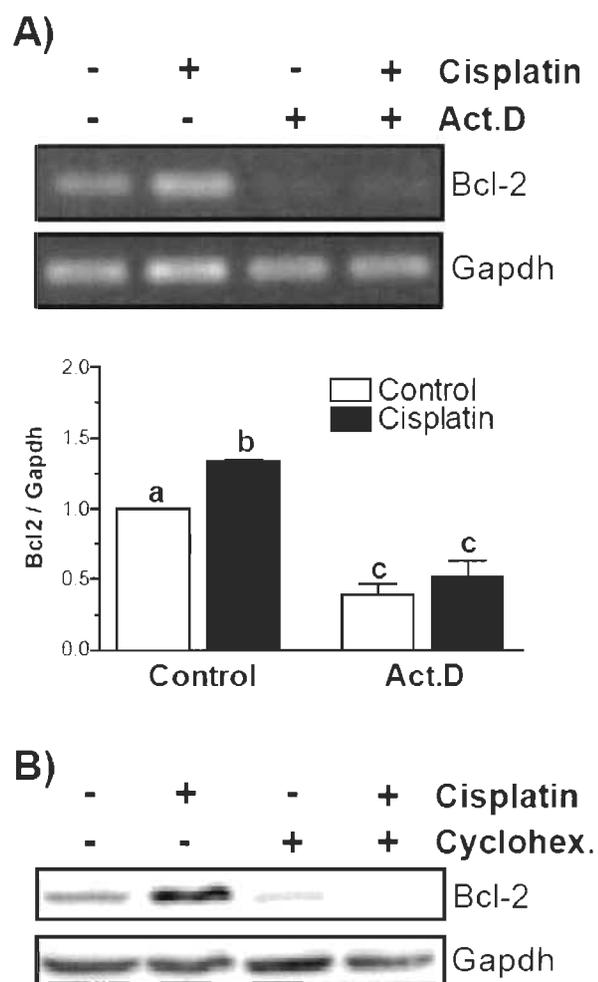


Figure 2.5

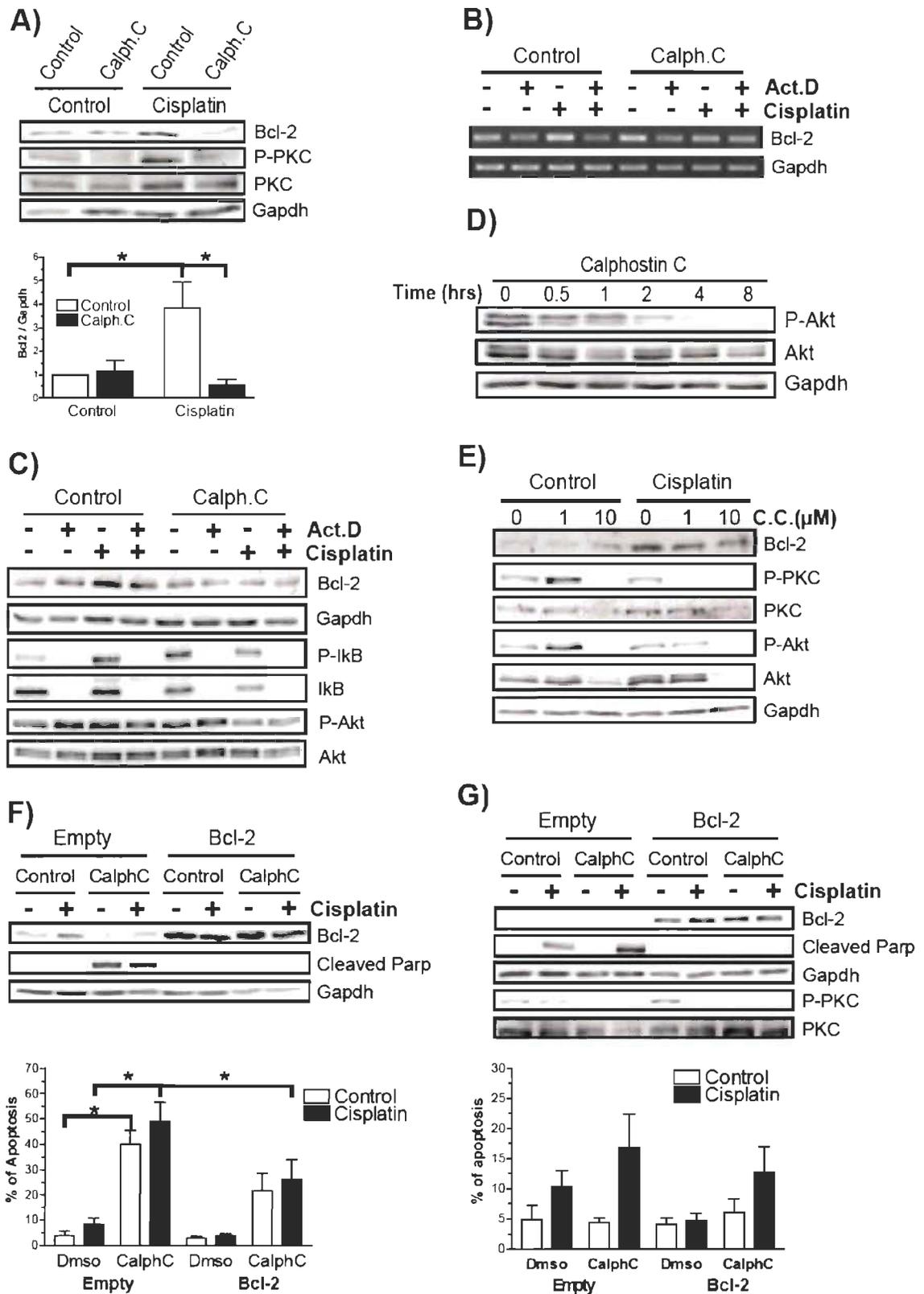
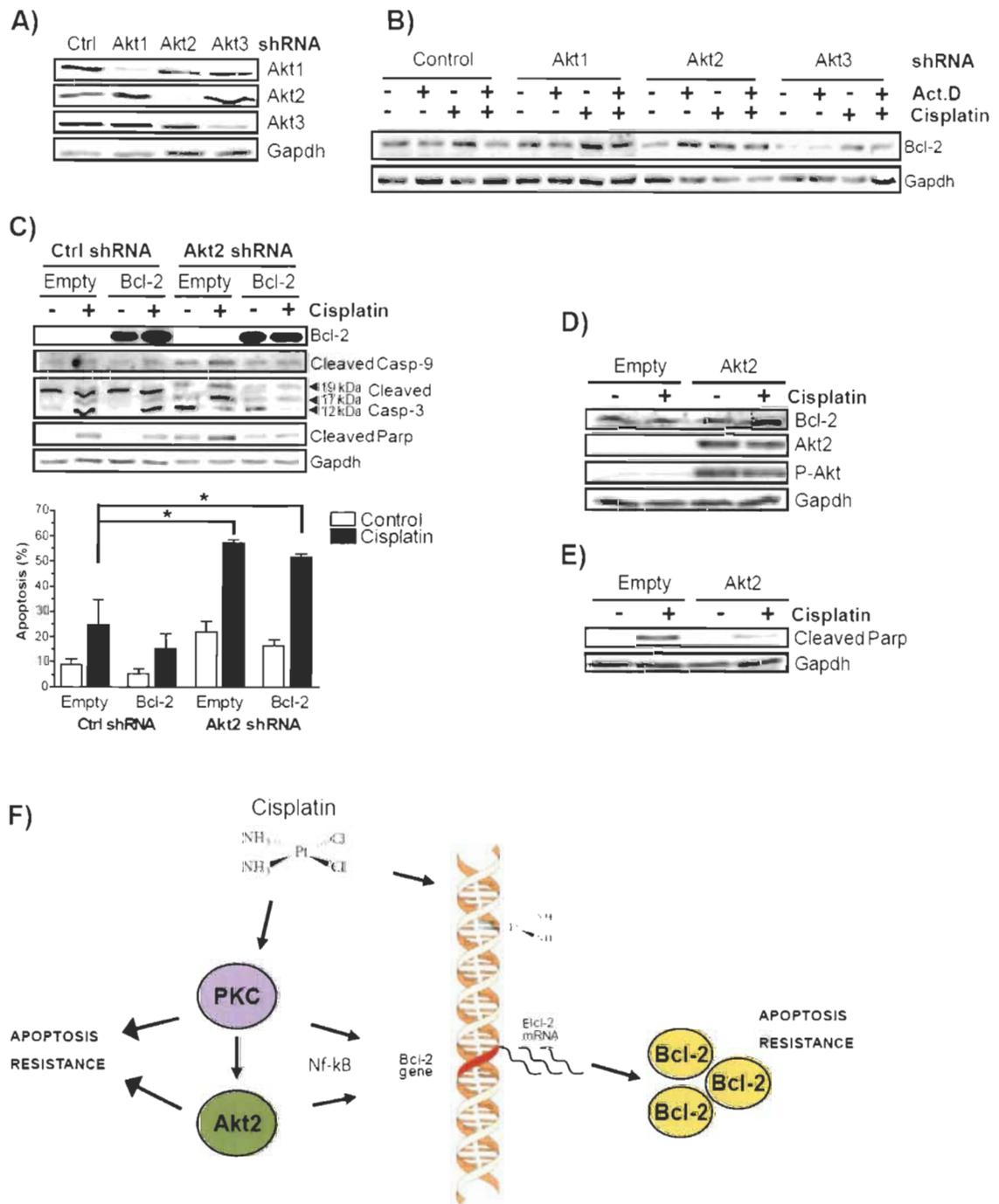


Figure 2.6



CHAPITRE 3

ANALYSE DES MUTATIONS DE P53

L'objectif principal de ce chapitre est de mesurer l'impact de différentes mutations courantes dans le gène P53 impliquées dans la résistance au cisplatine chez les cellules cancéreuses endométriales. Les objectifs spécifiques sont (A) comparer l'expression, l'activité transcriptionnelle et la localisation d'une protéine P53 mutante avec une protéine P53 sauvage et (B) comparer la réponse au cisplatine entre des cellules exprimant P53 mutant et des cellules exprimant la protéine de type sauvage. Nous avons comparé l'activité de la protéine P53 chez trois lignées cancéreuses de l'endomètre (HEC-1-A, KLE et RL-95) possédant une mutation ponctuelle différente dans le gène P53, avec une lignée cancéreuse du sein possédant un gène P53 sauvage (MCF-7)¹⁵³. La lignée HEC-1-A possède une substitution d'une arginine par une glutamine au codon 248 (R248Q) tandis que la lignée KLE possède une substitution d'une arginine par une histidine au codon 175 (R175H). La lignée RL-95 possède une délétion de l'acide aminé valine en position 218 (V218del)¹⁵⁴. Les mutations au niveau des codons 248 et 273 induisent l'immortalisation de cellules épithéliales¹⁵⁵, tandis que l'effet de la mutation au niveau du codon 218 n'a pas été étudié.

Cette étude montre qu'une mutation dans le gène P53 dans le domaine de liaison à l'ADN : 1) est associée à une augmentation de l'expression de la protéine P53 et à sa localisation nucléaire et à une diminution de l'expression de Mdm2, 2) ne perturbe pas l'intégrité du complexe P53/Mdm2, 3) est associée à une perte de l'expression des gènes cibles de P53 et 4) perturbe l'activité pro-apoptotique de la protéine P53 en réponse au cisplatine.

3.1. NIVEAUX DE P53 ET MDM2

Une mutation dans le gène de P53 entraîne souvent une stabilisation de la protéine P53 mutante et donc une augmentation de son expression¹²⁸. Pour vérifier cela dans nos modèles, les niveaux de P53 et de Mdm2 ont été mesurés par immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques de chaque protéine. Au niveau basal, P53 est indétectable chez MCF-7, tandis que son expression est détectée chez HEC-1-A, KLE et RL-95. Les niveaux de P53 sont significativement plus élevés chez HEC-1-A que chez KLE et RL-95. Au niveau basal, Mdm2 est détectée chez toutes les lignées. Son expression est significativement plus élevée chez MCF-7 que chez KLE, HEC-1-A et RL-95 (Figure 3.1).

Ces données montrent qu'une mutation dans le gène P53 corrèle avec une augmentation de l'expression de la protéine P53, ce qui suggère une augmentation de la stabilité de la protéine¹²⁸. De plus, ces données montrent qu'une mutation dans le gène P53 corrèle avec une diminution de la protéine Mdm2, ce qui suggère une perte d'activité de la protéine P53 car Mdm2 est une cible transcriptionnelle de P53¹¹⁴.

3.2. RÉGULATION DIFFÉRENTIELLE DE L'ACTIVITÉ DE P53

Il a été démontré qu'une mutation dans le gène P53 rendait la protéine mutante beaucoup plus stable à cause d'une liaison déficiente avec Mdm2¹²⁸. Pour déterminer si P53 était liée à Mdm2 dans nos lignées cellulaires, nous avons utilisé la technique d'immunoprécipitation. Cette technique consiste à lier un antigène avec un anticorps spécifique, puis à lier l'anticorps avec des billes de sépharose couplées à la protéine A qui possède une forte affinité pour la portion constante des anticorps. Le complexe antigène-anticorps-protéine A-bille sépharose formé pourra être précipité et ainsi isolé grâce au poids élevé des billes. Après immunoprécipitation avec un anticorps spécifique contre Mdm2, l'expression de P53 a été analysée. Chez toutes les lignées, P53 et Mdm2

sont présents dans les extraits totaux de protéines. Également, dans chaque lignée, P53 est détectée lorsque Mdm2 est immunoprécipité. L'immunoprécipitation avec un anticorps isotypique (anti-HA) confirme que l'interaction entre P53 et Mdm2 est spécifique (Figure 3.2A). Ces données suggèrent qu'une mutation dans le gène P53 n'abroge pas totalement la liaison de la protéine avec Mdm2, de façon qualitative à tout le moins.

Pour déterminer si P53 est toujours actif dans nos différents modèles, nous avons utilisé un inhibiteur sélectif de Mdm2, la Nutlin-3a. L'utilisation de cet inhibiteur est pertinente à la lumière des résultats obtenus à la section précédente confirmant que Mdm2 est lié à P53 dans nos modèles. L'inhibition de Mdm2 stabilise la protéine P53 et entraîne une augmentation de la transcription des gènes régulés par P53 lorsque le gène P53 est intact¹²⁴. En effet, chez la lignée MCF-7, l'expression de P53 est fortement augmentée et l'expression des gènes-cibles Mdm2 et Bax est aussi augmentée en réponse à la Nutlin-3a par immunobuvardage Western (Figure 3.2B). L'expression de l'ARNm du récepteur Fas est aussi augmentée en réponse à la Nutlin-3a par RT-PCR (Figure 3.2C). Les lignées HEC-1-A et RL-95 montrent une stabilisation de P53 en réponse à la Nutlin-3a, mais de façon moindre que chez MCF-7. Il n'y a aucune variation dans les niveaux de P53 chez la lignée KLE (Figure 3.2B). Chez HEC-1-A, l'expression de Mdm2 et du récepteur Fas est aussi augmentée, mais de façon moindre que chez MCF-7, et les niveaux de Bax ne varient pas. Cependant, chez KLE et RL-95, les niveaux de Bax et de Mdm2 ne varient pas en réponse à la Nutlin-3a (Figure 3.2B, C). L'ARNm du récepteur Fas est diminuée chez KLE tandis qu'elle n'est pas détectable chez RL-95 (Figure 3.2C). Ces données suggèrent qu'une mutation dans le gène P53 corrèle avec une perte de l'expression des gènes-cibles Mdm2, Bax et FasR en réponse à l'inhibition de Mdm2.

Pour déterminer si Mdm2 peut influencer la localisation de P53 dans nos différents modèles nous avons utilisé la technique d'immunofluorescence. Mdm2 est impliqué dans l'export nucléaire de P53¹¹⁶. Elle consiste à utiliser un fluorochrome couplé de

façon indirecte à un anticorps spécifique pour P53 sur des cellules fixées. Chez la lignée MCF-7, P53 est localisée dans le cytoplasme de façon endogène (Figure 3.2D). Après traitement avec la Nutlin-3a, P53 est importé au niveau du noyau (Figure 3.2D). Chez les lignées HEC-1-A, KLE et RL-95, P53 est localisé au noyau de façon endogène (Figure 3.2D) et le traitement avec la Nutlin-3a n'influence pas sa localisation (Figure 3.2D). Donc, ces résultats suggèrent qu'une mutation dans le gène P53 corrèle avec la localisation nucléaire de la protéine P53.

3.3 ACTIVATION DES PROCESSUS APOPTOTIQUES

Pour déterminer si P53 est impliqué dans l'apoptose induite par le cisplatine lorsque son gène est muté, nous avons diminué l'expression de son ARNm par interférence à l'ARN chez les lignées KLE et HEC-1-A et nous avons ensuite traité les cellules avec du cisplatine. Chez KLE, les niveaux de P53 sont diminués de façon importante lorsque les cellules sont transfectées avec siRNA dirigé contre P53 en comparaison avec une séquence contrôle, avec ou sans cisplatine. Le siRNA de P53 combiné avec un traitement au cisplatine diminue légèrement le clivage des caspases 9 et 3 et de PARP en comparaison avec le traitement au cisplatine en présence du siRNA contrôle, mais n'a aucun impact sur les niveaux totaux d'apoptose. Le traitement au cisplatine chez les cellules KLE transfectées avec le siRNA contrôle augmente l'expression de Bax. Cependant, la diminution de P53 par siRNA bloque l'induction de Bax induite par le cisplatine (Figure 3.3A). La diminution de P53 par siRNA ainsi que le traitement au cisplatine n'ont aucun impact sur les niveaux de Mdm2 (Figure 3.3A). Chez la lignée HEC-1-A, les niveaux de P53 sont augmentés en réponse au cisplatine tandis que le siRNA de P53 bloque cette augmentation. Le siRNA de P53 combiné avec un traitement au cisplatine diminue légèrement le clivage des caspases 9 et 3 et de PARP ainsi que l'induction de Bax et Mdm2 en comparaison avec le traitement au cisplatine en présence du siRNA contrôle, mais n'a aucun impact sur l'induction de l'apoptose (Figure 3.3B). Donc, ces résultats suggèrent que la diminution du gène P53 par ARN

interférant n'a aucun impact sur l'apoptose induite par le cisplatine, même si le facteur pro-apoptotique Bax est augmenté en réponse au cisplatine.

Afin de comparer l'effet de la diminution de P53 mutant sur l'apoptose avec la diminution de P53 sauvage, nous avons utilisé la lignée MCF-7. Tout d'abord, nous avons tenté de transfecter ces cellules avec le siRNA de P53. Après plusieurs tentatives, le taux de transfection des cellules MCF-7 était faible et la diminution de l'expression de P53 était trop faible pour avoir un effet cellulaire quelconque. Nous avons donc utilisé une autre approche, c'est-à-dire d'inhiber Mdm2 avec un traitement à la Nutlin-3a afin de stabiliser et de rendre actif P53 dans le but d'étudier son impact sur l'apoptose. Suite au traitement avec la Nutlin-3a chez MCF-7, P53 est stabilisé et l'expression de Bax est augmentée. Le clivage de la caspase 9 et de PARP ainsi que l'apoptose sont augmentés suite au traitement avec la Nutlin-3a tandis que l'expression de XIAP, un inhibiteur de l'activation des caspases 3, 7 et 9, demeure inchangée (Figure 3.4A). Ces données suggèrent que la Nutlin-3a active P53 et son gène-cible Bax pour induire de l'apoptose chez la lignée MCF-7.

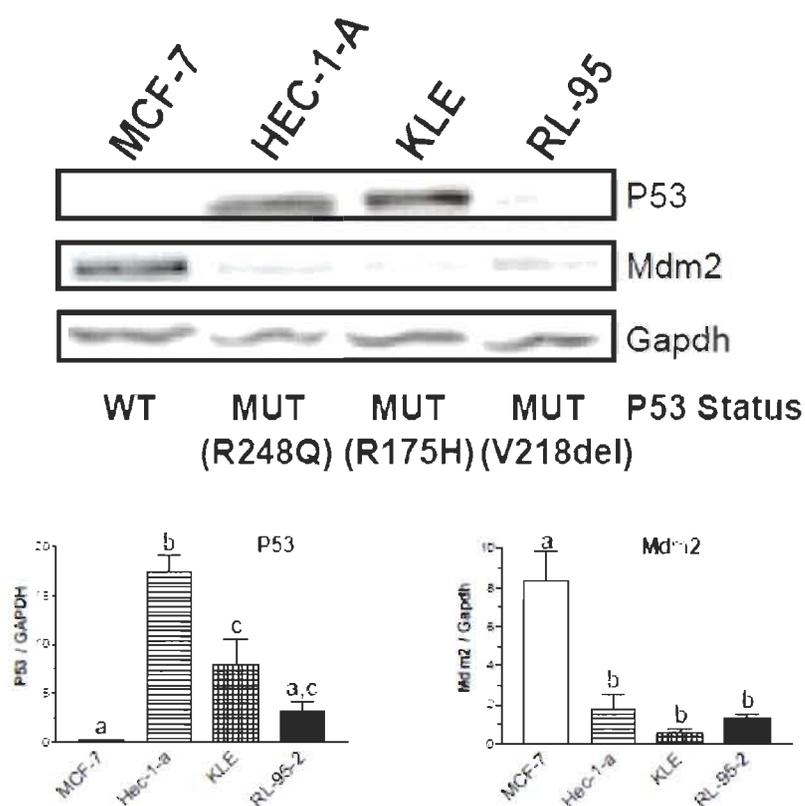
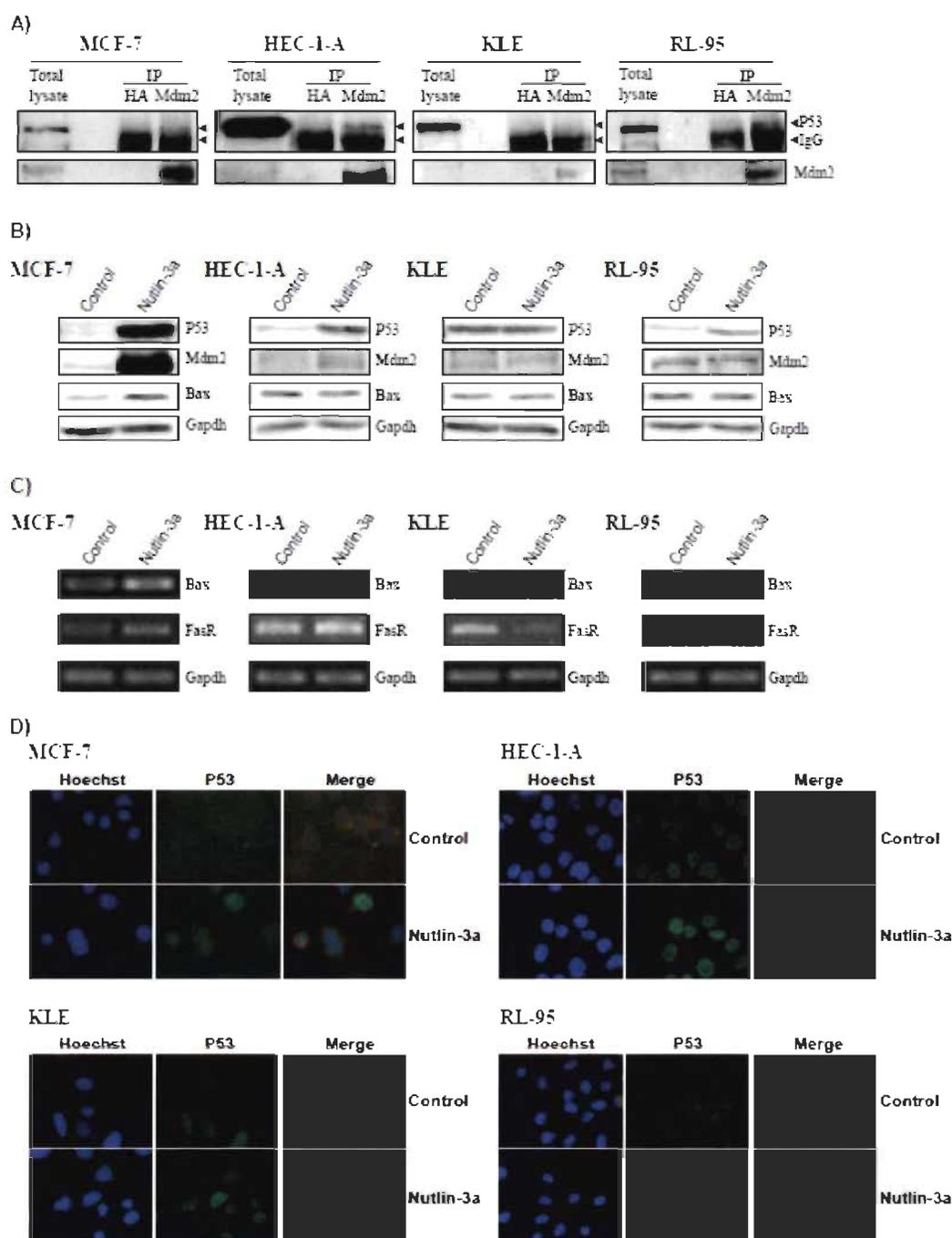


FIGURE 3.1

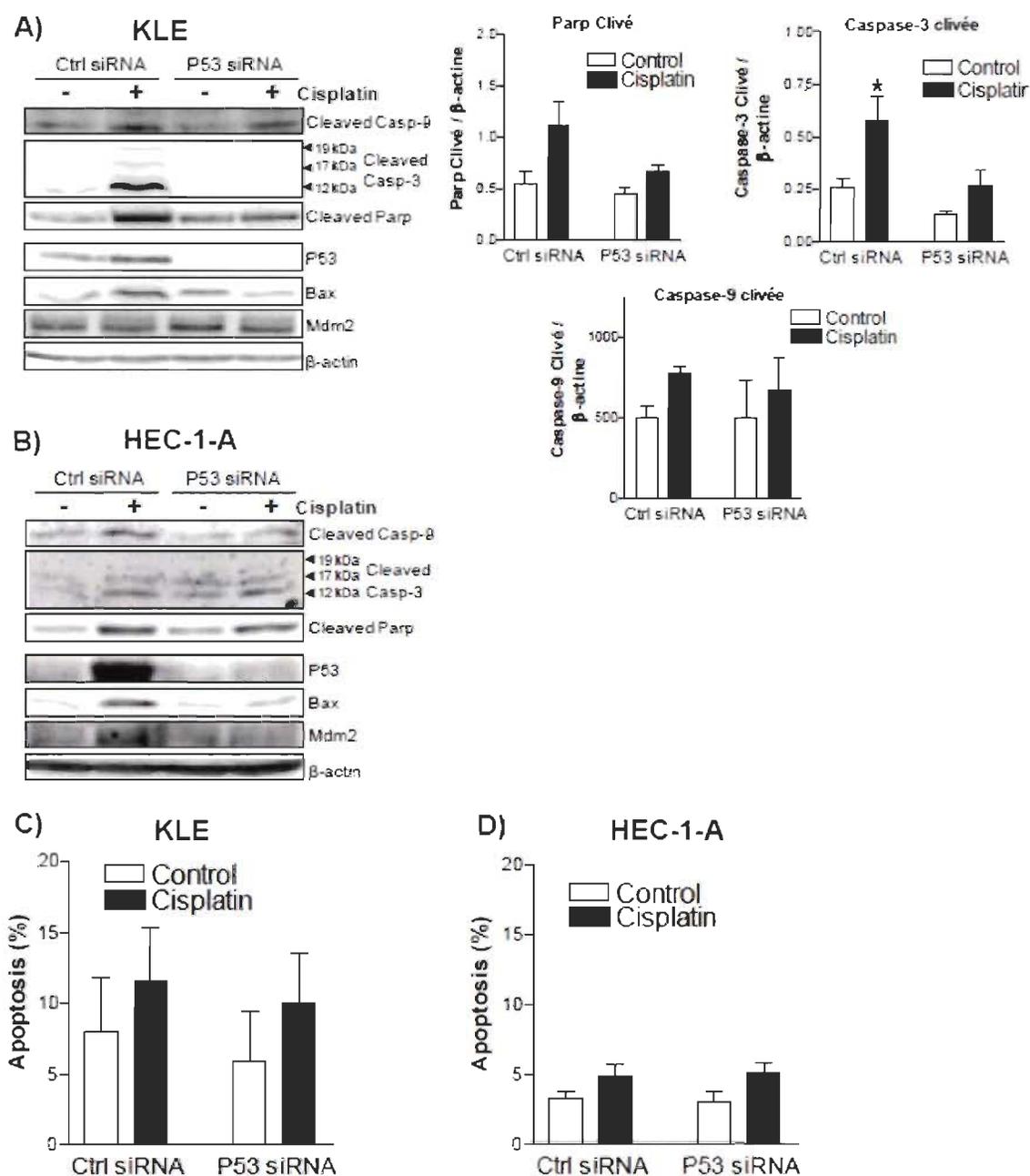
P53 est augmentée et Mdm2 est diminuée lorsque le gène P53 est muté.

Des lysats totaux de MCF-7, de HEC-1-A, de KLE et de RL-95 furent récoltés et les niveaux de P53 et de Mdm2 furent mesurés par immunobuvardage Western. La Gapdh fut utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes et correspondent à la moyenne \pm erreur-type. Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$).

**FIGURE 3.2**

Les mutations dans le gène P53 influencent son activité et sa localisation.

(A) Des lysats totaux furent immunoprécipités avec anti-HA ou anti-Mdm2 et les niveaux de P53 et Mdm2 furent mesurés par immunobuvardage western. Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec 25 μ M de Nutlin-3a et (B) les niveaux de P53, de Bax et de Mdm2 ont été mesurés par immunobuvardage Western, (C) les niveaux d'ARNm de FasR et de Bax ont été mesurés par RT-PCR ou (D) la localisation intracellulaire de P53 et de Mdm2 a été visualisée par immunofluorescence. La GAPDH fut utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes.

**FIGURE 3.3**

Les mutations dans le gène P53 augmentent l'apoptose induite par le cisplatine.

Les cellules KLE (A,C) ou HEC-1-A (B,D) furent transfectées 24h avec une séquence siRNA contrôle ou P53 et traitées 24h avec du cisplatine (10 μ M), suivi d'un marquage au Hoechst pour le décompte d'apoptose (C, D) ou suivi de la mesure du clivage des caspases et de PARP et des niveaux de Bax, Mdm2 et P53 par immunobuvardage Western (A, B). La β -actine fut utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de trois (A, C, D) ou une (B) expérience indépendante et correspondent à la moyenne \pm erreur-type. Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$).

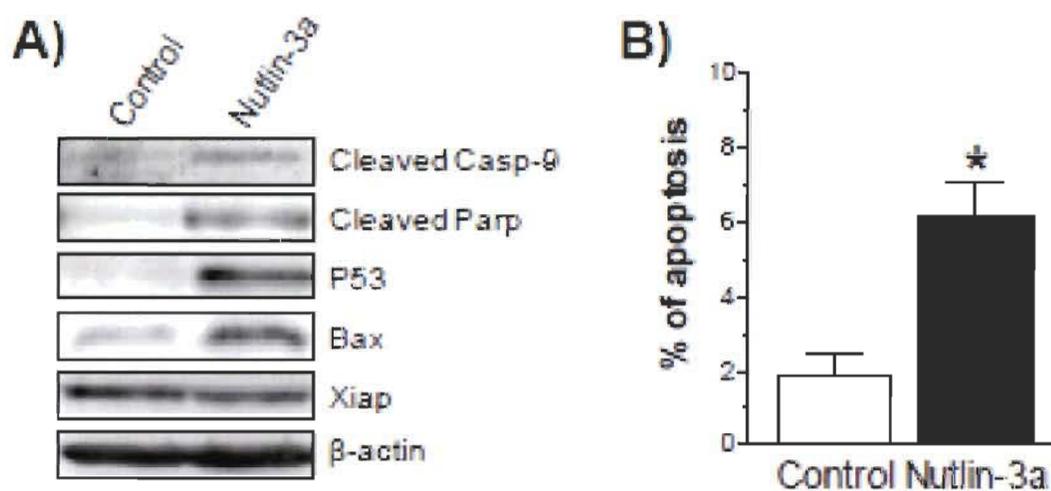


FIGURE 3.4

P53 sauvage augmente l'apoptose induite par le cisplatine

Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 24 h avec 25 μ M de Nutlin-3a), suivi d'un marquage au Hoechst pour le décompte d'apoptose ou suivi de la mesure du clivage des caspases et de PARP et des niveaux de Bax, XIAP et P53 par immunobuvardage Western. La β -actine fut utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes et correspondent à la moyenne \pm erreur-type. Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différents ($P < 0.05$).

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 DISCUSSION

Les cancers de l'endomètre montrent souvent de la résistance intrinsèque ou acquise à la mort cellulaire par apoptose, ce qui limite beaucoup le succès du traitement au cisplatine, l'agent de chimiothérapie couramment utilisé au niveau de ce type de cancer. Dans la présente étude, nous avons évalué le rôle de la famille de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 associé à la résistance au cisplatine, nous avons étudié la régulation de la protéine Bcl-2 après un traitement au cisplatine et l'impact de cette régulation sur l'induction de l'apoptose et finalement, nous avons mesuré l'impact de mutations dans le gène P53 sur la réponse à l'apoptose induite par le cisplatine au niveau des cellules cancéreuses endométriales.

Les lignées cancéreuses endométriales KLE et HEC-1-A sont deux excellents modèles pour l'étude des mécanismes impliqués dans la chimiorésistance : nous avons déjà démontré que ces cellules étaient très résistantes au cisplatine^{41, 110}. Nous avons comparé les mécanismes pro-apoptotiques activés par le cisplatine dans ces cellules avec ceux des cellules Ishikawa, une lignée d'adénocarcinome endométrial sensible à la chimiothérapie. Le cisplatine induisait beaucoup d'apoptose chez Ishikawa tandis que les cellules HEC-1-A et KLE étaient plus résistantes au traitement par le cisplatine. Tel que décrit précédemment par Gagnon et al^{41, 110}, nous avons observé que le cisplatine peut activer la voie mitochondriale de l'apoptose dans toutes les lignées cellulaires grâce aux fragments clivés de caspase-9, -3 et de PARP détectés suite à l'exposition au cisplatine. Ce phénomène a déjà été observé dans d'autres types de cancers^{139, 156}. Cependant, les fragments de caspase-9 clivés était présents en très faibles quantités chez KLE et HEC-1-A, ce qui suggère que le relargage du cytochrome c ainsi que la

formation de l'apoptosome étaient fortement inhibés¹⁵⁷. Le relargage du cytochrome c est favorisé par les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl2 : Bax et Bak. Cependant, une étude a démontré que l'induction de Bax était retardée en présence de niveaux élevés de Bcl-2⁵⁹, suggérant plutôt un rôle prépondérant pour Bcl-2 par rapport à Bax. C'est pourquoi nous avons concentré notre attention sur les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), car il a été démontré qu'ils peuvent inhiber le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol et empêcher l'activation de la voie mitochondriale apoptotique^{49, 51, 52}. Après avoir mesuré les niveaux de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dans nos lignées et avoir corrélé les résultats avec la réponse à l'apoptose, nous avons trouvé que les niveaux de Bcl-2 et de Bcl-xL, mais pas ceux de Mcl-1, corrélaient avec la réponse au cisplatine dans nos lignées cancéreuses endométriales. Nous avons ensuite mesuré l'effet du traitement au cisplatine sur Bcl-2 et Bcl-xL en fonction du temps. De façon surprenante, les niveaux de Bcl-xL étaient diminués de façon significative tandis que les niveaux de Bcl-2 étaient augmentés de façon significative chez la lignée résistante KLE suite au traitement au cisplatine. Cette augmentation de Bcl-2 était aussi observée chez la lignée résistante HEC-1-A, mais avec un délai. De plus, les niveaux de Bcl-2 étaient inchangés suite au traitement au cisplatine chez les cellules sensibles Ishikawa, ce qui suggère que l'augmentation des niveaux de Bcl-2 suite au traitement au cisplatine chez les cellules résistantes est un mécanisme de résistance cellulaire acquise contre la chimiothérapie par le cisplatine. De plus, ces résultats suggèrent que Bcl-2 joue un rôle prépondérant par rapport à Bcl-xL et Mcl-1 dans la résistance à l'apoptose induite par le cisplatine, même si des travaux antérieurs ont décrits Bcl-xL comme prédicteur de chimiorésistance devant Bcl-2 chez les cellules cancéreuses endométriales⁷¹. Toutefois, l'implication de Bcl-XL et Mcl-1 dans la résistance à la cisplatine ne peut pas être totalement exclue à moins d'utiliser une diminution ou une surexpression de chaque protéine séparément avant un traitement au cisplatine dans nos modèles. Néanmoins, nous émettons l'hypothèse que Bcl-xL et Mcl-1 pourrait accroître l'apoptose induite par le cisplatine dans nos modèles, mais dans une moindre mesure que Bcl-2 à cause de la régulation négative de Bcl-xL par le cisplatine ainsi que l'absence de corrélation des niveaux de

Mcl-1 avec la résistance au cisplatine dans nos modèles. Fait intéressant à noter, à notre connaissance, c'est la première fois qu'une augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2 par un agent de chimiothérapie ciblant l'ADN est décrite.

Pour déterminer l'implication de Bcl-2 dans la résistance au cisplatine, nous avons utilisé une molécule inhibitrice de Bcl-2, HA14-1, qui induit l'apoptose dans des cellules de leucémie qui surexpriment Bcl-2 par un mécanisme dépendant de la voie mitochondriale¹³⁵. En effet, l'inhibition de Bcl-2 chez KLE et HEC-1-A, deux lignées résistantes surexprimant Bcl-2, a mené à une augmentation significative de l'apoptose induite par le cisplatine. Il est bien connu que Bcl-2 est capable de bloquer l'activation de Bax, ce qui inhibe le relargage du cytochrome c et l'activation des caspases⁵². Effectivement, l'inhibition de Bcl-2 a augmenté de façon significative le clivage des caspases-9 et -3 et de PARP induit par le cisplatine, menant à l'apoptose mitochondriale. Même s'il a été démontré que Bcl-2 peut bloquer l'apoptose caspase-indépendante⁴², nous n'avons pas détecté de translocation d'AIF vers le noyau. Nous avons confirmé ces résultats en surexprimant Bcl-2 à l'aide d'un vecteur d'expression chez la lignée sensible Ishikawa. L'expression de Bcl-2 a diminué de façon significative l'apoptose induite par le cisplatine et a fortement inhibé le clivage des caspases-9 et -3 ainsi que de PARP. Collectivement, nos résultats démontrent pour la première fois que Bcl-2 joue un rôle clé dans l'inhibition de l'apoptose induite par le cisplatine dans les cellules cancéreuses de l'endomètre, de façon similaire à d'autres types cellulaires^{47, 62}.

Nous avons analysé plus en détails l'origine de cette augmentation des niveaux de Bcl-2 suite au traitement par le cisplatine dans les cellules cancéreuses résistantes. L'analyse par RT-PCR suggère que l'ARNm de Bcl-2 est augmenté en réponse au cisplatine. De plus, cet effet est bloqué en combinaison avec l'actinomycine D, un inhibiteur de transcription, ce qui suggère que l'augmentation se produit par une synthèse accrue d'ARNm, et non pas une augmentation de la stabilisation de l'ARNm déjà transcrit. Dû au fait que le RT-PCR semi-quantitatif est une technique moins sensible que le PCR en temps réel pour détecter les petites variations d'ADNc¹⁵⁸, nous

avons confirmé le résultat obtenu précédemment en combinant le cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, avec le traitement au cisplatine. En effet, le cycloheximide a pu bloquer l'augmentation des niveaux de Bcl-2 par le cisplatine. Cette expérience exclue la possibilité qu'un mécanisme post-traductionnel agisse sur Bcl-2, même s'il a été suggéré qu'Akt peut stabiliser Bcl-2 par la neutralisation de Bad et que la caspase-3 activée peut dégrader Bcl-2^{37, 140}.

Nous avons constaté que PKC est fortement activée chez les cellules KLE et non chez les cellules Ishikawa. L'inhibition de PKC par la calphostine c et par le « chelerythrine chloride » n'a eu aucun impact sur le niveau basal de Bcl-2, mais bloque l'augmentation des niveaux de Bcl-2 induit par le cisplatine. Ces données suggèrent que le cisplatine agit sur Bcl-2 via la voie PKC. Cependant, l'inhibition de PKC ne semble pas avoir d'impact direct sur la synthèse de Bcl-2 au niveau endogène, contrairement à ce qui a été observé au niveau du cancer de la prostate et du neuroblastome^{72, 73}. De plus, nous avons trouvé que l'inhibition de PKC augmente la sensibilité des cellules cancéreuses endométriales Ishikawa et KLE à l'apoptose induite par le cisplatine, de façon partiellement dépendante de Bcl-2. En effet, la surexpression de Bcl-2 a partiellement bloqué l'apoptose induite par la combinaison cisplatine-calphostine c. Ainsi, nos résultats suggèrent un rôle pour la voie PKC dans la résistance au cisplatine en partie par une diminution de l'expression de Bcl-2 chez les cellules cancéreuses de l'endomètre. Le laboratoire du Dr. Asselin a récemment démontré que l'inhibition de PKC rendait les cellules cancéreuses endométriales sensibles au traitement par le « Tumor Necrosis Factor α » (TNF- α)¹⁴¹. D'autres études ont démontré que l'inhibition de PKC sensibilisait d'autres types de cancers à l'apoptose induite par le cisplatine^{72, 86}. À notre connaissance, c'est la première étude qui montre que l'inhibition de PKC au niveau du cancer de l'endomètre potentialise l'apoptose induite par le cisplatine.

De plus, l'inhibition de PKC a permis à lui seul d'augmenter l'apoptose de façon significative chez les cellules KLE qui expriment une grande quantité de PKC actif. De ce résultat pourrait découler deux explications. La première possibilité implique une

toxicité non-spécifique de l'inhibiteur en raison d'une dose trop forte. De plus, une étude récente suggère que la calphostine c induit l'apoptose de cellules tumorales par la dégradation de la lamine nucléaire B1⁸⁷. Toutefois, cette hypothèse a été exclue à cause de la faible réponse apoptotique induite par la calphostine c chez les cellules Ishikawa exprimant moins de PKC actif que KLE. La seconde possibilité, qui semble plus probable, est que PKC est un régulateur important de la survie cellulaire au niveau basal chez la lignée KLE. De plus, plusieurs études ont suggéré que PKC est un facteur clé dans la régulation de l'apoptose et que la majorité des isoformes promeuvent la survie cellulaire (revue dans⁸⁴).

Les inhibiteurs de PKC utilisés dans notre étude sont des inhibiteurs à large spectre, possédant une activité sur plusieurs isoformes : le « chelerythrine chloride » inhibe les isoformes α , β , δ , γ et la calphostine c inhibe les isoformes θ et η en plus de PKC α , β , δ , ϵ , γ . Donc, il est impossible de savoir à ce stade quels isoformes spécifiques de PKC sont impliquées dans la régulation de l'expression de Bcl-2 chez les cellules KLE. De façon intéressante, quelques études ont suggéré que PKC-alpha, -delta et -epsilon sont associés à la fois à la survie cellulaire ainsi qu'à la régulation de Bcl-2^{73, 77, 85, 142, 143, 145}. Toutefois, en raison du fait que la lignée Ishikawa exprime des niveaux élevés de PKC-alpha, on peut émettre l'hypothèse que cet isoforme n'est pas impliqué dans la régulation de Bcl-2⁸⁵. L'identification de(s) l'isoforme (s) impliqué (s) dans la régulation de Bcl-2 fera l'objet d'une autre étude.

Afin d'identifier des facteurs pouvant agir en aval de PKC pour la régulation de Bcl2, nous avons examiné l'activation de la voie PI-3K/Akt dans nos modèles. Akt (ou protéine kinase B) est une sérine/thréonine kinase possédant une homologie avec les protéines kinases A et C. Des études ont démontrés que PKC pouvait réguler l'activité d'Akt positivement^{136, 159} ou négativement^{160, 161}. De plus, une étude a démontré qu'Akt peut réguler l'expression de l'ARNm de Bcl-2⁷⁴. Jusqu'à ce jour, trois isoformes d'Akt, Akt1, Akt2 et Akt3, ont été identifiés chez l'homme. Nous avons trouvé qu'Akt, surtout Akt2, était requis pour l'induction de Bcl-2 par le cisplatine chez les cellules KLE. Nous

nous sommes ensuite demandés si Akt agissait en amont de PKC ou de façon complètement indépendante. Nous avons découvert que l'inhibition de PKC par le « chelerythrine chloride » pouvait diminuer la phosphorylation d'Akt en fonction du temps d'exposition, et ce, dès la première heure. La diminution dans la phosphorylation était plus prononcée sur Akt2, ce qui explique le rôle majeur de cet isoforme dans la régulation de l'augmentation des niveaux de Bcl-2 en réponse au traitement au cisplatine. Par contre, la phosphorylation des isoformes d'Akt 1 et 3 était aussi diminuée, mais dans une moindre mesure que P-Akt2. Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi les cellules KLE déficientes en Akt1 (clone shRNA-Akt1) réussissent à bloquer de façon partielle l'augmentation de Bcl-2 induite par le cisplatine en comparaison avec les cellules parentales. Ces données suggèrent que le cisplatine agit à travers PKC, qui à son tour agit par Akt2, pour moduler les niveaux de Bcl-2 dans les cellules cancéreuses endométriales. Pour confirmer les résultats obtenus avec les shRNA et aussi pour tenter d'inactiver tous les isoformes de façon simultanée, nous avons utilisé un inhibiteur de la PI-3K, le LY294002. Cependant, la lignée KLE montre une grande résistance à cet agent et nous n'avons pas réussi à diminuer la phosphorylation d'Akt de façon significative après 1 heure.

La diminution des niveaux d'Akt2 par interférence à l'ARN (shRNA) chez KLE a augmenté de façon significative l'apoptose induite par le cisplatine. De plus, ce mécanisme était partiellement dépendant de Bcl-2 car le clivage des caspases était partiellement bloqué par la réinsertion de Bcl-2 chez les cellules KLE/shRNA-Akt2 traitées au cisplatine. Lorsqu'un phénomène est observé chez une lignée cellulaire unique dérivé d'un cancer, il y a toujours lieu de se demander si on peut l'extrapoler à toutes les lignées dérivées de ce cancer ou bien si c'est seulement un événement isolé. Nous avons confirmé que ce n'est pas un événement isolé en utilisant un vecteur d'expression Akt2-constitutivement actif que nous avons transfecté chez la lignée Ishikawa qui possède seulement Akt1 et Akt3 actifs (phosphorylés). En effet, le traitement au cisplatine augmente les niveaux de Bcl-2 en présence du vecteur Akt2 et non en présence du vecteur vide. Étant donné que PKC agit sur Bcl-2 à travers Akt2,

nous avons conclu que la stimulation de l'activité de PKC, ou la surexpression d'isoformes spécifiques de PKC, était inutile et que la surexpression d'Akt2 chez Ishikawa était suffisante pour suggérer que le cisplatine active l'expression de Bcl-2 par un mécanisme dépendant de PKC-Akt2. Cependant, l'augmentation de l'expression de Bcl-2 en réponse au cisplatine en présence d'Akt2 chez Ishikawa n'est pas aussi robuste que chez la lignée KLE. De ce résultat pourrait découler l'hypothèse que la stimulation moins forte de PKC sur Akt chez les cellules Ishikawa affecte partiellement l'augmentation des niveaux de Bcl-2. La surexpression d'Akt2 chez les cellules Ishikawa diminue le clivage de PARP induit par le cisplatine. Ceci confirme le rôle d'Akt2 dans la résistance au cisplatine chez les cellules cancéreuses endométriales, comme une étude précédente au laboratoire du Dr. Asselin a déjà suggéré⁴¹.

Chez la lignée KLE, la capacité de la surexpression de Bcl-2 à bloquer l'apoptose induite par le cisplatine était moins élevée chez les cellules Akt2-déficientes que chez les cellules traitées avec la calphostine c. Ce phénomène pourrait être expliqué par la large variété d'effecteurs de survie régulés par Akt contrairement à PKC. En effet, la plupart des dysfonctions cellulaires associées au cancer affectent la voie PI-3K/Akt (revue dans¹⁶²).

Une question intéressante soulevée par notre étude est la suivante : comment est-ce que le cisplatine, un agent liant l'ADN et qui est toxique pour la cellule, réussit à activer PKC et Akt2, deux molécules anti-apoptotiques, pour induire une augmentation de transcription de Bcl-2, une molécule anti-apoptotique ? La formation d'adduits covalents cisplatine-ADN entraîne l'activation de plusieurs voies cellulaires de stress qui culminent en l'activation de l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire²⁹. Cependant, certaines études ont démontré que le cisplatine peut aussi activer des voies cellulaires de survie qui, une fois activées, rend les cellules résistantes au cisplatine, dont les voies MAPK/ERK/JNK¹⁴⁶ et c-fos^{147, 148}. Également, cette augmentation de la transcription de c-fos est dépendante de l'activation de PKC par le cisplatine¹⁴⁹. D'autres études ont démontré qu'un traitement au cisplatine peut activer des isoformes de PKC, se traduisant

par une augmentation de la résistance au cisplatine^{150, 151}. En lien avec ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que le cisplatine active PKC chez les cellules cancéreuses de l'endomètre. La façon dont PKC pourrait être activée par le cisplatine demeure inconnue. Cependant, il est connu que le cisplatine peut activer la voie MAPK/JNK pour promouvoir la résistance à l'apoptose. Également, PKC et MAPK peuvent s'activer selon la situation. Il est donc possible que MAPK/JNK soit impliqué dans la régulation de PKC par le cisplatine.

P53 est muté dans environ 50% de tous les cancers, principalement dans le domaine qui se lie à l'ADN, ce qui en fait l'un des gènes les plus étudiés dans tous les cancers. Il a été suggéré que l'inactivation de P53 est un événement essentiel dans la genèse du cancer¹²². Comme la plupart des autres types de cancer, les cancers endométriaux montrent une fréquence élevée de mutations dans le gène P53¹⁵⁴. Cependant, il existe très peu d'études sur l'impact d'une mutation dans le gène P53 au niveau du cancer de l'endomètre. De plus, l'impact de chaque mutation courante sur l'affinité de P53 pour l'ADN est peu étudié. Nous avons donc voulu comparer l'expression, l'activité transcriptionnelle et la localisation d'une protéine P53 mutante avec une protéine de type sauvage et comparer l'effet de la suppression de P53 mutant dans la réponse au cisplatine avec une protéine de type sauvage. Les lignées cancéreuses HEC-1-A, KLE et RL-95 sont d'excellents modèles pour l'étude des mutations dans le gène P53 car elles possèdent une mutation ponctuelle différente dans le gène P53. La lignée HEC-1-A possède une substitution d'une arginine par une glutamine au codon 248 (R248Q) tandis que la lignée KLE possède une substitution d'une arginine par une histidine au codon 175 (R175H). La lignée RL-95 possède une délétion de l'acide aminé valine en position 218 (V218del)¹⁵⁴.

Nous avons comparé l'expression de P53 et de Mdm2 chez KLE, HEC-1-A et RL-95 avec la lignée MCF-7, un adénocarcinome du sein possédant un gène P53 intact¹⁵³. L'expression de P53 était augmentée fortement tandis que l'expression de Mdm2 était plus faible chez les lignées mutantes pour P53 en comparaison avec MCF-7.

Il a été démontré que la stabilité de P53 était augmentée lorsque son gène était muté¹²⁸. Une étude suggère qu'une expression élevée de P53 est associée à l'agressivité tumorale au niveau de l'endomètre¹⁶³. En effet, la lignée RL-95 est plus sensible à l'apoptose que HEC-1-A et KLE et possède des niveaux moins élevés de P53.

Il a été démontré qu'une mutation dans le gène P53 rendait la protéine mutante beaucoup plus stable à cause d'une liaison déficiente avec Mdm2¹²⁸. P53 était lié à Mdm2 dans tous nos modèles. Il est pratiquement impossible de comparer les niveaux de P53 liés à Mdm2 entre les types cellulaires à cause des niveaux différents de Mdm2 immunoprécipités dans chaque cas. Étant donné que P53 est lié à Mdm2 dans nos modèles, nous avons pu utiliser la Nutlin-3a, un inhibiteur de l'interaction P53-Mdm2¹²⁴, pour évaluer l'activité transcriptionnelle de P53. En effet, l'inhibition de Mdm2 stabilise la protéine P53 et entraîne une augmentation de la transcription des gènes régulés par P53 en présence d'un gène sauvage (MCF-7), ce qui suggère que la molécule est efficace dans nos conditions expérimentales. Cependant, la stabilisation de P53 est moins grande chez HEC-1-A et RL-95, voire absente chez KLE, conformément à la littérature¹²⁸. La différence de stabilisation de P53 entre les différentes lignées suggère que la mutation R175H (KLE) supprime complètement l'affinité de Mdm2 pour P53, tandis que R248Q (HEC-1-A) et V218del (RL-95) supprime partiellement cette affinité. La mutation V218del (RL-95) semble abroger complètement l'activité de P53 car la stabilisation par la Nutlin-3a n'induit aucune réponse dans l'activité génique. Cependant, la mutation R248Q (HEC-1-A) semble conserver la capacité d'induire Mdm2 et FasR, mais pas Bax dans des conditions basales.

L'inhibition de Mdm2 par la Nutlin-3a favorise l'import nucléaire de P53 sauvage (MCF-7), tel que décrit dans la littérature¹¹⁵. De plus, les mutations R175H (KLE), R248Q (HEC-1-A) et V218del (RL-95) sont associées à la localisation nucléaire de P53 au niveau basal, suggérant que Mdm2 ne module pas l'export nucléaire de ces protéines. Cependant, Mdm2 n'est pas seulement impliqué dans la régulation de P53 (revue dans¹⁶⁴) et il serait erroné de conclure seulement avec le traitement avec la Nutlin-3a. De

façon surprenante, la suppression de P53 mutant par siRNA diminue le clivage des caspases et de PARP induit par le cisplatine chez HEC-1-A et KLE, ce qui va dans le sens contraire à ce qui a été observé dans la littérature¹²⁹. Également, l'induction de Bax et de Mdm2 par le cisplatine est bloquée par la suppression de P53, ce qui suggère que les mutations R175H (KLE) et R248Q (HEC-1-A) ne réussissent pas à empêcher l'activité transcriptionnelle cisplatine-dépendante de P53. Nous suggérons que le blocage de l'induction des niveaux de Bax, une molécule pro-apoptotique⁴⁶, par le cisplatine est responsable de l'augmentation de la résistance observée suite à la suppression de P53 dans nos lignées. Toutefois, nous ne pouvons pas affirmer à ce stade si l'effet pro-apoptotique de P53 mutant dans nos conditions est dû à l'effet spécifique de chaque mutation dans le gène P53 ou à l'allèle intact restant. L'inhibition de Mdm2 et la stabilisation de P53 sauvage chez MCF-7 est également associée à une augmentation de Bax et de la cascade apoptotique mitochondriale, confirmant la validité de notre modèle.

4.2 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Les conclusions qui découlent de cette étude n'apportent pas seulement des données nouvelles mais aussi des questions importantes qu'il sera essentiel de clarifier dans le futur. Tout d'abord, nous n'avons pas évalué l'impact réel de Bcl-xL et de Mcl-1 au niveau de l'apoptose induite par le cisplatine chez les cellules cancéreuses de l'endomètre. La surexpression ou la suppression de Bcl-xL et de Mcl-1 chez les cellules Ishikawa, HEC-1-A et KLE suivi d'un traitement au cisplatine devrait nous éclairer sur l'implication de ces deux facteurs dans la réponse au cisplatine.

L'identification des isoformes de PKC impliquées dans la régulation de Bcl-2 par le cisplatine sera aussi une priorité. À cette fin, il existe une grande variété d'inhibiteurs de PKC spécifiques pour un isoforme ainsi que la technique d'ARN interférence. Donc en utilisant chacun de ces inhibiteurs ou de ces ARN interférents en combinaison avec un traitement au cisplatine chez la lignée KLE, il sera possible d'identifier l'isoforme impliquée dans la régulation de Bcl-2. Pour confirmer le résultat, il suffira de surexprimer

l'isoforme de PKC identifié chez la lignée Ishikawa. Il est probable qu'il y ait plus d'un isoforme agissant de concert pour augmenter l'expression de Bcl-2 en réponse au cisplatine. Si nous ne réussissons pas à isoler un isoforme spécifique, nous allons utiliser les inhibiteurs de PKC ou l'ARN interférant en combinaison. Les isoformes de PKC sont regroupés en 3 classes fonctionnelles (Classique, Nouvelle et Atypique) et il est probable qu'une redondance soit observée à l'intérieur d'une même classe d'isoforme. Nous allons donc utiliser les combinaisons à l'intérieur des classes fonctionnelles (Exemple : Inhibition de PKC α seul ou en combinaison avec PKC β I, qui sont deux membres de la famille Classique).

Pour valider notre modèle expérimental dans un système plus pertinent au niveau physiologique, des xénogreffes de cellules tumorales endométriales seront pratiquées *in vivo* sur des souris immunodéficientes nu/nu. Des cellules KLE, HEC-1-A et Ishikawa exprimant un vecteur-rapporteur luminescent (Luciférase) seront injectées dans les flancs des souris. Une fois la tumeur formée (après généralement deux semaines), du cisplatine en combinaison avec HA14-1, l'inhibiteur de Bcl-2, seront injectées de façon intraveineuse dans le système sanguin de l'animal. La croissance des tumeurs sera mesurée précisément à l'aide d'un appareil d'imagerie mesurant l'intensité lumineuse des tumeurs à plusieurs temps s'échelonnant sur un mois. Le signal sera quantifié et analysé afin de déterminer l'impact des traitements en fonction du temps sur la grosseur des tumeurs. Si la molécule HA14-1 est capable de diminuer de façon significative la croissance des tumeurs endométriales surexprimant Bcl-2 avec ou sans traitement au cisplatine, cela confirmera le rôle anti-apoptotique de Bcl-2 observé en culture cellulaire. Également, cela fournira possiblement une nouvelle approche clinique dans le traitement des cancer endométriaux.

À la fin de l'expérimentation, les tumeurs seront ensuite prélevées et l'ARN et les protéines seront extraits avec du TRIZol et du tampon de lyse RIPA, respectivement. L'expression de l'ARNm de Bcl-2 et de la protéine Bcl-2 sera mesurée par qRT-PCR et par immunobuvardage Western, respectivement. Nous allons vérifier si le traitement au

cisplatine augmente l'expression de l'ARNm de Bcl-2 *in vivo*. Si c'est le cas, cela va confirmer les résultats obtenus en culture cellulaire et suggérer que ce mécanisme pourrait être ciblé pour une thérapie contre les tumeurs résistantes au cisplatine.

Pour confirmer que notre modèle est pertinent au niveau de la résistance au cisplatine dans les cancers endométriaux, nous allons tenter d'obtenir des échantillons de tumeurs endométriales chez des patients suivant une thérapie de traitement au cisplatine. Nous voulons obtenir des échantillons de tumeurs avant et après le traitement au cisplatine. Les tumeurs seront classées selon leur indice de résistance au traitement de cisplatine. L'expression de l'ARNm de Bcl-2 et de la protéine Bcl-2 sera mesurée par qRT-PCR et par immunobuvardage Western, respectivement. Nous allons vérifier si le traitement au cisplatine augmente l'expression de l'ARNm de Bcl-2 *in vivo* en fonction de l'indice de résistance au cisplatine. Si c'est le cas, cela va confirmer les résultats obtenus en culture cellulaire et en xénogreffes et suggérer que ce mécanisme pourrait être ciblé pour une thérapie contre les tumeurs résistantes au cisplatine.

Pour confirmer le rôle des différentes mutations de P53 sur son activité et sur la résistance à l'apoptose, les mutants de P53 R175H, R248Q et V218del seront surexprimés chez la lignée MCF-7 (possédant un gène P53 sauvage). La réponse transcriptionnelle des gènes dépendants de l'activité de P53 sera mesurée par RT-PCR et la réponse apoptotique induite par le cisplatine sera évaluée.

4.3 CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons montré que Bcl-2 est associé à la résistance au cisplatine dans les cellules cancéreuses endométriales. Nous avons montré pour la première fois qu'une molécule intercalante utilisée en thérapie anti-cancéreuse, le cisplatine, induit une augmentation de l'expression de Bcl-2, un facteur anti-apoptotique. Nous avons décrit le mécanisme d'action du cisplatine sur l'expression de l'ARNm et de la protéine Bcl-2, c'est-à-dire par l'activation des voies de PKC et d'Akt2. De plus, nous

avons montré que PKC peut réguler l'activité d'Akt. Nous avons aussi décrit comment la modulation de PKC et d'Akt2 a un impact sur l'apoptose induite par le cisplatine dans les cellules cancéreuses de l'endomètre. Finalement, nous avons montré comment les mutations dans le gène de P53 modulent son activité pro-apoptotique.

Quel est l'impact de ces travaux pour l'amélioration des traitements anticancéreux au niveau du cancer de l'endomètre ? Le cisplatine est un agent de chimiothérapie largement utilisé pour le traitement de plusieurs cancers, incluant les cancers endométriaux. Une grande proportion de patients aura une rechute et ne répondront plus au traitement, ce qui est fatal. Il est donc primordial d'identifier des mécanismes moléculaires spécifiques qui confèrent la résistance à la chimiothérapie de ces tumeurs. Nous avons identifié un mécanisme moléculaire dans le cadre de nos travaux. En effet, en ciblant Bcl-2 directement, ou indirectement par l'inhibition des voies PKC ou Akt, nos travaux montrent qu'il est possible d'augmenter l'apoptose induite par le cisplatine en culture cellulaire. En ajoutant un traitement inhibant Bcl-2, PKC ou Akt en plus d'un traitement au cisplatine chez des patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre, nos travaux suggèrent que les tumeurs résistantes au cisplatine vont régresser suite à cette combinaison de traitements. Cependant, il faudra prouver que ces travaux ont un impact biologique en reproduisant ces résultats *in vivo* (Voir Perspectives de Recherche) pour s'assurer que ce phénomène n'était pas seulement un artefact de culture cellulaire. Aussi, il est possible que le mécanisme principal que nous suggérons (le cisplatine augmente l'expression de Bcl-2 chez les cellules résistantes) soit aussi impliqué dans la résistance au cisplatine dans d'autres types de cancer. Si c'est le cas, Bcl-2, PKC et Akt deviendraient des cibles de choix dans le traitement de cancers résistants à la chimiothérapie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tortora GJ, Grabowski SR. Le système reproducteur. In: du Renouveau Pédagogique I. Principles of Anatomy and Physiology, version française, vol. 9th. St-Laurent (Quebec), 2001:1052-69.
2. Teacher JH. NORMAL STRUCTURE OF ENDOMETRIUM AND DECIDUA AND THE MENSTRUAL CYCLE. Br.Med.J. 1930;2:896-7.
3. Ryan KJ. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. Cancer Res 1982;42:3342s-4s.
4. Lin CY, Strom A, Vega VB, Kong SL, Yeo AL, Thomsen JS, Chan WC, Doray B, Bangarusamy DK, Ramasamy A, Vergara LA, Tang S, et al. Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells. Genome Biol 2004;5:R66.
5. Harlow BL, Weiss NS, Lofton S. The epidemiology of sarcomas of the uterus. J. Natl Cancer Inst. 1986;76:399-402.
6. Nordal RR, Thoresen SO. Uterine sarcomas in Norway 1956-1992: incidence, survival and mortality. Eur J Cancer. 1997;33:907-11.
7. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. Gynecol Oncol. 1983;15:10-7.
8. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 2009;59:225-49.
9. Al-Jarrah M, Matalka I, Aseri HA, Mohtaseb A, Smirnova IV, Novikova L, Stehno-Bittel L, Alkhateeb A. Exercise training prevents endometrial hyperplasia and biomarkers for endometrial cancer in rat model of type 1 diabetes. J Clin Med Res 2010;2:207-14.
10. Fader AN, Arriba LN, Frasure HE, von Gruenigen VE. Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. Gynecol Oncol. 2009;114:121-7.
11. Tinelli A, Vergara D, Martignago R, Leo G, Malvasi A, Tinelli R. Hormonal carcinogenesis and socio-biological development factors in endometrial cancer: a clinical review. Acta Obstet Gynecol Scand. 2008;87:1101-13.

12. Furness S, Roberts H, Marjoribanks J, Lethaby A, Hickey M, Farquhar C. Hormone therapy in postmenopausal women and risk of endometrial hyperplasia. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* 2009;CD000402.

13. Vogel VG. Tamoxifen, raloxifene and tibolone decrease risk of invasive breast cancer in healthy women but increase risk of thromboembolism (tamoxifen, raloxifene), endometrial cancer (tamoxifen) or stroke (tibolone). *Evid.Based.Med.* 2010;15:122.

14. Karageorgi S, Hankinson SE, Kraft P, De VI. Reproductive factors and postmenopausal hormone use in relation to endometrial cancer risk in the Nurses' Health Study cohort 1976-2004. *Int.J.Cancer.* 2010;126:208-16.

15. Cavanagh D, Marsden DE, Ruffolo EH. Carcinoma of the endometrium. *Obstet.Gynecol.Annu.* 1984;13:211-60.:211-60.

16. Gambrell RD, Jr. Prevention of endometrial cancer with progestogens. *Maturitas.* 1986;8:159-68.

17. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Benedet JL, Heintz AP, Ngan HY, Sideri M, Pecorelli S. Carcinoma of the corpus uteri. *J.Epidemiol.Biostat.* 2001;6:47-86.

18. Mountzios G, Pectasides D, Bournakis E, Pectasides E, Bozas G, Dimopoulos MA, Papadimitriou CA. Developments in the systemic treatment of endometrial cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2010.

19. Rauh-Hain JA, Del Carmen MG. Treatment for advanced and recurrent endometrial carcinoma: combined modalities. *Oncologist.* 2010;15:852-61.

20. Masciullo V, Amadio G, Lo RD, Raimondo I, Giordano A, Scambia G. Controversies in the management of endometrial cancer. *Obstet.Gynecol.Int.* 2010;2010:638165. Epub@2010 Jun 16.:638165.

21. Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, Hu K, Shasha D. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *Oncologist.* 2002;7:492-508.

22. Chaudhry P, Asselin E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr.Relat Cancer.* 2009;16:363-80.

23. Burke TW, Walker CL. Arzoxifene as therapy for endometrial cancer. *Gynecol.Oncol.* 2003;90:S40-S6.

24. Fleming GF, Brunetto VL, Cella D, Look KY, Reid GC, Munkarah AR, Kline R, Burger RA, Goodman A, Burks RT. 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.* 2004;22:2159-66.

25. Thigpen JT, Brady MF, Homesley HD, Malfetano J, DuBeshter B, Burger RA, Liao S. Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J.Clin.Oncol.* 2004;22:3902-8.

26. Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol.Pharmacol.* 1994;45:649-56.

27. Kumar N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J.Biol.Chem.* 1981;256:10435-41.

28. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat.Rev.Cancer.* 2007;7:573-84.

29. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22:7265-79.

30. Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem.Biodivers.* 2010;7:543-66.

31. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2008;9:231-41.

32. Desoize B, Sen S. [Apoptosis or programmed cell death: concepts, mechanisms and contribution in oncology]. *Bull.Cancer.* 1992;79:413-25.

33. Guchelaar HJ, Vermes A, Vermes I, Haanen C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm.World Sci.* 1997;19:119-25.

34. Popov SG, Villasmil R, Bernardi J, Grene E, Cardwell J, Wu A, Alibek D, Bailey C, Alibek K. Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2002;293:349-55.

35. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int.Rev.Cytol.* 1980;68:251-306.:251-306.

36. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94:481-90.

37. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003;22:8543-67.
38. Pradelli LA, Beneteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol.Life Sci*. 2010;67:1589-97.
39. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412:95-9.
40. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239-52.
41. 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.
42. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J.Exp.Med*. 1996;184:1331-41.
43. Kuhar M, Sen S, Singh N. Role of mitochondria in quercetin-enhanced chemotherapeutic response in human non-small cell lung carcinoma H-520 cells. *Anticancer Res* 2006;26:1297-303.
44. Jin C, Reed JC. Yeast and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:453-9.
45. Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, Saikumar P. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J.Biol.Chem*. 2003;278:5367-76.
46. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*. 1998;17:3878-85.
47. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008;27:6398-406.
48. Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, Falda M, Giovanazzo B, Emanuel BS, Rovera G, Nowell PC, Croce CM. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 1984;81:7166-70.

49. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 1993;74:597-608.

50. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. *MCL1*, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to *BCL2*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1993;90:3516-20.

51. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic *Bak* is sequestered by *Mcl-1* and *Bcl-xL*, but not *Bcl-2*, until displaced by *BH3*-only proteins. *Genes Dev.* 2005;19:1294-305.

52. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. *Bcl-2* heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, *Bax*, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74:609-19.

53. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. *BCL-2*, *BCL-X(L)* sequester *BH3* domain-only molecules preventing *BAX*- and *BAK*-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol.Cell*. 2001;8:705-11.

54. Kang MH, Reynolds CP. *Bcl-2* inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1126-32.

55. Debatin KM, Poncet D, Kroemer G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*. 2002;21:8786-803.

56. Reed JC. *Bcl-2*-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*. 2008;111:3322-30.

57. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, Fillet G, Salles G, Marolleau JP, Diebold J, Reyas F, Gaulard P. Prognostic significance of *bcl-2* protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 1996;87:265-72.

58. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC. Immunohistochemical analysis of *bcl-2*, *bax*, *bcl-X*, and *mcl-1* expression in prostate cancers. *Am.J.Pathol.* 1996;148:1567-76.

59. Eliopoulos AG, Kerr DJ, Herod J, Hodgkins L, Krajewski S, Reed JC, Young LS. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of *p53* and *Bcl-2*. *Oncogene*. 1995;11:1217-28.

60. Brotin E, Meryet-Figuier M, Simonin K, Duval RE, Villedieu M, Leroy-Dudal J, Saison-Behmoaras E, Gauduchon P, Denoyelle C, Poulain L. *Bcl-XL* and *MCL-1* constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int.J.Cancer*. 2010;126:885-95.

61. Kutuk O, Arisan ED, Tezil T, Shoshan MC, Basaga H. Cisplatin overcomes Bcl-2-mediated resistance to apoptosis via preferential engagement of Bak: critical role of Noxa-mediated lipid peroxidation. *Carcinogenesis*. 2009;30:1517-27.
62. Arisan ED, Kutuk O, Tezil T, Bodur C, Telci D, Basaga H. Small inhibitor of Bcl-2, HA14-1, selectively enhanced the apoptotic effect of cisplatin by modulating Bcl-2 family members in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* 2010;119:271-81.
63. Bozdogan O, Atasoy P, Erekul S, Bozdogan N, Bayram M. Apoptosis-related proteins and steroid hormone receptors in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 2002;21:375-82.
64. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S, Yamoto M. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Hum.Reprod.* 2001;16:2211-8.
65. Mitselou A, Ioachim E, Kitsou E, Vougiouklakis T, Zagorianakou N, Makrydimas G, Stefanaki S, Agnantis NJ. Immunohistochemical study of apoptosis-related Bcl-2 protein and its correlation with proliferation indices (Ki67, PCNA), tumor suppressor genes (p53, pRb), the oncogene c-erbB-2, sex steroid hormone receptors and other clinicopathological features, in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *In Vivo*. 2003;17:469-77.
66. Ioffe OB, Papadimitriou JC, Drachenberg CB. Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. *Hum.Pathol.* 1998;29:1150-9.
67. Chhieng DC, Ross JS, Ambros RA. bcl-2 expression and the development of endometrial carcinoma. *Mod.Pathol.* 1996;9:402-6.
68. Saegusa M, Kamata Y, Isono M, Okayasu I. Bcl-2 expression is correlated with a low apoptotic index and associated with progesterone receptor immunoreactivity in endometrial carcinomas. *J.Pathol.* 1996;180:275-82.
69. Crescenzi E, Palumbo G. Bcl-2 exerts a pRb-mediated cell cycle inhibitory function in HEC1B endometrial carcinoma cells. *Gynecol.Oncol.* 2001;81:184-92.
70. Adhikari D, Feroz F, Liefshitz A, Barakat RR, Bertino JR, Banerjee D. Pretreatment of endometrial carcinoma cell lines with butyrate results in upregulation of Bax and correlates with potentiation of radiation induced cell kill. *In Vivo*. 2000;14:603-9.

71. Crescenzi E, Criniti V, Pianese M, Tecce MF, Palumbo G. Differential expression of antiapoptotic genes in human endometrial carcinoma: bcl-XL succeeds bcl-2 function in neoplastic cells. *Gynecol.Oncol.* 2000;77:419-28.
72. Villar J, Quadri HS, Song I, Tomita Y, Tirado OM, Notario V. PCPH/ENTPD5 expression confers to prostate cancer cells resistance against cisplatin-induced apoptosis through protein kinase Calpha-mediated Bcl-2 stabilization. *Cancer Res.* 2009;69:102-10.
73. Itano Y, Ito A, Uehara T, Nomura Y. Regulation of Bcl-2 protein expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: positive and negative effects of protein kinases C and A, respectively. *J.Neurochem.* 1996;67:131-7.
74. Pugazhenti S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J.Biol.Chem.* 2000;275:10761-6.
75. Horbinski C, Chu CT. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic.Biol.Med.* 2005;38:2-11.
76. Deng X, Ruvolo P, Carr B, May WS, Jr. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2000;97:1578-83.
77. Shankar E, Krishnamurthy S, Paranandi R, Basu A. PKCepsilon induces Bcl-2 by activating CREB. *Int.J.Oncol.* 2010;36:883-8.
78. Del BB, Valentini MA, Zunino F, Comporti M, Maellaro E. Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene.* 2001;20:4591-5.
79. Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* 1998;332:281-92.
80. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* 2000;19:496-503.
81. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 1984;308:693-8.
82. Basu A, Lu D, Sun B, Moor AN, Akkaraju GR, Huang J. Proteolytic activation of protein kinase C-epsilon by caspase-mediated processing and transduction of antiapoptotic signals. *J.Biol.Chem.* 2002;277:41850-6.

83. Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, Ghayur T, Wong WW, Kamen R, Weichselbaum R. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.* 1995;14:6148-56.
84. Reyland ME. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci.* 2009;14:2386-99.:2386-99.
85. Haughian JM, Reno EM, Thorne AM, Bradford AP. Protein kinase C alpha-dependent signaling mediates endometrial cancer cell growth and tumorigenesis. *Int.J.Cancer.* 2009;125:2556-64.
86. Pavlick AC, Wu J, Roberts J, Rosenthal MA, Hamilton A, Wadler S, Farrell K, Carr M, Fry D, Murgo AJ, Oratz R, Hochster H, et al. Phase I study of bryostatin 1, a protein kinase C modulator, preceding cisplatin in patients with refractory non-hematologic tumors. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 2009;64:803-10.
87. Chiarini A, Whitfield JF, Pacchiana R, Marconi M, Armato U, Dal PI. Calphostin C, a remarkable multimodal photodynamic killer of neoplastic cells by selective nuclear lamin B1 destruction and apoptogenesis (Review). *Oncol.Rep.* 2010;23:887-92.
88. Datta R, Kojima H, Yoshida K, Kufe D. Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J.Biol.Chem.* 1997;272:20317-20.
89. Wang S, Vrana JA, Bartimole TM, Freermerman AJ, Jarvis WD, Kramer LB, Krystal G, Dent P, Grant S. Agents that down-regulate or inhibit protein kinase C circumvent resistance to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis in human leukemia cells that overexpress Bcl-2. *Mol.Pharmacol.* 1997;52:1000-9.
90. Martin V, Garcia-Santos G, Rodriguez-Blanco J, Casado-Zapico S, Sanchez-Sanchez A, Antolin I, Medina M, Rodriguez C. Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death. *Cancer Lett.* 2010;287:216-23.
91. Sakai Y, Goodison S, Cao W, Urquidi V, Namiki K, Porvasnik S, Urbanek C, Rosser CJ. VEGF induces expression of Bcl-2 and multiple signaling factors in microvascular endothelial cells in a prostate cancer model. *World J.Urol.* 2009;27:659-66.
92. Coffey PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur.J.Biochem.* 1991;201:475-81.
93. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1991;88:4171-5.

94. Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem.J.* 1998;331:299-308.
95. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999;13:2905-27.
96. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J.Cell Mol.Med.* 2005;9:59-71.
97. Kim D, Chung J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J.Biochem.Mol.Biol.* 2002;35:106-15.
98. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501.
99. Van Themsche C, Leblanc V, Parent S, Asselin E. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. *J Biol Chem* 2009;284:20462-6.
100. Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, Roth RA. Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999;257:906-10.
101. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992;89:9267-71.
102. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J.Biol.Chem.* 2001;276:38349-52.
103. 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.
104. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, III, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 2001;292:1728-31.
105. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de JR, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A, et al. Role for

Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol.Cell Biol.* 2005;25:1869-78.

106. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996;93:3636-41.

107. Miwa W, Yasuda J, Murakami Y, Yashima K, Sugano K, Sekine T, Kono A, Egawa S, Yamaguchi K, Hayashizaki Y, Sekiya T. Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-q13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1996;225:968-74.

108. Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* 2005;20:539-50.

109. Maroulakou IG, Oemler W, Naber SP, Tsichlis PN. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res* 2007;67:167-77.

110. 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.

111. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88:323-31.

112. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 1991;51:6304-11.

113. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature.* 1993;362:847-9.

114. Zauli G, di Iasio MG, Secchiero P, Dal BM, Marconi D, Bomben R, Del PG, Gattei V. Exposure of B cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells to nutlin-3 induces a characteristic gene expression profile, which correlates with nutlin-3-mediated cytotoxicity. *Curr.Cancer Drug Targets.* 2009;9:510-8.

115. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 1997;420:25-7.

116. Brooks CL, Gu W. Dynamics in the p53-Mdm2 ubiquitination pathway. *Cell Cycle.* 2004;3:895-9.

117. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* 2001;1:68-76.

118. Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:164-71.

119. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.* 2001;268:2764-72.

120. Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia.* 2000;2:208-25.

121. Thompson T, Tovar C, Yang H, Carvajal D, Vu BT, Xu Q, Wahl GM, Heimbrook DC, Vassilev LT. Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279:53015-22.

122. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991;253:49-53.

123. Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, Zhang J, Mills N, Fuller C, Teunisse A, Lam S, Ramos Y, Mohan A, Johnson D, Wilson M, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature.* 2006;444:61-6.

124. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science.* 2004;303:844-8.

125. Kihana T, Hamada K, Inoue Y, Yano N, Iketani H, Murao S, Ukita M, Matsuura S. Mutation and allelic loss of the p53 gene in endometrial carcinoma. Incidence and outcome in 92 surgical patients. *Cancer.* 1995;76:72-8.

126. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* 2000;60:6788-93.

127. Bennett WP, Hollstein MC, Hsu IC, Sidransky D, Lane DP, Vogelstein B, Harris CC. Mutational spectra and immunohistochemical analyses of p53 in human cancers. *Chest.* 1992;101:19S-20S.

128. Lukashchuk N, Vousden KH. Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol Cell Biol.* 2007;27:8284-95.

129. Chan KT, Lung ML. Mutant p53 expression enhances drug resistance in a hepatocellular carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53:519-26.

130. Strano S, Dell'Orso S, Mongiovi AM, Monti O, Lapi E, Di AS, Fontemaggi G, Blandino G. Mutant p53 proteins: between loss and gain of function. *Head Neck*. 2007;29:488-96.
131. Strano S, Dell'Orso S, Di AS, Fontemaggi G, Sacchi A, Blandino G. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene*. 2007;26:2212-9.
132. Cuddihy AR, Jalali F, Coackley C, Bristow RG. WTp53 induction does not override MTP53 chemoresistance and radioresistance due to gain-of-function in lung cancer cells. *Mol.Cancer Ther*. 2008;7:980-92.
133. 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* 2011.
134. Vermorken JB, Hoekman K. Chemotherapy for gynecologic malignancies. *Curr.Opin.Oncol*. 1995;7:457-65.
135. Wang JL, Liu D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, Croce CM, Alnemri ES, Huang Z. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 2000;97:7124-9.
136. Yang L, Qiao G, Ying H, Zhang J, Yin F. TCR-induced Akt serine 473 phosphorylation is regulated by protein kinase C-alpha. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 2010.
137. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999;9:601-4.
138. Venkatraman M, Anto RJ, Nair A, Varghese M, Karunagaran D. Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Mol.Carcinog*. 2005;44:51-9.
139. 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.
140. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91:231-41.
141. Van Themsche C, Lafontaine L, Asselin E. X-linked inhibitor of apoptosis protein levels and protein kinase C activity regulate the sensitivity of human endometrial

carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Endocrinology*. 2008;149:3789-98.

142. Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, May WS. A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J.Biol.Chem*. 1998;273:25436-42.

143. Reno EM, Haughian JM, Dimitrova IK, Jackson TA, Shroyer KR, Bradford AP. Analysis of protein kinase C delta (PKC delta) expression in endometrial tumors. *Hum.Pathol*. 2008;39:21-9.

144. Haughian JM, Jackson TA, Koterwas DM, Bradford AP. Endometrial cancer cell survival and apoptosis is regulated by protein kinase C alpha and delta. *Endocr.Relat Cancer*. 2006;13:1251-67.

145. Pan Q, Bao LW, Kleer CG, Sabel MS, Griffith KA, Teknos TN, Merajver SD. Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. *Cancer Res*. 2005;65:8366-71.

146. Dent P, Grant S. Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action. *Clin.Cancer Res*. 2001;7:775-83.

147. Hollander MC, Fornace AJ, Jr. Induction of fos RNA by DNA-damaging agents. *Cancer Res*. 1989;49:1687-92.

148. Moorehead RA, Singh G. Influence of the proto-oncogene c-fos on cisplatin sensitivity. *Biochem.Pharmacol*. 2000;59:337-45.

149. Muscella A, Urso L, Calabriso N, Vetrugno C, Rochira A, Storelli C, Marsigliante S. Anti-apoptotic effects of protein kinase C-delta and c-fos in cisplatin-treated thyroid cells. *Br.J.Pharmacol*. 2009;156:751-63.

150. Muscella A, Urso L, Calabriso N, Ciccarese A, Migoni D, Fanizzi FP, Di JB, Storelli C, Marsigliante S. Differential response of normal, dedifferentiated and transformed thyroid cell lines to cisplatin treatment. *Biochem.Pharmacol*. 2005;71:50-60.

151. Urso L, Muscella A, Calabriso N, Ciccarese A, Fanizzi FP, Migoni D, Di JB, Storelli C, Marsigliante S. Differential functions of PKC-delta and PKC-zeta in cisplatin response of normal and transformed thyroid cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 2005;337:297-305.

152. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol.Cell Biol.* 1999;19:8469-78.

153. Wasielewski M, Elstrodt F, Klijn JG, Berns EM, Schutte M. Thirteen new p53 gene mutants identified among 41 human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.Treat.* 2006;99:97-101.

154. Yaginuma Y, Westphal H. Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1991;51:6506-9.

155. Cao Y, Gao Q, Wazer DE, Band V. Abrogation of wild-type p53-mediated transactivation is insufficient for mutant p53-induced immortalization of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1997;57:5584-9.

156. Henkels KM, Turchi JJ. Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 1999;59:3077-83.

157. Salvesen GS, Renatus M. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev.Cell.* 2002;2:256-7.

158. Li X, Wang X. Application of real-time polymerase chain reaction for the quantitation of interleukin-1beta mRNA upregulation in brain ischemic tolerance. *Brain Res.Brain Res.Protoc.* 2000;5:211-7.

159. Lu D, Huang J, Basu A. Protein kinase Cepsilon activates protein kinase B/Akt via DNA-PK to protect against tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J.Biol.Chem.* 2006;281:22799-807.

160. Li L, Sampat K, Hu N, Zakari J, Yuspa SH. Protein kinase C negatively regulates Akt activity and modifies UVC-induced apoptosis in mouse keratinocytes. *J.Biol.Chem.* 2006;281:3237-43.

161. Lu D, Huang J, Basu A. Dereglulation of PKB influences antiapoptotic signaling by PKC in breast cancer cells. *Int.J.Oncol.* 2004;25:671-6.

162. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat.Rev.Cancer.* 2006;6:184-92.

163. Yamazawa K, Shimada H, Hirai M, Hirashiki K, Ochiai T, Ishikura H, Shozu M, Isaka K. Serum p53 antibody as a diagnostic marker of high-risk endometrial cancer. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 2007;197:505-7.

164. Manfredi JJ. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev.* 2010;24:1580-9.